Izolacija vrsta roda Phytophthora iz tla indirektnom metodom

Hegol, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:571019

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

ŠUMARSTVO, UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

MARIJA HEGOL

IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ TLA INDIREKTNOM METODOM

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŠUMARSKI ODSJEK

IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ TLA INDIREKTNOM METODOM

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Šumarstvo, Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim gospodarenjem

Predmet: Integrirana zaštita šuma

Ispitno povjerenstvo:

1. prof.dr.sc. Danko Diminić
2. prof.dr.sc. Boris Hrašovec
3. Jelena Kranjec, mag.ing.silv

Student: Marija Hegol

JMBAG: 0068216086

Broj indexa: 551/14

Datum odobrenja teme: 11.4.2016.

Datum predaje rada: 16.9.2016.

Datum obrane rada: 23.9.2016.

Zagreb, rujan, 2016

Dokumentacijska kartica

Naslov	**IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophtora* IZ TLA INDIREKTNOM METODOM**
Title	**Isolation of *Phytophthora* from the soil by indirect method**
Autor	Marija Hegol
Adresa autora	Vinogradska 11, 10312 Kloštar Ivanić
Rad izrađen	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Prof. dr. sc. Danko Diminić
Izradu rada pomogao	Jelena Kranjec, mag.ing.silv.
Godina objave	2016.
Obujam	Stranica 37, slika 23, tablica 9
Ključne riječi	*Phytophthora,* izolacija iz tla, Pocket Diagnostic
Keywords	*Phytophthora,* isolation from soil, Pocket Diagnostic
Sažetak	Vrste roda *Phytophthora,* koje se nalaze među najdestruktivnijim patogenima polj.kultura i šuma u svijetu, u posljednje vrijeme predstavljaju sve veću prijetnju šumskom drveću i prirodnim ekosustavima europskih država. Većina vrsta živi u tlu te se putem tla i prenose. Iz tog ih je medija vrlo teško izolirati direktnim metodama, zbog čega se pri njihovom istraživanju najčešće koristi indirektna metoda koja uključuje postavljanje svježih mamaca (listova) na vodom potopljeno tlo. U ovom će se radu istraživati uspješnost opisane metode te pridolazak vrsta roda *Phytophthora* u uzorcima tla sakupljenog u sastojinama poljskog jasena s problemom sušenja, pri čemu će se kao mamci koristiti juvenilni listovi listopadnih vrsta drveća te razvijeni listovi vrsta roda *Rhododendron.* Pomoću dobivenih podataka će biti moguće odrediti ulogu vrsta roda *Phytophthora* u rastućem problemu odumiranja poljskog jasena u Hrvatskoj

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. SISTEMATSKA PRIPADNOST ... 2
1.1.1. RAZLIKE IZMEĐU RODOVA *Pythium* i *Phytophthora* ... 2
1.2. BIOLOGIJA ... 3
1.3. PATOGENOST ... 4
1.4. SIMPTOMI NA ZARAŽENIM BILJKAMA ... 5
1.5. VRSTE RODA *Phytophthora* POTVRĐENE NA ŠUMSKOM DRVEĆU U HRVATSKOJ ... 8
1.6. METODE ISTRAŽIVANJA ... 11
1.6.1. IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ ZARAŽENOG BILJNOG TKIVA ... 11
1.6.2. IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ TLA ... 13
1.7. INKUBACIJA ... 14
1.8. SKLADIŠTENJE ... 14
1.9. IDENTIFIKACIJA ... 14
1.10. INOKULACIJA ... 15
2. MATERIJALI I METODE ... 16
2.1. UZORKOVANJE TLA NA TERENU I POSTAVLJANJE MAMACA ... 17
2.2. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA STABALA ... 19
2.3. POCKET DIAGNOSTICS ... 21
2.4. IZOLACIJA IZ LIŠĆA ... 22
2.4.1. KUHANJE HRANJIVE PODLOGE ... 23
2.5. INDUKCIJA SPORANGIJA ... 24
3. REZULTATI ... 25
3.1. GJ ČRNOVŠČAK, DUGO SELO ... 25
3.1.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA STABALA ... 25
3.1.2. POCKET DIAGNOSTIC ... 25
3.2. GJ JOSIP KOZARAC, LIPOVLJANI ... 26
3.2.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA ... 26
3.2.2. POCKET DIAGNOSTIC ... 27
3.2.3. IZOLACIJA IZ LIŠĆA I INDUKCIJA SPORANGIJA ... 27
3.3. GOSPODARSKA JEDINICA TRSTIKA, NOVSKA ... 31
3.3.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA ... 31
3.3.2. POCKET DIAGNOSTIC ... 32
3.3.3. IZOLACIJA IZ LIŠĆA I INDUKCIJA SPORANGIJA ... 32
4. RASPRAVA I ZAKLJUČAK ... 35
LITERATURA ... 38

POPIS SLIKA

Slika 1. Simptomi na vrhu lista rododendrona zaraženog vrstom *P. ramorum*

Slika 2. Simptomi na izbojku

Slika 3. Simptomi na peteljci

Slika 4. Simptomi na listu

Slika 5. Tekline na kori bukve

Slika 6. Nekroze u unutarnjoj kori bukve

Slika 7 . Uzimanje uzoraka tla na terenu

Slika 8. Postavljanje mamaca

Slika 9. Procjena osutosti krošnje stabla

Slika 10. Pocket Diagnostic

Slika 11. Pocket Diagnostic- prikaz plave T i C linije

Slika 12. Komadići lista postavljeni na PDA hranjive podloge

Slika 13. Indukcija sporangija

Slika 14. Pocket Diagnostic testeri, GJ Črnovščak

Slika 15. Pocket Diagnostic testeri, GJ J.Kozarac

Slika 16. Bijeli micelij dobiven izolacijom iz lišća

Slika 17. Neseptirane hife

Slika 18. Septirane hife uz prisustvo različitih tvorbi

Slika 19. Prikaz tvorbi koje nalikuju na sporangije vrste roda *Phytophthora*

Slika 20. Pocket Diagnostic testeri, GJ Trstika

Slika 21. Septirane hife

Slika 22. Neseptirane hife

Slika 23. Prikaz tvorbi koje nalikuju na sporangij vrste roda *Phytophthora*, GJ Trstika

POPIS TABLICA

Tablica 1. Osnovni podaci o strukturi sastojine za odsjek 16g

Tablica 2. Osnovni podaci o strukturi sastojine za odsjek 71d

Tablica 3. Kategorija osutosti korištena u istraživanju

Tablica 4. Rezultati procjene osutosti krošnje stabala poljskoj jasena, GJ Črnovščak

Tablica 5. Rezultati procjene osutosti krošnje stabala poljskog jasena, GJ J. Kozarac

Tablica 6. Rezultati izolacije iz lišća, GJ J. Kozarac

Tablica 7. Rezultati procjene osutosti krošnje stabala poljskog jasena, GJ Trstika

Tablica 8. Rezultati Izolacije iz lišća, GJ Trstika

Tablica 9. Prikaz sveukupnih rezultata

1. UVOD

Vrste iz roda *Phytophthora* primarni su paraziti finog korijenja i kore biljaka te uzročnici truleži čitavog korijenovog sustava. Vrste iz ovog roda poznati su patogeni bilja u agronomiji, arborikulturi i šumarstvu. Iako ih mnogi ubrajaju u gljive (*Eumycota*) i tradicionalno ih istražuju mikolozi, *Phytophthora* vrste spadaju u koljeno *Oomycota*, pseudogljive filogenetski bliže algama (Županić 2013), čije su hife neseptirane, u građi stanične stijenke prevladava celuloza, dok kod gljiva hitin, diploidna faza dominira nad haploidnom, a za infekciju i razmnožavanje produciraju pokretne zoospore.

Danas je poznat velik broj vrsta iz roda *Phytophthora* koje parazitiraju stotinjak različitih vrsta drvenastog bilja, pa se posljednjih 20-tak godina ubrajaju u značajnije uzročnike biljnih bolesti i u šumarstvu. Dosadašnja istraživanja pokazuju povezanost odumiranja korijenja, uzrokovanih napadima *Phytophthora* vrsta i klimatskih ekstrema. Ta veza je ključna, jer kada su klimatski čimbenici nepovoljni po domaćina, dolazi do sinergističkog učinka dodatnih negativnih čimbenika, pri čemu šume propadaju (Županić 2013).

Podrijetlo roda *Phytophthora* usko je povezano s onim što je danas poznato kao „Irish Potato Famine“. Iako se vjerovalo da je bolest krumpira prvi put zabilježena na području Irske, prvi slučajevi zabilježeni su na području Sjeverne Amerike 1843-1845. U Irskoj je prvi uništenje krumpira istraživao David Moore, koji je smatrao da je potencijalni krivac bolesti gljiva. Potvrdu da je upravo riječ o gljivi tražio je od amaterskog mikologa Berkeleya. Iako se slagao sa njim, svoje otkriće o gljivama nerado je objavljivao, jer je gljiva kao biljni parazit do tada bila nepoznanica, a između ostalog, u to vrijeme smatralo se da gljive, odnosno mikroorganizmi mogu inficirati biljku tek nakon što je počela odumirati, a nikad nisu uzrokom njezina odumiranja.

U međuvremenu je njegova objava da je uzrok bolesti gljiva iz roda *Botrytis* dočekana skeptično od strane znanstvenika koji su se držali ne-gljivične teorije, no s vremenom je prihvaćena te je u razdoblju od 1845-1876 bolest opisana kao *Botrytis infestans*. Tek dva stoljeća kasnije, Anton de Bary, poznati njemački mikolog, donosi službeni naziv *Phytophthora infestans* koji je zamijenio prijašnji koji je preložio Montagne, te *Peronospora* koji je predložio Unger.

Riječ *Phytophthora* izvedena je od grčke riječi φυτόν (phyton) „biljka“, te φθορά (phthora) „uništenje“. U narednim godinama dolazi do promjene imena, što je posljedica razvoja znanosti o biljnoj patologiji (Ribeiro 1978).

1.1. SISTEMATSKA PRIPADNOST

Taksonomska pozicija:
Carstvo *Chromalveolata*

Odjel *Heterokontophyta* (*Stramenopiles*)

Razred *Oomycetes*

Red *Peronosporales*

Porodica *Pythiaceae*

Rod *Phytophthora*

Vrste roda *Phytophthora* pripadaju redu *Peronosporales*, unutar razreda *Oomycetes* koji obuhvaća četiri reda, od kojih dva *Peronosporales* i *Saprolegniales* obuhvaćaju važne biljne patogene. Red *Personosporales* obuhvaća porodicu *Pythiaceae* unutar koje se nalaze dva srodna roda *Phytophthora* i *Pythium* (Drenth i Sendall 2001). Rod *Phytophthora* sadrži oko 60 vrsta biljnih patogena od kojih neki devastiraju cijeli prirodni ekosustav, dok su neki odgovorni za epidemije.

1.1.1. RAZLIKE IZMEĐU RODOVA *Pythium* i *Phytophthora*

Pythium i *Phytophthora* dva su srodna roda, a kao razlike Drenth i Sendall (2001) navode:

- Proizvodnja zoospora – kod roda *Phytophthora*, zoospore se proizvode unutar sporangija, a kod roda *Pythium* zoospore se proizvode u „mjehuriću“ (vezikula,) kojeg razvija sporangij.
- Razlike u sporangijima – za razliku od vrsta roda *Phytophthora*, kod kojih je sporangij uvijek terminalan i najčešće jajastog ili obrnuto kruškolikog oblika, kod vrsta roda *Pythium* sporangiji mogu biti sferični, s režnjevima ili ulančani a često se nalaze na sredini hifa (nisu terminalni)
- Razlike u anteridijima – kod roda *Pythium* anteridiji su paraginijski (ne okružuju stapku oogonija) te mogu biti vezani na oogonij na bilo kojem mjestu, dok je kod roda

Phytophthora anteridij povezan sa oogonijem samo na donjem dijelu, s tim da kod vrsta roda *Pythium* više anteridija može biti vezano za jedan oogonij.

