

.....  
**Željko TOMIĆ, Adrijana NOVAK, Krešimir ŠIMUNAC, Ivana KRIŽANAC, Dario IVIĆ**

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za zaštitu bilja  
 zeljko.tomic@haphi.hr

## ***Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath NA PAČEMPRESU (*Chamaecyparis lawsoniana* (A.Murray bis) Parl.) U HRVATSKOJ**

### **SAŽETAK**

Pseudogljiva *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath, najopasniji uzročnik propadanja pačempresa (*Chamaecyparis lawsoniana*), izolirana je prvi put u Republici Hrvatskoj 2015. godine u Koprivničko-križevačkoj županiji. Zbog vrlo izražene patogenosti na pačempresu, vrlo zastupljenu ukrasnom stablu u Europi, *P. lateralis* uvrštena je na A2 listu karantenskih organizama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO). U radu su prikazani simptomi nagla sušenja pačempresa na mjestu nalaza toga štetnog organizma u Hrvatskoj, što je, prema nama dostupnim podacima, prvi takav nalaz izvan područja vlažne, oceanske klime u Europi. Opisane su i metode izolacije te načini identifikacije *P. lateralis* na temelju morfoloških karakteristika i molekularnim metodama. Budući da je izolat *P. lateralis* (PLMP-15) s pačempresa u Hrvatskoj nedvojbeno homotaličan – stvara oospore, ali samo u specifičnim medijima, opisana je i metoda dobivanja oospora u različitim hranjivim podlogama. U podlogama koje sadržavaju listove pačempresa (*C. lawsoniana*) i tuje (*Thuja occidentalis*) izolat PLMP-15 stvarao je oospore obilno i relativno brzo. Rezultati testa formiranja oospora s PLMP-15 izolatom jasno pokazuju da tvorba oospora ovisi o vrsti hranjive podloge i temperaturi na kojoj se test izvodi.

**Ključne riječi:** *Phytophthora lateralis*, pačempres, simptomi, metode izolacije i metoda dobivanja oospora u hranjivim podlogama.

### **UVOD**

Tijekom provođenja programa posebnog nadzora “Novi rizici u biljnom zdravlju” 2015. godine, u nadležnosti Centra za zaštitu bilja Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu, u selu Mali Poganac, u Koprivničko-križevačkoj županiji, na pačempresima (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca') posađenima uz okućnicu zamijećeni su simptomi sušenja. Nakon izolacije iz korjenova vrata i rizosfere bolesnih biljaka identificiran je uzročnik sušenja – pseudogljiva *Phytophthora lateralis*. Prva propadanja pačempresa, koja je izazvao taj iznimno agresivan patogeni organizam, zabilježena su dvadesetih godina prošloga stoljeća (Zobel i sur., 1985.) u rasadniku u Seattleu (SAD), ali je

uzročnik opisan kao *P. lateralis* tek 1942. godine (Tucker i Milbrat, 1942). Od pedesetih godina prošloga stoljeća *P. lateralis* proširila se u jedine svjetske prirodne sastojine *C. lawsoniana* (Port-Orford-cedar, Lawson's cypress) u jugozapadnom Oregonu i sjeverozapadnoj Kaliforniji (Zobel i sur., 1985.), a zatim i kroz cijeli tzv. pacifički sjeverozapadni pojas sve do Britanske Kolumbije u Kanadi, devastirajući kompletne sastojine pačempresa u nekim područjima. Zbog ekstremne patogenosti toga algama sličnog organizma, industrija proizvodnje sadnica ukrasnih pačempresa na zapadnoj obali SAD-a bila je gotovo potpuno uništena (Hansen i sur., 2000.). *P. lateralis* preživljava u tlu, na biljnim ostatcima i širi se trajnim sporama (hlamidospore, oospore) prisutnima u česticama tla (blato) koje prenose vozila, životinje i ljudi, a prisutna je i u vodotocima zaraženih područja u SAD-u. (Hansen i sur., 2000.). Osim toga, na velike udaljenosti vrlo se uspješno prenosi zaraženim sadnicama *C. lawsoniana*, ali i drugih domaćina. Do devedesetih godina prošloga stoljeća jedini poznati domaćin *P. lateralis* bio je pačempres – *C. lawsoniana*, a poslije se poznati krug domaćina proširio na pacifičku tisu (*Taxus brevifolia*), tuju (*Thuja occidentalis*), borovicu (*Juniperus communis*), sibirski čempres (*Microbiota decussata*) i na druge vrste pačempresa (*C. obtusa*, *C. pisifera*) te na neke ukrasne cvjetnice (*Vinca* sp. i *Petunia* sp.), (EPPO, 2024). *P. lateralis* najčešće napada pačempres iz tla, kada zoosporama zarazi korijen, te se zatim micelijem proširi na korjenov vrat i donji dio stabljike (debla), a kada micelij u unutrašnjoj kori i kambiju „zaokruži“ stabljiku, na nadzemnom dijelu biljke uočavaju se simptomi nagloga sušenja. U optimalnim uvjetima za razvoj (puno oborina i temperature 15 – 20 °C) taj patogeni organizam može zaraziti lišće i grane u krošnji pačempresa (Trione 1957.; Robin i sur., 2011.), što je svojstveno *Phytophthora* vrstama s otpadajućim sporangijima, koji su djelomično prisutni i kod *P. lateralis*.

Prvi nalazi *P. lateralis* u Europi zabilježeni su u rasadnicima drvenastog ukrasnog bilja u Francuskoj 1996. i 1998. te u Nizozemskoj 2005. i 2010. godine (EPPO, 2024). Iako se smatralo da je taj štetni organizam uspješno eradiciran, prvi simptomi propadanja na pačempresima koji su bili zasađeni kao vjetrobrani na području Bretanje u Francuskoj pojavili su se između 2005. i 2008. godine (Robin i sur., 2011.), a u godinama koje su uslijedile zabilježena su masovna sušenja na tome području. Do sada je u Europi *P. lateralis* nađena još u Velikoj Britaniji (Green i sur., 2013.) i Irskoj (EPPO, 2024), u područjima s blagom oceanskom klimom, sličnoj onoj koja prevladava na zapadnoj obali SAD-a.

U novijoj literaturi (Brasier i sur., 2010. i 2012.; Webber i sur., 2012.; Werres i Wagner, 2012.; Green i sur. 2013.; Jung i sur., 2018.; Peterson i sur., 2020.) razni autori navode da izolati *P. lateralis* korišteni u tim istraživanjima nisu formirali oospore na hranjivim podlogama. Na specijaliziranoj internetskoj stranici za identifikaciju *Phytophthora* vrsta (IDphy, 2024) *P. lateralis* opisana je kao sterilna vrsta (ne stvara oospore), iako ju je kao homotaličnu opisao Trione

1957. i 1974. godine. Homotaličnost (samooplodnost) izolata PLMP-15, testirana je u ovome radu na tri hranjive podloge prikladne za stvaranje oospora i dvije različite temperature inkubacije. U radu je opisana metoda na hranjivim podlogama s listovima pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca') i tuje (*Thuja occidentalis* 'Smaragd'), kojom su već nakon dva tjedna dobivene oospore izolata PLMP-15.

