

# GLASILO BILJNE ZAŠTITE

GODINA XIV

TRAVANJ - SVIBANJ

BROJ 3

Željko Tomić<sup>1</sup>, Dario Ivić<sup>1</sup>, Ivica Lovrinčević<sup>2</sup>, Borislav Levatić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski centar za poljoprivredu hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja

<sup>2</sup>Poljoprivredna savjetodavna služba

zeljko.tomic@hcphs.hr

## *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann – NOVI UZROČNIK BOLESTI SOJE U HRVATSKOJ

### SAŽETAK

U radu su navedeni prvi nalazi gljivicama sličnog organizma *Phytophthora sojae* u Hrvatskoj. Opisani su simptomi na soji, metode izolacije, osnovne morfološke karakteristike i načini identifikacije na osnovi morfoloških karakteristika i molekularnim tehnikama. Prikazane su štete izazvane napadom *P. sojae* na različitim lokalitetima u Hrvatskoj te navedene moguće mjere zaštite od tog opasnog uzročnika bolesti.

**Ključne riječi:** *Phytophthora sojae*, *Glycine max*, simptomi, metode izolacije

### UVOD

*Phytophthora sojae* prvi je put opisana kao uzročnik truleži korijena i stabljike soje - *Glycine max* (L.), 1958. godine u SAD-u (Kaufmann and Gerdemann, 1958). Jedan je od najopasnijih uzročnika bolesti soje na svijetu, a osobito velike štete izaziva u nekim državama SAD-a i Kanade. *P. sojae* svrstava se u tzv. monofagne parazite jer, iako može inficirati i lupinu (Jones and Johnson, 1969), soja je jedini domaćin na kojem su zabilježene štete. Prema dostupnim podacima (EPPO Global Data Base, 2013) u Europi je taj štetni organizam prisutan samo u Francuskoj, Italiji te u Rusiji i Ukrajini. Do 2006. godine *Phytophthora sojae* bila je na A1 Listi karantenskih štetočinja bilja, koje nisu utvrđene na teritoriju Republike Hrvatske (NN, 33/2001) pod nazivom *Phytophthora megasperma* Drechsler f.sp. *glycines* Kuan & Erwin. Zbog morfoloških sličnosti s *P. megasperma*, koja je identificirana u Hrvatskoj kao *Phytophthora megasperma* (Drechsler) var. *megasperma* na uljanoj repici (Cvjetković i sur., 1983), u prošlosti se *P. sojae* smatrala jednim od varijeteta te vrste (*Phytophthora megasperma* var. *sojae*), no molekularnim tehnikama nedvojbeno je dokazano da su to različite vrste (Erwin & Ribeiro, 2005).

U Hrvatskoj je *P. sojae* prvi put nađena 2006. godine u Slavoniji, a nakon toga i u drugim dijelovima zemlje. Najveće štete na soji zabilježene su u Posavini tijekom ljeta 2010. godine, kada su pale neuobičajeno velike količine oborina.

## MATERIJAL I METODE

Od 2006. do 2012. godine prikupljeno je ukupno 23 izolata pseudogljive *Phytophthora sojae* iz usjeva soje. U većini slučajeva za uzorak su se uzimale cijele biljke soje, s korijenom, na kojima su bili vidljivi karakteristični simptomi truleži na stabljici: tamno smeđa boja (čokoladno smeđa) donjega dijela stabljike, oštro odijeljena od zelenoga gornjeg dijela. S takvih je biljaka u laboratoriju, izolirana izravno na selektivnoj hranjivoj podlozi (P<sub>5</sub>ARP) *P. sojae*. Kod nekoliko izolata za uzorak se uzimalo tlo iz usjeva, a u laboratoriju je *P. sojae* izolirana metodom mamaca s pomoću listova soje. Izolacija i identifikacija štetnog organizma na osnovi morfoloških obilježja i molekularnim tehnikama obavljena je u laboratoriju za mikologiju HCPHS-Zavoda za zaštitu bilja.

