

.....

**Željko TOMIĆ, Dario IVIĆ**

Hrvatski centar za poljoprivredu hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja  
zeljko.tomic@hcphs.hr

***Phytophthora chrysanthemi* Naher, Motohash, Watanabe,  
Chikuo, Senda, Suga, Brasier & Kageyama - NOVI UZROČNIK  
BOLESTI KRIZANTEMA U HRVATSKOJ**

SAŽETAK

*Phytophthora chrysanthemi* - novi uzročnik truleži korijena i baze stabljike krizanteme, nađen je na više lokacija u Hrvatskoj tijekom 2008. i 2009. godine. U radu su opisani simptomi bolesti, metode izolacije toga gljivicama sličnog organizma te načini identifikacije na osnovi morfoloških karakteristika i molekularnim tehnikama. Prikazane su štete izazvane napadom *P. chrysanthemi* u plastenicima i na otvorenom te navedene moguće mjere zaštite.

**Ključne riječi:** *Phytophthora chrysanthemi*, krizantema, simptomi, metode izolacije

UVOD

*Phytophthora* vrste najvažniji su uzročnici truleži korijena biljaka. Dosad je poznato više od 120 vrsta tih gljivicama sličnih organizama, koji uzrokuju sušenja - povrća, industrijskog bilja i voćaka pa do ukrasnog bilja i stabala u šumama. Neke od *Phytophthora* vrsta izrazito su polifagne, npr. *P. cinnamomi*, koja napada više od tisuću različitih biljnih vrsta, a neke su monofagne, opasne samo za pojedinu vrstu (*P. rubi* – malina, *P. sojae* – soja itd.). Iako je trulež korijena ukrasnog bilja uzrokovana *Phytophthora* vrstama vrlo česta pojava, taj se tip bolesti krizanteme uglavnom povezuje s *Pythium* i *Rhizoctonia* vrstama (Anonymus, 1997). Tijekom fitosanitarnih pregleda presadnica krizantema u 2008. i 2009. godini zamijećena je pojava truleži korijena i donjeg dijela stabljike na pet lokaliteta. Iz svih bolesnih biljaka izoliran je isti uzročnik, a na osnovi morfoloških karakteristika te molekularnom analizom, određena je vrsta – *Phytophthora chrysanthemi*. Ta je vrsta novi patogen na krizantemi, prvi put nađena u Japanu (Naher *et al*, 2011). U dostupnim podacima iz literature, nema objavljenih drugih nalaza tog uzročnika bolesti, stoga izolati *P. chrysanthemi* s krizantema u Hrvatskoj predstavljaju i prvi nalaz u Europi.

MATERIJAL I METODE

Tijekom 2008. i 2009. godine prikupljeno je ukupno pet izolata pseudogljivice *Phytophthora chrysanthemi* iz krizantema sa simptomima truleži korijena i baze stabljike, na ovim lokacijama: Ribnik (Karlovac), Jakovlje, Kloštar Ivanić, Stružec (Popovača) i Pula. Za uzorak su uzimane cijele biljke krizanteme, s korijenom, na kojima su bili vidljivi karakteristični simptomi truleži korijena i

.....

donjeg dijela stabljike - tamno smeđe boje, oštro odijeljeni od zelenoga gornjega dijela. S takvih je biljaka *P. chrysanthemi* izolirana izravno na selektivnoj hranjivoj podlozi (P<sub>5</sub>ARP). Ta podloga sadrži antibiotike koji sprječavaju rast gljivica, a *Phytophthora* i *Phythium* vrste na njoj nesmetano rastu. Osim bolesnih biljaka, za uzorak se uzimalo i tlo u zoni korijena iz kojeg je, u laboratoriju, *P. chrysanthemi* izolirana metodom mamaca s pomoću listova krizanteme.

Izolacija i identifikacija štetnog organizma na osnovi morfoloških obilježja i molekularnim tehnikama, obavljena je u laboratoriju za mikologiju HCPHS-Zavoda za zaštitu bilja.