1.2. BIOLOGIJA

Razmnožavanje ovih organizama obavlja se na dva načina ovisno o vanjskim uvjetima. Ukoliko su vanjski uvjeti povoljni i ima dovoljno vode za širenje iz mikroskopskih plodnih tijela ispuštaju se zoospore, koje se pomoću bičeva mogu kretati kroz vodu na kraćim udaljenostima i širiti infekciju. Ukoliko su vanjski uvjeti nepovoljni te nedostaje vode stvaraju se hlamidospore s debelom staničnom stjenkom koja sadrži znatne količine hranjivih tvari pa zahvaljujući tome može izdržati nepovoljne vanjske uvjete i ostati na životu dugo vremena (Županić 2013), a neke se vrste u takovim uvjetima šire otpuštanjem čitavih sporangija koje raznosi vjetar na kraće udaljenosti.

Životni ciklus uključuje produkciju nespolnih i spolnih spora, gdje diploidni vegetativni micelij producira nespolne sporangije, koji mogu direktno klijati ili diferencirati te proizvoditi zoospore, koje se šire na domaćine te cistiraju prije inficiranja (Drenth i Sendall 2001). Spore vrsta roda *Phytophthora* mogu u tlu preživjeti više godina, čekajući optimalne uvjete za klijanje (visoka vlaga, temperatura viša od 10 °C). Klijanjem se formiraju zoosporangiji iz kojih izlaze zoospore (nespolno razmnožavanje), koje se aktivno, kemotaktički kreću prema finom korijenju (Pernek i dr. 2011) te kada zoospore dospiju na mjesto pogodno za infekciju, odbacuju svoj bič, te cistiraju, odnosno stvaraju ciste, nepokretnu privremenu strukturu iz koje se razvijaju hife kojom se domaćin inficira, s tim da se hife šire u svim smjerovima. Nakon što iscrpe hranjiva, formiraju trajne spore koje raspadanjem drvnog materijala ponovno ulaze u tlo i ciklus se ponavlja. Bolest se obično razvija duži niz godina, ali ga čimbenici poput pojačane vlažnosti tla (plavljenje, jake kiše, stajaća voda) značajno ubrzavaju. Većina vrsta iz roda *Phytophthora* žive i prenose se preko vode u tlu, a samo je mali udio vrsta koje se prenose zrakom. Glede specifičnog životnog ciklusa *Phytophthora* spp. koji se odvija u tlu, velika je vjerojatnost da se bolest ne prepozna, odnosno da se naseljavanjem sekundarnih patogena krivo determinira uzročnik odumiranja stabla (Pernek i dr. 2011).

Spolno razmnožavanje odvija se oogamijom. U tom spolnom procesu spajaju se dvije stanice koje su različite po veličini i obliku. Ženska jajna stanica je okrugla, nepokretna, veća od muške i smještena u oogoniju. Muška stanica je anteridij. Oplodnja teče slijevanjem sadržaja anteridija u jajnu stanicu. Nakon oplodnje razvija se oospora (Glavaš 1996).

Razlikuju se homotalične (samooplodnja) i heterotalične vrste (za oplodnju potreban suprotan reproduktivni tip - mating type). Dok se homotalične vrste mogu samostalno spolno reproducirati, heterotalične vrste imaju mogućnost križanja sa suprotnim reproduktivnim tipovima drugih vrsta te stvaranja hibrida (Ko 1978). Tako se formiranje oospora kod vrste *Phytophthora ramorum* događa isključivo sparivanjem A1 i A2 reproduktivnih tipova (mating type), budući da je *P.ramorum* heterotalična vrsta (nema samoplodnje). Gotovo svi europski izolati su A1 tipa (osim nekoliko belgijskih), za razliku od američkih, kod kojih je velika većina A2 tipa. S tim da za sparivanje može dobro poslužiti A2 tip *Phytophthora* (Tomić i Vukadin 2011).

1.3. PATOGENOST

Zadnjih nekoliko godina vrste roda *Phytophthora* predstavljaju poprilično prijetnju šumskom drveću i prirodnim ekosustavima europskih država. Smatra se da njihovom širenju pogoduje slaba kontrola transporta (uvoza/izvoza) sadnica, te da su izvori širenja upravo rasadnici (Brasier i Jung 2006).

Osim toga njihovo napredovanje se povezuje i s klimatskim ekstremima, koji bi im mogli pogodovati u smislu povećanja vlage, ali i fiziološkog slabljenja biljaka (izmjena sušnih i vlažnih ekstrema) (Pernek i dr. 2011).

Jung i dr. (1996) napominju kako su blage zime te povećana depozicija dušika posljednjih godina zasigurno imali utjecaj na širenje i aktivnost roda *Phytophthora* u tlu. Naime, povećani unos dušika u šumska tla (Nihlgard 1985, Thomas i Kiehne 1995) utječe na smanjenje mikorize (Zare-Maivan 1983), koja je poznata kao učinkovita mehanička i biokemijska barijera protiv infekcije vrsta roda *Phytophthora* (Zak 1964). Učinak dušika na bolesti uzrokovane vrstama roda *Phytophthora* varira ovisno o odnosu patogena i domaćina te obliku dušika (Huber i Watson 1974), s tim da postoje i primjeri gdje je dušik utjecao na smanjenje bolesti uzrokovanih vrstama roda *Phytophthora* (Schmmithenner i Canaday 1983).

Neke vrste roda *Phytophthora* su koevoluirale zajedno s biljkom domaćinom, te u normalnim životnim uvjetima, bez stresnih čimbenika (za domaćina) egzistiraju u ravnoteži, a kritičan faktor u preživljavanju domaćina predstavljaju samo ako je isti izložen određenom stresu koji uzrokuje fiziološko slabljenje. U tom slučaju se njihovim djelovanjem domaćin može predispozirati na napad drugih štetnih organizama. Ostale vrste roda *Phytophthora* mogu biti introducirane vrste koje mogu izazvati akutnije štete (Brasier 1999).

1.4. SIMPTOMI NA ZARAŽENIM BILJKAMA

Vrste iz roda *Phytophthora* stvaraju toksine zbog čega dolazi do odumiranja korijena i kore (Županić 2013). Zajednička značajka mnogih različitih patogena kod bilja je izlučivanje raznih vrsta izvanstaničnih efektornih molekula u apoplast bilja koji, pretpostavlja se, prevodi infekciju u biljku domaćina. Mnogi od tih proteina, zvanih elikatori, izazivaju obrambenih sustav (obrambenu reakciju), i u principu formiraju programiranu smrt zvanu hipersenzitivni odgovor. U većini slučajeva, obrambeni odgovor pogoduje biljci jer je pokrenut detekcijom elikatora od strane obrambenih receptora biljke. U nekim slučajevima, izmamljivanje tih odgovora dovodi do infekcije jer patogen može napredovati na umirujućem biljnom tkivu. Vrste roda *Phytophthora* posvuda izlučuju jedinstvenu vrstu visoko očuvanih efektornih molekula zvanih eliktin. Oni su vrlo rašireni unutar vrsta roda *Phytophthora* i bliski su srodnici vrste *Phytium*, ali su odsutni u svim drugim organizmima proučavanim do daljnjeg. Stoga, razumljivo je da bi mogli biti odgovorni za nove mehanizme interakcije s biljkama (Jiang i dr 2005).

Posljedice su tipični simptomi napada: tekline iz debla, prorijeđenost krošnje, povećanje udjela mrtvih grana, izostajanje postranih izbojaka, te formiranje bičastog oblika grane. Nakon toga list se smanji, pojedini dijelovi krošnje se suše, fotosinteza se značajno smanjuje, a vitalitet domaćina naglo opada. U konačnici dolazi do propadanja čitave krošnje odnosno do odumiranja stabla (Županić 2013).

Vrste koje inficiraju putem tla će prve simptome izazvati na korijenju te donjem dijelu debla zaraženog domaćina, dok vrste koje se šire zrakom mogu prvotne simptome izazvati u krošnji, odnosno na lišću domaćina koji u početku izgleda kao da je natopljen vodom, a zatim taj dio smeđi ili crni u nepravilnim oblicima (pjege, mrlje, klinovi i slično).

Infekcija počinje tako da patogen najčešće zarazi vrh lista, gdje se najduže zadržava voda (slika 1), pa se širi uz središnju nervaturu lista do peteljke i kroz nju prodre u izbojak. Bolesni dio izbojka uvijek je oštro odijeljen od zdravog tkiva (slika 2). Bolest se brzo širi i izaziva sušenje. Gotovo identične simptome na izbojcima i listovima mogu izazvati i neke gljive (*Phomopsis* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Botryosphaeria* spp. i dr.) pa je identifikacija uzročnika na osnovi simptoma nemoguća (Tomić i Vukadin 2011).

Slika 1. Simptomi na vrhu lista rododendrona zaraženog vrstom *P.ramorum*

Slika 2. Simptomi na izbojku

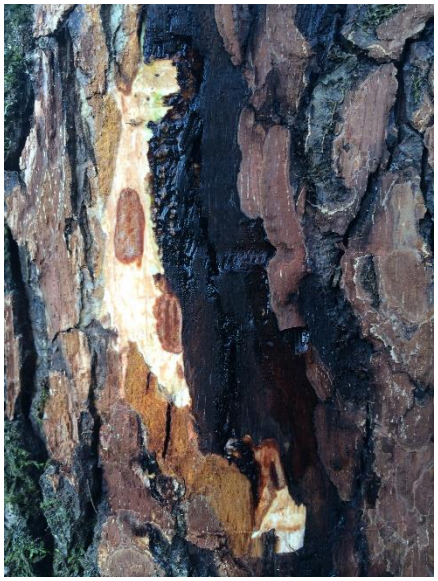
Vrste roda *Phytophthora* list mogu zaraziti iz izbojka pa se širiti kroz peteljku i središnjom nervaturom do vrha lista (slika 3), rjeđe se zaraza može ostvariti i na sredini plojke (slika 4) (Tomić i Vukadin 2011).

Slika 3. Simptomi na peteljci

Slika 4. Simptomi na listu

Osim toga, karakteristični simptomi mogu se uočiti i na deblu. Micelij prodire u unutarnju koru i kambij gdje se brzo širi, na površini debla vide se tamne, vlažne mrlje tzv. tekline (slika 5), a u unutarnjoj kori i u kambiju razvijaju se smeđa nekrozna tkiva (slika 6). Kad micelij proraste, a nekroza tkiva zaokruži deblo, dolazi do naglog sušenja stabla.

Slika 5. Tekline na kori bukve



Slika 6. Nekroza u unutarnjoj kori debla

Vrste roda *Phytophthora* mikroskopski su organizmi te samim time dokaz o njihovoj zarazi, u vezi s truljenjem (raspadanjem) neće biti vidljiv kao u slučaju mednjače (*Armillaria* spp) kod koje se može pronaći istaknuti bijeli micelij koji raste pod korom. Podzemna ispitivanja vrata korijena i baza zaraženih matičnih stabala upućuju na odumiranje korjenova sustava, s tim da će veliki dio finog, sitnog korijenja biti istrunut, a ostatak sustava pokazivati će znakove raspadanja. Biti će smeđi ili crni iznutra, mekši nego inače i vrlo lako će puknuti. Vrlo slične simptome ovima izaziva i dugotrajno zadržavanje vode stoga je potrebno obaviti laboratorijske analize kako bi se utvrdilo da li je korijen koji je pogođen truleži posljedica prevelikog zadržavanja vode ili posljedica infekcije vrstama roda *Phytophthora.*

1.5. VRSTE RODA *Phytophthora* POTVRĐENE NA ŠUMSKOM DRVEĆU U HRVATSKOJ

U Europi su provedena opširna istraživanja patogena iz roda *Phytophthora*, pri čemu su prvenstveno istraživane vrste koje narušavaju stabilnost prirodnih šumskih ekosustava. U posljednje vrijeme se intenzivno istražuju nove vrste, koje se opisuju kao opasni karantenski organizmi. Oni su naročito opasni, jer se domaće vrste drveća nisu na njih prilagodile, te nemaju razvijen adekvatan obrambeni sustav. O uzročnicima biljnih bolesti iz roda *Phytophthora* nema puno podataka u domaćoj literaturi, a intenzivna istraživanja u svijetu počinju sredinom 90-tih godina 20. stoljeća, naročito posljednjih 15 godina. Upravo tada je opisana većina danas poznatih vrsta. Obzirom da je problem pseudogljiva *Phytophthora* u svijetu prepoznat kao vrlo važan, te da su potencijalno opasne za hrvatsko šumarstvo, javila se potreba istraživanja prisutnosti vrsta u Hrvatskoj (Županić 2013).