### Hranjive podloge

Za izolaciju i identifikaciju korištene su sljedeće neselektivne i selektivne hranjive podloge:

- Carrot piece agar (CPA) – 50 g narezanih komadića mrkve i 22 g agara (Sigma-Aldrich, Select agar) u 1000 ml destilirane vode (Werres i sur., 2001b);
- Potato-Dextrose Agar (PDA);
- P<sub>5</sub>ARP Media – selektivna podloga za izolaciju *Phytophthora* vrsta (Erwin & Ribeiro, 2005).

### Metode izolacije

Za izravnu izolaciju *Phytophthora sojae* iz biljaka koristile su se CPA ili P<sub>5</sub>ARP hranjive podloge u koje su se stavljali komadi (3-4 po petrijevoj zdjelici) uzorkovanih dijelova stabljike. Stabljika je rezana dezinficiranim skalpelom na komade duge 5-10 mm, i to tako da jedan komad uvijek sadrži crtu između zdravog i bolesnoga (nekrotiziranoga) tkiva, a ostali komadi režu su u bolesnom tkivu.

Prethodna dezinfekcija odrezanih dijelova biljke potrebna je samo kad se koristi CPA, a ako se koristi selektivna podloga (P<sub>5</sub>ARP), dovoljno je samo dobro isprati vodom uzorkovane dijelove biljke. Dezinfekcija se obavlja 2 minute u otopini koja sadrži 0,037% aktivnog klora (Werres i sur., 2001 a), a potom se biljno tkivo dva puta po 5 minuta ispiru u demineraliziranoj vodi. Prije stavljanja na hranjivu podlogu oprani ili dezinficirani biljni dijelovi uvijek se moraju dobro osušiti između dva sterilna filtera papira.

Petrijeve zdjelice s biljnim dijelovima inkubirane su u komori, na 20 °C, u tami, a nakon dva do tri dana micelij *P. sojae* precijepjen je na CPA i PDA hranjive podloge radi identifikacije. PDA podloga korištena je isključivo za identifikaciju štetnog organizma (zbog specifičnog izgleda kolonije).

Za izolaciju iz tla korištena je metoda mamaca (bait test) s pomoću listova rododendrona (Themann and Werres, 2006), samo su umjesto rododendrona korišteni svježe ubrani, netretirani, listovi soje.

## Mjerenje sporangija i oospora

Komadi CPA hranjive podloge s izolatom *P. sojae* (veličine 30 x 30 mm) stavljeni su u staklenu petrijevu zdjelicu s izvorskom vodom (Jana, Cetina i sl.) i ostavljeni na sobnoj temperaturi, oko 20 °C. Sljedećega dana mjereno je 100 formiranih sporangija i izračunata prosječna veličina. Promjer oospora i anteridija mjereno je tako da se petrijeva zdjelica, s izolatom u CPA mediju, okrene s donje strane pod svjetlosni mikroskop (mjereno 100 oospora). Kao uzorak za mjerenje korišten je izolat PHSK1 iz Koške, što je prvi nalaz ovog patogena u RH.

## Identifikacija *P. sojae* molekularnim tehnikama

Za potvrdu identifikacije *P. sojae* lančanom reakcijom polimerazom (PCR) odabrano je sedam reprezentativnih izolata skupljenih na različitim lokacijama (PSNG, PSNG/2 – Nova Gradiška, PHSK1 – Koška, PSDM – Donji Marinkovac, PSOK – Okučani, PS/SPS – Staro Petrovo Selo i PSAGR – Zagreb, Agronomski fakultet). Kao negativna kontrola korišten je izolat *P. cinnamomi* CHR/PCN iz zbirke Zavoda. Izolati su uzgajani na PDA nekoliko tjedana, nakon čega je sterilnim skalpelom skupljen njihov micelij te usitnjen tekućim dušikom u tarionicima. Iz tako usitnjenog micelija ekstrahirana je ukupna DNA korištenjem kompleta DNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen GmbH, Njemačka) prema uputama proizvođača. Količina i čistoća ekstrahirane DNA provjerena je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Ekstrahirana DNA korištena je za PCR s početnicama PSOJF1 (5'-GCCTGCTCTGTGTGGCTGT-3') i PSOJR1 (5'-GGTTTAAAAAGTGGGCTCATGATC-3') prema protokolu Bienapfla i sur., (2011). Početnice PSOJF1 i PSOJR1 specifične su za vrstu *P. sojae* (Bienapfl i sur., 2011). Reakcijska smjesa za PCR ukupnog volumena 25 µl sastojala se od 12,5 µl GoTaq® Colorless Master Mix-a (Promega, SAD), 0,5 µM svake početnice i 5-15 ng ciljane DNA, a uvjeti za reakciju bili su 5 minuta na 94 °C, 35 ciklusa 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 66 °C, 30 sekundi na 72 °C te završno izduživanje 10 minuta na 72 °C. Produkti PCR reakcije podvrgnuti su elektroforezi u TBE puferu na 75 V kroz jedan sat, nakon čega su očitani na 1 % agaroznom gelu.

