



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

POLJOPRIVREDNI FAKULTET



Biljana Lolić

**ULOGA KOMPLEKSA *Phytophthora* spp. U SUŠENJU I
PROPADANJU MALINE U REPUBLICI SRPSKOJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2018. godina



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF AGRICULTURE



Biljana Lolić

**THE ROLE OF *Phytophthora* spp. COMPLEX IN RASPBERRY
DRYING AND DECAYING IN THE REPUBLIC OF SRPSKA**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2018

PODACI O MENTORU I DISERTACIJI

Mentor

Prof. dr Duška Delić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije

Uloga kompleksa *Phytophthora* spp. u sušenju i propadanju maline u Republici Srpskoj

Rezime

Posljednjih godina u Republici Srpskoj komercijalna proizvodnja i proizvodnja sadnog materijala maline (*Rubus idaeus* L.) ima sve veći porast. U mnogim zemljama značajan problem u proizvodnji maline predstavljaju štetni organizmi, posebno vrste roda *Phytophthora*, a jednom unesen u proizvodno područje, i u odsustvu biljaka domaćina, patogen može preživjeti u zemljištu dugi niz godina. Potvrđeno je da distribucija i upotreba zaraženog sadnog materijala iz rasadnika predstavlja najbrži način širenja.

Zbog toga je kao jedan od ciljeva ovog istraživanja bio uspostavljanje brze, efikasne, osjetljive i pouzdane metode za rutinsko testiranje uzoraka na prisustvo *Phytophthora* spp. tokom kontrole rasadničke proizvodnje, kao i prilikom uvoza maline.

U periodu od 2008. do 2016. godine u rasadnicima i u proizvodnim zasadima maline na različitim lokalitetima Republike Srpske sakupljeno je i analizirano ukupno 1.130 uzoraka maline i zemljišta.

Pored pregleda terena i utvrđivanja simptoma, za detekciju patogena u laboratorijskim uslovima korišćene su: klasične metode (izolacija na hranljive podloge i mikroskopiranje), serološke i molekularne metode. Ukupno 15 izolata je sekvencirano i identifikovano kao vrsta *Phytophthora rubi*.

Za nastavak ovog rada potrebno je posvetiti pažnju razvoju dijagnostičkih metoda za detekciju i identifikaciju drugih vrsta roda *Phytophthora*, posebno *P. ramorum* čije prisustvo je potvrđeno u ukrasnim biljkama i šumskim vrstama u zemljama u okruženju, pa postoji opravdana prijetnja njihovog unošenja na prostor Republike Srpske.

Ključne riječi

Phytophthora rubi, dijagnostičke metode, zasadi maline, rasadnici maline

Naučna oblast

Poljoprivredne nauke

Naučno polje

Biljne nauke

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrniku

B 390 Fitotehnika, hortikultura, zaštita prinosa, fitopatologija
UDK 634.711:664.8.047(497.6RS)(043.3)

Tip odabrane licence Autorstvo-nekomercijalno
Kreativne zajednice

INFORMATION ABOUT MENTOR AND DISSERTATION

Mentor

dr Duška Delić, associate professor, Faculty of Agriculture, University of Banja Luka

Title of doctoral dissertation

The role of *Phytophthora* spp. complex in raspberry drying and decaying in the Republic of Srpska

Abstract

In recent years in the Republic of Srpska, commercial production and production of raspberry (*Rubus idaeus* L.) planting material has been growing steadily. In many countries, significant problems in raspberries production are harmful organisms, especially *Phytophthora* spp., and once introduced into the production area, even in host plants absence, the pathogen can survive in the soil for many years. It was confirmed that the fastest way to spread is distribution and use of infected nurseries planting material.

Therefore, as one of the aims of this study was to establish fast, efficient, sensitive and reliable methods for routine sample testing in the presence of *Phytophthora* spp. during the control of nursery production as well as on the raspberry import.

In the period from 2008 to 2016 a total of 1.130 samples of raspberry and soil were collected and analysed in raspberries nurseries and orchards at different sites of the Republic of Srpska.

In addition to field examinations and diagnosis of symptoms, classical methods (isolation on nutrient substrates and microscopy), serological and molecular methods were used to detect pathogens in laboratory analyses. A total of 15 isolates were sequenced and identified as *Phytophthora rubi*.

For the continuation of this work, attention should be to develop a diagnostic methods for detection and identification other *Phytophthora* species, in particular *P. ramorum*, whose presence has been confirmed in ornamental plants and forest species in the surrounding countries, and there is a justified as the threat to entry into the territory of the Republic of Srpska.

Keywords

Phytophthora rubi, diagnostic methods, raspberry orchards, raspberry nurseries

Scientific area

Agricultural science

Scientific field

Plant science

Classification code for the scientific field under CERIF code book

B 390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology
UDK 634.711:664.8.047(497.6RS)(043.3)

Type of selected licence Authorship-non-commercial

Creative Commons

Stabilni temelji Poljoprivrednog fakulteta, jak kolektiv i zarazna općinjenost naukom, kao i sve do sada stvoreno ne bi bilo moguće bez Vaše vizije.

Hvala Vam prof. dr Nikola Mičiću.

Zahvaljujem se prof. dr Branki Kratić za sav trud tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji. Dugogodišnje i bogato iskustvo sučeljavanja sa problemima u oblasti zaštite zdravlja biljaka i nesebično prenošenje svoga znanja ne samo u radu, već i u životu je imalo neprocjenjivu vrijednost za mene.

Iskreno divljenje i posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Gordani Đurić za beskrajnu strpljivost i iznalaženje rješenja za sve prepreke i probleme koje su nastajale tokom realizacije ove disertacije, a kojih nije bilo nimalo malo.

Veliku zahvalnost osjećam prema prof. dr Duški Delić za sve zajedničke sate provedene u laboratoriji, sve korisne komentare tokom pisanja doktorske disertacije i sve smjernice koje su bile vodilja za pravi pravac.

Beskrajnu zahvalnost dugujem prof. dr Dragi Miloševiću za korisne sugestije tokom pisanja disertacije i odličnu dosadašnju saradnju, za koju se nadam da će se nastaviti i dalje.

Veliko hvala doc. dr Nenadu Stojanoviću za pomoć oko statističke obrade podataka.

Uspjeli ste pretvoriti taj dio u zanimljivu igru sa brojkama.

Svim mojim kolegama na Poljoprivrednom fakultetu se zahvaljujem na strpljenju i podršci koja je dolazila u trenucima kada je bilo teško, veoma teško, a ponekad i sve izgledalo bezizlazno.

Mojim kolegama na Institutu za genetičke resurse veliko hvala, oboгатili ste moj život u svakom mogućem segmentu.

Mojoj porodici, posebno mojim roditeljima veliko hvala za sve.

Biljana

SADRŽAJ

PODACI O MENTORU I DISERTACIJI

INFORMATION ABOUT MENTOR AND DISSERTATION

ZAHVALNICA

1.	UVOD	1
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3.	PREGLED LITERATURE	5
3.1.	Botanička pripadnost i porijeklo maline	5
3.2.	Proizvodnja maline u svijetu	5
3.3.	Proizvodnja maline u Republici Srpskoj	6
3.4.	Značaj maline kao voćne vrste	7
3.5.	Specifičnosti proizvodnje sadnog materijala maline	7
3.6.	Propisi u oblasti rasadničke proizvodnje u Republici Srpskoj	8
3.7.	Bolesti i štetočine maline	10
3.8.	Mjesto pseudogljiva u sistematici	10
3.9.	Kompleks <i>Phytophthora</i> spp.	13
3.10.	Vrste roda <i>Phytophthora</i> na malini	13
3.10.1.	<i>Phytophthora rubi</i> (Wilcox and Duncan) Man in 't Veld	14
3.10.2.	<i>Phytophthora fragariae</i> Hickman var. <i>fragariae</i> (Wilcox and Duncan)	15
3.10.3.	<i>Phytophthora ramorum</i> Werres	16
3.10.4.	<i>Phytophthora erythroseptica</i> Pethybr.	17
3.10.5.	<i>Phytophthora cactorum</i> (Lebert and Cohn) Schröter	18
3.10.6.	<i>Phytophthora cambivora</i> (Petri) Buisman	18
3.10.7.	<i>Phytophthora citricola</i> Sawada	19
3.10.8.	<i>Phytophthora drechsleri</i> Tucker	20
3.10.9.	<i>Phytophthora cryptogea</i> Pethybr. and Laff.	20
3.10.10.	<i>Phytophthora megasperma</i> Drechsler	21
3.10.11.	<i>Phytophthora syringae</i> (Berk.) Kleb.	21
3.10.12.	<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	22
3.10.13.	<i>Phytophthora idaei</i> D. M. Kenn.	23
3.11.	Sistem mjera zaštite maline od fitoftoroza	24
4.	RADNA HIPOTEZA	28
5.	MATERIJAL I METOD RADA	29
5.1.	Pregled terena, sakupljanje uzoraka i dijagnostičke metode	29
5.2.	Uzimanje uzoraka za laboratorijsku analizu	30
5.3.	Priprema uzoraka za laboratorijsku analizu	30
5.4.	Izolacija patogena na hranljive podloge	31
5.4.1.	Izolacija patogena iz biljnog materijala na hranljivu podlogu	31

5.4.2.	Izolacija patogena iz zemljišta na hranljivu podlogu	31
5.5.	Mikroskopiranje	33
5.5.1.	Mikroskopiranje biljnih dijelova u laktopenolu	35
5.5.2.	Mikroskopski pregled izolata sa hranljivih podloga	36
5.6.	Izolacija čistih kultura i formiranje kolekcije izolata	36
5.7.	Serološke metode	37
5.7.1.	Imunoenzimska metoda na ploči (DAS–ELISA)	37
5.7.1.1.	AGDIA	38
5.7.1.2.	ADGEN	40
5.7.2.	Specifičnost i senzitivnost korištenih ELISA kitova i analiza ROC krive	41
5.8.	Molekularne metode	43
5.8.1.	Izolacija ukupne DNK	43
5.8.1.1.	Ekstrakcija ukupne DNK pomoću Qiagen kita	43
5.8.1.2.	Ekstrakcija DNK iz micelije	44
5.8.1.3.	Ekstrakcija ukupne DNK iz korijena maline i prečišćavanje	45
5.8.2.	PCR (Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimeraze)	46
5.8.2.1.	Konvencionalni PCR	46
5.8.2.2.	Nested PCR (Nested Polymerase Chain Reaction)	47
5.8.2.3.	PCR bez PureTaq Ready-To-Go tubica	48
5.8.3.	Analiza PCR produkta	49
5.9.	Sekvenciranje i obrada sekvenci	50
5.10.	Test patogenosti	53
6.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	54
6.1.	Praćenje simptoma pojave bolesti i uzorkovanje	54
6.1.1.	Simptomi zabilježeni u proizvodnim zasadima	55
6.1.2.	Simptomi na biljkama u proizvodnim zasadima	56
6.1.2.1.	Simptomi na nadzemnim dijelovima maline	56
6.1.2.2.	Simptomi na podzemnim dijelovima maline	58
6.1.3.	Simptomi bolesti u rasadnicima	60
6.2.	Klasične laboratorijske metode	62
6.2.1.	Zasijavanje korjenčića uzoraka maline na hranljive podloge	62
6.2.2.	Mamci i zasijavanje mamaca na hranljivu podlogu	64
6.2.3.	Prosvjetljavanje biljnog materijala u laktopenolu	65
6.2.4.	Makroskopski i mikroskopski pregled izolata na hranljivim podlogama	65
6.3.	Serološke laboratorijske metode	69
6.3.1.	Rezultati DAS-ELISA testa uzoraka direktno iz korijena	71
6.3.2.	Statistička obrada seroloških analiza	73
6.3.2.1.	Rezultati AGDIA ELISA kit	74
6.3.2.2.	Rezultati ADGEN ELISA kit	75

6.3.3.	Upoređivanje rezultata dobijenih različitim ELISA kitovima	77
6.3.3.1.	Upoređivanje rezultata prilikom testiranja izolata iz korijena različitim ELISA kitovima	77
6.3.3.2.	Upoređivanje rezultata prilikom testiranja izolata iz zemlje preko mamac biljaka različitim ELISA kitovima	78
6.3.3.3.	Specifičnost i senzitivnost AGDIA kita	80
6.3.3.4.	Specifičnost i senzitivnost ADGEN kita	81
6.4.	Molekularne laboratorijske metode	82
6.4.1.	Konvencionalni PCR	82
6.4.2.	Nested PCR	83
6.4.3.	PCR bez PureTaq Ready-To-Go tubica	86
6.5.	Sekvenciranje, BLAST i pohranjivanje podataka u banku gena	87
6.6.	Provjera patogenosti	90
7.	DISKUSIJA	93
8.	ZAKLJUČAK	100
9.	LITERATURA	101
	PRILOZI	
	LISTA SLIKA	
	LISTA TABELA	
	LISTA GRAFIKONA	
	BIOGRAFIJA AUTORA	

1. UVOD

Malina (*Rubus idaeus* L.) je jedna od najznačajnijih vrsta jagodastih voćaka na prostoru Republike Srpske. Među voćkama se nalazi na 24. mjestu po proizvodnji u svijetu, tako da poslije jagode i crne ribizle, malina predstavlja najznačajnije jagodasto voće (Nikolić i Milivojević, 2010). Malina je voćka sjeverne zemljine polulopte. Najveći gen centri ove biljke nalaze se u Aziji i Sjevernoj Americi (Mišić, 1998).