## MATERIJAL I METODE

U travnju 2015. godine, tijekom monitoringa na području Koprivničko-križevačke županije, u selu Mali Poganac, uz ogradu okućnice (slika 1), uočeno je šest biljaka pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca'), starosti šest do sedam godina, od kojih su dvije pokazivale znakove sušenja. Prva biljka u nizu, sa simptomima sušenja, izvađena je iz tla i, nakon što su ispod kore na korjenovu vratu zamijećeni simptomi slični onima koje izaziva *P.lateralis* (slika 2), uzeta na laboratorijsku analizu.

U studenome 2015. godine, na istoj je lokaciji zamijećeno sušenje još tri pačempresa u nizu (slika 3) pa su uzeti uzorci tla (cca 1 kg) iz rizosfere tih biljaka i testirani na *Phytophthora* vrste metodom mamaca s pomoću listova rododendrona Cunningham's white (Themann i Werres, 1998), i pačempresa u laboratoriju.

### Hranjive podloge korištene za izolaciju, identifikaciju i formiranje oospora

Za direktnu izolaciju *P. lateralis* iz korjenova vrata pačempresa korištena je selektivna hranjiva podloga:

- P<sub>5</sub>ARP Media – selektivna podloga za izolaciju *Phytophthora* vrsta (Erwin i Ribeiro, 2005.)

Za morfološku identifikaciju do vrste korištene su slijedeće neselektivne hranjive podloge:

- Carrot piece agar (CPA) – 50 g narezanih komadića korijena mrkve i 22 g agara (Select agar, Sigma-Aldrich,) u 1000 ml destilirane vode, uz autoklaviranje na 121 °C (Werres i sur., 2001.).
- 30 %-tni V8 Campbell's juice – agar (hranjiva podloga od soka raznog povrća ) (Erwin i Ribeiro, 2005.)
- Potato-Dextrose Agar (PDA, Oxoid ili Biolife)

Za testiranje tvorbe oospora, osim CPA podloge koja se, budući da je izvrsna za tu namjenu, rutinski koristi u Laboratoriju za mikologiju HAPIH Centra za zaštitu bilja, u ovome su radu korištene i dvije hranjive podloge kao njezina modifikacija:

- *Chamaecyparis* leaf agar (CHLA) – modifikacija CPA hranjive podloge: 50 g narezanih dijelova lista pačempresa (*C.*

*lawsoniana* 'Columnaris Glauca') i 15 g agara (Select agar, Sigma-Aldrich) u 1000 ml destilirane vode, uz autoklaviranje na 121 °C 15 minuta.

- *Thuja* leaf agar (THLA) – modifikacija CPA hranjive podloge: 50 g narezanih dijelova lista tuje (*Thuja occidentalis* 'Smaragd') i 15 g agara (Select agar, Sigma-Aldrich) u 1000 ml destilirane vode, uz autoklaviranje na 121 °C 15 minuta.

### Metode izolacije *P. lateralis* iz pačempresa

Za izravnu izolaciju izolata PLMP-15 iz pačempresa korištena je P<sub>5</sub>ARP selektivna podloga u koju su stavljeni skalpelom svježe odrezani komadići unutarnje kore s korjenova vrata pačempresa (5-6 po Petrijevoj zdjelici, Ø 90 mm), na kojemu su bili prisutni simptomi posmeđenja (nekroze). Svaki je odrezani dio korjenova vrata (veličine cca. 5 x 5 mm) sadržavao liniju između zdravoga i bolesnoga tkiva. Prije stavljanja na P<sub>5</sub>ARP hranjivu podlogu ti su odrezani komadići bili oprani u destiliranoj vodi i nakon toga osušeni između dva sterilna filter-papira.

Za izolaciju iz truloga korijena i tla korištena je tzv. metoda mamaca na listove rododendrona (Themann i Werres, 1998.). U ovome su radu kao mamac, uz listove rododendrona (*Rhododendron* 'Cunningham's White'), korišteni svježe ubrani, zdravi listovi pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca'). „Pecanje“ *Phytophthora* vrsta na listove rododendrona i pačempresa odvijalo se u komori, u tami, na 15 °C. Metoda je provedena kako je opisano u izvornom radu (Themann i Werres, 1998.), u tri plastične posude (veličine 25 x 15 cm) stavljeno je 200 g tla i pripadajućeg korijenja (tri uzorka) i 400 ml destilirane vode te je na površinu vode u svakoj posudi postavljeno pet zdravih listova rododendrona (Cunningham's White) uz dodatak 2 g narezanih potpuno zdravih listova (prethodno ispranih u destiliranoj vodi) pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca'). Pet do deset dana nakon što se ostvarila zaraza listova rododendrona i pačempresa, zaraženi komadići listova (cca. 3 x 3 mm), prethodno isprani u destiliranoj vodi, stavljeni su na P<sub>5</sub>ARP podlogu kako bi se izolirao patogen.

Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm) s komadićima korjenova vrata te listova rododendrona i pačempresa na P<sub>5</sub>ARP podlozi, inkubirane su u komori na 15 °C, u tami. Spororastući micelij presađen je nakon tjedan dana na CPA, V8 i PDA hranjive podloge (Petrijeve zdjelice, Ø 90 mm) radi identifikacije i ostavljen na inkubaciju u komori rasta na 15 °C, u tami.

### Identifikacija *P. lateralis* na osnovi morfoloških karakteristika

Identifikacija vrste kod izolata PLMP-15 iz Malog Poganca obavljena je nakon tri do četiri tjedna, kada je spororastući micelij prerastao tri četvrtine Petrijeve

zdjelice na CPA, V8 i PDA podlogama. Vrsta je određena na temelju izmjerenih veličina sporangija i hlamidospora te karakteristična lateralnog rasta hlamidospora u CPA i izgleda kolonije na PDA podlozi. Za mjerenje sporangija korištena je 30 %-tna V8 hranjiva podloga. Ta je podloga, s izolatom PLMP-15, izrezana na komade veličine 30 x 30 mm i stavljena u sterilnu staklenu Petrijevu zdjelicu (Ø 120 mm) u koju je dodana prirodna izvorska voda (Jana, Kala, Cetina i sl.), koliko je bilo dovoljno da potpuno prekrije komade izrezane podloge. Ta je Petrijeva zdjelica odložena u komoru rasta na temperaturu 20 °C te je nakon četiri dana inkubacije izmjereno 30 formiranih sporangija i izračunana njihova prosječna veličina. Promjer hlamidospora (30) izmjeren je pod svjetlosnim mikroskopom direktnim mikroskopiranjem Petrijevih zdjelica s izolatom PLMP-15 na CPA hranjivoj podlozi, okrenutih s donje strane ili stavljanjem dijela podloge s izolatom na predmetno stakalce.

Na PDA podlozi analiziran je izgled kolonije radi potvrde identifikacije vrste.

Mjerenja su obavljena svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53 programom Imaging Software - CellSens Dimensions.

### Identifikacija *P. lateralis* molekularnim metodama

Radi potvrde identifikacije vrste na osnovi morfoloških obilježja obavljena je identifikacija izolata PLMP-15 amplifikacijom i sekvenciranjem ribosomalne (ITS) i mitohondrijalne (COX1) regije gena.