## Dokazivanje patogenosti

U dokazivanju patogenosti pseudogljive *P. sojae* prema Kochovim postulatima koristila se sljedeća metoda:

Zdrava zrna soje, dobre klijavosti, uz prethodnu površinsku dezinfekciju 2 do 5 minuta u 0,5 %-tnom natrijevom hipokloritu ili 96 % -tnom etanolu, posiju se, pojedinačno u male lončice (ili slične posude), u prethodno sterilizirani supstrat za cvijeće. Izolat *P. sojae* precijepi se na CPA hranjivu podlogu i nakon što micelij preraste petrijevu zdjelicu (Ø 90 mm), spreman je za umjetnu infekciju. Kada biljke dosegnu fazu prvih pravih listova obavlja se umjetna infekcija korijena zoosporama tako da se CPA hranjiva podloga s *Phytophthorom* skalpelom izreže na male komade (oko 1x1 cm), stavi u veću staklenu petrijevu zdjelicu s izvorskom vodom (dovoljno je da voda prekrije komade hranjive

podloge) i ostavi 24 sata ili dulje na 20 °C, da bi se formirali sporangiji. Nakon što se u vodi formiraju sporangiji (često i zoospore koje odmah izlaze iz zoosporangija), skine se površinski sloj supstrata u lončiću s biljkom soje toliko da se može vidjeti korijen te se sadržaj petrijevke ulije u lončić kraj korijena. Zatim se vrati uklonjeni dio supstrata u lončić koji se natopi izvorskom vodom tako da supstrat bude potpuno zasićen vodom 48 sati. Isti opisani postupak provodi se i s petrijevom zdjelicom u kojoj je samo hranjiva podloga, bez *P. sojae*, a takav lončić služi kao kontrola. Nakon pojave simptoma na umjetno zaraženoj biljci soje, reizolacija *Phytophthore* obavlja se na način opisan u metodama izolacije. Dokazivanje patogenosti obavljeno je u laboratoriju na sorti Ana s izolatom PHSK1.

## REZULTATI

*P. sojae* prvi put je dokazana kao uzročnik truleži korijena i stabljike soje u srpnju 2006. na području Koške pokraj Našica, u usjevu soje sorte Ika, koja je bila sijana na površini na kojoj je dijelom i prethodne godine sijana soja. Na tom dijelu parcele uočeno je jako propadanje soje, masovno sušenje biljaka i intenzivno žućenje i venuće listova (slika 1.). Žućenje listova bilo je posljedica truleži korijenova sustava izazvanog napadom gljive *P. sojae* jer se na tim biljkama, zbog dugotrajne suše, bolest najčešće nije proširila u stabljiku. Prema



Slika 1. Simptomi napada *P. sojae*, Koška 2006.g.  
(snimio Ž.Tomić)

našoj procjeni više od 40% biljaka bilo je potpuno uništeno. Na dijelu iste parcele, gdje je pretkultura bio kukuruz (na slici 1. lijevo), šteta je bila zanemariva.

Za izolaciju uzročnika bolesti iz tla korištena je metoda mamaca spomoću listova soje. Izravna izolacija iz stabljike nije se mogla obaviti jer je većina biljaka sa zaraženom stabljikom bila suha.