Za izolaciju i identifikaciju korištene su ove 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 *et al.* 2001a)
- Potato-Dextrose Agar (PDA)
- P<sub>5</sub>ARP Media – selektivna podloga za izolaciju *Phytophthora* vrsta (Erwin & Ribeiro, 2005)
- V8 – agar (Erwin & Ribeiro, 2005)

## Metode izolacije

Za izravnu izolaciju *Phytophthora chrysanthemi* iz biljaka koristila se P<sub>5</sub>ARP hranjiva podloga, u koju su stavljani komadi (3-4 po Petrijevoj zdjelici) uzorkovanih donjih dijelova stabljike i truloga korijena. Stabljika je rezana dezinficiranim skalpelom na komade duljine 5-10 mm i to tako da jedan komad uvijek sadrži crtu između zdravoga i bolesnoga (nekrotiziranoga) tkiva, a ostali komadi režu su u bolesnome tkivu. Dijelovi truloga korijena također su rezani skalpelom na komade duljine 5-10 mm i sterilnom pincetom stavljani u selektivnu hranjivu podlogu. 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 u otopini koja sadrži 0,037 % aktivnog klora (Werres *et al.* 2001 a) 2 min., nakon čega se biljno tkivo dva puta po 5 min. ispiru u destiliranoj vodi. Prije stavljanja na hranjivu podlogu oprani ili dezinficirani biljni dijelovi, uvijek se moraju dobro osušiti između dva sterilna filter papira. Petrijeve zdjelice s biljnim dijelovima inkubirane su u komori, na 20 °C, u tami. Nakon dva do tri dana micelij je precijepljen na CPA i PDA hranjive podloge radi identifikacije.

Za izolaciju iz truloga korijena i tla prikladnija je tzv. metoda mamaca (Themann & Werres, 2006), a kao mamac (umjesto rododendrona) koriste se svježe ubrani, netretirani, listovi krizanteme. Obično se *P. chrysanthemi* najprije „ulovi“ na peteljku lista.

## Mjerenje sporangija i oospora

Komadi V8 hranjive podloge s izolatom *P. chrysanthemi* (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. Idućega dana mjereno je 50 formiranih sporangija i izračunata je 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 50 oospora). Kao uzorak za mjerenje korišten je izolat *P. chrysanthemi* iz Ribnika koji predstavlja prvi nalaz toga patogena u Hrvatskoj.

## Identifikacija *P. chrysanthemi* molekularnim tehnikama

Radi potvrde identifikacije na osnovi morfoloških obilježja obavljena je identifikacija reprezentativnog izolata PH 11/CHR (Ribnik) sekvenciranjem ITS1, 5.8S rRNA i ITS2 regije i analizom sekvencije. Ukupna DNA ekstrahirana je iz micelija kulture uzgajane na PDA korištenjem kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen Inc., SAD) prema uputama proizvođača. Približno 5 µl razrijeđene ekstrahirane DNA korišteno je u 50 µl PCR reakciji s parom početnica ITS1 i ITS4 (White *et al.* 1990), 5 µl 10 x PCR pufera, 1 µl 2,5 mM dNTP-a, 1,5 µl 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> i 1 U Taq polimeraze. Uvjeti za reakciju bili su 94 °C 5 minuta, 30 ciklusa 94 °C 30 sekundi, 55 °C 30 sekundi i 72 °C 30 sekundi, sa završnim izduživanjem na 72 °C 7 minuta. Dobiveni PCR produkt pročišćen je korištenjem kompleta GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, SAD) i sekvenciran u Macrogen Inc., Nizozemska. Sekvencije su analizirane i uspoređene s referentnim sekvencijama iz GenBank baze korištenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0. (Hall, 1999).