❖ *Phytophthora cambivora*

U Hrvatskoj je primijećena 2008. godine na bukvama bjelovarskog područja (Bakran et al. 2009), te je 2011. izolirana s obične bukve na bjelovarskom području i topola (šum. kultura) na osječkom području. Uzročnik je tintne bolesti na pitomom kestenu (*Castanea sativa*), te truleži korijena i rakastih tvorevina u Europi i Sj. Americi na običnoj bukvi (*Fagus silvatica*), a moguća je na crnoj johi (*Alnus glutinosa*) i hrastu (*Quercus* spp.). Tipični simptomi na kestenu su trulež korijena te donjeg dijela debla, koja se na vanjskom dijelu kore očituje kroz tekline ispod kojih su, ako se kora ukloni, vidljive lezije u obliku plamena. Ukoliko trulež korijena i debla uznapreduje, dolazi do pojave simptoma i u krošnji: kloroze lišća, smanjenja njihovih dimenzija (mikrofilija) te venuća.

Na običnoj bukvi u Europi (i drugdje) su također vidljive rakaste tvorevine s crnim teklinama na kori, ali bez dramatičnih diskoloracija ispod iste (na unutarnjoj kori).

Zbog izostanka, odnosno manjka struktura za preživljavanje nepovoljnih uvjeta (oospore, hlamidospore) ovu je pseudogljivu teško izolirati veći dio godine, odnosno, samo kada su povoljni klimatski uvjeti za infekciju zoosporama.

❖ *Phytophthora quercina*

Smatra se najagresivnijom vrstom iz roda *Phytophthora* na hrastu, koja je u Hrvatskoj prvi put determinirana 2003. godine na kitnjaku (*Quercus petreae*), lužnjaku (*Quercus robur*), ceru (*Quercus cerris*), meduncu (Quercus *pubescens*), crniki (*Quercus ilex*).

P. quercina patogen je na finom (sitnom) korijenju hrasta, s daljnjim potencijalom proizvodnje toksina koji će smanjiti vitalnost krošnje (Brasier 1999).

Pseudogljiva proizvodi proteine (elicitine) naziva quercinini, koji uzrokuju nekrozu biljnog tkiva (posebice se razgrađuju membrane kloroplasta) (Oβwald et al. 1999).

Oβwald i dr. (1999) pretpostavljaju da quercinini mogu djelovati na dva načina, prvi je da smanjuju turgor i rast stanica finog korijenja, drugi je da potencijalno mogu prijeći i u listove te na taj način negativno utjecati na fotosintezu.

Simptomi su otpadanje grančica, pojava živića, smanjenje krošnje, odumiranje grana i krošnje, žućenje listova.

❖ *Phytophthora alni*

Usko je specijalizira za vrste roda *Alnus,* od kojih je crna joha (*Alnus glutinosa*) najpodložnija, a siva joha (*Alnus incana*) najotpornija. U Hrvatskoj je prvi potvrđeni nalaz iz 2012. godine na tri lokaliteta u Koprivničko - križevačkoj i Bjelovarsko - bilogorskoj županiji (Tomić i Ivić 2013). Bolest zasad nije potvrđena ni na jednom drugom rodu drveća, te nije potvrđena ni na drugim vrstama poplavnih šuma.

Phytophthora alni dolazi u tri podvrste: ssp. alni (najčešće izolirana i najvirulentnija), ssp. uniformis (švedska varijanta) i ssp. multiformis (pojavnost u Nizozemskoj, Britaniji i Njemačkoj)

Stabla koja od infekcije pate nekoliko godina će imati suhe izbojke (grane), a moguća je i ekscesivna proizvodnja češerića, tipična pojava kada je joha izložena nekom stresnom čimbeniku. Iako stabla često brzo odumiru kada se dijelovi krošnje počnu sušiti, to ne mora uvijek biti slučaj, jer bolest može poprimiti kronični karakter, a isto tako, odumrijeti mogu samo neki izdanci iz panja dok se ostali ili oporave ili djeluju zdravo.

Osim toga, *P. alni* izaziva pojavu rđastih ili tamnih teklina na deblu čak do 3 m visine od tla, ispod kojih je floem odumro te je jasno vidljiva diskoloracija (crvenkasta, ljubičasto smeđa) u

odnosu na ostatak unutarnje kore koja je kremasto bijele boje. Također, omogućuje pojavu truleži pri bazi koja okružuje deblo.

Istraživanja su pokazala da sitno korijenje mladih joha privlači zoospore, ali to najvjerojatnije nisu područja glavnine infekcija u prirodi, jer se pokazalo da odumiranja kore uglavnom počinju od baze debla, a ne od korijena (Lonsdale 2003). Folijarni te simptomi krošnje javljaju se tek kada dođe do intenzivnijeg prstenovanja debla/korijena, tako da može proći i dulji niz godina prije nego što dođe do razvoja vidljivih simptoma u krošnji (Webber et al 2004).

Johe se mogu zaraziti u rasadniku, zalijevanjem kontaminiranom vodom ili kontaktom sa zaraženim materijalom, stoga bi se u rasadnicima trebalo izbjegavati zalijevanje biljaka riječnom (potočnom) vodom, sadnja novih johovih sadnica u tlo gdje su prije toga obitavale zaražene barem tri godine, a preporuča se rutinska dezinfekcija prije sadnje novih sadnica (Webber et al 2004).

❖ *Phytophthora gonapodyides*

U Hrvatskoj je utvrđena na topolama u šumskim kulturama, nakon što su prvi simptomi uočeni 2005. godine (Pernek et al. 2011). Uzrokuje trulež korijena i lezije debla kod hrasta lužnjaka (Jung et al. 1996, Balci i Halmschlager 2003), s tim da je sporadično utvrđena na običnoj bukvi u Belgiji (Schmitz et al. 2009), te na johama u Mađarskoj (Szabo 2009).

❖ *Phytophthora cactorum*

Poznata je kao uzročnik polijeganja ponika, te općenito kao patogen na mladim biljkama (bukva, jasen, javor), a na najosjetljivijoj bukvi je moguća pojava smeđih pjega na supkama i listovima, te kasnije smeđenje i sušenje čitavih supki (Glavaš 1999).

Iako dolazi na širokom rasponu domaćina, kao što su vrste rodova *Acer* spp., *Quercus* spp., te divlji kesten (*Aesculus hippocastanum*), zasada se ne smatra značajnim patogenom u šumskim sastojinama, već prvenstveno problemom u rasadnicima te u voćnjacima gdje dolazi na jabukama (*Malus* spp.) i kruškama (*Pyrus* spp.).

Na zaraženim biljkama uzrokuje niz simptoma, od truleži korijena, donjeg dijela debla i plodova, do rakastih tvorevina na deblu i venuća lišća i ponika.

1.6. METODE ISTRAŽIVANJA

Oomycetes nisu prave gljive, pa je sukladno tome potrebno koristiti posebne tehnike za njihovu izolaciju. Većina vrsta roda *Phytophthora* rastu poprilično sporo, u uvjetima „in vitro“, u odnosu na saprotrofne gljive i bakterije, tako da je populacije bakterija potrebno održavati na niskoj razini, jer su izravna konkurencija vrstama roda *Phytophthora* te mogu potisnuti njihov rast. Taj problem riješen je korištenjem selektivnih medija za izolaciju, u koji su dodani antibiotici kako bi se spriječio rast bakterija. Za izolaciju vrsta roda *Phytophthora* preporučuju se koristiti podloge slabije hranjive vrijednosti, jer ih u protivnom često nadrastu patogene gljive. Osim selektivnih medija za izolaciju *Phytophthora,* koriste se i bazalni mediji (osnovni) (Drenth i Sendall 2001).

Procjenjuje se da vrste roda *Phytophthora* uzrokuju oko 90 % truleži korijenja šumskog drveća. Međutim, nedostatak znanja o tome kako izolirati vrste roda *Phytophthora* često dovodi do negativnog rezultata, što rezultira da se drugi patogeni, kao što su *Fusarium, Pythium, Rhizoctonia* i nematode, često krivo smatraju uzročnicima truleži korijena i krošanja.

Većina vrsta roda *Phytophthora* napadaju samo živa ili svježe oštećena tkiva. Otkrivanje i / ili izolacija Phytophthora iz tkiva relativno je jednostavna i uspješna ako je tkivo svježe i nedavno zaraženo, s tim da je iz nekrotičnih tkiva vrste roda *Phytophthora* teško izolirati jer imaju slabe saprotrofske sposobnosti, te hlamidospore i oospore sporo i teško kliju. Izolacija iz tla je teška, ali korištenje metode „mamljenja“ znatno povećava uspješnost njihove izolacije (Drenth i Sendall 2001).

1.6.1. IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ ZARAŽENOG BILJNOG TKIVA

Vrste roda *Phytophthora* napadaju samo zdravi biljni materijal, uključujući i korijen stabala. Prema tome, patogen može biti prisutan bez da su vanjski simptomi vidljivi i očiti. Izolacija iz nekrotičnog biljnog tkiva je teška jer ono, između ostalog, može sadržavati i druge sekundarne patogene, stoga je za mamljenje i izolaciju najbolje uzimati uzorke sa stabala koja pokazuju početne simptome ili tla oko stabala koja se nalaze u neposrednoj blizini onih odumrlih, te uzorke s ruba aktivnih lezija (Drenth i Sendall 2001).

Uspješnost izolacije vrsta roda *Phytophthora* iz oboljelog tkiva uključuje pažljivi odabir svježe zaraženog tkiva. Zato je najbolje da se uzorak uzme s ruba aktivnih lezija. Idealan uzorak za izolaciju sadrži dio bolesnog i dio zdravog tkiva, odnosno 50% bolesnog i 50% zdravog tkiva. Kada je tkivo površinski sterilizirano, potrebno ga je prenijeti na odgovarajuću selektivnu hranjivu podlogu te redovito pregledavati Petrijeve zdjelice zbog sporije pojave neseptiranih hifa.

Vrste roda *Pythium* gotovo su uvijek prisutne na dijelovima zdravog i bolesnog korijenja, vratu korijena te donjeg dijela stabla (Drenth i Sendall 2001).

Postoje tri načina pomoću kojih se kontaminacija izolacijskog medija od strane roda *Pythium* može svesti na minimum:

- vrste roda *Pythium* obitavaju na korijenu te jako trulim dijelovima stabljike, pa je potrebno izbjegavati te dijelove ukoliko je moguće
- vrste roda *Pythium* obitavaju na vanjskoj kori korijena, pa je kao alternativu dobro odabrati središnji dio, ili obaviti površinsku sterilizaciju
- hymexazol opstruira rast vrsta roda *Pythium*, osim *P. irregulare* i *P. vexans*, dok većini *Phytophthora* vrsta omogućuje rast, s time da vrstama kao što su *Phytophthora cinnamomi* , *P. citrophthora* i *P. palmivora* onemogućuje rast. U tom slučaju potrebno je koristi hranjive podloge bez hymexazola ako se želi dobiti izolat tih vrsta ili kad se kultura dobiva od suspenzija zoospora, jer su ciste zoospora jako osjetljive na hymexazol (Drenth i Sendall 2011).

Kako bi se potaknula sporulacija radi lakše identifikacije, korijen, stabljiku ili list, za koje se smatra da su zaraženi vrstama roda *Phytophthora*, potrebno je dobro oprati te nakon toga postaviti u sloj jezerske vode, vode iz lokve ili destilirane vode, ostaviti 24 - 48 sati na svjetlu i temperaturi od 18 – 25 stupnjeva i pratiti razvoj sporangija. U slučaju pronalaska sporangija, manji dijelovi zaraženog biljnog tkiva se mogu izrezati, površinski sterilizirati i postaviti na selektivni medij. Također je važno da komadići korijena budu dobro obrisani i suhi te postavljeni ispod površine agara. To će osigurati dobar kontakt između bakterija u tkivu i antibiotika u mediju. Osim toga, vrste roda *Phytophthora* moguće je izolirati iz zaraženog biljnog tkiva mamljenjem. Ta metoda obično se koristi iz dva razloga:

- početne korake moguće je provesti na terenu
- u većini slučajeva sterilizaciju mamaca nije potrebno raditi (Drenth i Sendall 2001).