Od 2006. do 2012. godine prikupljeno je ukupno 23 izolata pseudogljive *Phytophthora sojae* iz usjeva soje na ovim lokalitetima: Dautan, Donji Marinkovac, Dragalić, Koška, Mala Pisanica, Nova Gradiška, Okučani, Prvča, Staro Petrovo Selo, Zagreb – Maksimir, Županja. Većina uzoraka (13) uzeta je iz usjeva na području Nove Gradiške (Okučani, Dragalić, Prvča, Nova Gradiška, Staro Petrovo Selo) i Županje (4). Čak 16 od 23 izolata prikupljeno je tijekom srpnja 2010. godine kad je pala velika količina kiše pa se voda dugo zadržavala u usjevima soje, osobito u Posavini.

## Simptomi bolesti

Najprepoznatljiviji simptom bolesti jest trulež stabljike. Iako parazit napada soju od sjetve do zriobe i napada sve biljne dijelove: korijen, stabljiku, listove, mahune i zrno, samo je tamno smeđa boja donjega dijela stabljike, oštro odijeljena od zdravoga (zelenoga) tkiva, karakterističan znak te bolesti (slika 2.). Taj se simptom razvija najčešće tijekom srpnja, nakon lipanjskih kiša (u nas često obilnih), kada se obično ostvari zaraza korijena, iz kojega se *P. sojae*, u povoljnim uvjetima, brzo širi u stabljiku.

Dugotrajno zadržavanje vode u usjevu, na nepropusnim tlima i u vrijeme poplava zbog obilnih kiša, omogućava gljivicama iz roda *Phytophthora* i izravno zarazu stabljike zoosporama, bez napada na korijen. U tom slučaju razvija se opisana trulež stabljike, a korijen ostaje zdrav, što nije tipičan simptom, ali je nerijetko bio prisutan u usjevima soje u Posavini tijekom srpnja poplavne 2010. godine.



Slika 2. Tipični simptom napada *P. sojae* s oštro odijeljenim bolesnim i zdravim dijelom stabljike (snimio Ž.Tomić)

Primarna zaraza soje s *P. sojae*

otvara mogućnost sekundarne infekcije najčešće *Fusarium* i *Phomopsis* vrstama pa se, u kasnijoj fazi, često događa da se vide simptomi primarne infekcije s *P. sojae* 20 – 25 cm visoko na stabljici i bijeli micelij (*Fusarium*) ili piknidi gljivice (*Phomopsis*), 5-10 cm niže (slika na naslovnici).

Znakovi zaraze u usjevima soje ovise o stupnju infekcije i vide se najčešće kao sušenje, nekoliko ili više biljaka u redu. Ako je zaraza jaka vidi se masovno sušenje i venuće biljaka, uvijek jače izraženo na dijelovima parcele na kojima se dulje zadržava voda, često praćeno intenzivnim rastom korova. Sušenje biljaka u redu mogu izazvati i neki drugi uzročnici bolesti, najčešće *Rhizoctonia solani*, pa određivanje uzročnika katkad može biti otežano (poglavito kad se biljke potpuno osuše). Kod zaraze s *R. solani* simptomi truleži na stabljici soje jesu crvenkasto-smeđe boje i, ako biljka nije potpuno suha, lako se razlikuju od simptoma nastalih zarazom s *P. sojae*.

Tijekom provedenog istraživanja, u nekoliko slučajeva, zamijetili smo da se u ranoj fazi razvoja soje, zbog prisutnosti dovoljno vode u tlu, ostvari zaraza korijena i razvija trulež, ali se u kasnijoj fazi, zbog suše, trulež ne širi u stabljiku. Korijen većim dijelom biva uništen pa se javlja žućenje listova i prijevremena zrioba, što uzrokuje veće ili manje gubitke uroda. Na korijenu se formiraju oospore *P. sojae*, što se lako vidi pod mikroskopom, ali je, zbog često prisutnih *Pythium* vrsta, moguća pogreška u određivanju uzročnika truleži. U takvim je slučajevima najsigurnija izolacija uzročnika metodom mamaca s pomoću listova soje, jer je direktna izolacija s korijena na selektivnom mediju

(P<sub>5</sub>ARP) otežana zbog brzorastućih *Pythium* vrsta, koje lako prerastu *Phytophthora* vrste.