## Dokazivanje patogenosti

Da bi se dokazala patogenost pseudogljive *P. chrysanthemi* prema Kochovim postulatima, korištena je ova metoda:

- dvije zdrave presadnice krizanteme posađene su pojedinačno u nove plastične lončice, u prethodno sterilizirani supstrat za cvijeće. Izolat *P. chrysanthemi* precijepljen je na CPA hranjivu podlogu i nakon što je micelij prerastao Petrijevu zdjelicu (Ø 90 mm), bio je spreman za umjetnu infekciju. Budući da je osnovni simptom bolesti trulež korijena i donjega dijela stabljike, obavljena je umjetna infekcija korijena zoosporama i to tako da je CPA podloga s izolatom skalpelom izrezana na male komade (oko 10 x 10 mm), stavljena u veću staklenu Petrijevu zdjelicu s izvorskom vodom (dovoljno je da voda prekrije komade hranjive podloge) i ostavljena 24 sata (ako je potrebno i dulje) na 20 °C, da bi se formirali sporangiji. Nakon što su se u vodi formirali sporangiji (često i zoospore odmah izlaze), uklonjen je površinski sloj supstrata u lončiću s biljkom krizanteme toliko da se može vidjeti korijen te je sadržaj petrijevke uliven u lončić kraj korijena. Zatim se vratio uklonjeni dio supstrata u

lončić, koji je nakon toga natopljen izvorskom vodom, tako da supstrat bude potpuno zasićen najmanje 48 sati.

Isti postupak obavio se i s Petrijevom zdjelicom u kojoj je samo CPA hranjiva podloga, bez *P. chrysanthemi*, a takav lončić služio je kao kontrola.

Nakon pojave simptoma na umjetno zaraženoj biljci krizanteme, reizolacija je obavljena na način opisan u metodama izolacije. Dokazivanje patogenosti obavljeno je u laboratoriju na nepoznatoj sorti krizanteme s izolatom *P. chrysanthemi* iz Ribnika.

## REZULTATI

*P. chrysanthemi* prvi put je izolirana u rujnu 2008. iz trulog korijena i stabljike krizanteme s područja Ribnika, u blizini Karlovca. Tijekom fitosanitarnog pregleda zamijećeno je zaostajanje u rastu i propadanje u dijelu tzv. „tunela“ za proizvodnju rezanih krizantema (slika 1.), a nakon izvlačenja bolesnih biljaka iz tla, uočeni su simptomi truleži korijena i baze stabljike karakteristični za *Phytophthora* vrste (slika 2.). Zaražene biljke bile su višestruko kraće od zdravih, sivkasto-zelene boje, najčešće koncentrirane u dijelu „tunela“ gdje se zadržavala voda. Donji dio stabljike poprimio je tamno smeđu boju i bio je oštro ograničen od zdravoga dijela (obilježeno strjelicom na slici 2.).



**Slika 1.** Karakteristični simptomi venuća *P. chrysanthemi* (snimio Ž. Tomić)



**Slika 2.** Bolesne krizanteme u „tunelu“, Ribnik, 2008. (snimio Ž. Tomić)

Nakon prvoga nalaza slijedila su i ostala tri nalaza tijekom 2008. (Kloštar Ivanić, Pula, Stružec) te jedan u 2009. godini (Jakovlje). Simptomi su bili vrlo slični, većinom su se uočavali u plastenicima za proizvodnju rezanih krizantema, u klasičnim plastenicima ili u „tunelima“ prekrivenim plastičnom folijom i to u dijelovima gdje se zadržavala voda. U Stružecu, kraj Popovače, *P.*

*chrysanthem*i izolirana je iz propale krizanteme - multiflore u polju (slika 3.), a u Puli je izolirana iz lončanice u plasteniku sa simptomima venuća (slika 4.).



**Slika 3.** Sušenje multiflore, Stružec, 2008. (snimio Ž. Tomić)



**Slika 4.** Propadanje krizanteme lončanice, Pula, 2008. (snimio Ž. Tomić)

Na svim zaraženim biljkama vidjeli su se simptomi reduciranog rasta, jake truleži korijena i posmeđenja donjega dijela stabljike (slika 5. i 6.)



**Slika 5.** Trulež korijena i korienovog vrata na krizantemi iz lončanica, Pula, 2008. (snimio Ž. Tomić)



**Slika 6.** Trulež korijena i donjeg dijela stabljike – proizvodnja rezane krizanteme u plasteniku, Jakovlje, 2009. (snimio Ž. Tomić)

Opisani simptomi lako se mogu zamijeniti simptomima uzrokovanim napadom *Pythium* vrsta (najčešće *P. aphanidermatum*), koje su često prisutne na korijenu i, zbog brzog rasta na hranjivoj podlozi, mogu stvarati probleme pri izolaciji *P. chrysanthem*i .