S površine PDA, sterilnim je skalpelom ostrugano 20 mg micelija izolata PLMP-15 koji je prebačen u eppendorf tubice od 2 ml i usitnjen tučkom u tekućem dušiku. Izolacija DNK obavljena je korištenjem kompleta Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., SAD) prema uputama proizvođača. Za umnažanje ribosomalne regije korištene su početnice ITS 1 i ITS 4 (White i sur., 1990.) dok su za mitohondrijalnu regiju korištene početnice FM84 (5'-TTTAATTTTTAGTGCTTTTGC-3') i FM77 (5'-CACCAATAAAGAATAACCAAAAATG-3') (Martin i sur., 2014.).

Za svaki par početnica pripremljene su zasebne reakcijske smjese. U PCR reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 25 µl korišteno je 5 µl ekstrahirane DNK 12,5 µl EmeraldAmp Max PCR mastermix (Takara), 5,5 µl vode (pročišćena voda za PCR) te po 1 µl početnice ITS1 i ITS4. Reakcijska smjesa s početnicama FM84 i FM77 pripremljena je na isti način. Uvjeti za amplifikaciju ITS regije bili su: 95 °C 2 minute, 30 ciklusa na 95 °C 20 sekundi, 55 °C 25 sekundi i 72 °C 50 sekundi, sa završnim izduživanjem na 72 °C 10 minuta. Uvjeti za amplifikaciju COX1 regije bili su 95 °C 3 minute, 35 ciklusa na 95 °C 1 minuta, 56 °C 1 minuta i 72 °C 2 minute, sa završnim izduživanjem na 72 °C 5 minuta (Martin i sur., 2014). Provjera dobivenih PCR produkata izvršena je elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu, 45 minuta pri 110 V. Dobiveni PCR produkti pročišćeni su korištenjem kompleta GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, SAD) i

sekvencirani u Macrogen Inc., Nizozemska. Sekvence su analizirane i uspoređene s referentnim sekvencama iz GenBank baze korištenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0. (Hall, 1999.). Uređene sekvence upisane su u GenBank bazu podataka.

### Test patogenosti

Da bi se dokazala patogenost *P. lateral* prema Koch-ovim postulatima, korištena je sljedeća metoda umjetne infekcije pačempresa: Pet trogodišnjih sadnica pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca') posađeno je u nove plastične lončice, u prethodno steriliziran supstrat za ukrasno bilje. Izolat PLMP-15 presađen je u tri plastične Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm) na V 8 hranjivu podlogu (30%-tnu) i držan u komori rasta na 20 °C. Nakon što je micelij prerastao tri četvrtine Petrijeve zdjelice, V 8 hranjive podloge izrezane su sterilnim skalpelom na komade i stavljene u tri sterilizirane staklene Petrijeve zdjelice (Ø 120 mm) s prirodnom izvorskom vodom te premještene na inkubaciju u komoru na 20 °C. Nakon 4 dana, na izrezanim su se komadima V8 podloge obilno formirali sporangiji *P. lateral*. Kako bi se osigurala što veća količina zoospora potrebnih za umjetnu infekciju posađenih pačempresa, u sve tri Petrijeve zdjelice ubačena su po 2 g narezanih, svježe ubranih, potpuno zdravih, listova pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca'), nakon čega su Petrijeve zdjelice vraćene u komoru (20 °C) na daljnju inkubaciju. Nakon 10 dana na zaraženim dijelovima listova pačempresa u Petrijevim zdjelicama obilno su se formirali sporangiji sa zoosporama. Prije umjetne zaraze, skalpelom je oprezno otkopan površinski sloj supstrata u zoni korijena i korjenova vrata posađenih pet sadnica pačempresa. Zatim je sadržaj tri Petrijeve zdjelice (izvorska voda, narezana hranjiva podloga s izolatom PLMP-15 i zaraženi dijelovi listova pačempresa) ispražnjen u zonu korijena tri pačempresa i ponovno prekriven supstratom. Isti postupak ponovljen je i s preostale dvije sadnice koje su predstavljale kontrolu, gdje se umjesto V8 podloge s izolatom PLMP-15 koristila čista V8 podloga. Svih pet sadnica pačempresa postavljeno je u klima-komoru na 18 °C i 75 % relativne vlage zraka uz osvjetljenje 12 sati. U komori su biljke odmah zalivene destiliranom vodom tako da je supstrat bio potpuno zasićen, a svaki je lončić bio postavljen u veću plastičnu posudu tako da se višak vode kod zalijevanja u njima zadržavao. Na taj je način osigurana potpuna zasićenost supstrata vodom u prva dva dana od umjetne infekcije. Poslije su lončići zalijevani vodom do potpune zasićenosti supstrata svakih 5 dana i pratila se pojava simptoma na pačempresima. Nakon pojave simptoma na umjetno zaraženim biljkama pačempresa, iz korjenova vrata s karakterističnim simptomima bolesti, obavljena je reizolacija *P. lateral* na način opisan u metodama izolacije.

## Testiranje izolata PLMP-15 na tvorbu oospora

Za rast izolata PLMP-15 korištena je V8 hranjiva podloga, a za testiranje formiranja oospora korištene su tri hranjive podloge CPA, CHLA i THLA. Svaka je podloga izlivena u četiri sterilne plastične Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm). CPA podloga modificirana je tako da su umjesto mrkve korišteni dijelovi listova pačempresa (CHLA) i tuje (THLA), a količina agara smanjena je s 22 na 15 grama. Dijelovi listova tuje korišteni su za podlogu jer *P. lateralis* izaziva tipične simptome „zračne“ infekcije na listovima tuje (Schlenzig, i sur., 2011). Prema dostupnim podatcima iz literature, listovi tuje nisu do sada bili korišteni u hranjivim podlogama za formiranje oospora *P. lateralis*.

Izolat *P. lateralis* PLMP-15 prethodno je uzgojen na 30 %-tnoj V8 podlozi u Petrijevim zdjelicama promjera 9 cm. Odrezani komadići V8 hranjive podloge, s ruba kolonije *P. lateralis*, (veličine 5 x 5 mm) stavljeni su na pripremljene CHLA i THLA podloge od kojih je svaka sadržavala najmanje dva komada lista pačempresa ili tuje te na CPA podlogu s narezanim komadićima korijena mrkve. Komadići odrezane 30 %-tne V8 hranjive podloge, koji su sadržavali rastući rub kolonije *P. lateralis*, bili su postavljeni u blizinu (5 – 10 mm) dijelova lista pačempresa i tuje ili narezanog korijena mrkve u CHLA, THLA i CPA podlogama.

U testiranju su korištene dvije debljine izlivanja hranjive podloge u Petrijeve zdjelice kako bi se usporedila brzina stvaranja oospora. Prva, tanja, 2 do 3 mm i druga, deblja, 5 do 6 mm.

Testiranje na tvorbu oospora provedeno je u klima-komorama na temperaturama 15°C i 20°C u mraku. Stvaranje oospora provjeravalo se pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX53), pregledom donje strane Petrijeve zdjelice s izolatom PLMP-15. Promjer oogonija, oospora i veličina anteridija izmjereni su tako da su komadići CHLA i THLA podloga s *P. lateralis* stavljeni na predmetno stakalce pod svjetlosni mikroskop. Izmjereno je 50 oogonija, oospora i anteridija. Za mjerenje je korišten Imaging Software - CellSens Dimensions program na mikroskopu Olympus BX53.