### Morfološke karakteristike pseudogljive *P. sojae*

*P. sojae* je homotalična (samooplodna) vrsta, što znači da osim vegetativnog (nespolnog) načina razmnažanja sporangijima, koje obilno stvara na hifama u vodi, ima i spolni stadij u kojem formira trajne spore – oospore, koje služe za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i širenje patogena na veće udaljenosti. Katkad je gotovo nemoguće određivanje vrste roda *Phytophthora* bez korištenja raznih molekularnih tehnika. Međutim, zbog prepoznatljivih simptoma koje izaziva na soji, optimalnih temperatura rasta, „monofagnosti“ i izgleda kolonija na PDA hranjivoj podlozi, izmjerom osnovnih morfoloških karakteristika moguće je identificirati *P. sojae*.

Rezultati mjerenja sporangija, oospora i nabreklina hifa:

- Sporangiji su najčešće elipsoidni ili jajoliki (slika 5.), bez papile i čvrsto se drže na sporangioforu (hifi). Mogu biti jako veliki, a dužina x širina jako im variraju: 45-91 x 28-51 μm. Formiraju se simpodijalno na hifama ili unutarnjom i vanjskom proliferacijom. U hranjivoj podlozi (CPA) stvaraju se iznimno rijetko. Kao i većina ostalih *Phytophthora* vrsta *P. sojae* obilno sporulira kada se komad hranjive podloge s micelijem stavi u izvorsku vodu.

- Spolni stadij, tj. formiranje oospora, u prirodi se događa u zaraženim biljnim organima, a u laboratorijskim uvjetima CPA podloga idealna je za tu namjenu. Oogoniji su najčešće sferični, glatki, 28-45 μm u promjeru. Oospore su plerotične (gotovo potpuno ispunjavaju oogonij), ili aplerotične, 20-39 μm u promjeru, s relativno debelom stijenkom oko 2,5 μm. Anteridiji su pretežno paragini (slika 6.), rjeđe amfigini, prosječne veličine 10-18 x 8-15 μm.

Izgled i veličina nabreklina hifa (hyphal swellings) jedno je od morfoloških obilježja važnih za točnu identifikaciju vrste roda *Phytophthora*. Kod izolata PHSK1 nabreklina hifa bile su najčešće interkalarne, okruglog oblika, lančano poredane na hifama ili solitarne, promjera 22 - 47 μm. Formirale su se isključivo u vodi. (slika 7.)



Slika 5. *P. sojae*; sporangij – unutarnja proliferacija (snimio Ž.Tomić)



Slika 6. *P. sojae*; oogonij s oosporom i paraginim anteridijem (snimio Ž.Tomić)



Slika 7. Nabreklina hifa *P. sojae* u vodi (snimio Ž.Tomić)

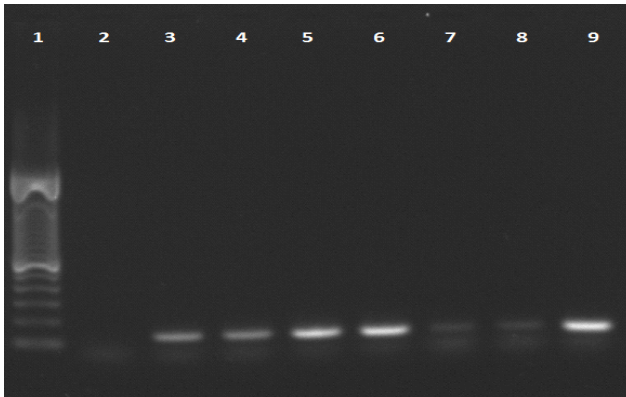


Optimalna temperatura za rast micelija *P. sojae* jest 20 – 25 ili 28 °C (Erwin & Ribeiro, 2005). Karakteristično je da vrlo sporo raste na PDA mediju pri 20 °C, po čemu se razlikuje od *Phytophthora megasperma* kojoj je slična.