Nakon izolacije iste, tada potpuno nepoznate, *Phytophthora* vrste sa svih pet lokaliteta, u laboratoriju je obavljeno i dokazivanje patogenosti na presadnicama krizanteme, prema opisanoj metodologiji.

Znaci bolesti, istovjetni simptomima na uzorkovanim biljkama, razvili su se šest tjedana nakon umjetne infekcije suspenzijom zoospora (slika 7. i 8.), a nakon reizolacije potvrđen je uzročnik – *Phytophthora chrysanthemi*.



**Slika 7.** Umjetna zaraza presadnica krizanteme, zaražena biljka - desno, kontrola - lijevo (snimio Ž. Tomić)



**Slika 8.** *P. chrysanthemi* - trulež korijena i donjeg dijela stabljike na umjetno zaraženoj biljci (snimio Ž. Tomić)

### Morfološke karakteristike *P. Chrysanthemi*

Osim vegetativnog (nespolnog) načina razmnažanja sporangijima, koje obilno stvara na hifama (sporangioforima) u vodi, *P. chrysanthemi* ima i spolni stadij u kojem formira trajne spore – oospore, koje služe za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i širenje patogena na veće udaljenosti. Osim relativno velikih oospora, u hranjivoj podlozi i vodi stvara neuobičajene, također velike, nabrekline hifa (hyphal swellings) te hlamidospore. Navedene morfološke karakteristike u kombinaciji s domaćinom (krizantema) jedinstvene su i omogućavaju brzu identifikaciju patogena. *P. chrysanthemi* raste relativno sporo u PDA hranjivoj podlozi na 20 °C (slika 12.). Optimalna temperatura za rast u hranjivoj podlozi je 30 °C, a dobro raste čak i na 35 °C (Naher *et al.*, 2011.). Rezultati mjerenja sporangija, oospora, nabrekline hifa i hlamidospora jesu:

- Sporangiji su najčešće kruškoliki, elipsoidni ili jajoliki (slika 9.), bez papile i čvrsto se drže na sporangioforu (hifi), dužina x širina im varira: 22-61 x 18-45 μm. Formiraju se terminalno (rijetko simpodijalno) na sporangioforima, unutarnjom proliferacijom. U hranjivoj podlozi (CPA) stvaraju se vrlo rijetko, a

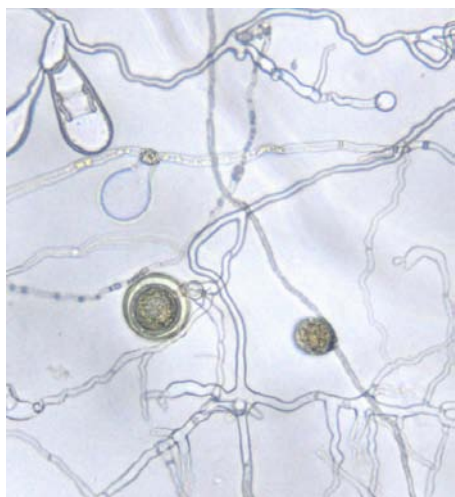
kao i većina ostalih *Phytophthora* vrsta *P. chrysanthemi* obilno sporulira kada se komad V8 hranjive podloge s micelijem stavi u izvorsku vodu.



**Slika 9.** *P. chrysanthemi* – sporangiji (snimio Ž. Tomić)



**Slika 10.** *P. chrysanthemi* – nabrekli hifa (snimio Ž. Tomić)



**Slika 11.** *P. chrysanthemi* – apalerotična oospora (snimio Ž. Tomić)



**Slika 12.** *P. chrysanthemi* – PDA, nakon 7 dana na 20 °C (snimio Ž. Tomić)

- Izgled i veličina nabreklina hifa (hyphal swellings) i hlamidospora jedno je od morfoloških obilježja važnih za točnu identifikaciju vrste roda *Phytophthora*. Velike (do 70  $\mu\text{m}$ ), izdužene, najčešće interkalarne nabrekli hifa vrlo su specifične za *P. chrysanthemi* i rijetko su prisutne u drugim *Phytophthora*. Često su okrugle, lančano poredane na hifama ili solitarne, slične hlamidosporama. Formiraju su se i u CPA hranjivoj podlozi i u vodi. (slika 10.). Tankostijene

hlamidospore uglavnom su sferične, terminalne, lateralne ili interkalarne, veličine 25 - 50 µm u promjeru.