1.6.2. IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* IZ TLA

Drenth i Sendall (2001) navode da je uzorke najbolje uzimati iz vlažnog tla, u blizini zdravog korijenja najmanje 5 cm ispod površine tla. Površinski dio tla često je suh, i podložan djelovanju visokih temperatura, što ga čini neprikladnim mjestom za razvoj vrsta roda *Phytophthora*. Uzorke tla potrebno je uzimati tijekom ili nakon kišnog vremena, s ruba projekcije krošnje (rub korijenove mreže).

Sa uzorcima tla, nakon prikupljanja, potrebno je postupati oprezno. Ne smiju se izložiti djelovanju visokih temperatura i suše, jer gube svoju vitalnost. Potrebno ih je pohraniti u plastične vrećice kako bi se spriječilo isušivanje, i staviti ih u prijenosni hladnjak kako bi se spriječilo pregrijavanje, s tim da se uzorci ne smiju stavljati u direktan kontakt s blokovima leda. Zato je blokove leda potrebno omotati novinskim papirom. U slučaju da se uzorci trebaju pohraniti, ne treba koristiti hladnjak, nego ih je potrebno pohraniti na mjesto gdje se održava temperatura 10-15 Celzijevih stupnjeva uz održavanje njihove vlažnosti. Općenito, uzorke je potrebno obraditi u roku nekoliko dana, no u ovom slučaju uzorci tla mogu se koristiti i nakon nekoliko mjeseci. Ako se uzorci tla tijekom skladištenja osuše, moguće ih je 1-7 dana prije izolacije navlažiti. To će potaknuti razvoj sporangija, te klijanje hlamidospora ili oospora (Drenth i Sendall 2001).

- **DETEKCIJA I IZOLACIJA VRSTA RODA *Phytophthora* MAMLJENJEM IZ TLA**

Mnogi biljni dijelovi mogu se koristiti kao mamac za vrste roda *Phytophthora*: voće, sjemenke, lišće, supke, latice, itd.

Postavljanje mamaca za vrste roda *Phytophthora* iz uzoraka tla može se izvesti na tri osnovna načina

- umetanjem tla ili inficiranog tkiva u voćku (jabuku, krušku)
- sadnjom sjemena ili sadnica u uzorak tla s redovitim i obilnim zalijevanjem
- stavljanjem mamaca poput listova ili plodova u smjesu vode i tla

Izbor mamca ovisi o vrsti *Phytophthora* za koju se smatra da je uzročnik bolesti te o biljci domaćinu.

1.7. INKUBACIJA

Većina vrsta roda *Phytophthora* ima optimalne rastuće uvjete za inkubaciju na temperaturi od 15 do 25 Celzijevih stupnjeva. Nešto nižim temperaturama nastoji se dati prednosti i pogodovati vrstama roda *Phytophthora*, te onemogućiti razvoj bakterija. Petrijeve zdjelice s uzorcima potrebno je inkubirati u mraku, a u slučaju da se koriste antibiotici osjetljivi na svjetlo, potrebno je posude postaviti u foliju ili crnu plastiku. Do pojave micelija može doći i do 20 dana kasnije ako je izolacija vršena iz tla ili odumrlog tkiva zbog sporog klijanja hlamidospora i oospora (Drenth i Sendall 2001).

1.8. SKLADIŠTENJE

Za dugoročno skladištenje kultura vrsta roda *Phytophthora* bi idealan bio tekući dušik. Zamrzavanje kultura *Phytophthora* u tekućem dušiku na -196 ° C dobar je način da se pohrani najviše vrsta *Phytophthora*. Kulture se održavaju u izvornom genetskom obliku i ne čini se da gube patogenost ili agresivnost.

U nedostatku istoga su pogodne i sterilizirane staklene bočice s 5 mL destilirane vode i dvije konopljine sjemenke, u koje se stave čepovi agara (3 do 5 mm) uzeti s rubova čistih kultura (područje najveće aktivnosti). Kada se razvije micelij (1 do 2 dana), bočice se zatvaraju i izoliraju parafilmom, te skladište u tamu na sobnu temperaturu (moguće do dvije godine). Kultura se regenerira ponovnim stavljanjem čepova agara u hranjivi medij (V8 sok).

Drugi način skladištenja je u V8 medij sa slojem steriliziranog mineralnog ulja u nagnutoj epruveti.

1.9. IDENTIFIKACIJA

Mnoge vrste roda *Phytophthora* mogu se lako identificirati. Međutim, morfološke razlike među pojedinim vrstama su slabo varijabilne što stvara poteškoće prilikom točne klasifikacije. Značajke koje se koriste za određivanje svake pojedine vrste, između ostalog, uključuju: morfologiju sporangija, morfologiju anteridija, oogonija, oospora, morfologiju hifa te prisutnost ili odsutnost hlamidospora (Drenth i Sendall 2001).

1.10. INOKULACIJA

Jednom kada je vrsta roda *Phytophthora* izolirana, dobivena čista kultura te obavljena identifikacija, sljedeći korak u vezi patologije obuhvaća inokulaciju biljke domaćina. Postoje brojni razlozi inokulacije biljke domaćina, koji između ostalog uključuju:

- određivanje patogenosti (sposobnost da uzrokuje bolesti) pojedine vrste roda *Phytophthora* na domaćinu
- utvrđivanje agresivnosti *Phytophthora* izolata
- utvrđivanje virulentnosti pojedinih izolata (provode se u slučajno specifičnih vrsta, kao što su *P. sojae, P. infestans, P. vignae* itd.)
- provjeravanje kultura tkiva na otpornost na bolesti uzrokovane određenim sojem ili vrstom roda *Phytophthora*

Postoji mnogo načina pomoću kojih se obavljaju testovi inokulacije biljaka, ovisno o vrsti roda *Phytophthora*, vrsti biljke domaćina, s tim da je uključena i zrelost biljke domaćina.

Općenito se koriste sljedeće metode:

- inokulacija sporangija u tkivo lista ili ploda
- umetanje micelija u stabljike mladih sadnica
- umetanje komada agara s ruba micelija u pripremljene rupe na stabljikama drvenastog odraslog bilja
- inokulacija tla i sadnja mladih biljaka u ovako zaraženo tlo (Drenth i Sendall 2001).

2. MATERIJALI I METODE

Uzorci tla za analizu uzimani su sa tri lokacije na kojima su uočeni simptomi koji upućuju na moguće postojanje patogena iz roda *Phytophthora,*, a to su Dugo Selo, Novska te Lipovljani.

❖ Dugo Selo, GJ Črnovščak, odjel/odsjek: 16g

Mlada mješovita sastojina poljskog jasena i johe, nastala iz sjemena i panja, starosti 30 godina, sa čije se sjeverne strane nalazi šumska cesta dok je na zapadnoj strani omeđena kanalom. Stabla su vidljivo zaostala u rastu te bilježe promjere od 10 do 20 cm u prosjeku, s time da je joha zastupljenija od poljskog jasena, koji je srednje dobre kvalitete, ravnih debala i dobrih visina (tablica 1).

Tablica 1. Osnovni podaci o strukturi sastojine za odsjek 16g

VRSTA	POLJSKI JASEN	CRNA JOHA	UKUPNO
BROJ STABALA N/ha	255	467	722
DRVNA ZALIHA m^3	144 (41 m^3/ha)	262 (75 m^3/ha)	406 (116 m^3/ha)
TEČAJNI GODIŠNJI PRIRAST m^3	11 (3,2 m^3/ha)	13 (3,8 m^3/ha)	24 (7,0 m^3/ha)

❖ Novska, GJ Trstika, odjel/odsjek: 37b

Mlada (25 godina), jednodobna sjemenjača poljskog jasena u kojoj se još javljaju joha i brijest te rubno pojedinačno deblja stabla hrasta lužnjaka. Teren je niza prekrivena slojem prizemnog rašća i gusto razvijenim slojem grmlja kojeg čine glog, brijest i dr. Sastojina je gustog sklopa i suženih krošanja.

❖ Lipovljani, GJ Josip Kozarac, odjel/odsjek: 71d

Mlada, čista sastojina poljskog jasena starosti 30 godina, uzrasla do razvojnog stadija letvika, rjeđe stupovlja (tablica 2).

Tablica 2. Osnovni podaci o strukturi sastojine za odsjek 71d

VRSTA	POLJSKI JASEN	UKUPNO
BROJ STABALA N/ha	923	923
DRVNA ZALIHA m^3	249 (251 m^3/ha)	249 (251 m^3/ha)

2.1. UZORKOVANJE TLA NA TERENU I POSTAVLJANJE MAMACA

Ovisno o stanišnim i sastojinskim prilikama (tip tla, gustoća sastojine, površina projekcije krošnje, prisutnost i struktura sloja prizemnog rašća i grmlja), uzorci tla uzimani su na dubini 10 do 20 cm s četiri različite točke na udaljenosti 0,5 do 1,5 m od debla svakog istraživanog stabla (slika 7).

Slika 7. Uzimanje uzoraka tla na terenu

Uzorci tla sa svih lokacija su iskorišteni za ispitivanje prisutnosti pseudogljiva roda *Phytophthora*, korištenjem metoda mamljenja pomoću razvijenih listova rododendrona (*Rhododendron catawbiense* „Grandiflorum“), te mladih listova poljskog jasena, javora klena

i razvijenih listova lovorvišnje. Korištena metoda je uz manje prilagodbe preuzeta od Themann i Werres (2001). U plastične posude dimenzija (15 x 22 x 6 cm) je stavljeno po 250 ml uzorkovanog tla zajedno sa sitnim korjenčićima poljskog jasena. Zatim se ulijalo 500 ml destilirane vode, na čiju su površinu stavljeni pod slavinom oprani i sterilizirani listovi (slika 8). Važno je da matična biljke s koje su uzimani listovi nije bila tretirana fungicidima jer to smanjuje mogućnost uspjeha ove metode.

Slika 8. Postavljanje mamaca

Listovi su sterilizirani močenjem u 0,5% otopini HCl na nekoliko sekundi, zatim ostavljeni na papirnatim ručnicima unutar laminara 10 – 20 min da otopina djeluje te zatim isprani u destiliranoj sterilnoj vodi (voda autoklavirana na 121 °C, 15 min), nakon čega su ostavljeni u laminaru da se u potpunosti osuše. Nekoliko dana kasnije, na većini listova pojavile su se diskoloracije/nekroze.

Svi listovi su skupljeni, a dio njih je opran pod vodom iz slavine, steriliziran 1 do 2 minute u otopini klora (0,04 %) te 3 puta ispran u destiliranoj sterilnoj vodi. Izrezani su komadići s rubova nekroza te postavljeni na PDA hranjive podloge u petrijeve zdjelice koje su stavljene na inkubaciju na 20 °C u tamu, dok je drugi dio listova opran pod vodom iz slavine, postavljen na papirnate ručnike radi sušenja, s tim da je listove potrebno još dodatno prebrisati. Pomoću tih listova obavljeno je ispitivanje pomoću Pocket diagnostics testera.