### Meteorološki podatci

Kako bi se bolje razumjela etiologija bolesti na pačempresima u Malom Pogancu analizirani su meteorološki podatci (oborine i temperatura pri tlu) na području Križevaca za razdoblje od 2011. do 2015. godine. Meteorološki podatci dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda Republike Hrvatske (DHMZ).

### REZULTATI

Iz zaražena korjenova vrata pačempresa, uzorkovanoga u travnju 2015. godine (slika 2), na selektivnoj hranjivoj podlozi (P<sub>5</sub>ARP), izoliran je spororastući micelij karakterističan za *Phytophthora* vrste. Morfološkom analizom rasta micelija i hlamidospora na hranjivim podlogama (CPA, V8 i PDA) te sporangija

koji su se formirali u izvorskoj vodi određeno je da se radi o vrsti *Phytophthora lateralis*, najopasnijem uzročniku propadanja pačempresa.



**Slika 1.** Mali Poganac, **travanj 2015**, sušenje pačempresa (sinimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 1.** Mali Poganac, **April 2015**, Lawson's cypress dieback (photo: Ž. Tomić, 2015)



**Slika 2.** Mali Poganac, **travanj 2015.**, simptomi na korjenovom vratu (snimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 2.** Mali Poganac, **April 2015**, crown rot symptoms (photo: Ž. Tomić, 2015)

U studenome 2015. godine ponovno je obavljen pregled pačempresa na istoj lokaciji te je uočeno sušenje još triju pačempresa (*C. lawsoniana* 'Columnaris Glauca') u nizu (slika 3). Nakon analize prikupljenih uzoraka tla iz rizosfere biljaka sa simptomima sušenja, metodom mamaca na listove rododendrona i pačempresa, izolirana je *P. lateralis* iz svakog od tri uzorka tla.



**Slika 3.** Mali Poganac, **studen 2015.**, simptomi naglog sušenja pačempresa (snimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 3.** Mali Poganac, **November 2015**, sudden dieback and death of *C. lawsoniana* (photo: Ž. Tomić, 2015)



Analizom meteoroloških podataka za područje Križevaca u razdoblju od 2011. do 2015. godine (ovdje nisu detaljno prikazani) utvrđeno je da vremenski uvjeti nisu bili optimalni za razvoj *P. lateralis* sve do 2014. godine. Naime, od 2011. do 2013. prevladavale su vremenske prilike karakteristične za klimu sjeverne Hrvatske, sa čestim sušnim razdobljima i visokim temperaturama zraka ljeti te niskima zimi (često ispod 0 °C). Osobito se ističe 2012. godina s ljetnim temperaturama i do 38,5 °C te zimskima do – 20 °C. Tijekom 2014. godine vremenske prilike bile su potpuno drugačije od uobičajenih, ekstremne količine oborina, značajno niže temperature od prosječnih ljeti i neuobičajeno topli zimski mjeseci bili su idealni za širenje zaraze s *P. lateralis* na pačempresima. Tijekom proljetnih mjeseci 2015. godine (ožujak i travanj) zabilježena je neuobičajeno mala količina oborina na području Križevaca, što je, uz karakteristično sušno i vrlo toplo ljeto, pogodovalo pojavi simptoma naglog sušenja pačempresa.

### Morfološke karakteristike izolata PLMP-15

Najvažnije je morfološko obilježje *P. lateralis* tvorba većinom sferičnih (kuglastih), lateralnih hlamidospora na hifama u hranjivoj podlozi, po čemu je ova vrsta dobila ime. Analizom na CPA hranjivoj podlozi utvrđeno je da izolat PLMP-15 obilno stvara hlamidospore, većinom lateralno na hifama. Mjerenjem promjera hlamidospora PLMP-15 izolata utvrđeno je da je raspon veličina u skladu s opisom hlamidospora *P. lateralis* u originalnom radu (Tucker i Milbrath 1942.). Prosječna veličina bila je 42 µm, minimalna 35 µm, a maksimalna 71 µm. Mlade hlamidospore su tankostjene, a zrele, osobito u tkivu domaćina gdje uslijed izlučivanja pigmenta poprimaju zlatno do tamnosmeđu boju, imaju debelu stijenku (slika 4).

Iako je većina sporangija izolata PLMP-15 perzistentna na sporangioforima i bez papile, tijekom analize utvrđena je prisutnost i otpadajućih sporangija s kratkom drškom (slika 5). Dio takvih sporangija na vrhu formira zadebljanje koje je vrlo slično semipapili. Mjerenjem sporangija izolata PLMP-15 utvrđeno je da njihov oblik i raspon veličina odgovara opisu sporangija *P. lateralis* u originalnom radu (Tucker i Milbrath 1942.). Izmjerena veličina sporangija bila je u rasponu 23 – 62 x 15 – 22 µm.

Na hranjivim podlogama CPA, V8 i PDA, korištenima za analizu morfoloških karakteristika izolata PLMP-15, *P. lateralis* nije stvarala oospore. Izgled kolonije izolata PLMP-15 na PDA podlozi potpuno je odgovarao opisu u literaturi (IDphy, 2024.).



**Slika 4.** *P. lateralis* – hlamidospore na listu pačempresa u izvorskoj vodi (snimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 4.** *P. lateralis* – chlamydospores on the Lawson's cypress leaf in the spring water (photo: Ž. Tomić, 2015)



**Slika 5.** *P. lateralis* – perzistentni i otpadajući sporangiji (snimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 5.** *P. lateralis* – persistent and deciduous sporangia (photo: Ž. Tomić, 2015)

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

Sekvenca ITS regije reprezentativnog izolata PLMP-15 pokazala je 100 %-tnu podudarnost sa sekvencama *P. lateralis* MG865522 – extype sequence , MK780085 i KJ755127 iz GenBank baze. ITS sekvenca izolata PLMP-15 upisana je u GenBank bazu pod pristupnim brojem ON318974.

Sekvenca COX1 regije reprezentativnog izolata pokazala je 100 %-tnu podudarnost sa sekvencama *P. lateralis* JX121303 i MK792735 te MH136917 – extype sequence iz GenBank baze.

COX 1 sekvenca izolata PLMP-15 upisana je u GenBank bazu pod pristupnim brojem ON375540.

### Test patogenosti

Prvi simptomi promjene boje listova (sivo-zelena) tri umjetno zaražena pačempresa, bili su zamijećeni 100 do 120 dana od umjetne infekcije, a simptomi identični onima na lokaciji u Malom Pogancu (potpuno sušenje i nekroza korjenova vrata) pojavili su se nakon šest do sedam mjeseci. Dva pačempresa koja su poslužila kao kontrola u testu patogenosti nisu pokazala

nikakve simptome bolesti. Iz korjenova vrata sva tri umjetno zaražena pačempresa, postupkom opisanim u metodama izolacije, na selektivnoj P<sub>5</sub>ARP podlozi izolirana je *P. lateralis*, čime su potvrđeni Kochovi postulati testa patogenosti.