- Oogoniji su najčešće sferični, glatki, 25-49 µm u promjeru. Oospore (slika 6.) gotovo su uvijek ap(er)otične (nepotpuno ispunjavaju oogonij), sferične, 22-38 µm u promjeru, s relativno debelom stijenkom, oko 3,5 µm. Anteridiji su pretežno paragini, rijetko amfigin, prosječne veličine 10-25 x 8-18 µm.

### **Potvrda identifikacije *P. chrysanthemi* molekularnim tehnikama**

Sekvencija reprezentativnog izolata pokazala je 99,8 % sličnosti sa sekvencijama *P. chrysanthemi* AB511826 i *P. chrysanthemi* AB437136 iz GenBank baze. Sekvenca analiziranog izolata PH 11/CHR upisana je u GenBank pod pristupnim brojem KJ508824.1.

### **RASPRAVA**

*Phytophthora chrysanthemi* nedavno je opisana u Japanu (Naher *et al.*, 2011.) kao uzročnik truleži stabljike i korijena krizantema. Nema podataka o primarnom izvoru zaraze u Japanu. Moguće je da je primarni izvor bio treset u kojem se krizantema uzgaja kao lončanica, a koji se u Japan uglavnom uvozi, ili je to o domaća vrsta koja je odavno bila prisutna u okolišu, ali nije izazivala bolest krizanteme. Općenito su vrlo rijetki izvještaji koji opisuju *Phytophthora* vrste kao uzročnike bolesti krizanteme. *P. cryptogea* (MacDonald, 1982) i *P. nicotianae* (Mullen *et al.*, 2001) opisane su kao uzročnici truleži korijena – *P. cryptogea* i cvata krizanteme – *P. nicotianae*. U Hrvatskoj nema podataka o *Phytophthora* vrstama na krizantemama, iako valja spomenuti da smo tijekom vlastitih istraživanja izolirali *P. cryptogea* iz bolesnog vrata korijena krizanteme te *P. inundata* iz korijena iste biljke iz koje je izolirana *P. chrysanthemi*, kao uzročnik truleži baze stabljike.

Zanimljivo je da su praktično svi nalazi *P. chrysanthemi* u Hrvatskoj vezani za tlo, u proizvodnji u plastenicima (rezana) ili polju (multiflora). Tijekom brojnih fitosanitarnih pregleda *P. chrysanthemi* nikada nije bila izolirana iz presadnica krizantema (koje se kasnije sade u plastenike) sa simptomima truleži korijena i baze stabljike. Jedini nalaz na lončanici (Pula, 2008.) vrlo vjerojatno također potječe iz tla u kojem je krizantema uzgajana prije presađivanja u lončice. Iz toga je očigledno da je, barem u dijelu Hrvatske (Zagrebačka i Sisačko-moslavačka županija), *P. chrysanthemi* domaća vrsta odavno prisutna u okolišu. Više je mogućih razloga zbog kojih je tek nedavno registrirana kao patogen na krizantemi:

- Simptomi koje izaziva vrlo su slični simptomima nastalim napadom *Pythium* vrsta, iz literature dobro poznatim uzročnicima mokre truleži korijena i baze stabljike krizanteme. Stoga je vrlo vjerojatno da su se moguća propadanja krizantema izazvana napadom *P. chrysanthemi* pripisivala djelovanju *Pythium* vrsta.

- Izolacija *P. chrysanthemi* iz bolesnoga dijela biljke, zbog sporog rasta i prisustva mnogih saprofitskih gljivica i bakterija, veoma je zahtjevna i praktično



nemoguća bez korištenja selektivne hranjive podloge (P<sub>5</sub>ARP). Zbog tog su razloga eventualne laboratorijske analize mogle dati pogrešan rezultat – najčešće se kao uzročnik evidentiraju *Pythium*, *Rhizoctonia* ili *Fusarium* vrste.