Malina potiče iz Male Azije. Bila je bila poznata starim Grcima i Rimljanima kao divlja biljka. Njene plodove brali su po šumama, koristili za jelo i kao lijek (Nikolić i Milivojević, 2010). Postoji grčki mit prema kojem je malina Zevsu spasila život kad je bio dijete tako što ga je njegova majka sakrila iza žbunja maline jer je tadašnji vrhovni bog Kron, njegov otac, htio da ga ubije. Plinije Stariji (Gaius Plinius Sekundus Maior, 23-79 godina nove ere) navodi da je obilje maline raslo na planini Ida (oko 1 900 m n.v.) na sjevero-zapadu Male Azije, u blizini starog grada Troje, u staroj Grčkoj. Otac moderne botanike, Karl Line u svom djelu *Historia Naturalle* oslanja se na navode rimskog prirodnjaka Plinija Starijeg i po ovoj planini 1753. godine daje latinsko ime crvenoj malini, *Rubus idaeus* L. (Mišić, 1998).

U četvrtom vijeku nove ere, rimski pisac Palladius u knizi *De re rustica* (O poljoprivredi) pominje malinu kao baštensku biljku (Mišić, 1998). Prvi pouzdan primjer gajenja maline potiče iz 1548. godine. Tada engleski botaničar Turner navodi da se malina gaji u nekim vrtovima u Engleskoj (Mišić, 1998). U srednjem vijeku malina se počinje koristiti u medicinske svrhe i kao boja, a mogli su je koristiti samo bogati ljudi.

Prve pitome sorte maline su nastale somatskim mutacijama, selekcijom, prirodnim i planskim ukrštanjem divljih vrsta. Prve sorte maline, u pravom smislu te riječi, stvorene su početkom 17. vijeka. Danas svjetska pomološka nauka poznaje više od 1100 sorti različitih biološko-privrednih osobina (Petrović i Milošević, 2002).

Zbog ekonomskog značaja ove vrste voćaka, intenzivno se radi na stvaranju novih i poboljšanju kvalitativnih osobina postojećih sorti (Petrović i Leposavić, 2009). U drugoj polovini 20. vijeka se težilo stvaranju novih, boljih sorti maline (rodnijih, krupnijih, čvršćih plodova), otpornih prema nepogodnim abiotskim činiocima sredine i prouzrokovateljima bolesti, kao i kvalitetnijih plodova, pogodnih za mehanizovanu berbu i smrzavanje (Mišić, 1998).

Značajan problem u proizvodnji maline predstavljaju štetni organizmi, posebno prouzrokovatelji bolesti. Bolesti biljaka izazvane fitopatogenim gljivama i pseudogljivama su ekonomski i po rasprostranjenosti sve značajnije. Posljednjih godina u ekspanziji su

pseudogljive iz roda *Phytophthora*, naročito u Evropi, koje izazivaju značajne štete na brojnim gajenim poljoprivrednim biljkama, ukrasnim, šumskim i divljim vrstama. Vrste pseudogljiva iz roda *Phytophthora* su patogene za više od 100 različitih biljaka domaćina. Ove vrste se uglavnom nalaze u zemljištu zbog čega je njihova kontrola izuzetno komplikovana.

Propadanje i sušenje maline dugo je pripisivano drugim uzročnicima propadanja maline, kao što su niske zimske temperature ili gušenje korijena u vlažnom zemljištu (Duncan *et al.*, 1987).

U mnogim zemljama vrste roda *Phytophthora* predstavljaju glavni problem proizvodnje maline. Potvrđeno je da distribucija i upotreba zaraženog sadnog materijala iz rasadnika predstavlja najbrži način širenja patogena (Duncan *et al.*, 1987). Kada se jednom patogen unese u proizvodno područje, može preživjeti dugi niz godina u zemljištu, čak i u odsustvu biljaka domaćina (Ivanović i Ivanović, 2004).

Pravilna dijagnoza je nezaobilazan prvi korak ka uspostavljanju fitosanitarnog sistema. Jedino je tako moguće blagovremeno definisati problem, preduzeti mjere kontrole ili organizovati brzu i efikasnu eradikaciju u slučaju introdukcije nekog potencijalno opasnog patogena.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U Republici Srpskoj (RS) komercijalna proizvodnja maline ima sve veći porast u novije vrijeme. Proizvodnja sadnog materijala maline u rasadnicima Republike Srpske je započeta posljednjih dvadesetak godina i od tada ima konstantno povećanje.

Povećanje proizvodnje maline i porast uvoza sadnog materijala u Republiku Srpsku, praćeni su i problemima pojave novih i širenjem postojećih štetnih organizama.

Istovremeno sa intenziviranjem komercijalne i rasadničke proizvodnje, počeli su se pojavljivati problemi sušenja i propadanja zasada, pa je cilj ovog istraživanja bio da se utvrdi uzročnik sušenja maline u Republici Srpskoj.

Praćenje zdravstvenog stanja maline sprovedeno je u:

- proizvodnim zasadima
- rasadnicima.

Redovne godišnje kontrole sadnog materijala u rasadničkoj proizvodnji se odvijaju najmanje 2 puta godišnje, a obavezno je pratiti pojavu prisustva bolesti u rasadniku i u matičnjaku. Ovo je veoma važno ako se uzme u obzir da se radi o destruktivnoj bolesti koja izaziva ekonomski značajne štete ili čak dovodi do potpunog propadanja zasada maline.

Česta je pojava da se izdanci iz proizvodnih zasada, koji se odstranjuju u jesen, koriste za podizanje novih proizvodnih zasada. Ovakva praksa je veoma loša jer se mogu uzeti zaraženi izdanci, čime se pospješuje širenje bolesti.

Štetni organizmi iz roda *Phytophthora* prisutni su u cijelom svijetu i izazivaju probleme na različitim biljnim vrstama.

Do sada je identifikovano više od 80 vrsta roda *Phytophthora*, ali je njihova identifikacija i dalje specijalizovan, dugotrajan i težak zadatak. Zbog toga je u mnogim slučajevima oboljenja identifikacija izvršena samo do nivoa roda *Phytophthora*. Korišćenje tradicionalnih ključeva za identifikaciju vrsta u okviru roda *Phytophthora* ima nedostatka zbog slabo izraženih razlika i nedovoljno stabilnih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika.

Vrste roda *Phytophthora* na malini nisu značajno proučavane u Republici Srpskoj, a bolest je registrovana u Evropi i zemljama u okruženju (Srbija, Hrvatska, Slovenija) tako da je cilj istraživanja utvrditi pojavu, prisustvo i rasprostranjenost bolesti u našoj zemlji.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi rasprostranjenost *Phytophthora* spp. u najznačajnijim proizvođačkim regionima maline u Republici Srpskoj primjenom konvencionalnih i savremenih metoda za identifikaciju vrsta roda *Phytophthora*;
2. Na osnovu pouzdanosti korišćenih laboratorijskih metoda, uspostaviti brze, efikasne, osjetljive i pouzdane metode za rutinsko testiranje uzoraka na prisustvo *Phytophthora* spp. tokom kontrole rasadničke proizvodnje, kao i prilikom uvoza maline;
3. Uspostaviti dijagnostički protokol zasnovan na morfološkim, patogenim, biohemijskim, antigenim i molekularnim osobinama *Phytophthora* spp., izvršiti identifikaciju i sekvenciranje odabranih izolata;
4. Konačni cilj je da se na osnovu dobijenih rezultata utvrdi značaj *Phytophthora* spp. u kompleksu propadanja maline u rasadnicima i proizvodnim zasadima obuhvaćenog regiona.

3. PREGLED LITERATURE

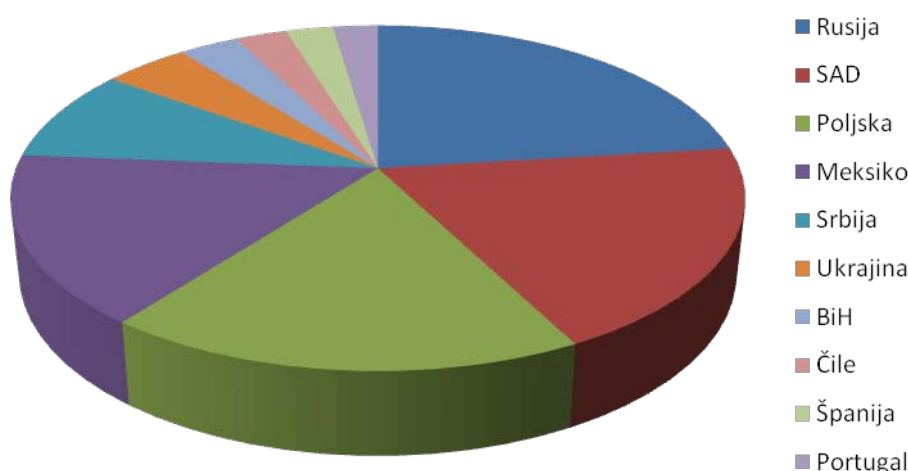
3.1. Botanička pripadnost i porijeklo maline

U sistematici biljaka (Prilog 1), malina (*Rubus idaeus* L.) pripada podrođu *Idaeobatus* W. O. Focke koji obuhvata više od 200 vrsta maline širom svijeta, a 20 vrsta malina ima jestiv plod i od njih su nastale plemenite sorte maline (Ellis *et al.*, 1991). Od 21 vrste roda *Rubus* (Tourn.) L. nastale su plemenite sorte maline (Prilog 2). Među njima, najznačajnije su:

1. Crvena malina (*Rubus idaeus* L.) sa podvrstama:
 - a) Evropska crvena malina - *R. idaeus* spp. *vulgatus* Arrhen.
 - b) Američka crvena malina - *R. idaeus* spp. *strigosus* Michx.
2. Crna (američka, kupinolika) malina - *R. occidentalis* L.
3. Purpurna (ljubičasta) malina - *R. neglectus* Peck.

3.2. Proizvodnja maline u svijetu

Prema FAO statističkim podacima od ukupno obrađenih podataka 46 zemalja svijeta, najveću proizvodnju maline ima Rusija sa 20,7% od ukupne svjetske proizvodnje, a u Evropi najveći proizvođač je Poljska sa 16,2% od ukupne svjetske proizvodnje. Srbija zauzima 5. mjesto sa 7,8%, dok je Bosna i Hercegovina (BiH) na 7. mjestu, sa 2,8% od ukupne svjetske proizvodnje (Grafikon 1).



Grafikon 1. Prikaz deset najvećih svjetskih proizvođača maline, izvor: FAOSTAT 2016, <http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity>, datum posjete: februar, 2018.