### Test na tvorbu oospora

Rezultati testa na formiranje oospora s izolatom PLMP-15 jasno ukazuju da tvorba oospora ovisi o vrsti hranjive podloge i temperaturi na kojoj se testiranje obavlja (tablica 1). CPA hranjiva podloga, inače izvrsna za stvaranje oospora kod većine *Phytophthora* vrsta, nije prikladna za *P. lateralis* jer se u njoj oospore te vrste nisu formirale, neovisno o temperaturama korištenim u testiranju. Na podlogama s inkorporiranim listovima pačempresa (CHLA) i tuje (THLA) oospore su se obilno formirale samo na temperaturi 15 °C. Na temperaturi 20 °C oospore izolata PLMP-15 stvarale su se samo sporadično (nekoliko oospora u četiri Petrijeve zdjelice) u CHLA i THLA podlogama.

**Tablica 1.** Formiranje oospora u različitim hranjivim podlogama i temperaturama nakon 30 dana

**Table 1.** Formation of oospores in different agar media and temperatures after 30 days

Temperatura	Hranjiva podloga		
	CPA PLMP-15	CHLA PLMP-15	THLA PLMP-15
15 °C	-	+++	+++
20 °C	-	+	+

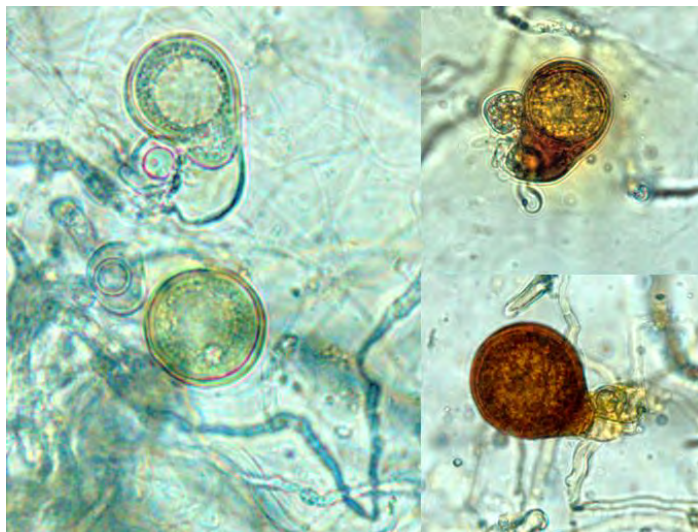
- = ne stvara oospore, + = rijetko formira oospore, +++ = obilno formira oospore

- = does not form oospores, + = rarely forms oospores, +++ = abundantly forms oospores

Prve oospore u CHLA podlozi, do 3 mm debljine, na 15 °C bile su vidljive, u sve četiri Petrijeve zdjelice, nakon dva tjedna u agaru (15. – 16. dan). Debljina izlijevanja podloge imala je utjecaj na brzinu formiranja oospora, u CHLA podlozi debljine do 6 mm prve su oospore bile vidljive nakon tri tjedna (21. – 23. dan). U THLA podlozi oospore se nisu stvarale unutar 30 dana u agaru, ali su se zato obilno formirale u dijelovima lista tuje, u sve četiri Petrijeve zdjelice. Oospore u listu tuje u podlozi počele su se formirati nakon tri tjedna, a nakon 28 dana u listovima se pod mikroskopom moglo vidjeti obilje tamnosmeđih oospora (slika 6). Nakon 30 dana oospore su se formirale i u agaru THLA hranjive podloge.

Zanimljivo je to što su se oospore *P. lateralis* obilno formirale i u Petrijevim zdjelicama s CHLA i THLA podlogama koje su držane na 20 °C kada su, nakon što se u razdoblju od 30 dana nisu obilno formirale oospore, premještene u

hladnjak na 5 – 7 °C. Na toj temperaturi u roku od 10 do 14 dana formirale su se oospore u listovima *C. lawsoniana* i *T. occidentalis* unutar podloga. Iz analize utjecaja temperature na tvorbu oospora izolata *P. lateralis* PLMP-15 može se zaključiti da se neusporedivo brže i obilnije formiraju na značajno nižim temperaturama (do 15 °C) od one optimalne za rast micelija i sporulaciju (20 °C).



**Slika 6.** Oospore s paraginim anteridijima u listu *Thuja occidentalis* 'Smaragd' (snimio: Ž. Tomić, 2015.)

**Fig. 6.** Oospores with paragynous antheridia in the leaf of *Thuja occidentalis* 'Smaragd' (photo: Ž. Tomić, 2015)

Mlade oospore u CHLA i THLA hranjivim podlogama zlatnožute su boje i najčešće plerotične (potpuno ispunjavaju oogonij), a neovisno o tome nalaze li se u agaru ili u listovima pačempresa i tuje, zrele oospore najčešće su sferične (kuglaste) i tamnosmeđe boje. Svaka oospora sadrži najčešće jednu veliku „kružnicu“ ooplasta (slika 6) po kojoj se najlakše razlikuje od slično pigmentiranih hlamidospora u hranjivoj podlozi. Velik broj analiziranih oogonija imao je tzv. suženu bazu (tapered base) na koju se naslanjaju relativno veliki anteridiji. Često oogoniji poprimaju oblik zareza (comma-shaped oogonia), a u listovima pačempresa i tuje u podlogama (CHLA i THLA) nerijetko i druge nepravilne izdužene oblike. Izmjerene dimenzije oogonija izolata PLMP-15 iznose 26,8 – 55,44 (44,2) x 24,7 – 54,49 (42,8) μm. Raspon promjera izmjerenih oospora 24 – 52 μm nešto je veći nego onaj u originalnom radu (Trione, 1957), ali je prosječna veličina ista, približno 40 μm. Izmjerena debljina stijenke oospora bila je 1,6 – 3,6 μm, a prosječna 2,7 μm.

Anteridiji izolata PLMP-15 bili su vrlo često jasno vidljivi, osobito na oosporama koje su se formirale u komadiću lista tuje, ako se on dovoljno usitni u kapi vode prije mikroskopiranja. Anteridiji su isključivo paragini, formiraju se

najčešće uz vrat oogonija, uvijek jedan po oospori, oblik im varira od gotovo kuglastih ili izduženih do nepravilnog oblika, a izmjerena veličina bila je 8,1 - 19,2 (13,8) x 9,01 - 30,6 (18,1) µm.

U testiranju tvorbe oospora THLA hranjiva podloga pokazala se najboljom jer listovi tuje ne izlučuju u agar jak crvenkastosmeđi pigment kao listovi pačempresa u CHLA podlozi pa se sve morfološke karakteristike puno jasnije vide pod mikroskopom. Taj pigment otežava analizu morfoloških karakteristika oospora u CHLA podlozi i u njemu je teže razlikovati oospore od hlamidospora, koje se također formiraju u podlozi.

Na ostalim hranjivim podlogama korištenima u radu (V8 i PDA) oospore se nikada nisu formirale.

## RASPRAVA

*Phytophthora lateralis* primjer je egzotičnog, invazivnog patogena koji, dospjevši u okoliš u kojemu prevladavaju optimalni uvjeti za njegov razvoj i u kojemu je osjetljivi domaćin naširoko rasprostranjen, čini drastične štete. Odavno se pretpostavljalo da je podrijetlo ove vrste iz Azije (Zobel i sur., 1985.) zbog rezistentnosti azijskih *Chamaecyparis* vrsta na nju, a kada je *P. lateralis* prvi put nađena u šumi *C. obtusa* na Tajvanu (Brasier i sur., 2010.), a kasnije i u šumama Japana (Jung i sur., 2021.), ta je hipoteza dodatno dobila na važnosti. *P. lateralis* spororastući je patogen prilagođen blagoj i vlažnoj oceanskoj klimi, karakterističnoj za sjeverozapad SAD-a, gdje su rasprostranjene prirodne sastojine *C. lawsoniana* (Port-Orford-Cedar) u kojima je izazvala goleme štete, jer je to stablo vrlo cijenjeno u drvnoj industriji, ali i u proizvodnji pačempresa kao drvenastog ukrasnog bilja na tome području.