Sva morfološka obilježja izolata PHSK1 odgovarala su obilježjima navedenim za *P. sojae* u literaturi (Stamps i sur.; 1990; Erwin & Ribeiro, 2005; Gallegly & Hong, 2008).

### Potvrda identifikacije molekularnim tehnikama

Lančanom reakcijom polimerazom potvrđena je identifikacija vrste *P. sojae* u Hrvatskoj. Svih sedam analiziranih izolata determiniranih kao *P. sojae* na temelju morfologije dalo je pozitivnu reakciju (slika 8.). U kontrolnom izolatu *P. cinnamomi* nije zabilježen vidljivi produkt.



Slika 8. Rezultati umnožavanja *Phytophthora* izolata PCR reakcijom uz korištenje para početnica PSOJF1/PSOJR1: linija 1 – 100 bp ljestvica; linija 2 – *P. cinnamomi* CHR/PCN; linije 3 do 9 – *P. sojae* PSNG, *P. sojae* PSNG2, *P. sojae* PHSK1, *P. sojae* PSDM, *P. sojae* PSOK, *P. sojae* PS/SPS i *P. sojae* PSAGR (snimio D. Ivić)

### Dokazivanje patogenosti

Patogenost izolata PHSK1 dokazana je u laboratoriju. Simptomi venuća i truleži korijena na sorti Ana pojavili se već nakon 3 dana, a 8 dana nakon umjetne infekcije zaražene su biljke potpuno propale. Na kontrolnom lončiću nije bilo simptoma bolesti (slika 9.). Reizolacijom iz stabljike sa simptomima venuća u (P<sub>5</sub>ARP) mediju, dobivena je *Phytophthora sojae*.



Slika 9. Umjetna infekcija; *P. sojae* – lijevo, kontrolni lončić – desno (snimio Ž. Tomić)

Za uspješnu umjetnu infekciju mora se koristiti osjetljiva sorta, što za gljivicu *P. sojae* ne mora uvijek biti jednostavno zbog postojanja velikog broja fizioloških rasa.

Pokusima u laboratoriju HCPHS – Zavoda za zaštitu bilja utvrđeno je da je svega 6-8 sati dovoljno za stvaranje primarnih sporangija u vodi, ostvarenje zaraze korijena soje i formiranje sekundarnih sporangija na njemu, što *P. sojae* svrstava u najgresivnije vrste roda *Phytophthora*.

## RASPRAVA

Nakon višegodišnjeg istraživanja raširenosti i štetnosti *P. sojae* u našoj zemlji, možemo zaključiti da je, iako je bila na karantenskoj listi, kod nas prisutna dulji niz godina. To proizlazi iz činjenice da je na nekim područjima (Brodsko – posavska, Vukovarsko - srijemska i Bjelovarsko – bilogorska županija) ovaj patogeni organizam jako raširen, za što je sigurno bilo potrebno duže vrijeme. Tijekom godina sa suhim proljećem i ljetom, simptomi ostaje nezamijećeni u usjevima soje (na pojedinačnim biljkama), a u godinama s dosta oborina na zaraženim površinama vide se drastične posljedice napada, tada su moguća propadanja više od 50% biljaka u usjevu. U dosadašnjem istraživanju (2006. – 2012.) *P. sojae* u Hrvatskoj, nismo naišli na drastične štete u fazi klijanja i nicanja. Razlog tomu su nepovoljni uvjeti za razvoj bolesti (niže temperature ili nedostatak oborina) u početnoj vegetativnoj fazi razvoja soje. Inenzitet napada *Phytophthora sojae* i štete koje nastaju u usjevu soje, direktno su povezani s otpornosti sorte na prisutnu fiziološku rasu. Osim toga, naravno, ovise i o



Slika 10. Sortni pokus soje, lijevo osjetljiva sorta (snimio Ž. Tomić)

količini oborina, inokulumu u tlu, propusnosti tla za vodu i temperaturama u trenutku ostvarenja zaraze. I u najidealnijim uvjetima za infekciju (2010.god), kad smo na osjetljivim sortama soje registrirali štete veće od 50%, na otpornim su bile zanemarive. S druge strane, na osjetljivijoj sorti, na tlu gdje se voda ne zadržava, štete mogu biti minimalne.