Prema FAO statističkim podacima, ukupna proizvodnja maline u periodu 2012-2016. godine, sa ukupnim proizvodnim površinama i količinom ostvarenih prinosa po jedinici površine kod 10 najznačajnijih svjetskih proizvođača je prikazana u Tabeli 1.

Tabela 1. Najveći svjetski proizvođači maline (FAOSTAT, 2016)

Region	Ukupna količina proizvodnje po godinama (tona)					Površina (ha) u 2016.	Prinos (t/ha) u 2016.
	2012.	2013.	2014.	2015.	2016.		
1. Rusija	133,000	143,000	144,000	137,800	164,602	21,025	7,829
2. SAD	76,498	83,280	103,510	119,295	137,829	8,765	15,725
3. Poljska	127,055	121,040	125,859	79,895	129,063	29,282	4,408
4. Meksiko	17,009	30,411	35,627	65,388	112,661	6,208	18,147
5. Srbija	70,320	68,458	61,715	66,176	61,875	11,041	5,604
6. Ukrajina	30,300	29,510	30,800	30,360	31,920	4,600	6,939
7. BiH	7,016	9,075	10,613	13,631	22,160	2,647	8,372
8. Čile	17,515	13,630	13,559	18,498	19,132	4,783	4,000
9. Španija	12,931	11,703	14,307	16,724	17,808	1,801	9,886
10. Portugal	3,091	2,757	4,697	12,659	16,972	-	1,697

izvor: <http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity>, datum posjete: februar, 2018.

Od zemalja koje nas okružuju, Srbija, a naročito zapadna Srbija ima najdužu tradiciju proizvodnje maline, a zamrznuta malina je jedan od najznačajnijih izvoznih poljoprivrednih proizvoda ovog regiona (Mišić i Nikolić, 2003).

3.3. Proizvodnja maline u Republici Srpskoj

Proizvodnja sadnog materijala maline u Republici Srpskoj počinje 2000. godine (Davidović Gidas *et al.*, 2017), i od tada ova proizvodnja bilježi rast.

Tabela 2. Podaci širenja proizvodnje maline u RS i količine otkupa ploda

Godina proizvodnje	Podignuti novi proizvodni zasadi (ha)	Otkupljena količina ploda maline (t)
2012.	12.00	1.113
2013.	15.00	1.219
2014.	7.32	1.521
2015.	29.44	3.064
2016.	79.02	3.970

izvor: Arhiva Resora za pružanje stručnih usluga u poljoprivredi RS

Povećanje proizvodnje maline može se pratiti kroz povećanje broja registrovanih rasadnika, povećanje količine proizvedenog sadnog materijala, kao i povećanje površina pod proizvodnim zasadima.

Prema podacima iz Resora za pružanje stručnih usluga u poljoprivredi Republike Srpske prikazanih u Tabeli 2., evidentno je posljednjih godina povećanje površina pod proizvodnim zasadima maline.

3.4. Značaj maline kao voćne vrste

Malina je specifična biljka po tome što se njeni vegetativni pupoljci nalaze pod zemljom. Na novoformiranim izdancima, koji se razvijaju iz vegetativnih pupoljaka, formiraju se generativni pupoljci koji plodonose. Malina ima plitak korijen, gaji se u relativno gustom sklopu i ima visoku produktivnost biomase (Mičić i Mičić, 2016).

U poređenju sa drugim voćnim vrstama, malina ima više prednosti: 1) lako se razmnožava izdancima; 2) počinje da rađa u prvoj godini poslije sadnje, a pun rod dostiže u trećoj godini; 3) plod dozrijeva u junu i julu, kada na tržištu nema dovoljno svježeg voća; 4) dvorodne (remontantne) sorte maline donose i drugi, manji rod u jesen (septembar i oktobar); 5) rizik od nepovoljnih prirodnih činilaca u proizvodnji maline manji je nego kod drugih voćaka, te se nalazi u grupi najrentabilnijih voćnih vrsta (Mišić, 1998).

Ukupan obim proizvodnje maline u svijetu zaostaje za ukupnom potražnjom, a to se posebno odnosi na zamrznuti plod maline prvog kvaliteta (rollend) (Mišić, 1998).

3.5. Specifičnosti proizvodnje sadnog materijala maline

Proizvodnja zdravog i kvalitetnog sadnog materijala predstavlja osnovu uspješne, savremene rasadničke proizvodnje, a zadovoljavajući rezultati u uzgoju voća u velikoj mjeri zavise od kvaliteta i zdravstvene ispravnosti materijala koji se koristi za njihovu reprodukciju (Lučić i sar., 1996; Nikolić i sar., 2006., Ivić i Fazinić, 2011).

Jedan od faktora za postizanje visokih prinosa i dobrog kvaliteta plodova maline jeste korišćenje kvalitetnog, sortnog i zdravog sadnog materijala. Razmnožavanje maline se vrši na sljedeće načine: 1) iz matičnjaka, 2) korijenovim reznicama i 3) kulturom tkiva („in vitro“).

Najkvalitetniji izdanci maline se dobiju iz matičnjaka koji su podignuti od sortno čistog i zdravog sadnog materijala, u izdvojenim i zatvorenim prostorima. Matičnjak se može

formirati na otvorenom polju koje je prostorno izolovano od drugih matičnjaka ili zasada maline najmanje 400 m (standardni sadni material).

Prednost korišćenja korijenovih reznica je ubrzano umnožavanje novostvorenih sorti maline. Korijenove reznice se sijeku tako da imaju razvijen najmanje jedan podzemni pupoljak, a optimalno je 2-3 pupoljka. Reznice proizvedene na ovakav način treba da imaju dobro razvijene žile, sa najmanje 3-4 mm u prečniku.

Najsavremeniji i najbezbjedniji način proizvodnje sadnog materijala maline je „*in vitro*“ umnožavanje (kultura tkiva) za koju su neophodni laboratorijski uslovi, čime se dobija bezvirusni, zdrav i sortno čist sadni materijala visokog rodnog potencijala (Petrović i Leposavić, 2016).

U praksi se malina masovno razmnožava zrelim i zelenim izdancima. Ne preporučuje se korišćenje izdanaka maline iz rodniha zasada za podizanje novih zasada, što je zabranjeno i zakonom o sjemenu i sadnom materijalu. Ovakav način proizvodnje i korišćenja izdanaka može dovesti do niza opasnosti kao što su: širenje gljivičnih bolesti i viroza i umnožavanje klonova (sijanaca) koji su izgubili pozitivne karakteristike sorte, a postali su klijanjem iz sjemena opalih plodova. Iz navedenih razloga, za podizanje novih zasada treba isključivo koristiti sadni materijal maline proizveden savremenim načinom, a koji se nalazi pod stručnom i zdravstvenom kontrolom ovlašćenih lica od strane Republičkog ministarstva za poljoprivredu.

3.6. Propisi u oblasti rasadničke proizvodnje u Republici Srpskoj

Oblast zaštite zdravlja biljaka rasadničke proizvodnje je uređena Zakonom o sadnom materijalu („Službeni glasnik Republike Srpske“, br. 37/09 i 117/11) i Zakonom o zaštiti zdravlja bilja u Republici Srpskoj („Službeni glasnik Republike Srpske“, br. 25/09), kao i pratećim podzakonskim aktima.

Zakon o zaštiti zdravlja bilja u Republici Srpskoj („Službeni glasnik Republike Srpske“, br. 25/09) predviđa obavezu pregleda zdravstvenog stanja sadnog materijala tokom proizvodnje, prije stavljanja u promet i prilikom uvoza u Republiku Srpsku, i izdavanja potvrde o ispunjavanju fitosanitarnih uslova propisanih ovim Zakonom i propisima.

Zakon o zaštiti zdravlja bilja predviđa obavezu donošenja sljedećih podzakonskih akata:

- Pravilnik o ispunjavanju kriterijuma za davanje ovlaštenja ispitnim i referentnim fitosanitarnim laboratorijama u oblasti dijagnostike štetnih organizama i zaštite zdravlja bilja i načinu izvještavanja;
- Pravilnik o uslovima i načinu upisa u Registar pružaoca usluga i načinu vođenja evidencije;
- Pravilnik o uslovima, postupcima, načinu određivanja visine naknade štete i potrebnoj dokumentaciji za naknadu štete za štetne organizme;
- Pravilnik o načinu i uslovima za uvoz malih količina bilja, biljnih proizvoda i regulisanih objekata („Službeni glasnik Republike Srpske", br. 28/12, od 26.03.2012. godine);
- Pravilnik o polaganju stručnog ispita iz oblasti zaštite zdravlja bilja;
- Pravilnik o načinu vođenja evidencije o unošenju, uzgajanju i korišćenju organizama autohtonih i introdukovanih vrsta;
- Pravilnik o načinu povezivanja baze podataka, kao i načinu prikupljanja i korišćenja podataka iz drugih baza podataka;
- Pravilnik o načinu povezivanja informacionih sistema, uslovima za čuvanje evidencija, spiskova i baza podataka (Davidović, 2015).

3.7. Bolesti i štetočine maline

Malina, naročito crvena malina (*Rubus idaeus* L.) je osjetljiva prema prouzrokovateljima bolesti i štetočinama (Prilog 3, 4 i 5). Najčešći ograničavajući faktor uspješnog gajenja i rentabilne proizvodnje voća predstavljaju bolesti izazvane infektivnim patogenima (gljive, virusi, viroidi, fitoplazme, bakterije) (Ivić i Fazinić, 2011). Ukoliko se ne suzbijaju, mogu prouzročiti velike štete, a u nekim slučajevima izazvati potpuno sušenje. Zbog toga se malina može uspješno gajiti samo ako se poznaju prouzrokovatelji bolesti i štetočine, i ako se blagovremeno i sistematski djeluje na njenoj zaštiti (Mišić, 1998).

Trulež korijena ili fitoftoroza maline čiji prouzrokovatelj pripada grupi pseudogljiva (gljivolikih organizama), javlja se u svim značajnim regionima proizvodnje maline u svijetu, uključujući Sjevernu Ameriku (Converse and Schwartze, 1968; Wilcox, 1989), Južnu Ameriku (Latorre and Muñoz, 1993; Wilcox and Latorre, 2002), Evropu (Duncan *et al.*, 1987; Graberg, 1994; Heiberg, 1995; Ilieva *et al.*, 1995; Kennedy and Duncan, 1995) i Australiju (Washington, 1988).

3.8. Mjesto pseudogljiva u sistematici

- Domen: *Eucaryota*
- Carstvo: *Chromista*
- Razdio: *Oomycota*
Pseudofungi
- Klasa: *Oomycetes*
- Red: *Peronosporales*
- Familija: *Pythiaceae*
- Rod: *Phytophthora*

Grupa organizama koji prouzrokuju veliki broj značajnih biljnih bolesti, pripadaju razdjelu *Oomycota* ili klasi *Oomycetes*, svrstani su u pseudogljive, gljivama slične organizme ili „niže gljive“. Većina autora ih svrstava u carstvo *Chromista*, dok ih drugi svrstavaju u carstvo *Straminipila* (Rossman and Palm, 2006), ponekad se navodi kao carstvo *Stramenopila* (Patterson and Sogin, 1992).

Razdio *Oomycota* obuhvata više od 800 vrsta koje su saprofiti ili paraziti zemljišnih ili vodenih biljaka i životinja. *Oomycota* je klasifikovana kao posebna grupa sa jedinstvenim karakteristikama (Tabela 3) (Rossman and Palm, 2006). Pseudogljive razdjela *Oomycota* uzimaju hranljive materije putem apsorbicije. Kod pseudogljiva micelija stvara septu samo radi odvajanja reproduktivne strukture od asimilativnog dijela talusa (Rossman and Palm, 2006).