Budući da u Europi ne postoje prirodne sastojine pačempresa (postoje plantažne šume u Španjolskoj i Portugalu), širenje *P. lateralis* najviše je rizično za proizvodnju sadnica *C. lawsoniana*, jedne od najvažnijih ukrasnih četinjača u rasadničarskoj industriji (EPPO, 2024). Osim u rasadničarstvu, širenje *P. lateralis* moglo bi biti vrlo opasno i za vrlo velik broj već posađenih ukrasnih stabala pačempresa diljem Europe pa tako i unutrašnjosti Hrvatske (pačempresa gotovo i nema u obalnom području).

Nalaz *P. lateralis* ispred okućnice u Malom Pogancu travnju 2015. godine bio je prilično iznenađujući, a impresivna je bila i brzina propadanja pačempresa jer su se od četiri preostale zdrave biljke tri osušile već do studenoga, a u svibnju 2016. godine na toj lokaciji više nije bilo nijednoga pačempresa (sve su suhe biljke bile uklonjene). Prema podacima dobivenima od vlasnika, pačempresi su bili kupljeni u jednom prodajnom centru na području Koprivničko-križevačke županije i posađeni na jesen 2010. godine. Budući da u tome selu tijekom istraživanja nisu nađeni drugi mogući domaćini *P. lateralis*, niti su na istoj lokaciji prije sađeni pačempresi, jasno je da je su izvor infekcije bile zaražene sadnice, što je vrlo čest slučaj kada se radi o *Phytophthora* vrstama (Jung i sur.,

2016.). Dvije su europske zemlje, u kojima je prisutna *P. lateralis*, iz kojih su sadnice pačempresa mogle doći u Hrvatsku – Nizozemska i Francuska. Budući da je uvoz drvenastoga ukrasnog bilja iz Francuske zanemariv u odnosu na uvoz iz Nizozemske, najvjerojatnije su zaražene sadnice uvezene iz te zemlje.

Tijekom pregleda toga područja sljedećih godina nigdje više nisu zabilježena propadanja pačempresa uzrokovana tim štetnim organizmom, štoviše, i u ostalim krajevima Hrvatske, u brojnim rasadnicima i vrtnim centrima *P.lateralis* nikada nije izolirana iako smo tijekom monitoringa vrlo često nalazili pačemprese sa simptomima sušenja uzrokovanog raznim *Phytophthora* vrstama (*P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. cryptogea*, *P. multivora* i dr.).

Prisutnost i širenje *P. lateralis* na lokaciji s umjerenom kontinentalnom klimom, gdje se zimi temperature spuštaju znatno ispod 0 °C, a u srpnju i kolovozu nerijetko uz vrlo visoke temperature vlada i jaka suša, veoma je zanimljivo jer je taj patogeni organizam raširen u blagom i vlažnom podneblju oceanske klime. Analiza meteoroloških podataka za područje Malog Poganca (Križevci) za razdoblje od 2011. do 2015. godine objašnjava zašto su pačempresi posađeni potkraj 2010. godine naglo propali tek 2015. do 2016. godine, ali i otkriva mogućnost preživljavanja *P. lateralis* u, za nju, ekstremno nepovoljnim klimatskim uvjetima. Naime, u razdoblju od 2011. do 2013. godine vladale su uobičajene klimatske prilike za to podneblje koje nisu optimalne za razvoj *P. lateralis* i bolest se relativno sporo razvijala (prema izgledu biljaka u travnju 2015. godine vjerojatno su simptomi bili vidljivi na samo jednom pačempresu). U tome razdoblju ističe se 2012. godina s ekstremno niskim temperaturama u veljači (do -20 °C) i ekstremno visokim temperaturama (do 38,5 °C) te jakom sušom tijekom srpnja, kolovoza i rujna, koje je, očigledno, *P. lateralis* uspješno preživjela. Ono što je omogućilo brz razvoj bolesti tijekom 2015. godine bile su vremenske prilike u 2014. godini, koje su obilježili ekstremno kišovito ljeto i jesen (bez uobičajeno visokih temperatura tijekom ljeta) te neuobičajeno topli zimski mjeseci, također s obiljem kiše. Kada je nastupilo sušno razdoblje u ožujku i travnju 2015. godine, počeli su se pojavljivati simptomi nagloga sušenja. Tijekom ljeta ti su se simptomi brzo proširili (što je karakteristično za sušenja uzrokovana *Phytophthora* vrstama), tako da je u studenom samo jedna biljka bila bez simptoma, a i ona se osušila na proljeće 2016. godine.

Nakon potvrde prvog nalaza *P. lateralis* u Hrvatskoj 2015. godine analizirane su morfološke karakteristike izolata PLMP-15. Najvažnije je morfološko obilježje *P. lateralis* tvorba većinom sferičnih, lateralnih hlamidospora na hifama u hranjivoj podlozi. Hlamidospore su zapravo interkalarne, kako je opisano u originalnom radu Tucker i Milbrat (1942.) i radovima kod drugih autora (Trione, 1974.; Erwin i Ribeiro, 2005.), a razvijaju se kao lateralna nabreknuća hifa koja sazrijevanjem zadobiju sesilni oblik. Mjerenjem hlamidospora izolata PLMP-15 utvrđeno je da je njihov promjer u skladu s

rasponom veličina hlamidospora *P. lateralis* koju navode Tucker i Milbrath (1942.). Za formiranje hlamidospora u ovome istraživanju idealnom se pokazala CPA hranjiva podloga. Na toj se podlozi hlamidospore obilno stvaraju, a budući da je to medij niske nutritivne vrijednosti, *P. lateralis* u njemu stvara i sporangije, osobito kada rub kolonije dosegne rub Petrijeve zdjelice.

Iako su Tucker i Milbrath (1942.) opisali sporangije *P. lateralis* kao perzistentne na sporangioforu i bez papile (nonpapilate), u kasnijim istraživanjima (Hansen, 1999.; Brasier i sur., 2010.; Robin i sur. 2011.) utvrđeno je da dio sporangija može biti otpadajući s kratkom drškom, što je karakteristika i PLMP-15 izolata iz Hrvatske (slika 5). Kod dijela otpadajućih sporangija na vrhu se moglo uočiti zadebljanje vrlo slično semipapili (slika 5), što je primijećeno i kod izolata *P. lateralis* u Francuskoj (Robin i sur., 2011.). Takvi otpadajući sporangiji sa zadebljanjem na vrhu koje se vizualno ne razlikuje od semipapile, jako su slični onima koje stvara *Phytophthora ramorum*, filogenetski vrlo bliska *P. lateralis*. Otpadajući sporangiji vrlo su važni za ostvarenje „zračne“ infekcije na granama, listovima i deblu pačempresa i tuje. Za razliku od zaraženih stabala pačempresa u SAD-u (Trione, 1957.), Francuskoj (Robin i sur., 2011.), na Tajvanu (Webber i sur., 2012.) i u Velikoj Britaniji (Schlenzig i sur., 2014.), na nadzemnim dijelovima biljaka *C. lawsoniana* u Malom Pogancu nisu se mogli zamijetiti simptomi napada *P. lateralis*. Simptomi sušenja bili su posljedica zaraze korijena i korjenova vrata.