Iako u našoj zemlji ne postoje podaci o fiziološkim rasama *P. sojae*, u našem smo istraživanju više puta registrirali različitu osjetljivost sorti soje na napad ove pseudogljivice. Na istoj površini različite sorte soje različito su reagirale na prisutnu rasu *P. sojae*. Često su te razlike bile vrlo velike (slika 10.).

Određivanje *Phytophthora* vrsta molekularnim tehnikama danas se temelji na sekvenciranju različitih dijelova genoma ovih pseudogljivica ili na korištenju početnica



specifičnih za vrstu. Početnice specifične za vrstu potrebno je pažljivo odabrati iz razloga što su mnoge od njih razvijene u doba kada je bio opisan znatno manji broj *Phytophthora* vrsta nego danas. Početnice starijeg datuma tako danas mogu zapravo dati pozitivan rezultat za kompleks srodnih *Phytophthora* vrsta ili pokazivati unakrsnu reakciju s novo opisanim vrstama iz tog roda. Osim para početnica korištenih u ovom istraživanju, za detekciju *P. sojae* razvijen je i par početnica PS1 i PS2 – (Wang i sur., 2006), no za njih je utvrđeno da pri nižim temperaturama nalijeganja daju pozitivan rezultat i za *P. cinnamomi*, *P. parasitica* i *P. cactorum*, dok na višim daju negativan rezultat za *P. sojae* (Bienapfl i sur., 2011). Par početnica PSOJF1 i PSOJR1, korišten u ovom istraživanju, razvijen je relativno nedavno i ne daje unakrsnu reakciju s *Phytophthora* vrstama koje bi se često mogle naći u tlu ili eventualno biti prisutne zajedno s *P. sojae*. Prema rezultatima Bienapfla i sur., (2011), ovaj par početnica također ne daje unakrsnu reakciju s ostalim gljivičnim i pseudogljivičnim parazitima soje kao što su *R. solani*, *Phialophora gregata*, *Phomopsis sojae*, *P. longicolla*, *Fusarium virguliforme* ili *Aphanomyces euteiches*, što ga čini prikladnim za ranu i pouzdanu detekciju *P. sojae* u tlu ili direktno u biljnom tkivu. Ovaj par početnica u nekim državama SAD-a počeo se koristiti u svrhu monitoringa prisutnosti *P. sojae* u tlu, prvenstveno zbog praktičnosti i brzine u usporedbi s klasičnim tehnikama mamaca.

## SUZBIJANJE

- Sjetva otpornih sorti osnovna je mjera suzbijanja ovog štetnog organizma (Sweets i sur., 2008), no za primjenu takve mjere potrebno je poznavati raširenost pojedinih rasa na područjima uzgoja soje u nekoj državi i reakcije sorti na njih. Postoje dva tipa genetske otpornosti kod sorti soje (Dorrance & Mills, 2009): otpornost specifična za pojedinu fiziološku rasu ili rase *P. sojae*, a kontroliraju je *Rps* geni i tzv. parcijalna otpornost, koja se odnosi na sve rase gljivice *P. sojae*, ali nije potpuna pa se, iako u slabijem intenzitetu, bolest može pojaviti u usjevu. Kako je pojava novih rasa relativno česta, u SAD se najboljim rješenjem pokazala sjetva sorti s kombinacijom ovih dvaju tipova otpornosti.
- Obrada i drenaža tla. Najveće štete od gljivice *P. sojae* događaju se na površinama gdje se ne provodi klasična obrada tla (no-till fields), jer se na takvim tlama voda dulje zadržava (Iowa State University Extension, 2010). Odvodnja vode (dreniranje) i prozračivanje tla obradom, znatno smanjuju mogućnost zaraze u usjevu soje.
- Sjetva u toplo (>16 °C) i plodno tlo, izbjegavanje preduboke sjetve i prevelike količine sjemena (University of Illinois Extension, 2000).
- Plodored. Iako je od manje važnosti, jer oospore mogu preživjeti u zaraženom tlu dugi niz godina, rotacija različitih kultura koje nisu domaćini *P. sojae* ipak smanjuje infektivni potencijal.
- Tretiranje sjemena i/ili tla. U Hrvatskoj nemamo registriranih fungicida za tu namjenu, ali se u svijetu (poglavito u SAD-u), ta metoda često