Tabela 3. Razlike između *Oomycota* iz carstva *Chromista* i pravih gljiva

Osobine	<i>Oomycota</i>	Prave gljive
Polno razmnožavanje	Heterogametangija Oospore nastaju spajanjem oogonija sa anteridijama	Polnom reprodukcijom se stvaraju: zigospore, askospore i bazidiospore. Oospore se ne stvaraju
Jezgro vegetativne micelije	Diploid	Haploid ili dikariotik
Kompozicija ćelijskog zida	Beta glukan, celuloza	Hitin Celuloza je rijetko prisutna
Tipovi flagela na zoosporama	Heterokont Bičasta flagela orjentisana pozadi i končasta flagela sa cilijama orijentisana naprijed	Ako se flagele i stvaraju, najčešće postoji samo jedan tip: bičaste, orijentisane pozadi
Mitohondrija	Cijevaste kriste	Polegle kriste

izvor: Rossman and Palm, 2006.

Rod *Phytophthora* sadrži više od 80 vrsta i obuhvata skupinu značajnih biljnih patogena, uljučujući neke vrste koje su kroz istoriju imale epifitotične razmjere (*P. cinnamomi* Rands, *P. infestans* [Mont.] de Bary i *P. ramorum* Werres) (Abad *et al.*, 2008).

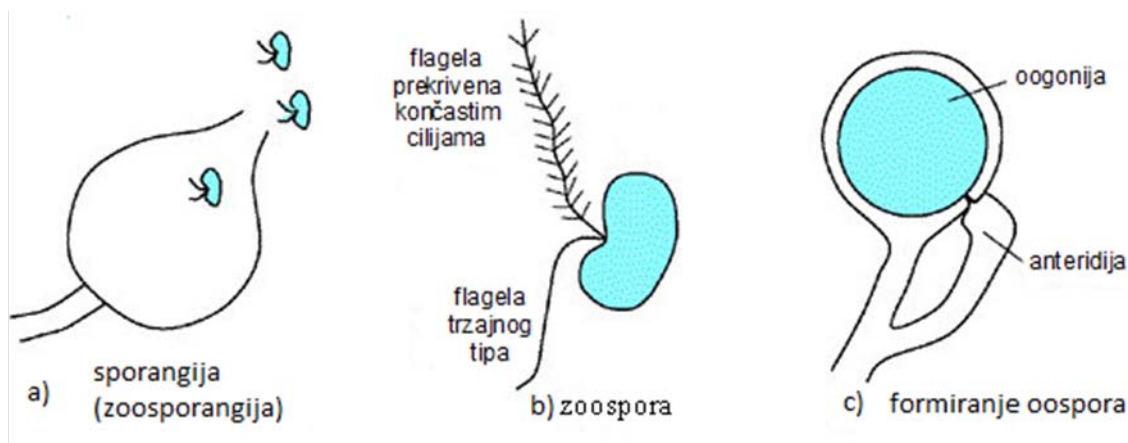
Tipični životni ciklus *Phytophthora* obuhvata bespolnu (aseksualnu) i polnu (seksualnu) fazu (Rossman and Palm, 2006). Samo oko polovine vrsta roda *Phytophthora* su homotalične i sposobne stvoriti oospore u jednoj kulturi. Preostale vrste su heterotalične i dolazi do gametangije kao odgovor na hemijsku stimulaciju izolata suprotnog srodnog tipa (Brasier, 1992; Ko, 1978).

Aseksualna reprodukcija se vrši zoosporama koji se stvaraju u zoosporangijama (Slika 1a). Zoospore (Slika 1b) su pokretne i imaju dvije vrste flagele: 1) flagela trzajnog tipa, orjentisana pozadi; 2) flagela koja je prekrivena končastim cilijama i orjentisana naprijed. Zbog pojave dvije vrste flagela, ova skupina organizama je poznata kao heterokonti, za razliku od pravih gljiva (odnosi se na Chytridiomycota) koje u određenoj fazi formiraju pokretne zoospore, ali samo sa jednim tipom flagela, trzajnog tipa orijentisanog pozadi (Rossman and Palm, 2006).

Drugi tip aseksualnih (bespolnih) spora su hlamidospore sa zadebljalim zidom koje se obrazuju direktno na hifama od vršnih ćelije i sa sposobnošću dugoročnog preživljavanja (Brasier, 1992; Ko, 1978).

Seksualna reprodukcija se događa direktnim ubrizgavanjem muškog nukleusa (spermija) iz anteridijuma u jaja sadržanih u oogonijum (Slika 1c). Plivanje spermija je odsutno kod *Oomycota*. Ova vrsta seksualnog razmnožavanja naziva se gametangijalno,

odnosno heterogametangijalno parenje. Jaja i spermiji su proizvodi mejoze i haploidni (n broj hromozoma) su u dijelu životnog ciklusa prije oplodnje (Rossman and Palm, 2006).



Slika 1. Reproductivna struktura *Oomycota* (Izvor: Rossman and Palm, 2006)

Različite vrste roda *Phytophthora*, prouzrokovajući truleži korijena i stabla, preživljavaju zimsku hladnoću i topla, suva ljeta u formi oospora, hlamidospora ili micelije u inficiranim biljnim dijelovima ili u zemlji. U proljeće, oospore i hlamidospre klijaju i formiraju zoospore, dok micelija nastavlja porast i formira zoosporangiju iz kojih se oslobađaju zoospore. Ukoliko se ne prenose tekućom vodom, zoospore imaju ograničeno širenje (Deacon and Donaldson, 1993). Zoospore plivaju u zemljišnoj vodi i inficiraju korijen osjetljivih biljaka domaćina sa kojima dođu u kontakt. U uslovima hladnog i vlažnog vremena, formira se više micelija i zoospora, a takođe bolest se širi na veći broj biljaka (Agrios, 2004).

Prvi put je objavljeno od strane Goode (1956) da postoji privlačenje zoospora velikog broja *Phytophthora* vrsta ka korijenu biljaka domaćina (Raftoyannis and Dick, 2006). Zoospore bivaju privučene korijenom biljaka i plivaju oko korijena, nakon čega se umire, zaokruže i pričvrste se, precizno orjentisane tako da začetak micelije direktno prodire u biljku domaćina (Jones *et al.*, 1991). Vlada prilična nespecifičnost u prepoznavanju biljke domaćina, prvenstveno jer zoospore na sličan način reaguju na korijen biljke domaćina, kao i na korijen biljke koja nije domaćin patogena (Carlile, 1983). Dakle, faza zoospora nije specifična kada je u pitanju izbor domaćina i specifičnost na relaciji patogen-biljka domaćin se pojavljuje u momentu pokušaja prodiranja i invazije biljnog tkiva (van West *et al.*, 2003).

3.9. Kompleks *Phytophthora* spp.

Različite vrste roda *Phytophthora* mogu izazvati značajne gubitke mnogih gajenih jednogodišnjih i višegodišnjih vrsta, dok je za nekoliko vrsta roda *Phytophthora* dokazano da epifitotično djeluju na drvenaste vrste koje rastu u različitim dijelovima svijeta (Agrios, 2004). Brojne vrste *Phytophthora* spp. su izolovane iz zaraženog korijena sa simptomima truleži (Duncana *et al.*, 1987; Washington, 1988; Wilcox, 1989; Latorre and Muñoz, 1993). Biljke domaćini, kao što su: citrusi, lijeska, malina, jagoda, krompir i paradajz mogu biti zaražene različitim vrstama roda *Phytophthora* i izazvati ozbiljnu pojavu bolesti. Izgled zaraženih biljnih dijelova se razlikuju u zavisnosti od infekcije različitim patogenim vrstama roda *Phytophthora* (Ristaino *et al.*, 1998).

Ne postoji precizno objašnjenje zašto je veliki broj vrsta roda *Phytophthora* postao štetan prema prethodno poznatim biljakama domaćinima, kao i zašto inficiraju nove biljke domaćine (Agrios, 2004). Jedno od mogućih objašnjenja za povećanje raznolikosti i aktivnosti fitoftoroza u posljednjih 10-20 godina, moglo bi se dovesti u vezu sa intenziviranjem međunarodne trgovine ornamentalnih biljaka (Brasier, 2008).

Na svim biljkama domaćinima, vrste roda *Phytophthora* izazivaju sušenje i izumiranje velikog broja malih korjenčića, dok na glavnom korijenu pojavljuju se smeđe, nekrotične rane. Kod mladih biljaka ili starijih sukulenatnih biljaka, cijeli korijenov sistem može da istrune, što je praćeno više-manje brzim sušenjem cijele biljke (Agrios, 2004).

3.10. Vrste roda *Phytophthora* na malini

Trulež korijena maline prouzrokovana vrstama roda *Phytophthora* je poznata od 1930. godine, kada je došlo do pojave masovnog širenja truleži korijena u Škotskoj (Lucas *et al.*, 1991), ali nije smatrana značajnom bolesti maline sve do sredine 1980-tih (Koprivica *et al.*, 2009). Danas se vrste roda *Phytophthora* smatraju primarnim prouzrokovateljima sušenja maline u svim proizvodnim regionima u svijetu (Duncan *et al.*, 1987; OEPP/EPPO, 2005). Trulež korijena ili fitoftoroza maline najznačajnija je bolest korijena ove biljke u svijetu. Od 1937. godine kada je Waterson utvrdio da je *P. citricola* izazvala trulež oboljelih biljaka maline u Škotskoj, više vrsta roda *Phytophthora* se povezuje sa sindromom sušenja i propadanja maline. Nekoliko vrsta roda *Phytophthora* su potvrđeni kao patogeni maline u različitim zemljama: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. erythrosepica*, *P. fragariae* var. *rubi*, *P. megasperma* i *P. syringae* (Brien and Dingley,

1959; Converse and Schwartze, 1965, 1968; Duncan *et al.*, 1987, 1990; Nourisseau and Baudry, 1987; Seemüller *et al.*, 1986; Washington, 1988; Wilcox *et al.*, 1993, 1989). Iz maline sa simptomima truleži izolovano je nekoliko vrsta od kojih su *P. fragariae* i *P. citricola* ekstremno virulentne, prouzrokujući kompletnu trulež i propadanje biljaka (Wilcox, 1989). *P. ramorum* ima veliki broj domaćina (28 vrsta) iz 12 biljnih familija (APHIS, 2007), i ovaj spisak je u stalnom porastu (Parke and Lewis, 2007). *P. idaei* je utvrđena kao prouzrokovatelj truleži korijena crvene maline (Kennedy and Duncan, 1995).

Dakle, postoji više vrsta roda *Phytophthora* vezanih za sušenje i propadanje maline u mnogim regionima gajenja u svijetu. Najznačajnija i najčešće izolovana vrsta iz oboljele maline je *P. fragariae* koja ima dva varijeteta koja prouzrokuju trulež korijena i to: trulež korijena maline (raspberry root rot) *P. fragariae* var. *rubi* i crvenilo jezgre korijena jagode (red core of strawberry) *P. fragariae* var. *fragariae* (Hickman, 1940). Kasnija istraživanja su pokazala da *P. fragariae* var. *rubi* predstavljaju odvojenu i posebnu vrstu, *Phytophthora rubi* comb. nov. (EPPO, 2009).

3.10.1. *Phytophthora rubi* (Wilcox and Duncan) Man in 't Veld

Phytophthora rubi (Wilcox and Duncan) Man in 't Veld je poznata i kao *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (Wilcox and Duncan). *P. rubi* uzrokuje najčešću i najdestruktivniju formu truleži (Kennedy and Duncan, 1991). Nalazi se na EPPO A2 karantinskoj listi (EPPO, 2017).

U EPPO regionu domaćini ovog patogena su gajena malina (*Rubus idaeus*) i njeni hibridi: *R. occidentalis*, *R. loganobaccus* (loganberry) i *R. fruticosus* x *idaeus* (tayberry).

Svi biljni dijelovi mogu biti zaraženi: korijen, korjenovi pupoljci, krana i bazni dijelovi izdanaka (mladi izdanci i rodni izdanci). Zaraženi izdanci se suše u prvoj godini ili propadaju njihovi pupoljci već na početku sljedeće proizvodne sezone. U slučaju da se izdanci razviju iz zaraženih pupoljaka, dolazi do venjenja i izumiranja u bilo kom periodu od njihove pojave do faze kasnog plodonošenja.