Tucker i Milbrath (1942.), u originalnom radu, na hranjivim podlogama koje su koristili, nisu našli oospore *P. lateralis*, stoga ih nisu ni opisali. Oospore toga patogenog organizma prvi su put opisane u Trioneovoj doktorskoj disertaciji 1957. godine. Od mnogobrojnih hranjivih podloga korištenih u tome istraživanju oospore su se formirale samo na podlogama s listom *C. lawsoniana*, s uvarkom od lista *C. lawsoniana* (Cedar Decoction Agar) i s listovima lucerne. Zanimljivo je da je u toj doktorskoj disertaciji Tirone naveo da je prosječna debljina stijenke oospora *P. lateralis* 6  $\mu\text{m}$ , ali je u radu iz 1974. godine isti autor napisao da je ta debljina prosječno 2  $\mu\text{m}$ . Pitanje izgleda i veličina anteridija, oogonija, oospora i njihova formiranja u hranjivim podlogama u kasnijim je radovima postalo prilično kontroverzno. U starijim knjigama (Erwin i Ribeiro, 2005.; Gallegly i Hong, 2008.) opisuju *P. lateralis* kao homotaličnu vrstu. Ti autori navode da je debljina stijenke oospore 5 – 6  $\mu\text{m}$ .

U novijoj literaturi (Brasier i sur., 2010. i 2012., Werres i Wagner, 2012., Green i sur. 2013., Jung i sur., 2018., Peterson i sur., 2020.) navodi se da *P. lateralis* ne stvara oospore na različitim hranjivim podlogama ili, ako ih stvara, da je to atipično (Brasier i sur., 2010). Osim toga i na specijaliziranoj internetskoj stranici za identifikaciju *Phytophthora* vrsta (IDphy, 2024.) navodi se da *P. lateralis* ne stvara oospore, odnosno da se radi o sterilnoj vrsti.

Budući da je stvaranje oospora, trajnih spora koje služe za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, vrlo važno svojstvo u etiologiji bolesti domaćina

*Phytophthora* vrsta, u ovome je radu testiran izolat PLMP-15 na tvorbu oospora na različitim hranjivim podlogama.

Rezultati testa pokazali su da izolat PLMP-15 *P. lateralis* obilno formira oospore u CHLA i THLA podlogama na 15 °C, dok na ostalim hranjivim podlogama korištenima u radu (CPA, V8 i PDA) ne stvara oospore. Važan je podatak dobiven testiranjem da se oospore obilno formiraju u CHLA i THLA podlogama na znatno nižoj temperaturi (15 °C) od one optimalne za rast micelija i sporulaciju *P. lateralis* (20 °C). Na 20 °C formiraju se samo sporadično. Budući da, prema podacima dostupnima u literaturi, CHLA i THLA podloge nisu nikada prije korištene za formiranje oospora *P. lateralis* (podloga s listovima pačempresa korištena je samo u Trioneovu istraživanju 1957. i 1974. godine, ali je bila spravljena na drugačiji način), moguće je pretpostaviti da su navedene podloge prikladnije za tvorbu oospora od podloga od uvaraka listova *C. lawsoniana* (Cedar Decoction Agar) i mrkve (Carrot Agar) koju su koristili Brasier i sur. (2010., 2012.) i Green i sur. (2013.) kao i od CPA (Werres i Wagner, 2012.) te CMA (Corn meal agar) podloga (Peterson i sur., 2020.). Naravno, ovu pretpostavku potrebno je potvrditi analizom većeg broja izolata *P. lateralis*. Vrlo je zanimljivo da u dostupnoj literaturi, iako se radi o dobro poznatom, notornom patogenu, ne postoje novije mikrofotografije oospora *P. lateralis*. Posljednje dostupne crno-bijele fotografije objavljene su u knjizi *Phytophthora – Identifying Species by morphology and DNA Fingerprints* (Gallegly i Hong, 2008.), ali je očito da je, od tri objavljene fotografije, samo jedna (vrlo loša) stvarno oospora. Iako se u originalnu opis oospora *P. lateralis* (Trione, 1957. i 1974.) navodi da su anteridiji isključivo paragini, nije opisan njihov oblik niti su navedene njihove dimenzije. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o obliku i dimenzijama anteridija *P. lateralis*. Iz rezultata analize morfoloških karakteristika izolata PLMP-15 može se zaključiti da su anteridiji isključivo paragini, gotovo kuglasti (sferični) ili izduženi, do nepravilnog oblika, relativno veliki, prosječne veličine 14 x 18 µm.

Prema Brasier i sur. (2012.) kod *P. lateralis* poznate su četiri fenotipski i filogenetski različite loze (lineages) od kojih većina europskih izolata pripada tzv. PNW lozi (Pacific North West) zajedno s sjevernoameričkim izolatima. Tvorba oospora kod izolata PLMP-15 u našem laboratoriju sukladna je podacima koji se odnose na američke izolate (PNW lineage) u starijoj literaturi. Ta činjenica također ukazuje da na to da je moguće da je formiranje oospora u hranjivoj podlozi (barem za PNW lozu) prije stvar metode koja se za to koristi, nego atipičnosti izolata, što je potrebno provjeriti u daljnjim istraživanjima. U ovome testiranju vrlo je važna činjenica da izolat *P. lateralis* PLMP-15 vrlo rado stvara oospore u listovima pačempresa i tuje što se potpuno slaže s podacima iz doktorske disertacije u kojoj su oospore prvi put opisane (Trione 1957.), a u kojoj se navodi da *P. lateralis* u prirodi tvori oospore u listovima i grančicama pačempresa. To znači da osim hlamidospora i oospore, kao trajne spore, mogu



.....

imati značajnu ulogu u preživljavanju toga patogenog organizma u nepovoljnim uvjetima, osobito u uvjetima ekstremne suše (Jung i Burgess, 2009.), koji su nerijetko prisutni u kontinentalnim krajevima Hrvatske.

Iz rezultata istraživanja pojave *P. lateralis* na pačempresima (*C. lawsoniana*) u Hrvatskoj može se zaključiti da taj iznimno patogen organizam može preživjeti i u, za njega, ekstremnim uvjetima sušnih i vrućih ljeta i vrlo niskih zimskih temperatura te da se simptomi naglog propadanja i sušenja pačempresa pojavljuju čim se ostvare optimalni uvjeti za njegov razvoj. Osim toga, važno je istaknuti da je izolat PLMP-15 iz Malog Poganca homotaličan i da formiranje oospora u hranjivoj podlozi ovisi o vrsti podloge i temperaturi inkubacije. Način tvorbe oospora u hranjivoj podlozi (mnoštvo oospora u listovima pačempresa i tuje) snažno sugerira da je takvo formiranje oospora prisutno i u prirodi, što je vrlo važno u etiologiji bolesti koju *P. lateralis* uzrokuje, jer joj osigurava preživljavanje i u njoj ekstremnim uvjetima.