koristi, jer štiti mlade biljčice soje u najosjetljivijoj fazi razvoja. Većinom se koriste pripravci na osnovi metalaksila (iz skupine fenilamida) Tretiranje tla u sjetvi obavlja se najčešće samo kad se soja sije u široke redove, jer inače nije isplativo, a rezultati su odlični (Draper & Chase, 2001).

## Znanstveni rad

### SUMMARY

*Phytophthora sojae* is one of the most destructive pathogens of soybean in the world. First findings of this fungus-like organism in Croatia are described in this paper. Methods of isolation and identification on the basis of morphological features and molecular technique are presented. Disease symptoms and losses on soybean caused by *P. sojae* on various locations in Croatia are described.

**Key words:** *Phytophthora sojae*, *Glycine max*, symptoms, methods of isolation

### LITERATURA

**Bienapfl J.C., Malvick D.K., Percich J.A.** (2011). Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. *Fungal Biology*, Vol. 115, 733-740.

**Cvjetković B., Kišpatić J., Milatović I.** (1983). Morfološke i kulturalne karakteristike *Phytophthora megasperma* (Dresler) var. *megasperma*, novog parazita uljane repice u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, XXXIV (4): 166, 483-491.

**Dorrance, A.E. & Mills, D.** (2009). *Phytophthora* damping off and root rot of soybean. Fact Sheet, Agriculture and Natural Resources, Ohio State University Extension.

**Draper, M.A. & Chase, T.** (2001). *Phytophthora* root rot and stem rot (PPR) of soybean. South Dakota Extension Fact Sheet 902 – B, South Dakota State University.

**Erwin, D.C., & Ribeiro, O.K.** (2005). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, St Paul, MN, U.S.A., second printing.

**Gallegly, M. E. & Hong, C.** (2008). *Phytophthora* – Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. APS Press, American Phytopathological Society, St Paul, MN, U.S.A.

**Iowa State University Extension**, (2010). Soybean diseases. Iowa State University of Science and Technology.

**Jones, J.P. and Johnson, H.W.** (1969). Lupine, a new host for *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 5, 504-507.

**Kaufmann, M.J. and Gerdemann, J.W.** (1958). Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. *Phytopathology* 48, 201-208.

**Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.G. and Hall, G.S.** (1990). revised Tabular key to the species of *Phytophthora*, *Mycological Papers*, No. 162, CAB IMI.

**Sweets, L.E., Wrather, A., Wright, S.** (2008). Integrated pest management, Soybean Diseases. Plant Protections Programs, University of Missouri Extension.

**Themann, K. & Werres, S.** (2006). Guidelines for the handling of the *Rhododendron* leaf test to detect *Phytophthora* spp. In root, soil and water samples. [www.bba.de/phytoph/diagn\\_r.htm](http://www.bba.de/phytoph/diagn_r.htm)

.....  
**University of Illinois Extension**, (2000). Management of *Phytophthora* root and stem rot of soybeans. Report on plant disease RPD No. 510, Department of crop sciences.

**Werres, S., Marwitz, R., Poersche, U., Themann, K.** (2001a). A long-term study of *Phytophthora* species in Germany. I - *Phytophthora* species which could be definitely identified. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108 (2), 113-120.

**Werres, S., Marwitz, R., Man in't veld, W.A., De Cock, A.W.A.M., Bonants, P.J.M., De Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E., and Baayen, R.P.** (2001b). *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological research* 105 (10), 1155-1165.

**Korištene internet stranice:**

EPPO Global Data Base <http://gd3.eppo.int/organism.php/PHYTMS> , pristupljeno 22.1.2013.

Narodne novine. [www.nn.hr/Default.aspx](http://www.nn.hr/Default.aspx) , pristupljeno 22.1.2013.