U zemljištu gljiva može preživjeti mnogo godina u formi rezistentnih oospora, kao i na drugim domaćinima *Rubus* vrsta. Dodatno otežavajuće okolnosti za kontrolu ove bolesti su: veliki broj generacija patogena tokom godine, brza proizvodnja novih oospora, kao i njihovo dugotrajno održavanje klijavosti. Formiranje i oslobađanje zoospora, kao primarnog izvora infekcije *Phytophthora* spp., zavisi od uslova zasićenosti zemlje vodom (Duniway, 1983) ali nije poznat precizan vodni potencijal i dužina vlaženja zemljišta za infekciju maline

sa *Phytophthora rubi*. Bolest se najjače ispoljava u uslovima pretjerane zemljišne vlage (Wilcox, 1989), a prvi simptomi u polju se najčešće pojavljuju u slabo dreniranim područima (Duncan *et al.*, 1987; Wilcox, 1989). Međutim, eksperimentalni podaci pokazuju da za razliku od drugih vrsta roda *Phytophthora* koje prouzrokuju trulež korijena, *Phytophthora rubi* je visoko patogena za neke sorte maline čak i bez perioda zadržavanja vode (Duncan and Kennedy, 1989).

P. rubi je homotalusna. Oospore su plerotične (ispunjavaju oogoniju), promjera oko 35 µm. Sporangije nemaju papilu, elipsoidnog su oblika (60 x 40 µm). Nisu zapžene hlamidospore. Maksimalna temperatura za rast je <30°C (Gallegly and Hong, 2008).

3.10.2. *Phytophthora fragariae* Hickman var. *fragariae* (Wilcox and Duncan)

Phytophthora fragariae Hickman var. *fragariae* (Wilcox and Duncan) je patogen gajene jagode (*Fragaria x ananassa*). Bolest crvene srži korijena jagode, prouzrokovana od strane *Phytophthora fragariae* Hickman je prvi put utvrđena 1921. godine (Wardlaw, 1926), a prouzrokovatelj bolesti prvi put opisan 1940. godine (Hickman, 1940). Patogene rase *P. fragariae* su prvi put objavljene 1950. godine (Scott *et al.*, 1950), a pokušaj razlikovanja rasa na osnovu fizioloških karakteristika se pokazao kao neuspješan (Maas, 1973).

Nalazi se na A2 karantinskoj listi (EPPO, 2017).

Utvrđeno je da *Rubus* hibrid loganberry može biti prirodno inficiran (McKeen, 1958) kao i kupina (*Rubus fruticosus*), a brojni rodovi porodice *Rosaceae* mogu biti vještački inficirani (Pepin, 1967). *P. fragariae* je veoma virulentna vrsta za sorte crvene maline Heritage i Taylor, gdje izaziva potpunu trulež korijena i odumiranje biljaka (Wilcox, 1989). Biljka domaćin može biti *Rubus x loganobaccus* (EPPO, 2017).

Srž inficiranog korijena dobija crvenu boju, a kasnije počinje truljenje od vrha (Erwin and Ribeiro, 1996). Inficirano korijenje trune i raspada se zbog djelovanja velikog broja sekundarnih organizama, a time se oslobađa ogroman broj oospora koje ostaju u zemljištu. U zemljištu gljiva može preživjeti mnogo godina u formi rezistentnih oospora. Eksperimentalno je potvrđeno da oospore mogu preživjeti više od 4 godine, a na nekim poljima su se očuvale 13-15 godina nakon prestanka proizvodnje jagoda. Gljiva je homotalusna, tako da je potreban samo jedan soj za formiranje oospora. Policiklična priroda bolesti, brzo stvaranje novih generacija oospora, kao i njihovo dugotrajno održavanje klijavosti dodatno otežavaju kontrolu ove bolesti (EPPO/CABI, 1997).

Hife su hijalinske i neseptirane (promjera oko 6,5 μm). Sporangije su ovalnog oblika (59 x 40 μm) i formiraju se jedino u uslovima navodnjavanja, nemaju papilu već samo zadebljanje vršnog zida. Optimalna temperatura klijanja oospora je 10-15°C, klijanje se može odvijati na 5°C, ali i na 20°C. Klijanjem oospora nastaje jedna ili nekoliko sporangija. Iz sporangija se oslobađaju veoma pokretne zoospore koje plivaju do vrhova korijenovih dlačica biljaka domaćina, imobilisu se, zaokruže, odbacuju flagelu i kličaju u kličinu cijev (germ tube) koja prodire u korijen. Jedan dio hifa prodire van korijena formirajući novu generaciju sporangija iz kojih se oslobađaju zoospore za nove infekcije. Sekundarna sporangija nema papilu, formira se u roku nekoliko dana, tako da je moguće da nastane veći broj infekcija tokom zimskih mjeseci (Gallegly and Hong, 2008).

3.10.3. *Phytophthora ramorum* Werres

Phytophthora ramorum Werres (Werres *et al.*, 2001) je prouzrokovatelj sušenja ukrasnih i šumskih vrsta biljaka, poznata kao bolest „iznenadna smrt hrasta“ (Sudden oak death, SOD) (Rizzo *et al.*, 2002).

Od 2002. godine ova vrsta se nalazila na Alert listi EPPO i njeno praćenje je regulisano posebnim odlukama Savjeta Evrope (Commission decision on provisional emergency phytosanitary measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of *Phytophthora ramorum*, 2002/757/EC od 19. 09. 2002.) (Bulajić i Krstić, 2008), kasnije je uvrštena na A2 karantinsku listu (EPPO, 2017).

U EPPO listi kao prirodni domaćini *P. ramorum* navedene su sljedeće vrste: *Pieris* (Inman *et al.*, 2002), *Viburnum* (Werres *et al.*, 2001), *Rhododendron*, *Camellia*, *Kalmia*, *Syringa*, *Leucothoe*, *Taxus baccata*, *Hamamelis virginiana*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arbutus unedo*. Preko 100 biljaka su domaćini *P. ramorum*, tako da su različiti simptomi vezani za ovog patogena (Werres and Kaminski, 2005). Hansen *et al.* (2002) navodi da patogen prouzrokuje tri različita tipa simptoma: 1) „iznenadna smrt hrasta“ (Sudden oak death) koji se karakteriše letalnom pojavom raka rana; 2) „sušenje izdanaka ramoruma“ (Ramorum shoot dieback), koji nastaje kao rezultat folijarne infekcije i direktne infekcije stabla; 3) „palež lista ramoruma“ (Ramorum leaf blight), koji nastaje kao rezultat folijarne infekcije.

Smatra se da je prisustvo *P. ramorum* u Evropi posljedica unosa patogena putem međunarodne trgovine biljnim materijalom (Werres and Kaminski, 2005; Brasier *et al.*, 2007a). Evropska Unija je 2002. godine uvela obavezne zakonske fitosanitarne mjere da spriječi unošenje i širenje *P. ramorum* u zemlje Evropske Unije. Zakonska fitosanitarne

regulativa je obuhvatala inspekciju i eradikaciju zaraženih rasadnika, pregled parkova i trgovinu uz biljni pasoš vrsta *Rhododendron* i *Viburnum*, a 2004. godine su dodate i vrste roda *Camellia*.

Postoje istraživanja u cilju selekcionisanja i gajenja otpornijih genotipova biljaka domaćina (Tjosvold *et al.*, 2002c; Tooley *et al.*, 2004; Kaminski *et al.*, 2007; Tooley and Kyde, 2007; Grünwald *et al.*, 2008a, 2008b), kao i ispitivanja mogućnosti prognoze pojave bolesti (Cohen and Venette, 2005).

Izolacija *P. ramorum* nije uvijek uspješna i zavisi od vrste uzorka, svježine materijala, vrste biljke domaćina i perioda godine u kojem se uzorkuje (Rizzo *et al.*, 2002). Izolacija je veoma komplikovana ukoliko se vrši iz drvenastih vrsta ili ukoliko se uzorci uzimaju tokom sušne sezone (Hayden *et al.*, 2004), a takođe može biti otežano zbog prisustva kompeticijskih organizama (Rizzo *et al.*, 2002).

P. ramorum je heterotalusna. Oospore su plerotične i promjera 27-32 µm, a zid oospore je debljine 2-3 µm. Sporangije su elipsoidne sa zaobljenim bazalnim dijelom (54 x 25 µm), papile su široke i zaravnjene (semipapile). Hlamidospore imaju tanak zid, promjera 50 µm i formiraju se obilno. Maksimalna temperatura za rast je oko 27°C (Gallegly and Hong, 2008).

3.10.4. *Phytophthora erythroseptica* Pethybr.

Phytophthora erythroseptica Pethybr. je dobila naziv tokom proučavanja ružičaste truleži krtola krompira (*Solanum tuberosum* L.) u Irskoj (Pethybridge, 1913). Ova bolest može prouzrokovati značano smanjenje prinosa u polju i u skladištu (Secor and Gudmestad, 1999).

P. erythroseptica je danas poznata kao prouzrokovatelj bolesti brojnih nehrvenastih biljaka (Erwin and Ribeiro, 1996).

Sušenje vegetativnih izdanaka i prijevremeno uginuće rodni izdanaka maline su glavni simptomi koji se dovode u vezu sa truljenjem korijena koju izaziva zemljišna pseudogljiva *P. erythroseptica* (Converse and Schwartze, 1968). Isti simptomi se dovode u vezu sa oštećenjem korijena maline koje izaziva plavljenje zemljišta, kasno zimi ili u rano proljeće, u periodu kada se obnavlja korijenje (Atkinson, 1973). Čak i kratak period poplavljenog zemljišta može izazvati oštećenja korijenja maline. Posljedice oštećenja izazvanih truljenjem korijenja najčešće budu primjećena tek kada ugrozi porast vegetativnih i

rodnih izdanaka maline, kada oslabljeni korijenov sistem više ne može da prati njihov porast (Bristow *et al.*, 1989).

P. erythroseptica formira sporangije bez papile, elipsoidnog često nepravilnog oblika ($44.2 \times 27.2 \mu\text{m}$). Sporangiospore se simpodijalno granaju. Hlamidospore nisu deuter. Optimalna temperature za rast je $27,5^{\circ}\text{C}$ (Erwin and Ribeiro, 1996).

3.10.5. *Phytophthora cactorum* (Lebert and Cohn) Schröter

Patogen *Phytophthora cactorum* (Lebert and Cohn) Schröter je prvi put objavljen pod nazivom *Peronospora cactorum*, prouzrokovatelj truljenja stabljike kaktusa (Lebert and Cohn, 1870). Erwin and Ribeiro (1996) su utvrdili postojanje brojnih sinonima, s tim da je *P. cactorum* i danas jedini priznat naziv (Schröter, 1886).

P. cactorum je raširen svuda u svijetu i prouzrokuje bolest na brojnim domaćinima (oko 80 različitih rodova) (Erwin and Ribeiro, 1996). Može izazvati značajna oštećenja brojnih poljoprivrednih i ukrasnih biljaka, kao i šumskih vrsta (Causin *et al.*, 2005). Najpoznatiji je kao prouzrokovatelj truljenja korijena, prizemnog dijela stabla i krošnje drvenastih biljnih vrsta, posebno voćaka (Gallegly and Hong, 2008).

P. cactorum je patogen koji se širi putem sadnog materijala bez ispoljenih simptoma (latentna infekcija), a može preživjeti i u zemljištu kao i u biljnim ostacima (Lilja *et al.*, 2006). Na gajenoj jagodi (*Fragaria x ananassa* Duch.) izaziva truljenje krune bokora i kožastu trulež plodova (Rose, 1924). *P. cactorum* je blago virulentna vrsta za crvenu malinu sorte Heritage i Taylor (Wilcox, 1989).

Sporangija ima izraženu papilu, elipsoidnog do ovalnog oblika, dimenzija $31.4 \pm 4.8 \times 26.4 \pm 4.0 \mu\text{m}$ (Oudemans and Coffey, 1991a). Hlamidospore se ponekad stvaraju, najčešće kao posljedica nepovoljnih uslova spoljašnje sredine (Waterhouse and Waterston, 1966). *P. cactorum* je homotalusna. Oospore imaju zadebljale zidove prosječnog promjera $2 \mu\text{m}$. Optimalna temperature za rast je 20°C (Oudemans and Coffey, 1991a).