I na kraju, nalaz opasnog štetnog organizma *P. lateralis* na pačempresima u Hrvatskoj izvrstan je primjer kako se važni invazivni patogeni lako prenose sadnicama drvenastog ukrasnog bilja unutar EU-a.

***Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath ON LAWSON'S CYPRESS  
(*Chamaecyparis lawsoniana* (A.Murray bis) Parl.) IN CROATIA**

**SUMMARY**

Pseudo-fungus *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath, the most dangerous cause of *Chamaecyparis lawsoniana* decline and mortality, was isolated for the first time in the Republic of Croatia in 2015. Due to the extreme pathogenicity to Lawson's cypress (*C. lawsoniana*), a widespread ornamental tree in Europe, this pathogen is included in the A2 list of quarantine organisms of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Symptoms of sudden dieback of Lawson's cypress at the site of the finding in Croatia are shown, which is, to the best of our knowledge, the first such finding outside of the mild and humid oceanic climate in Europe. The paper also describes isolation methods and methods of identification based on morphological characteristics and molecular techniques. Since the isolate of *P. lateralis* (PLMP-15) from *C. lawsoniana* in Croatia is undoubtedly homothallic, but only in a specific media, the method of obtaining oospores in the media containing leaves of Lawson's cypress (*C. lawsoniana* 'Columnaris glauca') and thuja (*Thuja occidentalis* 'Smaragd') is described. On these media isolate PLMP-15 produced oospores relatively quickly and abundantly. The results of the oospore formation test with PLMP-15 isolate clearly indicate that oospore formation depends on the type of nutrient medium and the temperature at which the test is performed. The way in which oospores were formed in the nutrient

medium (the abundance of oospores in the leaves of *C. lawsoniana* and *Thuja occidentalis*) strongly suggests that such oospores formation is also present in the nature, which is very important in the etiology of the disease caused by *P. lateralis*, as it ensures its survival even in extreme conditions for this dangerous pathogen.

The finding of the *P. lateralis* on *C. lawsoniana* in Croatia is an excellent example of how important invasive pathogens are easily transmitted by the woody ornamental plants within the EU.

**Keywords:** *Phytophthora lateralis*, *Chamaecyparis lawsoniana*, symptoms, methods of isolation, identification and oospore production.

## LITERATURA

**Brasier, C.M., Vettraino, A.M., Chang, T.T., Vannini, A.** (2010.). *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth *Chamaecyparis* forest in Taiwan. *Plant Pathology*, 59, 595–603.

**Brasier, C.M., Franceschini, S., Vettraino, A.M., Hansen, E.M., Green, S., Robin, C., Webber, J.F., Vannini, A.** (2012.). Four phenotypically and phylogenetically distinct lineages in *Phytophthora lateralis*. *Fungal Biology*, 116, 1232–1249.

**EPO** (2024.) Global Database: *Phytophthora lateralis*. <https://gd.eppo.int/taxon/PHYTLA/distribution> (pristupljeno ožujak 2024)

**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.

**Gallegly, M.E., Hong, C.** (2008.). *Phytophthora* – Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints, American Phytopathological Society, St Paul, MN, U.S.A., 86 – 87.

**Green, S., Brasier, C.M., Schlenzig, A., McCracken, A., MacAskill, G.A., Wilson, M, Webber, J.F.** (2013.). The destructive invasive pathogen *Phytophthora lateralis* found on *Chamaecyparis lawsoniana* across the UK. *Forest Pathology*, 43 (1), 19 – 28.

**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.

**Hansen, E.M., Streito, C. & Delatour, C.** (1999.). First confirmation of *Phytophthora lateralis* in Europe. *Plant Disease* 83, 587.

**Hansen, E.M., Goheen, D.J., Jules, E.S., Ullian, B.** (2000.). Managing Port-Orford-Cedar and the Introduced Pathogen *Phytophthora lateralis*. *Plant Disease*, 84 (1), 4 – 13.

**IDphy** (2024). Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types <https://idtools.org/phytophthora/index.cfm?searchTerm=lateralis> (pristupljeno ožujak 2024).

**Jung, T., Burgess, T.I.** (2009.). Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia* 22, 95–110

**Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P. et al.** (2016.). Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest pathology*, 46 (2), 134 – 163.

Jung, T., Perez-Sierra, A., Duran, A., Horta Jung, M., Balci, Y., Scanu, B. (2018.). Canker and decline diseases caused by soil and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia* 40, 182 – 220

Jung, T., Horta Jung, M., Webber, J.F., Kageyama, K., Hieno, A., Masuya, H., Uematsu, S., Pérez-Sierra, A. *et al.* (2021) The destructive tree pathogen *Phytophthora ramorum* originates from the laurosilva forests of East Asia. *Journal of Fungi* 7, 226.

Martin, F.N., Blair, J.E., Coffey, M.D. (2014.). A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 19 – 32.

Peterson, E.K., Rupp, F., Eberhart, J., Parke, J.L. (2020.). Root Rot of *Juniperus* and *Microbiota* by *Phytophthora lateralis* in Oregon Horticultural Nurseries. *Plant disease*, 104 (5), 1500 – 1506.

Robin, C., Piou, D., Douzon, G., Schenck, N., Hansen, E.M. (2011.). Root and aerial infections of *Chamaecyparis lawsoniana* by *Phytophthora lateralis*: a new threat for European countries. *Forest Pathology*, 41 (5), 417 – 424.

Schlenzig, A., Campbell, R., Mulholland, V. (2011.). *Thuja occidentalis*: a new host for *Phytophthora lateralis*. *New Disease Reports* 24, 8.

Schlenzig, A., Campbell, R., Eden, R. (2014.). First report of *Phytophthora lateralis* on *Chamaecyparis pisifera*. *New Disease Reports* 29, 15.

Themann, K., Werres, S. (1998.). Use of *Rhododendron* leaves to detect *Phytophthora* species in root and soil samples. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 50(2), 37-45.

Trione, E.J. (1957.). The Physiology and Pathology of *Phytophthora lateralis* on Native *Chamaecyparis lawsoniana*, Thesis, Oregon State College. <https://ir.library.oregonstate.edu/downloads/2f75rb64s> (pristupljeno: ožujak 2024.)

Trione, E.J. (1974.). Sporulation and Germination of *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 64, 1531 – 1533.

Tucker, C.M., Milbrat, J.A. (1942.). Root Rot of *Chamaecyparis* Caused by a Species of *Phytophthora*. *Mycologia*, 34 (1), 94 – 103.

Webber, J.F., Vettriano, A.M., Chang, T.T., Bellgard, S.E., Brasier, C.M., Vannini, A. (2012.). Isolation of *Phytophthora lateralis* from *Chamaecyparis* foliage in Taiwan. *Forest Pathology*, 42 (2), 136 – 143.

Werres, S., Wagner, S. (2012.). *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath (1942). JKI Data Sheets, Plant Diseases and Diagnosis. 1 – 13.

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

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990.). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, 315 – 322.

Zobel, D.B., Roth, L.F., Hawk, G.M. (1985.). Ecology, Pathology and Management of Port-Orford-Cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*), U.S. Forest Service, Oregon, General Technical Report PNW-184, 1 – 161.

izvorni znanstveni rad