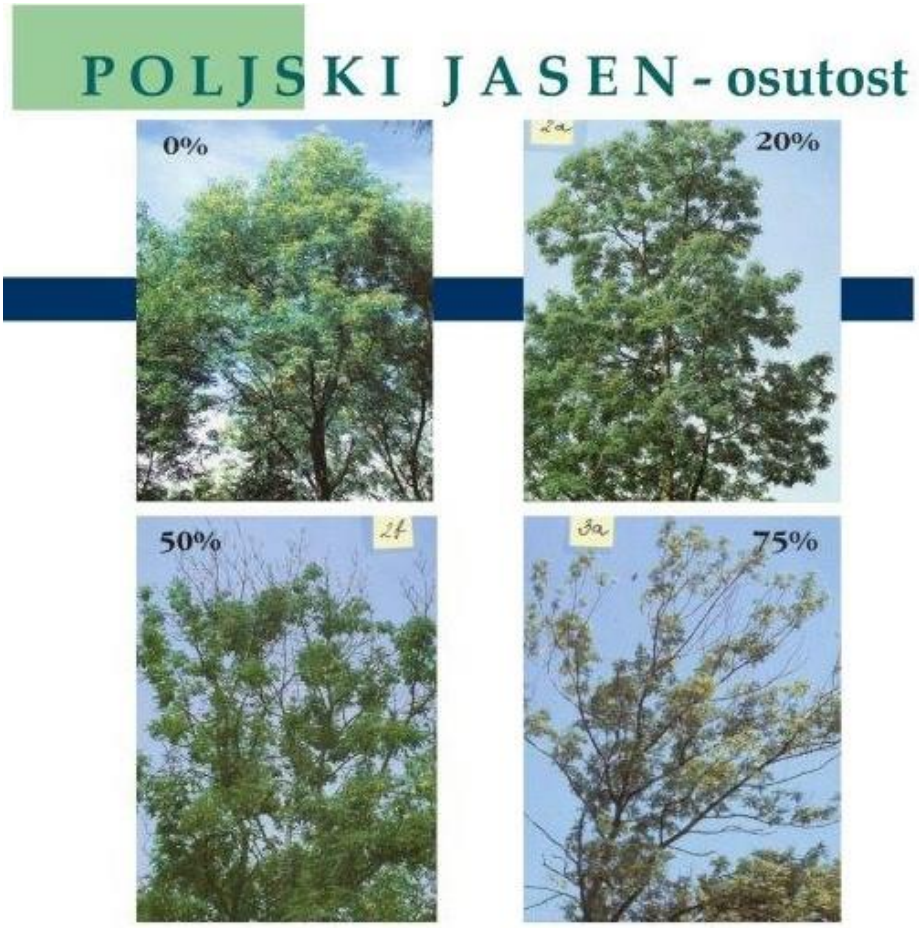
2.2. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA STABALA

Na svim lokacijama, osim uzimanja tla za ispitivanje prisutnosti patogena roda *Phytophthora* korištenjem metode mamljenja pomoću listova, vršena je i procjena osutosti krošanja stabala poljskog jasena. Za procjenu osutosti krošanja korištena je metoda ICP-Forests s manjim prilagodbama, čije su osnovne postavke bile sljedeće:

- za procjenu osutosti se u obzir nisu uzimali sušci, odnosno stabla sa 100% osutosti
- postotak osutosti procjenjivao se na osnovi usporedbe osutosti konkretnog stabla s prikazima u foto-priručniku ili lokalnim referentnim stablom, koje je definirano kao "najbolje stablo s potpunom krošnjom razvijeno pri određenim lokalnim stanišnim i sastojinskim uvjetima"
- procjena se obavljala tako da se stablo promotrilo sa svih strana (procjena se obavlja vizualnim putem, uz popunjavanje propisanih obrazaca)
- stabla su se prema osutosti grupirala u tri kategorije (tablica 3)

Tablica 3. Kategorije osutosti korištene u istraživanju

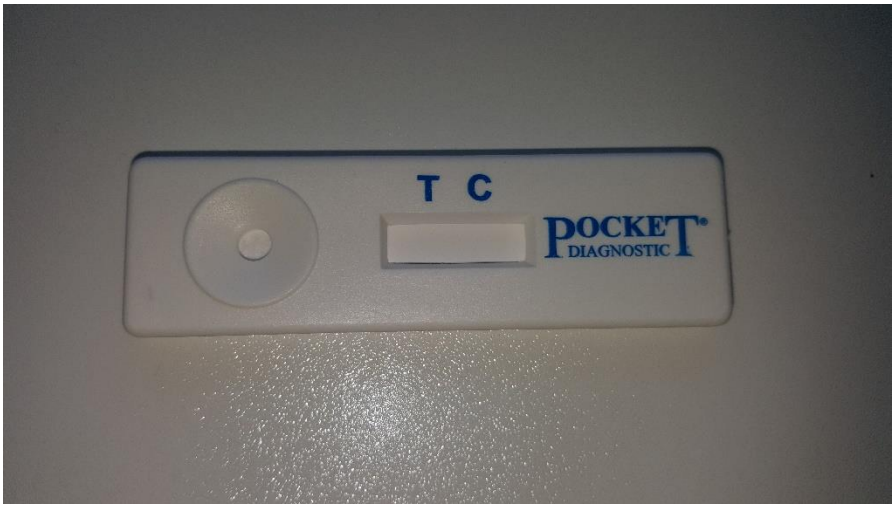
Stupnjevi osutosti	Tip osutosti	Gubitak lisne mase (%)
0 i 1	Nema ili blaga	0-25
2	Umjerena	26-60
3	Jaka	61-99



Slika 9. Procjena osutosti krošanja stabala

2.3. POCKET DIAGNOSTICS

Pocket diagnostics (slika 10) je test koji se može primijeniti neposredno na terenu za utvrđivanje prisutnosti vrsta roda *Phytophthora* u simptomatičnom biljnom tkivu.

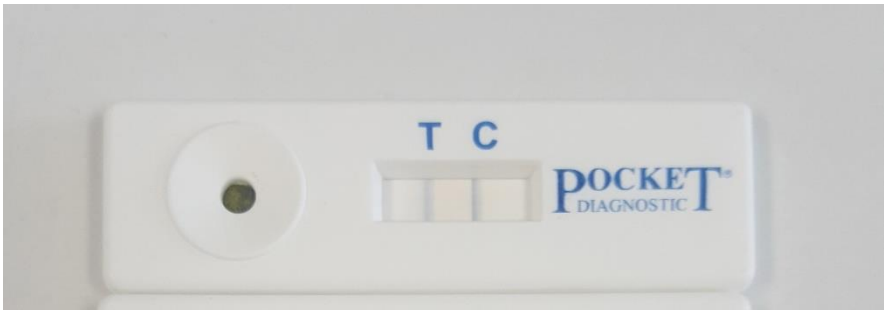


Slika 10. Pocket Diagnostic

Listovi na kojima su se pojavile diskoloracije/nekroze, sakupljeni su te oprani pod vodom iz slavine i postavljeni na papirnate ručnike radi sušenja i dodatno prebrisani. Za testiranje može poslužiti biljno ili drvno tkivo, ali je bitno da su uzorci svježi i dovoljno usitnjeni (npr. za list je dovoljna količina od 0,2 g ili lisni dio površine 25 mm^2). Kao materijal za testiranje ne smije se koristiti mrtvo tkivo, već ga je potrebno uzimati na spoju simptomatičnog (bolesnog) i zdravog tkiva. U slučaju korijena, prethodno ga je potrebno dobro isprati od tla, ukloniti vanjsku koru od sloja unutarnje (mekše) kore i usitniti na komadiće. Također, tekline iz rakastih tvorevina nisu odgovarajući materijal za testiranje.

Temperatura na kojoj se vrši testiranje ne bi smjela biti ispod 10 °C, a ukoliko je, buffer i test je potrebno prethodno ugrijati u ruci ili držati u džepu blizu tijela.
Usitnjeno tkivo se stavlja u bočicu s bufferom, koja se dobro zatvori te se mućka 60 sekundi. Zatim se iz bočice pipetom uzima samo čista tekućina (bez uzorka tkiva i zračnih mjehurića), te se u otvor na testeru kapnu dvije kapljice. Ako se primijeti da tekućina u testeru ne napreduje, pažljivo je potrebno dodati još jednu kapljicu. Prilikom provođenja testiranja, tester mora biti u horizontalnom položaju, na ravnoj podlozi ili mirnoj ruci.

Rezultati se čekaju 3 do 10 minuta, a sve što se pojavi nakon isteka 10 minuta ne uzima se u obzir. Na testeru se mora pojaviti plava linija C, za kontrolu ispravnosti testera. te plava linija T koja označava pozitivan rezultat (slika 11). Važno je da linije budu plave boje, ukoliko su zelene ili smeđe, rezultati se ne mogu uzeti u obzir.



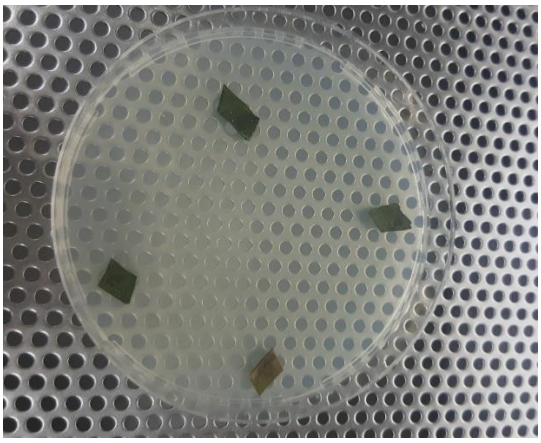
Slika 11. Pocker Diagnostic – prikaz plave T i C linije

Uzrok blijede C linije je vjerojatno prevelika koncentracija uzorka u bufferu, što može usporiti protok reagensa uz membranu te je čest slučaj kod uzoraka tkiva pod bakteriozom jer stanice bakterija mogu začepiti membranu. Ako je T linija blijeda, znači da je infekcija svježa, patogen u niskim koncentracijama ili nejednako distribuiran.

2.4. IZOLACIJA IZ LIŠĆA

Sterilizacija sakupljenih listova obavljena je postavljanjem svakog lista u otopinu klora (0,04%) na 1 – 2 minute, te ispiranjem u destiliranoj vodi tri puta. Cijeli postupak obavljan je u besprašnoj komori (laminarni mikrobiološki kabinet s vertikalnim strujanjem za rad u atmosferi čistog zraka) kako bi se osigurali sterilni uvjeti. U komori su listovi, nakon sterilizacije, postavljeni na papirnate ručnike, te se sušili oko 20 minuta.

S rubova nekroza, izrezani su komadići lišća koju su postavljeni na PDA hranjive podloge u petrijeve zdjelice (slika 12) koje su stavljene na inkubaciju na 20 °C u tamu. Nakon nekoliko dana razvili su se miceliji koji su potom promatrani pod mikroskopom.



Slika 12. Komadići lista postavljeni na PDA hranjive podloge

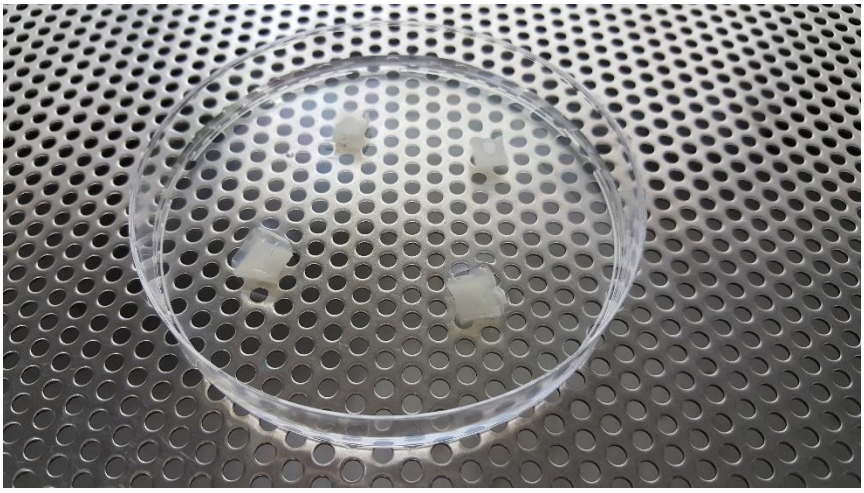
Za samo mikroskopiranje potrebno je uzeti što manji komadić micelija te ga prenijeti na predmetno stakalce u kapljicu destilirane vode i lagano poklopiti pokrovnim stakalcem. Nakon toga su pod mikroskopom promatrane hife, kako bi se utvrdilo radi li se o septiranim ili neseptiranim, te je li došlo do eventualnog razvoja sporangija. Ukoliko nije došlo do njegovog razvoja, obavljena je indukcija sporangija.

2.4.1. KUHANJE HRANJIVE PODLOGE

Prije svega, potrebno je izvagati masu kupovnog i već pripremljenog praha za pripremu hranjive podloge prema uputama na ambalaži (PDA – potato dextrose agar 39g/1l). U Erlenmayerovu tikvicu ulije se 1 litra destilirane vode i umetne magnet, s tim da je vodu prije toga moguće zagrijati u kuhalu kako bi se prah što prije otopio. U tikvicu s vodom dodaje se odvagana masa praha te se postavlja na magnetsku miješalicu, na kojoj se namjeste broj okretaja (vrtnja) na 700 okretaja u minuti te temperatura na 250 °C. Potom je potrebno pričekati da se prah u potpunosti otopi, odnosno dok otopina ne proključa (zapjeni se). Otopinu je potrebno sterilizirati u prijenosnom parnom sterilizatoru na 121 °C, 15 minuta. Kada se hranjiva podloga ohladi na približno 50 – 55 °C, u 1 litru hranjive podloge dodaje se 20 ml 1 %-tne otopine (1 g antibiotika na 100 ml vode) streptomycina. Streptomycin je antibiotik koji se u otopinu dodaje kako bi se spriječio rast bakterija.