3.10.6. *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman

Phytophthora cambivora (Petri) Buisman je najprije opisana kao *Blepharospora cambivora* (Petri, 1917), a kasnije je došlo do uvrštavanja u rod *Phytophthora* (Buisman, 1927).

P. cambivora je široko rasprostranjena. Najprije je utvrđena u Engleskoj, a kasnije u još nekim evropskim zemljama (Gallegly and Hong, 2008).

P. cambivora je prouzrokovatelj truljenja korijena nekoliko drvenastih i zeljastih biljaka (Erwin and Ribeiro, 1996). Ipak, najpoznatija je kao prouzrokovatelj mastiljave bolesti kestena (Gallegly and Hong, 2008).

P. cambivora formira sporangiju bez papile, okruglastog do elipsoidnog oblika (85 x 60 µm) (Waterhouse and Waterston, 1966). Sporangiofore su jednostavne, nerazgranate ili simpodijalne. Starija micelija je često septirana (Mircetich and Matheron, 1976). *P. cambivora* je heterotalusna. Optimalna temperatura za rast je 22-24°C (Erwin and Ribeiro 1996).

3.10.7. *Phytophthora citricola* Sawada

Phytophthora citricola Sawada (1927) je opisan kao prouzrokovatelj truljenja korijena slatke narandže. Danas su širom svijeta zabilježeni brojni simptomi truleži korijena i prizemnog dijela stabla, kao i simptomi krvarećeg raka mnogobrojnih drvenastih vrsta koji su vezani za prouzrokovatelja *P. citricola* (Gallegly and Hong, 2008). *P. citricola* prouzrokuje trulež korijenovog vrata i odumiranje sijanaca trešnje Mahaleb i Mazzard (Wilcox, 1989).

Zbog morfoloških razlika, izolati *P. citricola* su svrstani u 3 grupe: I, II, III. Tipični izolat *P. citricola* I je izolovan iz vrhova grana rododendrona u West Virginia, dok je *P. citricola* II izolovanja iz rododendron biljaka u Long Islandu i Njujorku. Izolat *P. citricola* III je dobijen iz reciklirane vode za navodnjavanje koja se koristila u rasadniku Oklahoma, kao i iz javora u Wisconsin (Gallegly and Hong, 2008).

Potvrđeno je da je *P. citricola* prouzrokovatelj truleži korijena crvene maline u Škotskoj (Waterston, 1937). To je veoma virulentna vrsta za crvenu malinu sorti Heritage i Taylor, gdje izaziva potpunu trulež korijena i odumiranje biljaka (Wilcox, 1989).

Oblik sporangije je veoma varijabilan, od ovalnog do značajno zaravnjenog na jednoj strani (47 x 34 µm) (Zentmyer *et al.*, 1974). Papile su široke i zaravnjene (semipapile). Sporangiofore su jednostavne, nerazgranate ili ponekad simpodijalno razgranate. Hlamidospore su zabilježene samo na agaroznoj podlozi od ovsu (Erwin and Ribeiro, 1996). *P. citricola* je homotalusna, optimalna temperatura za rast je 25-28°C (Waterhouse, 1963; Zentmyer *et al.*, 1974).

3.10.8. *Phytophthora drechsleri* Tucker

Phytophthora drechsleri Tucker je prvi put izolovan iz trulog krompira (Tucker, 1931). *Phytophthora drechsleri* i *Phytophthora cryptogea* imaju mnogo zajedničkih morfoloških karakteristika, ali se veoma razlikuju u uslovima gajenja, tako da na temperaturi od 35°C *P. drechsleri* dobro raste, a *P. cryptogea* ne raste (Gallegly and Hong, 2008).

P. drechsleri je ekonomski značajna vrsta na velikom broju različitih domaćina (Erwin and Ribeiro, 1996), a prouzrokuje gumoznost i truljenje korijenja pistacija (Shahidi Bonjar *et al.*, 2006).

Kompleks *P. cambivora* i *P. citricola* može izazvati ozbiljna oštećenja na malini, dok *P. cactorum* i *P. drechsleri* može izazvati ozbiljna oštećenja samo u uslovima slabe dreniranosti zemljišta ili na onim dijelovima polja koja su pod vodom (Duncan and Kennedy, 1989).

Oblik sporangija varira od ovalnog do izduženog (ponekad zaoštren u bazalnom dijelu) (Klisiewicz, 1977), bez papile (39 x 24 µm). Sporangiofore su tanke i najčešće simpodijalno razgranate. Hlamidospore su registrovane samo kod nekih izolata (Cother and Griffin, 1974, 1973b). Heterotalusne su, a optimalna temperatura za rast je 28-31°C (Tucker, 1931).

3.10.9. *Phytophthora cryptogea* Pethybr. and Laff.

Phytophthora cryptogea Pethybr. and Laff. je prvi put opisan u Irskoj kao prouzrokovatelj truljenja prizemnog dijela stabla paradajza (Pethybridge and Lafferty, 1919). Danas je jedan od najznačajnijih biljnih patogena u okviru roda *Phytophthora*.

Veoma je polifagan, oko 150 vrsta u 23 familije su domaćini vrste *P. cryptogea* (Erwin and Ribeiro, 1996).

P. cryptogea je potvrđena kao prouzrokovatelj bolesti u Ujedinjenom Kraljevstvu (Duncan *et al.*, 1987), Njemačkoj (Seemüller *et al.*, 1986), Francuskoj (Nourrisseau and Baudry, 1987), Norveškoj (Heiberg *et al.*, 1990), Švicarskoj (Bolay and Lauber, 1989), kao i u nepotvrđenim izvještajima u nekoliko drugih zemalja (Wilcox, 1989; Wilcox and Mircetich, 1987, Washington, 1988).

P. cryptogea je izolovana u zasadima crvene maline sorti Willamette, Glen Clova i Canby, gdje je došlo do ispoljavanja simptoma venjenja, sušenja, pojave rana na stablu i truljenja korijena (Washington, 1988).

Postoji značajna morfološka sličnost sa *P. drechsleri* (Erwin and Ribeiro, 1996). Molekularnim analizama potvrđene su razlike između izolata ove dvije vrste (Gallegly and Hong, 2008).

Sporangije su najčešće ovalnog oblika, s tim da one koje se kasnije formiraju su izdužene ili variraju u obliku (Ho and Jong, 1991). Sporangije (37 x 23 µm) nemaju papilu (Stamps, 1978b). Heterotalusna je i ne formira hlamidospore. Oospore imaju zadebljali zid promjera 3,5 µm. Na hranljivoj podlozi formira vazdušastu miceliju, optimalna temperatura za rast je 22-25°C (Erwin and Ribeiro, 1996).

3.10.10. *Phytophthora megasperma* Drechsler

Phytophthora megasperma Drechsler je naprije izolovan iz vrtnog sljeza (Tucker, 1931). Erwin and Ribeiro (1996) su opisali varijabilnost i kompleksnost vrste *P. megasperma*, a formira 3 grupe izolata: I, II i III (Gallegly and Hong, 2008). *P. megasperma* I je izolovan iz sljeza (Tucker, 1931), *P. megasperma* II je izolovan iz duglazije (*Pseudotsuga menziesii* (Mirbell) Franco) i kokotca (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.), dok je *P. megasperma* III izolovan iz *Prunus* spp. (Gallegly and Hong, 2008).

P. megasperma ima širok krug biljaka domaćina, a zajedno sa *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten može zaraziti veliki broj drvenastih vrsta, a među njima i maslinu, gdje najčešće zaražava površinski dio korijena (Domsch *et al.*, 1980; Sánchez Hernández *et al.*, 1998).

P. megasperma je prisutna u Aziji (Jordan i Izrael) (EPPO, 2017).

P. megasperma i *P. cryptogea* su umjereno do visoko virulentne vrste koje prouzrokuju 46-96% trulež korijena i 20-80% potpunog sušenja maline (Wilcox, 1989).

Sporangije nemaju papilu, ovalnog su oblika (35-60 x 25-45 µm) (Drechsler, 1931). Sporangiofore su jednostavne ili slabo razgranate. Ne stvaraju hlamidospore. Većinom su homotalusne, mada je registrovano postojanje heterotalusnih izolata kod lucerke (Barr, 1980; Ho, 1986).

3.10.11. *Phytophthora syringae* (Berk.) Kleb.

Phytophthora syringae (Berk.) Kleb. je naprije imenovana kao *Phloeophthora syringae* (Klebahn, 1905) ali je Klebahn kasnije promijenio naziv u *Phytophthora syringae* (Klebahn, 1909). Originalni opis predstavljaju izolati iz *Syringae* spp. koji naseljavaju

međućelijski prostor kore i pupoljke jorgovana (*Syringae vulgaris* L.) (Gallegly and Hong, 2008).

Trulež plodova jabuke u skladišnim uslovima prouzrokovana *P. syringae* potvrđena je u Kanadi (Ross and Gourley, 1969), Engleskoj (Snowdon, 1990) i SAD (Spotts, 2002). *P. syringae* je potvrđena i u Njemačkoj, Grčkoj, Portugalu, Italiji, Irskoj, Argentini i Novom Zelandu (Gallegly and Hong, 2008).

Trenutna lista domaćina nabrojana od Erwin and Ribeiro (1996) obuhvata 31 biljku iz 19 rodova. Na stablu badema izaziva rak rane (Doster and Bostock, 1988a), a napada jabuku izazivajući trulež korijena, stabla i ploda (Harris, 1991).

P. syringae djeluje veoma destruktivno, izazivajući palež lišća i grančica, truleži korijena i plodova, kao i rak stabla (Doster and Bostock, 1988a).

Sporangija je široko ovalna (24,4 x 51,3 µm), semipapilarna. Prema Waterhouse and Waterston (1964a) i Ho and Jong (1993) ne stvaraju hlamidospore, dok Stamps *et al.* (1990) navodi formiranje hlamidospora, promjera 25 µm. Optimalna temperatura rasta je 15-20°C (Erwin and Ribeiro, 1996).

3.10.12. *Phytophthora cinnamomi* Rands

Originalni opis *Phytophthora cinnamomi* Rands (1922) je nastao nakon istraživanja trakastog raka na cimetu (*Cinnamomum burmanni* (Nees) Blume) u Burmi (Rands, 1922).

Poznata je kao jedna od najraširenijih vrsta roda *Phytophthora*, prouzrokujući bolesti širom svijeta (Gallegly and Hong, 2008).

P. cinnamomi ima preko 1000 vrsta biljaka domaćina (Gallegly and Hong, 2008). Neke od značajnih drvenastih vrsta kod kojih se javlja trulež korijena su: brusnica, ananas, čempres, eukaliptus, američki kesten, hrast i neke druge šumske, drvenaste vrste (Gallegly and Hong, 2008), visoko-žbunasta borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) (Royle and Hickman, 1963; Clayton and Haasis, 1964).

Inficirano korijenje postaje nekrotično i trune, a simptomi na listovima se javljaju u obliku hloroze, crvenila i defolijacije (de Silva *et al.*, 1999). Sorte crne borovnice (*Vaccinium ashei* Reade) su tolerantnije na fitoforoznu trulež korijena od visoko-žbunaste borovnice (Milholland and Galletta, 1967). Infekcija brusnice sa *P. cinnamomi* sa simptomima postepenog sušenja se pojavljuje u uslovima kada je slabo drenirano zemljište i kada biljke ostaju duži period u zemljištu saturisanom vodom (Jeffers and Caruso, 1995). Oudemans (1999) ističe da je stepen ostvarenih infekcija *P. cinnamomi* donijetih površinskom vodom za

navodnjavanje u pozitivnoj korelaciji sa temperaturom i količnom vode u ranoj fazi proizvodne sezone. Što se tiče kiselosti zemljišta, iako je poznato da visoka pH vrijednost zemljišta utiče na povećanu pojavu bolesti prouzrokovanu nekim vrstama iz roda *Phytophthora* (Schmitthenner and Cannaday, 1983), pH vrijednost 6.0-6.5 je optimalna za formiranje sporangijuma *P. cinnamomi* (Weste, 1983).