- Moguće je da je, zbog još nepoznatih razloga, *P. chrysanthemi* postala patogena za krizantemu u novije vrijeme (prvi put je izolirana 1998. god. u Japanu) i da je zato zabilježena samo u Japanu i Hrvatskoj te prema nekim neobjavljenim podacima vjerojatno i u SAD. Sigurno je samo to da između tih pojedinačnih nalaza ne postoji nikakva veza.

Štete od napada *P. chrysanthemi* u nekim od pregledanih plastenika bile su velike i sigurno je da ta pseudogljivica ima znatan infekcijski potencijal. Napadnute biljke višestruko su kraće od zdravih te venu i suše se prije stvaranja cvata. Iako mogu biti napadnute pojedinačne biljke (ili nekoliko susjednih) bilo gdje u plasteniku, najčešće se intenzivno propadanje događalo u dijelovima plastenika gdje se zadržavala voda. Primarna infekcija uglavnom se događa odmah nakon sadnje presadnica krizanteme u tlo, tako zaražene biljke ostaju krhke. Rjeđe se zaraza ostvari na već razvijenim biljkama.

Iako ne postoje provjerene mjere zaštite od *P. chrysanthemi*, iz dosadašnjih istraživanja tog patogenog organizma vidljivo je da bi osnovna mjera suzbijanja trebala biti – sprječavanje zaraze mladih presadnica krizanteme. Najvažnije je ne dopustiti da se zadržava voda u plasteniku ili polju (multiflore).

Od izravnih mjera, zalijevanje korijena presadnica fungicidom registriranim za tu namjenu prije sadnje u plastenik, sigurno će negativno djelovati na ostvarenje infekcije.

Dezinfekcija tla, jedna od mjera koja se, radi osiguravanja normalne proizvodnje, u plasteniku periodično mora provoditi trebala bi uništiti izvor infekcije u tlu.

Moguće je da se *P. chrysanthemi* intenzivnije javlja u plasticima gdje se ne provodi dezinfekcija tla.

## SUMMARY

### ***Phytophthora chrysanthemi* Naher, Motohash, Watanabe, Chikuo, Senda, Suga, Brasier & Kageyama – NEW CAUSE OF CHRYSANTHEMUM DISEASE IN CROATIA**

*Phytophthora chrysanthemi* - new species causing crown and root rot of chrysanthemum was found in Croatia during phytosanitary inspections in 2008 and 2009. Disease symptoms, methods of isolation and identification as well as basic morphological features are described in this paper. Possible losses in chrysanthemum production and protection measures are discussed. To our knowledge, this is the first time that *P. chrysanthemi* has been reported in Croatia and Europe.

**Keywords:** *Phytophthora chrysanthemi*, chrysanthemum, symptoms, methods of isolation

**Znanstveni rad**

## LITERATURA

**Anonymus**, (1997) Compendium of Chrysanthemum Diseases. APS Press, American Phytopathological Society, St Paul, MN, U.S.A., 15-16.

**Erwin, D.C., & Ribeiro, O.K.** (2005) *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, St Paul, MN, U.S.A., second printing, 39, 84.

**Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.

**MacDonald, J. D.** (1982) Effect of salinity stress on the development of *Phytophthora* root rot of chrysanthemum. *Pytopathology* 72, 214-219.

**Mullen, J. M., Hagan, A. K., Carey, D. K.** (2001) First report of phytophthora blossom blight of chrysanthemum caused by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Disease*, Vol. 85, No. 8, 923

**Naher, M., Motohash, K., Watanabe, H., Chikuo, Y., Senda, M., Suga, H., Brasier, C. & Kageyama, K.** (2011) *Phytophthora chrysanthemi* sp. nov., a new species causing root rot of chrysanthemum in Japan. *Mycological Progress*, Vol. 10, 21-31.

**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)

**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.** (2001a) *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological research* 105 (10), 1155-1165.

**Werres, S., Marwitz, R., Poersche, U., Themann, K.** (2001b). 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.

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. U: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (ur.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315-322. Academic Press Inc., New York, SAD.