2.5. INDUKCIJA SPORANGIJA

Za indukciju sporangija uzimane su mlade kulture, ne starije od 3 – 4 dana. Sa ruba micelija uzimana su po tri do četiri čepa odnosno kockice agara, postavljene u petrijeve zdjelice u koje se zatim ulijevala sterilna destilirana voda sobne temperature, tako da visina vode u petrijevoj zdjelici ne bude viša od čepova (slika 13). Kako bi došlo do razvoja sporangija za 24 – 48 sati, petrijeve zdjelice ostavljane su na sobnoj temperaturi na svjetlu.



Slika 13. Indukcija sporangija

3. REZULTATI

3.1. GJ ČRNOVŠČAK, DUGO SELO

3.1.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA STABALA

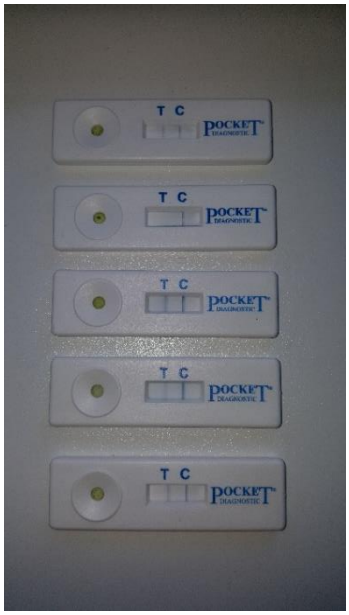
Na području GJ Črnovščak uzimanje tla za analizu i procjena osutosti krošanja vršena je na stablima poljskog jasena koja nose oznake od 4 – 8.

Iz tablice 4. vidljivo je da na području GJ Črnovščak, od promatranih stabala, prevladavaju stabla lošeg, odnosno narušenog zdravstvenog stanja, čija je osutost krošanja od 61 – 99 %, odnosno 26 – 60 %.

Tablica 4. Rezultati procjene osutosti krošanja stabala poljskog jasena, GJ Črnovščak

Stablo	Oznaka	Datum	Kategorija osutosti	Promjer (cm)
4	DS 4	5.5.2016.	3	17,4
5	DS 5	5.5.2016.	1	14,5
6	DS 6	5.5.2016.	3	10,7
7	DS 7	5.5.2016.	2	12,8
8	DS 8	5.5.2016.	1	11,7

3.1.2. POCKET DIAGNOSTIC



Pomoću testa Pocket diagnostic određivana je prisutnost vrsta roda *Phytophthora* u simptomatičnom biljnom tkivu, čiji je rezultat pojava plave C i T linije. Na svim promatranim uzorcima pojavila se plava C linija (kontrola ispravnosti testera), dok se plava T linija koja kao takva prikazuje pozivan rezultat, pojavila na 4/5 promatrana uzorka (slika 14).

Slika 14. Pocket diagnostic testeri, GJ Črnovščak

3.2. GJ JOSIP KOZARAC, LIPOVLJANI

3.2.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA

U GJ Josip Kozarac na području Lipovljana promatrana stabla poljskog jasena za određivanje osutosti krošnje nose oznaku od 46 – 55. Uokolo tih stabla, odnosno na udaljenosti od 0,5 do 1.5 metara uzimani su uzorci tla za ispitivanje prisutnosti patogena roda *Phytophthora* korištenjem metode mamljenja pomoću listova. Rezultati su prikazani u tablici 5. iz koje je vidljivo da dominiraju stabla koja su lošeg, odnosno narušenog zdravstvenog stanja te da im se osutost krošanja kreće u visokim postocima, od 61 – 99 %, odnosno 26 – 60 %.

Tablica 5. Rezultati procjene osutosti krošanja stabala poljskog jasena, GJ Josip Kozarac

Stablo	Oznaka	Datum	Kategorija osutosti	Promjer (cm)
46	L 16	21.6.2016.	2	27,6
47	L 17	21.6.2016.	3	25,2
48	L 18	21.6.2016.	3	21,4
49	L 19	21.6.2016.	3	26,2
50	L 20	21.6.2016.	2	25,0
51	L 21	11.7.2016.	2	27,9
52	L 22	11.7.2016.	1	34,0
53	L 23	11.7.2016.	3	26,0
54	L 24	11.7.2016.	1	28,5
55	L 25	11.7.2016.	3	31,8

3.2.2. POCKET DIAGNOSTIC

Za određivanje prisutnosti patogena roda *Phytophthora* na simptomatičnom biljnom tkivu pomoću testova Pocket diagnostic, obrađeni su uzorci tla uz stabla oznake od 51 – 55. Na svim obrađenim uzorcima pojavila se plava C linija koja potvrđuje ispravnost testa, te na 3/5 uzoraka plava T linija koja je na pozitivnim uzorcima bila bljeđe boje, što ukazuje da je riječ ili o svježoj infekciji, da je patogen prisutan u niskim koncentracijama ili nejednako distribuiran (slika 15.).

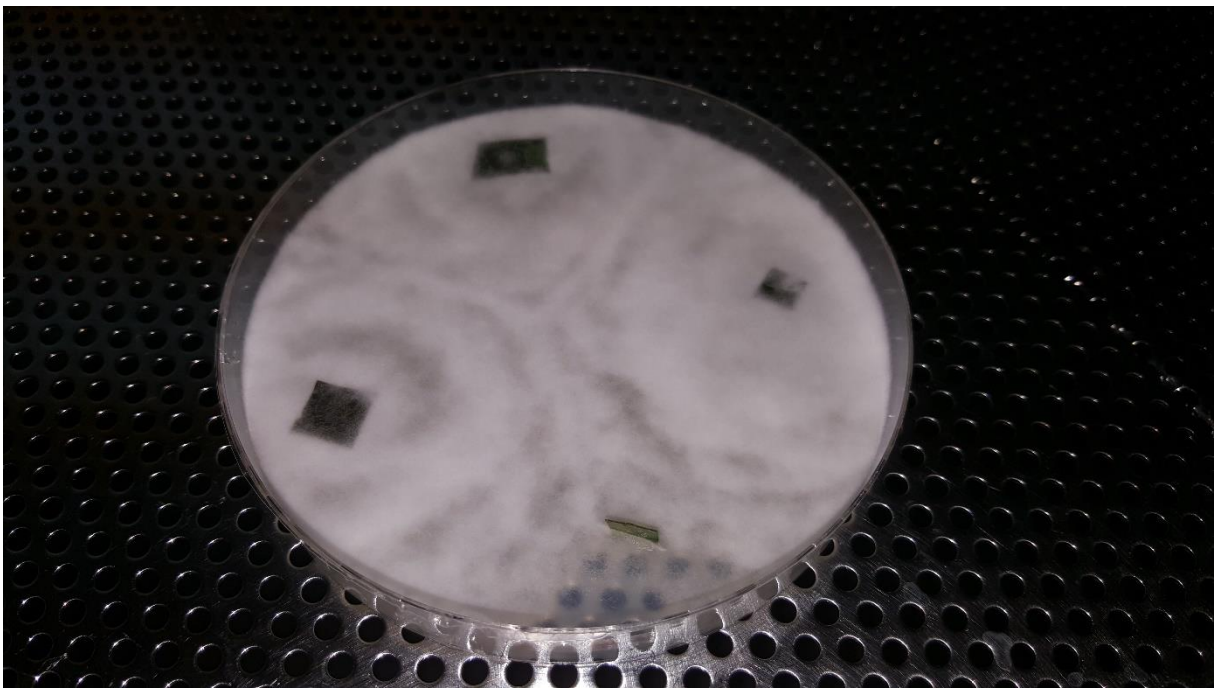
Slika 15. Pocket diagnostic testeri, GJ J.Kozarac

3.2.3. IZOLACIJA IZ LIŠĆA I INDUKCIJA SPORANGIJA

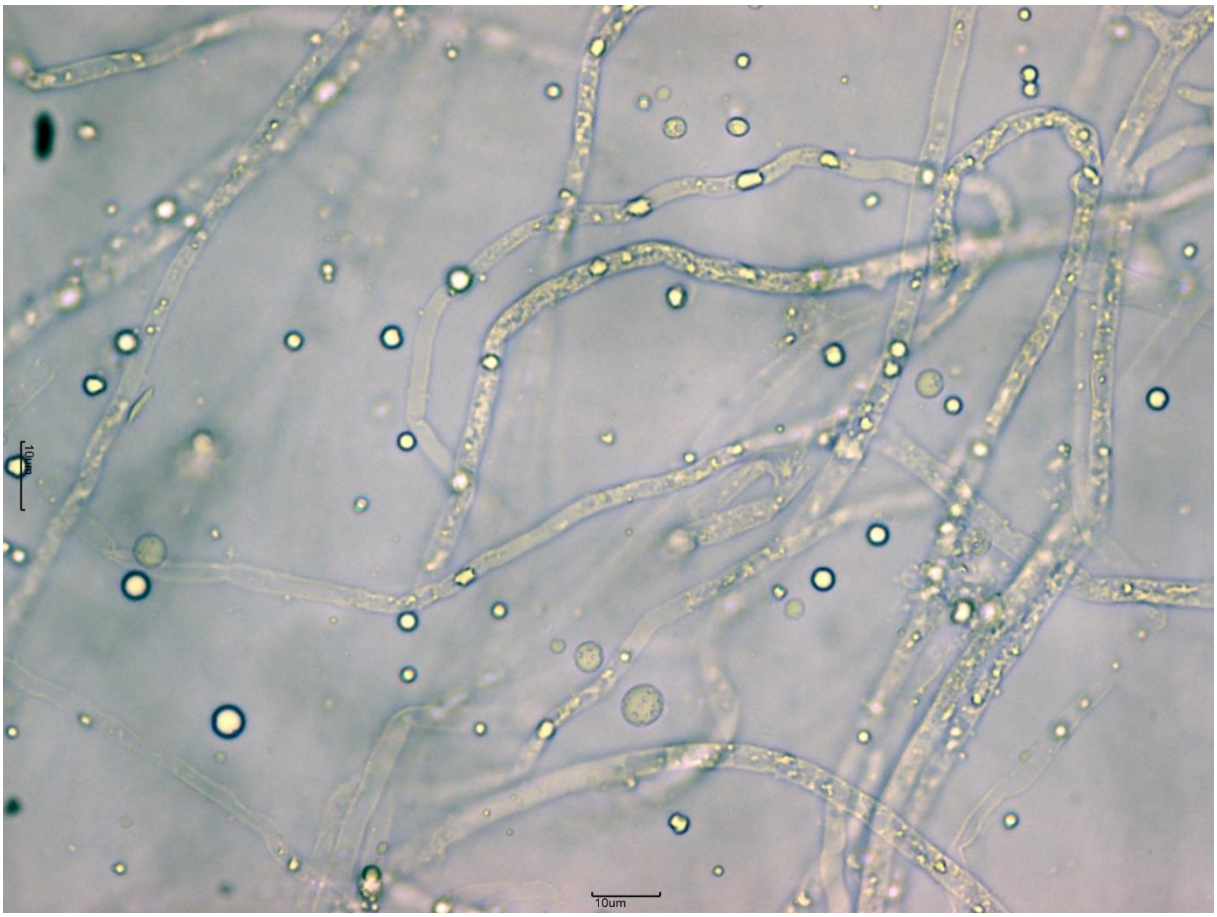
Izolacijom iz lišća dobiveni su miceliji bijele boje (slika 16.) koji su potom promatrani pod mikroskopom kako bi se utvrdilo je li riječ o septiranim ili neseptiranim hifama, te je li došlo do razvoja sporagnija koji, kao i prisutnost ili odsutnost septi, ima dijagnostičko značenje. Neseptirane hife (slika 17.) tipične su za primitivne gljive sa mnogo jezgara uronjenih u protoplazmu. Promatranjem micelija pod mikroskopom kod većine uzoraka uočene su neseptirane hife te upravo one mogu biti znak da riječ o patogenima iz roda *Phytophthora* (tablica 7.). Septirane hife (slika 18.) pojavljuju se u viših gljiva čije dvije susjedne stanice jedne hife komuniciraju putem specijalnih otvora na septi.