Sporangija je ovalnog do elipsoidnog oblika, nema papilu. Hlamidospore se obilno formiraju, sferičnog su oblika i sa tankim zidom. Oospore su sferične sa umjereno zadebljalim zidom. Optimalna temperatura rasta je 26-32° C (Erwin and Ribeiro, 1996).

3.10.13. *Phytophthora idaei* D. M. Kenn.

Phytophthora idaei D. M. Kenn. (1995) je utvrđena u Velikoj Britaniji kao prouzrokovatelj truleži korijena crvene maline, i predložen je naziv *Phytophthora idaei* sp. nov. (Kennedy and Duncan, 1995).

Nije utvrđeno prisustvo patogena izvan Velike Britanije (Gallegly and Hong, 2008).

Neke biljke malina sa više od 20% korijena zaraženog sa *Phytophthora idaei* ne ispoljavaju simptome u nadzemnom dijelu, pa se smatra da je ovaj patogen od manjeg značaja (Gallegly and Hong, 2008). Ipak, *P. idaei* može da prouzrokuje venjenje biljaka, a lišće postaje hlorotično sa nekrotičnim marginama (Abad *et al.*, 2008).

P. idaei imaju ograničenu vazdušnu miceliju, ne formira hlamidospore. Sporangije su uglavnom sferičnog do blago izduženog oblika (49 x 36 µm) i imaju papilu. Direktno klijanje je rijetko, a najčešće formiraju zoospore. Optimalna temperatura za rast je 20-22° C (Erwin and Ribeiro, 1996).

3.11. Sistem mjera zaštite maline od fitoftoroza

Dijagnoza biljnih bolesti zasnovana isključivo na simptomatologiji oboljenja je nepouzdana s obzirom da mnogi patogeni mogu izazvati nespecifične i varijabilne simptome, ili su prisutni bez vidljivih simptoma (Miller and Martin, 1988). Dijagnoza biljnih bolesti zasnovana na simptomatologiji mora da bude praćena identifikacijom patogena laboratorijskim metodama (Ivanović *et al.*, 2004).

Metode suzbijanja prouzrokovaca zemljišnih fitoftoroza zavisi prvenstveno od proizvodnog sistema maline (Maloney *et al.*, 2005). Ne postoji jednostavno „izlječenje“ od fitoftoroze, međutim postoje brojne, različite metode koje proizvođači mogu koristiti sa ciljem da se izbjegnu ili barem smanje gubici (Ellis, 2008). S obzirom da pojedinačne metode zaštite nisu efektivne, najbolja strategija je formiranje programa integralnih mjera zaštite gdje bi se uključile sve praktične raspoložive mjere (Ellis, 2008).

Poštovanje principa integralne proizvodnje u cilju kontrole fitoftoroze uključuje sadnju otpornih sorti maline, upotrebu fungicida i fumiganata, izbjegavanje vlažnih zemljišta (Heiberg, 1995; Maloney *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1999), kao i uvođenje pokrivene drenaže i proizvodnja maline na bankovima (Ellis, 2008; Maloney *et al.*, 1993; Kloczko *et al.*, 1990). Za crvenu malinu preporučuje se da voda ostane 1 ili više metara ispod zemljine površine, čak i u zimskom periodu (Scheer and Garren, 1981).

Izbor zdravog sadnog materijala je najznačajnija preventivna mjera zaštite. Danas je moguće kupiti sadnice maline različitog sortimenta koje su proizvedene tehnikom kulture tkiva u laboratorijskim i stakleničkim uslovima, bez kontakta sa zemljom tokom proizvodnje. Preporuka proizvođačima je da se odluče za takav sadni materijal, a ne za sadnice koje su proizvedene u rasadniku (u polju) gdje postoji rizik od infekcije (Ellis, 2008).

Najbolja tehnika za kontrolu bilo koje bolesti jeste proizvodnja i sadnja otpornih sorti. Što se tiče crvene maline, nijedna sorta nije potpuno imuna na fitoftorozu, ali brojne sorte pokazuju različit stepen osjetljivosti. Sorte: Festival, Heritage, Reveille i Taylor imaju umjerenu do visoku osjetljivost, dok sorte: Newburgh, Latham, Boyne, Killarney i Nordic se smatraju prilično otpornim (Ellis, 2008). Navodi se da sorta Chilliwack ima određenu rezistentnost prema fitoftorози (Daubeney, 1987), dok Heiberg (1995) ističe da se kod ove sorte ispoljava određeni neletalni stepen fitoftoroze. U Južnoj Americi, sorte maline kao što su Latham i Newburgh imaju visok stepen otpornosti na trulež korijena, dok neke druge sorte pokazuju umjerenu otpornost (Barritt *et al.*, 1979). Bolest je potvrđena i kod purpurne maline (*R. idaeus* x *R. occidentalis* L.) sorti Brandywine i Royalty kao i kod crne maline (*R.*

occidentalis) sorte Bristol (Wilcox, 1989). U Evropi ni jedna značajna komercijalna sorta ne pokazuje dovoljan stepen otpornosti prema fitoftorozi (Scherer and Riedel, 1990).

Većim razumijevanjem zastupljenosti i rasprostranjenosti neke sorte maline kao i genetske i fenotipske raznovrsnosti, može dovesti do usklađenosti kontrole bolesti izazvanim patogenima *Phytophthora* spp. (Stewart *et al.*, 2014). Analiza nove sorte maline Cascade Bounty pokazuje otpornost prema *P. rubi*; široko zastupljena sorta za svježiu upotrebu Tulameen je osjetljiva, dok najzastupljenija sorta Meeker ima umjerenu reakciju (Hoashi-Erhardt *et al.*, 2008). Međutim, reakcija ovih sorti na druge vrste roda *Phytophthora* nisu poznate. Veoma je važno razumjeti kolika genetička i patogena varijacija postoji u *P. rubi* i drugim *Phytophthora* vrstama prema malini (Stewart *et al.*, 2014).

Za razvijanje sistema kontrole fitoftoroze, značajno je razumijevanje uticaja patogena na biljku domaćina. Tako na primjer, otpornost biljke domaćina može biti specifična za svaku pojedinačnu vrstu roda *Phytophthora*. Neke sorte crvene i crne maline koje su otporne na *P. fragariae* istovremeno su osjetljive na *P. megasperma* (Wilcox *et al.*, 2002). Isto tako, *P. fragariae* se može održati u zasadu maline i jagode mnogo godina, smanjujući efektivnost rotacije usijeva u cilju zaštite od bolesti (Pinkerton *et al.*, 2002).

Nedovoljno je poznato koliko sastojci zemljišta kao što su sadržaj komposta, mineralnih đubriva i krečnjaka utiču na vrste roda *Phytophthora* u zasadu maline (Maloney *et al.*, 2005). Ipak, smatra se da ne postoji značajan uticaj glavnih zemljišnih sastojaka na pojavu fitoftoroznih bolesti (Schmitthenner and Cannady, 1983). Brojni eksperimenti u laboratorijama i staklenicama zabilježili su uticaj Ca^{++} u pojavi fitoftoroznih bolesti (Deacon and Donaldson, 1993; Donaldson and Deacon, 1993; Hill *et al.*, 1998; Morris and Gow, 1993; von Broembsen and Deacon, 1997; Warburton and Deacon, 1998; Xu-Chang and Morris, 1998). Zemljište zasićeno kalcijumom utiče na smanjeno oslobađanje i smanjenu pokretljivost zoospora, što može uticati na smanjenu pojavu bolesti (Xu-Chang and Morris, 1998; von Broembsen and Deacon, 1997).

Unošenje ovčijeg stajnjaka u zemljište nema značajan uticaj na kontrolu bolesti (Heiberg, 1995).

Izbor i modifikacija mjesta sadnje koje omogućava brzo oticanje vode pomaže kontroli fitoftoroznih bolesti (Wilcox and Ellis, 1989). Modifikacija mjesta sadnje podrazumijeva uvođenje pokrivene drenaže (tile drain) i proizvodnju maline na bankovima (izdignutim brazdama) (Ellis, 2008; Maloney *et al.*, 2005; Wilcox *et al.*, 1999b; Maloney *et al.*, 1993; Kloczko *et al.*, 1990) u visini iznad 25 cm, mada visina brazda za kontrolu bolesti

varira zavisno od faktora kao što su: struktura zemlje, padavine, prisutnost inokuluma i osjetljivosti biljaka domaćina (Heiberg, 1995). Smatra se da proizvodnja maline na bankovima smanjuje mogućnost fitoftorozne truleži korijena (Heiberg, 1995, Maloney *et al.*, 1993, Wilcox *et al.*, 1999b). Maloney *et al.* (2005) navodi da na bankovima ne dolazi do povećanja prinosa, čak prinos ostaje značajno manji, ali da se stvaraju izdanaci značajne visine i debljine. Ipak, zapaženo je da proizvodnja maline na bankovima omogućava značajno povećanje prinosa kod otporne sorte Newburgh ali ne i kod veoma osjetljive sorte Titan (Maloney *et al.*, 2005; Wilcox *et al.*, 1999b). Postoji mogućnost da su biljke koje se gaje na bankovima više izložene stresu tokom sušnog perioda što uslovljava smanjenje prinosa. Zbog toga, ukoliko se bankovi koriste kao mjera kontrole fitoftoroza maline, posebna pažnja se mora posvetiti održavanju optimalne vlažnosti zemljišta kako bi se izbjegao stres, naročito u sušnim godinama (Maloney *et al.*, 2005).

Heiberg (1995) i Wilcox *et al.* (1999b) su potvrdili da se malčiranjem povećava fitoftorozna trulež korijena u zasadima maline (Maloney *et al.*, 2005). Malčiranje povećava pojavu fitoftoroze na malini ukoliko se primjenjuje na izdignutim brazdama, čak i na dobro dreniranom zemljištu, malč može dovesti do visoke vlažnosti i izazvati infekciju sa *P. rubi* (Heiberg, 1995).

Fumigacija zemljišta se široko preporučuje u proizvodnji jagodastih voćnih vrsta, mada se proizvođači slabo odlučuju za ovaj vid zaštite zbog visokih cijena početnih ulaganja (Pinkerton *et al.*, 2002). Fumigacija sa metil bromid-pikrin uništava mnoge gljive koje izazivaju kompleks crne truleži korijena (Wolf *et al.*, 1990; Yuen *et al.*, 1991), ali ponovna invazija brzo rastućih gljiva kao što su *Pythium* ili *Rhizoctonia* mogu tokom vegetacije umanjiti efektivnost fumigacije (Katan, 1981). Johnson *et al.* (1973) navodi da fumigacija može jedino odgoditi početak truleži korijena u zasadima maline na 3 do 4 godine. Fumigacija se preporučuje na poljima na kojima se vrši ponovna sadnja maline, prvenstveno u cilju kontrole fitoftoroze ali i nematode *Pratylenchus penetrans* (Stewart *et al.*, 2014).

Metalaksil je dopušteno sredstvo u zasadu maline za kontrolu bolesti izazvanim vrstama roda *Phytophthora* (Valois *et al.*, 1996). Ovaj fungicid se unosi u zemljište zalijevanjem, brzo se usvaja preko korijenja i prenosi kroz biljku (Carris and Bristow, 1987). Metalaksil je bio koristan dok se koristio u sistemu integralne zaštite, uključujući bankove i genetsku otpornost domaćina (Maloney *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1999b). Nažalost, dokazano je da *Phytophthora fragariae* može razviti rezistentnost prema metalaksilu (Nickerson, 1990).

Nije utvrđena rezistentnosti *P. rubi* prema mefenoksam, mada je utvrđeno da vrste roda *Phytophthora* imaju sposobnost brzog razvijanja rezistentnosti prema fungicidima, tako da se to može očekivati uskoro i prema mefenoksamu. Neophodno je razviti program zaštite maline fungicidima kojom će se izbjeći pojava rezistentnosti (Stewart *et al.*, 2014).