Tablica 6. Rezultati izolacije iz lišća, GJ Josip Kozarac

STABLO	NESEPTIRANE HIFE
46	+
47	+
48	+
49	+
50	+
51	+
52	-
53	+
54	-
55	+



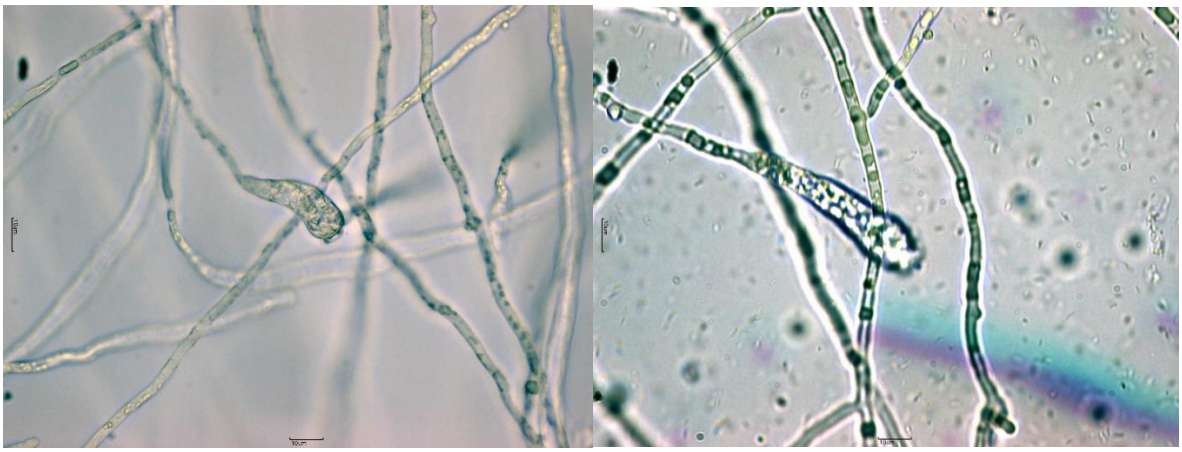
Slika 16. Bijeli micelij dobiven izolacijom iz lišća



Slika 17. Neseptirane hife

Slika 18. Septirane hife uz prisustvo različitih tvorbi

S obzirom da ni na jednom promatranom uzorku nije uočen razvoj sporangija, koji ima dijagnostičko značenje, obavljena je indukcija sporangija. Indukcijom sporangija na pojedinim promatranim uzorcima uočene su tvorbe (slika 19) koje prema svom obliku nalikuju na sporangij vrsta roda *Phytophthora*. Da bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da je riječ o sporangiju vrsta roda *Phytophthora*, potrebno je promatrati, između ostalog, njegovu morfologiju (oblik, veličina, odnos dužine i širine), duljinu peteljki na sporangiju, širenje sporangija (proizvodnju novog sporangija unutar sporangija koji je proklijao izravno) itd.



Slika 19. Prikaz tvorbi koje nalikuju na sporangij vrste roda *Phytophthora*

3.3. GOSPODARSKA JEDINICA TRSTIKA, NOVSKA

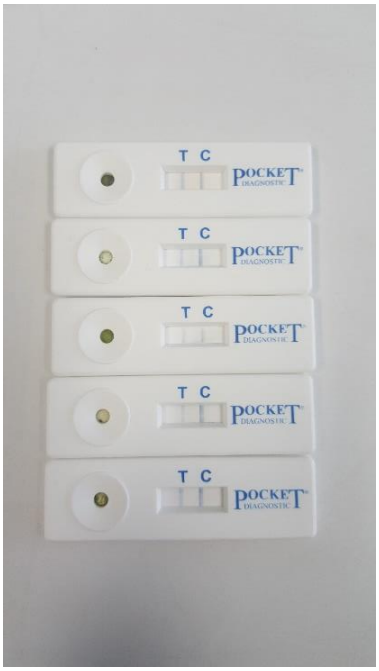
3.3.1. PROCJENA OSUTOSTI KROŠANJA

Procjena osutosti krošanja u GJ Trstika u Novskoj kao i uzimanje tla za ispitivanje prisutnosti patogena roda *Phytophthora* korištenjem metode mamljenja obuhvaćala je stabla odnosno tlo sa oznakom 76 – 80. Slično kao i kod prethodnih gospodarskih jedinica, prevladavaju stabla koja nisu dobrog zdravstvenog stanja, odnosno koja su narušenog do lošeg zdravstvenog stanja, osutosti krošanja od 26 – 60 %, tj. 61 – 99 % (tablica 7).

Tablica 7. Rezultati procjene osutosti krošanja, GJ Trstika

Stablo	Oznaka	Datum	Kategorija osutosti	Promjer (cm)
76	N 16	5.7.2016.	1	19,9
77	N 17	5.7.2016.	2	31,7
78	N 18	5.7.2016.	3	29,5
79	N 19	5.7.2016.	1	27,7
80	N 20	5.7.2016.	2	21,8

3.3.2. POCKET DIAGNOSTIC



Na temelju Pocket diagnostic testera određena je prisutnost patogena roda *Phytophthora* pomoću simptomatičnog biljnog tkiva. Na svim uzorcima pojavila se plava C i plava T linija koja potvrđuje prisutnost vrste roda *Phytophthora* (slika 20), iako na pojedinim uzorcima blijeđe boje.

Slika 20. Pocket diagnostic testeri, GJ Trstika

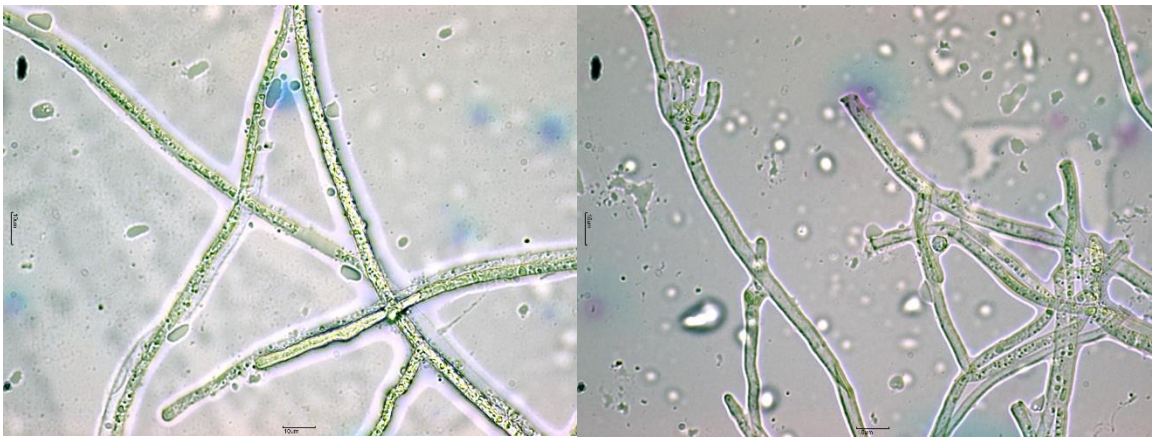
3.3.3. IZOLACIJA IZ LIŠĆA I INDUKCIJA SPORANGIJA

Izolacijom iz lišća, slično kao i u prethodnoj gospodarskoj jedinici, dobiveni su miceliji bijele boje. Pod mikroskopom su promatrane hife kako bi se odredilo jesu li hife neseptirane ili septirane (slika 21). U većini promatranih uzoraka bile su razvijene neseptirane hife (slika 22), što predstavlja važan korak u identifikaciji, s obzirom da su one prisutne kod pseudogljiva u koje spada i rod *Phytophthora*.

Tablica 8. Rezultati izolacije iz lišća, GJ Trstrika

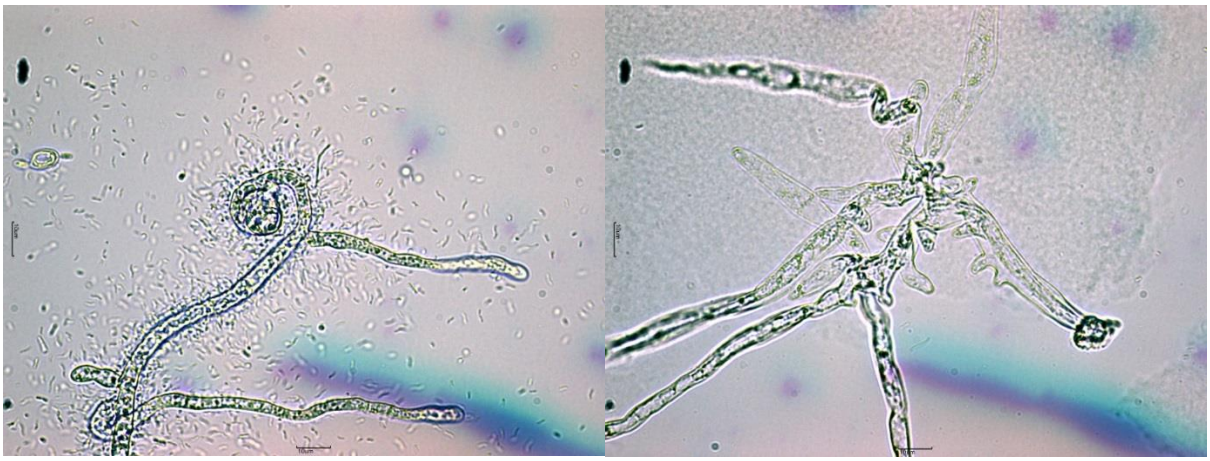
STABLO	NESEPTIRANE HIFE
76	+
77	-
78	+
79	+
80	+

Slika 21. Septirane hife



Slika 22. Neseptirane hife

S obzirom da na promatranim uzorcima hifa nije došlo do razvoja sporangija obavljena je njihova indukcija. Promatranjem pod mikroskopom uočene su tvorbe koje svojim oblikom nalikuju na oblik sporangija koje stvaraju vrste roda *Phytophthora* (slika 23.).



Slika 23. Prikaz tvorbi koje nalikuju na sporangije vrste roda *Phytophthora*, GJ Trstika

Radi lakšeg pregleda, prikaz sveukupnih rezultata istraživanja prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Prikaz sveukupnih rezultata

Stablo	Lokacija	GJ	Kategorija osutosti	Pocket D., plava T linija	Neseptirane/Septirane hife
4	Dugo Selo	Črnovščak	3	Da	
5	Dugo Selo	Črnovščak	1	Ne	
6	Dugo Selo	Črnovščak	3	Da	
7	Dugo Selo	Črnovščak	2	Da	
8	Dugo Selo	Črnovščak	1	Da	
46	Lipovljani	Josip Kozarac	2		Neseptirane hife
47	Lipovljani	Josip Kozarac	3		Neseptirane hife
48	Lipovljani	Josip Kozarac	3		Neseptirane hife
49	Lipovljani	Josip Kozarac	3		Neseptirane hife
50	Lipovljani	Josip Kozarac	2		Neseptirane hife
51	Lipovljani	Josip Kozarac	2	Ne	Neseptirane hife
52	Lipovljani	Josip Kozarac	1	Da	Neseptirane hife
53	Lipovljani	Josip Kozarac	3	Da	Neseptirane hife
54	Lipovljani	Josip Kozarac	1	Da	Septirane hife
55	Lipovljani	Josip Kozarac	3	Ne	Neseptirane hife
76	Novska	Trstika	1	Da	Septirane hife
77	Novska	Trstika	2	Da	Neseptirane hife
78	Novska	Trstika	3	Da	Neseptirane hife
79	Novska	Trstika	1	Da	Neseptirane hife
80	Novska	Trstika	2	Da	Neseptirane hife

4. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Osutost predstavlja postotak osutosti lišća ili iglica u odnosu na normalno razvijenu krošnju, odnosno manjak lišća ili iglica u odnosu na referentno stablo te se procjenjuje s preciznošću od 5% i razvrstava u stupnjeve osutosti. Razlikuju se lokalno i teoretski referentno stablo. Lokalno referentno stablo je najbolje stablo sa potpuno razvijenom krošnjom, koje se razvija pri lokalnim ekološkim uvjetima (nadmorska visina, strana svijeta, geografska širina, dob stabla, stanje sastojine, socijalni status stabla i dr.), dok je teoretski referentno stablo najbolje stablo te vrste drveća uzimajući u obzir sve stanišne uvjete, dob stabla i dr. Za razliku od osutosti, požutjelost predstavlja postotak lišća ili iglica koji je promijenio boju u odnosu na normalnu boju zdravih stabala. Ona se također procjenjuje s preciznošću od 5%, te razvrstava u stupnjeve požutjelosti. Važnost osutosti proizlazi iz činjenice da ona utječe na vitalnost stabla, a kao posljedica narušene vitalnosti nastupa propadanje i odumiranje stabla koje je kompleksne naravi i posljedica je abiotskih i biotskih čimbenika. Uz sve to, ukoliko su i klimatski čimbenici nepovoljni po domaćina, dolazi do sinergističkog učinka dodatnih negativnih čimbenika pri čemu stabla postaju podložna napadu različitih bolesti i štetnika. Dokaz tome su dosadašnja istraživanja koja pokazuju povezanost odumiranja korijenja uzrokovanih napadima *Phytophthora* vrsta i klimatskih čimbenika (Županić 2013).

Vrste roda *Phytophthora* spadaju u koljeno *Oomycota*, pseudogljive filogenetski bliže algama (Županić 2013), pa je sukladno tome potrebno koristiti posebne metode za njihovu izolaciju i/ili otkrivanje. Procjenjuje se da vrste roda *Phytophthora* uzrokuju oko 90 % truleži korijenja šumskog drveća. Međutim, nedostatak znanja o tome kako izolirati vrste roda *Phytophthora* često dovodi do negativnog rezultata, što rezultira da se drugi patogeni, kao što su *Fusarium, Pythium, Rhizoctonia* i nematode, često krivo smatraju uzročnicima truleži korijena i krošanja. Otkrivanje i/ili izolacija *Phytophthora* iz tkiva relativno je jednostavna i uspješna ako je tkivo svježe i nedavno zaraženo, s tim da je iz nekrotičnih tkiva vrste roda *Phytophthora* teško izolirati jer imaju slabe saprotrofske sposobnosti, te hlamidospore i oospore sporo i teško kliju. Stoga je ovu skupinu patogena općenito zahtjevno istraživati i često se moraju primjenjivati posebne metode.

Izolacija iz tla je teška, ali korištenje metode „mamljenja“ znatno povećava uspješnost njihove izolacije. Za mamljenje i izolaciju najbolje je uzimati uzorke sa stabala koja pokazuju početne simptome ili tla oko stabala koja se nalaze u neposrednoj blizini onih odumrlih, te uzorke s ruba aktivnih lezija (Drenth i Sendall 2001). Ova se metoda pokazala vrlo uspješnom u ovome

istraživanju, što pokazuje velik broj testera pozitivnih na prisustvo vrsta roda *Phytophthora* u postavljenima mamcima. Također, iako većina radova i dosadašnjih istraživanja preporučuju korištenje listova rododendrona kao mamaca, u ovome su istraživanju dobri rezultati postignuti korištenjem listova lovorvišnje te mladog lišća listopadnih vrsta (klen, jasen). Za utvrđivanje prisutnosti vrste roda *Phytophthora* u postavljenim mamcima korišten je tester Pocket diagnostic kojim se omogućuje vrlo jednostavan i praktičan rad na terenu u svim uvjetima. Također, rezultati su vidljivi u kratkom vremenskom roku te su pouzdani, a kao negativna strana testera može se navesti njihova visoka cijena.

S oko 124 opisane vrste roda *Phytophthora* oslanjanje na morfološke karakteristike pri identifikaciji predstavlja izazov čak i za iskusne istraživače. To posebno vrijedi za vrste gdje se morfološke karakteristike preklapaju ili uopće ne postoje unutarvrsne razlike u morfologiji. Na iste se probleme naišlo i tijekom ovog istraživanja, ne samo zbog međusobne međuvrsne sličnosti u morfologiji, već i nedostatka plodišta i/ili spora. Naime, velik broj vrsta uopće ne sporulira u laboratorijskim uvjetima, a za sporulaciju određenih vrsta su potrebni posebni uvjeti (selektivna hranjiva podloga, temperatura, svjetlost). Čak i nakon pokušaja indukcije razvoja sporangija rezultati nisu bili obećavajući. Napretkom molekularnih analiza, koje su skupe, ali brže i točnije, postiže se preciznija identifikacija. Najtočnija metoda molekularne analize za identifikaciju *Phytophthora* vrsta temelji se na DNA sekvenciranju (Kurt 2012). Prvo je potrebno ekstrahirati DNA iz čiste kulture vrste roda *Phytophthora* uz pomoć određenog kompleta za ekstrakciju DNA. Ekstrahirana DNA se u PCR uređaju amplificira, uz dodatak početnica (primera) (obično dva primera, npr. ITS1 i ITS4), enzima polimeraze (najčešće Taq polimeraza) i nukleotidnih trifosfata (dNTP). Produkt toga je PCR proizvod kojeg je potrebno pročistiti. Nepročišćeni ili pročišćeni PCR proizvod se šalje na sekvenciranje.

U ovom je istraživanju usporedbom svih podataka na tri lokacije kod većine stabala koja su lošeg i narušenog zdravstvenog stanja, odnosno čija se osutost krošanja nalazi između 26 – 99 %, odnosno u kategoriji značajne osutosti, prisutna plava T linija na testerima Pocket Diagnostic. Time je potvrđena prisutnost vrsta roda *Phytophthora* u simptomatičnom biljnom tkivu, odnosno zdravom biljnom tkivu koje je postavljeno na površinu plastične posude u kojoj se nalazilo 250 ml uzorkovanog tla zajedno sa sitnim korjenčićima poljskog jasena i 500 ml destilirane vode. Promatranjem pod mikroskopom kod tih uzoraka uočene su neseptirane hife koje su prisutne kod pseudogljiva, a indukcijom sporangija tvorbe koje nalikuju sporangijima roda *Phytophthora,* što ukazuje na mogućnost važnije uloge ovih patogena u

odumiranju poljskog jasena. Iako u Europi dosad vrste roda *Phytophthora* nisu u većoj mjeri istraživane na običnom i poljskom jasenu te se ne povezuju s njihovim odumiranjem, simptomi primijećeni na terenima obuhvaćenim ovim istraživanjem, kao i podaci laboratorijskih analiza upućuju na mogućnost sudjelovanja ovih patogenih gljivama sličnih organizama u sinergističkom djelovanju biotskih i abiotskih čimbenika koji dovode do odumiranja poljskog jasena u posavskim šumama Hrvatske. Propadanje poljskog jasena na području Europe prisutno je posljednjih 20 godina, a kao mogući uzročnik njegova propadanja navodi se *Hymenoscyphus fraxineus*. U nedavnim istraživanjima provedenim na običnom jasenu na području Danske i Poljske četiri vrste roda *Phytophthora* (*Phytophthora cactorum, P. plurivora, P.* taxon salixsoil te *P. gonapodyides,*) potvrđene su u uzorcima tla uzetih iz rizosfere, na korijenju te nekrotičnim lezijama na kori stabljike. Prve tri navedene vrste roda *Phytophthora* vrlo su agresivni patogeni na običnom jasenu, te je zaključeno kako bi glavni čimbenik odumiranja jasena te njegove predispozicije za infekciju *H. fraxineus* mogle biti upravo te vrste. Također, na temelju istraživanja koja su provedena u Turskoj utvrđeno je kako je *Phytophthora lacustis* glavni uzročnik propadanja običnog, ali i poljskog jasena koji je važna gospodarska vrsta u Turskoj.

Zadnjih nekoliko godina vrste roda *Phytophthora* predstavljaju poprilično prijetnju šumskom drveću i prirodnim ekosustavima europskih država. Smatra se da njihovom širenju pogoduje slaba kontrola transporta (uvoza/izvoza) sadnica, te da su izvori širenja upravo rasadnici (Brasier i Jung 2006). Također, glede specifičnog životnog ciklusa *Phytophthora* spp. koji se odvija u tlu, velika je vjerojatnost da se bolest ne prepozna, odnosno da se naseljavanjem sekundarnih patogena krivo determinira uzročnik odumiranja stabla (Pernek i dr. 2011). Iako još uvijek postoji veliki broj vrsta roda *Phytophthora* koje je potrebno otkriti primjenom adekvatnih karantenskih metoda i edukacijom javnosti potencijalna prijetnja za njihovom pojavom i širenjem smanjuje se i kontrolira.

LITERATURA

1. Bakran, Ž., Šušnjić, V., Pernek, M., 2009: Pojava pseudogljive *Phytophthora* sp. na Bilogori i njen utjecaj na sušenje bukve. 53. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska.

2. Balci, Y., Halmschlager, E., 2003: Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. Forest Pathology 33: 157 - 174.

3. Brasier, C. M., 1999: The role of Phytophthora pathogens in forests and semi-natural communities in Europe and Africa. Proceedings from the First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 6 – 13.

4. Brasier, C., Jung, T., 2006: Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. Proceedings of Third International IUFRO Working Party S07.02.09, Freising, Germany, 5 – 16.

5. Drenth, A., Sendall, B., 2001: Practical guide to detection and identification of Phytophthora. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia, 1 – 41.

6. Glavaš, M., 1996: Morfologija i razmnožavanje gljiva, Osnove šumarske fitopatologije, 16.-27., Zagreb

7. Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P., 1996: Isolation, identification and pathogenicity of Phytophthora species from declining oak stands. European Journal of Forest Pathology 26: 253 – 272.

8. Rays H. Y. Jiang, Brett M. Tyler, Stephen C. Whisson, Adrienne R. Hardham and Francine Govers, 2005: Ancient Origin of Elicitin Gene Clusters in Phytophthora Genomes. Molecular Biology and Evolution 23 (2): 338 – 351.

9. Lonsdale, D., 2003: Phytophthora disease of alder: sources of inoculum, infection and host colonisation. Phytophthora disease of alder in Europe, Forestry commission bulletin 126, Edinburgh, 65 – 72.

10. Nihlgard, B., 1985: The ammonium hypothesis – an additional explanation to the forest dieback in Europe. Ambio 14: 2 – 8.

11. Oβwald, W., Brummer, M, Fromm, J., Schlenzig, A., Koehl, J., Jung, T., Heiser, I., Matyssek, R., 1999: Investigation on photosynthesis of oak seedlings infected with Phytophthora quercina and characterization of the P.quercina toxin quercinin. Proceedings from the First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 67 – 70.

12. Pernek, M., Županić, M., Diminić, D., Cech, T., 2011: Vrste roda Phytophthora na bukvi i topolama u Hrvatskoj. Šumarski list 13 (poseban broj): 130-137.

13. Schmitz, S., Zini, J., Chandelier, A., 2009: Involvement of Phytophthora species in the decline of beech (*Fagus sylvatica*) in the southern part of Belgium. Proceedings of the Fourth Meeting of IUFRO Working Party S07.02.09., Monterey, California, 320 – 323.

14. Schmmithenner, A. F., Canaday, C. H., 1983: Role of chemical factors in development of *Phytophthora* diseases. Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 189 – 196.

15. Szabo, I., Lakatos, F., 2009: Occurrence and impact of Phytophthora species in forest trees in Hungary. Proceedings of the Fourth Meeting of IUFRO Working Party S07.02.09., Monterey, California, 331 – 333.

16. Thomas, F. M., Kiehne, U., 1995: The nitrogen status of oak stands in Northern Germany and its role in oak decline. Nutrient uptake and cycling in forest ecosystems, U. T. Academic Press, Netherlands, 671 – 676.

17. Themann, K., Werres, S., 1999: Baiting of *Phytophthora* sp. with the rhododendron leaf test. Proceedings from the First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Oregon, USA, 141 – 144.

18. Tomić, Ž., Vukadin, A., 2011: Venuće i sušenje drvenastog bilja – Phytophthora ramorum. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb, 1 – 24.

19. Webber, J., Gibbs, J., Hendry, S., 2004: Phytophthora disease of alder. Forestry Commission Information Note, 1 – 6.

20. Zare – Maivan, H., 1983: Root and mycorrhizal distribution of healthy and declining English oaks (*Quercus robur* L.) Master Thesis, Western Illinois University, USA.

21. Županić, M., 2004: *Phytophthora quercina*, nova gljivična bolest na hrastovima. 48. Seminar biljne zaštite, Opatija, Hrvatska.

22. Županić, M., 2013: Patogeni šumskog drveća iz roda *Phytophthora*, Izvješća znanstveno-istraživačkog rada za razdoblje 2011.-2013.,