Različite forme fosforne kiseline se koriste u zaštiti od različitih fitoftoroznih bolesti (Bristow and Windom, 1992; Lim *et al.*, 1990; Pegg *et al.*, 1990; Wicks and Hall, 1990).

Solarizacija zemljišta je proces gdje se koristi sunčana radijacija radi zagrijavanja zemljišta koje je prekriveno plastičnim, providnom folijom do temperature koje su štetne za zemljišne patogene. Povećanjem zemljišne temperature smanjuje se populacija korova i biljnih patogena, uključujući gljive, bakterije i nematode, te na taj način kontrolišu različite biljne bolesti i štetočine (DeVay, 1991; Katan, 1981). Glavni cilj solarizacije je uništavanje mezofilnih organizama, gdje spadaju većina biljnih patogena i štetnih organizama, bez uništavanja termotolerantnih gljiva i *Bacillus* spp. (Stapleton and DeVay, 1982).

Aktinomicete predstavljaju značajnu količinu mikrobiološke zemljišne biomase. Veza između aktinomiceta i nadzemnih dijelova biljke mogu biti štetni ali i korisni. Dok neke aktinomicete luče herbicidne materije (Tanaka and Omura, 1993) i prouzrokuju bolesti kao što su pjegavost i krastavost (Locci, 1994), druge mogu simbiotski vezivati atmosferski azot (Benson nad Silvester, 1993) ili zaštititi korijenje od gljivičnih infekcija (Weller, 1988). Aktinomicete roda *Streptomyces* komercijalno se koriste u kontroli biljnih bolesti (Valois *et al.*, 1996). Utvrđeno je da brojne streptomicete, proizvodeći antibiotike, mogu spriječiti rast *Phytophthora* spp. (Broadbent *et al.*, 1971; Knauss, 1976). Osim toga, u nekoliko eksperimenata je dokazano da se tretiranjem zemljišta sa specifičnim sojevima streptomiceta mogu značajno smanjiti štete uzrokovane vrstama roda *Phytophthora* u proizvodnji ukrasnog bilja (Bolton, 1978, 1980; Yuan and Crawford, 1995), leguminoza (Filnow and Lockwood, 1985) i hortikulurnog bilja (Crawford *et al.*, 1993; Sutherland and Papavizas, 1991, Turhan and Turhan, 1989).

4. RADNA HIPOTEZA

Sa popularizacijom gajenja maline na području Republike Srpske posljednjih godina, javila se potreba za praćenje zdravstvenog stanja u rasadnicima, sadnog materijala pri uvozu i u komercijalnim malinjacima. Pregledom literature utvrđeno je da su pseudogljive iz roda *Phytophthora* prouzrokovajući najdestruktivnijih bolesti korijena na malini.

Kako je bolest registrovana u Evropi i u zemljama u okruženju (Srbija, Hrvatska, Slovenija), a simptomi fitoftoroze zabilježeni u malinjacima, javila se potreba za njihovim istraživanjem u Republici Srpskoj.

Zbog toga, uzimajući u obzir sve navedeno u pregledu literature, mogu se postaviti sljedeće radne hipoteze:

- Vrste roda *Phytophthora* su prouzrokovajući sušenja malina u Republici Srpskoj;
- Upotrebom odgajivačkih, biohemijskih, seroloških i molekularnih metoda identifikovaće se vrsta ili vrste iz roda *Phytophthora* koje su prouzrokovajući sušenja maline u Republici Srpskoj;
- Dobijeni rezultati poslužiće za preduzimanje odgovarajućih profilaktičkih mjera kao i uvođenju redovne kontrole sadnog materijala iz rasadnika i iz uvoza, na prisustvo pseudogljiva iz roda *Phytophthora*.

5. MATERIJAL I METOD RADA

5.1. Pregled terena, sakupljanje uzoraka i dijagnostičke metode

Prisustvo i rasprostranjenost prouzrokovaca fitoftoroze maline ispitivani su u periodu od 2008. do 2016. godine u rasadnicima i u proizvodnim zasadima maline na lokalitetima Republike Srpske: Bratunac, Srebrenica, Zvornik, Banja Luka, Gradiška, Prijedor, Novi Grad, Kozarska Dubica, Teslić, Čelinac, Modriča, Šipovo, Ribnik, Trebinje, Rudo, Čajniče, Novo Goražde, Rogatica, Višegrad, Milići, Šekovići, Osmaci, Bijeljina i Koraj.

Vršen je pregled i sakupljanje uzoraka maline sa simptomima koji ukazuju na prisustvo prouzrokovaca fitoftoroze maline u proizvodnim zasadima, kao i pregled i sakupljanje uzoraka sa i bez simptoma u rasadnicima u cilju redovne godišnje kontrole rasadničke proizvodnje.

U navedenom periodu uvedene su: klasične (zasijavanja hranljivih podloga, vizuelni i mikroskopski pregled micelije), serološke (DAS ELISA) i molekularne (PCR) metode za detekciju patogena u uzorcima maline iz proizvodnih zasada i rasadnika i u uzorcima zemlje (Tabela 4).

Tabela 4. Periodičnost sakupljanja uzoraka i uvođenje dijagnostičkih metoda

Godina	Uzorci maline	Uzorci zemlje	Dijagnostičke metode	Laboratorijski kompleks
2008 - 2010.	381	256	izolacija patogena (zasijavanje biljnog materijala i preko mamac biljaka) na različitim hranljivim podlogama, odgajanje čistih kultura i stvaranje kolekcije, mikroskopski pregled morfologije micelije	Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu (Laboratorija za virusologiju i mikologiju)
2011 - 2013.	137	91	izolacija patogena na CPA, serološka metoda sa dva različita ELISA testa (AGDIA i ADGEN), provjera testa patogenosti na test biljkama, molekularna metoda analize uzoraka i sekvenciranje odabranih izolata	i Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci (Laboratorija za sertifikaciju sadnog materijala i rasada hortikulturnih biljaka)
2014 - 2016.	265	-	molekularne metode (PCR) analiza uzoraka i odabranih izolata iz kolekcije, sekvenciranje odabranih izolata i pohranjivanje podataka u banku gena.	
UKUPNO	783	347	= 1.130	

5.2. Uzimanje uzoraka za laboratorijsku analizu

Uočavanje simptoma i uzorkovanje biljnog materijala u cilju utvrđivanja prisustva fitoftoroze maline može se vršiti tokom cijele vegetacije. Odabirani su donji dijelovi nagnutih parcela gdje je povećano zadržavanje vode i gdje su izraženi vidljivi simptomi pojave bolesti na malini.

Na odabranim mjestima u proizvodnim zasadima na lokacijama koje su navedene u poglavlju 5.1, korijen maline je iskopavan iz zemlje, vadeći korijenov sistem sa što više korijenovih dlačica. Za uzorkovanje su odabirane biljke koje se nisu potpuno osušile, a koje se nalaze u neposrednoj blizini pojedinačnih ili grupe od više potpuno osušenih biljaka u redu. Svaki uzorak koji se doprema u laboratoriju na analizu sastojao se od najmanje 2-3 biljke iste sorte. Broj uzoraka po jedinici proizvodne površine nije standardizovan (Koprivica *et al.*, 2009), tako da se uzimao što veći broj uzoraka.

U rasadnicima, radi uspješnije analize uzoraka mladih biljaka bez ispoljenih simptoma, sakupljan je veći broj uzoraka, vodeći računa da budu zastupljene sve sorte.

Nakon dostavljanja u laboratoriju, uzorcima su dodjeljivani laboratorijski brojevi i čuvani su u frižideru na temperaturi 4-10°C. Uzorci su analizirani u narednih 1-2 dana, mada se navodi da ukoliko je potrebno, uzorci se mogu čuvati u frižideru nekoliko sedmica, vodeći računa da ne dođe do zagrijavanja i isušivanja uzoraka (OEPP/EPPO, 2006).

Za uzorkovanje zemljišta, lopatom je uzimano najmanje 500 g ili 200 ml zemlje sa zaraženog ili sumnjivog prostora, na dubini rasta korjenovog sistema. Uzorci su stavljani u čvrstu plastičnu vreću koja se dobro zatvori i čuva na temperaturi 4-10°C. Preporuka je da se uzorci dostavljaju laboratoriji na analizu najkasnije jedan dan nakon uzorkovanja (OEPP/EPPO, 2006).

5.3. Priprema uzoraka za laboratorijsku analizu

Tokom pripreme uzoraka za laboratorijsku analizu, pregledao se cijeli uzorak maline (cijela biljka) da bi se utvrdili simptomi na nadzemnom dijelu, a posebno pažljivo je vršen pregled korijenovog sistema. Uzorak korijena je pran pod mlazom česmenske vode da bi se uklonili ostaci zemlje, korijenje drugih biljaka i druge nečistoće, nakon čega se sušio na papiru nekoliko sati (2-3 sata). Tokom vizuelnog pregleda, traženi su dijelovi korijena na kojima su, nakon skidanja kore, uočavani simptomi promjene bjeličaste boje u crvenkastu do mrku boju ili pojava smanjenog broja korjenčića, i zatim se pripremao za dalju analizu.

5.4. Izolacija patogena na hranljive podloge

Izolaciju patogena iz prikupljenih uzoraka maline tokom 2008-2010. godine vršena je na različite hranljive podloge (CMA, V8A, FBA i CPA) kako bi se dobile čiste kulture i stvorila kolekcija. Dalje, na osnovu vizuelnog pregleda razvijenih micelija u Petrijevim posudama i mikroskopskog pregleda napravljenih preparata, posmatrana je morfologija micelije *Phytophthora* spp.

U periodu 2011-2013. godine nastavila se izolacija patogena korišćenjem samo CPA hranljive podloge.

5.4.1. Izolacija patogena iz biljnog materijala na hranljivu podlogu

Za izolaciju *Phytophthora* spp. iz biljnog materijala, korišćeni su dijelovi korjenčića i korijena koji se nalaze na prelazu nekrotičnog i zdravog tkiva. U tu svrhu, najmanje 4 dijela (dužine 1 cm) su se isijecali sterilnim skalpelom i prenosili sterilnom pincetom na 1 ili više različitih hranljivih podloga (hranljivi medij). Svaki izolat se zasijavao u 2-3 Petrijeve posude za svaku pojedinačnu hranljivu podlogu.

Nakon pranja i sušenja korijena, dijelovi koji će se zasijavati, potapani su u 70% alkohol u trajanju 10-30 sekundi. Nakon toga se biljni materijal suši na filter papiru par minuta prije zasijavanja.

Zasijane hranljive podloge su stavljane u inkubator (termostat) (BINDER, Njemačka) na temperaturu 20-22°C, nekoliko dana (7-10 dana), u mraku ili u uslovima smjene svjetlosti i mraka (12h bijelo svjetlo i 12h mrak).

Zemljišne pseudogljive vrste roda *Phytophthora* su izolovane na nekoliko selektivnih hranljivih podloga. Urađena je komparacija procesa pravljenja podloga, morfoloških i odgajivačkih razlika na njima, kao i lakoće prilikom vizuelnog i mikroskopskog pregleda micelija gljiva gajenih na različitim hranljivim podlogama.

Korišćene hranljive podloge za izolaciju patogena su:

CMA - Corn Meal Agar (Hazen and Reed, 1955)

kukuruzno brašno	40 g
agar	15 g
destilovana voda	1000 ml

Priprema: Kukuruzno brašno se dodavalo u destilovanu vodu uz lagano miješanje vodeći računa da se ne naprave grudvice od kukuruznog brašna. Dodavan je agar i sve zajedno je sterilisano u autoklavu na 115°C tokom 15 minuta. Antibiotici: piramicin, ampicilin i rifampicin su se rastvarali u 1ml 95% etanola, dok su pentahloronitrobenzen (PCNB) i hymexazol se rastvarali u 10 ml sterilne, destilovane vode. Pripremljeni antibiotici su dodavani u prohladenu podlogu.

V8A - V8 agar (Strandberg, 1987)

sok od povrća (paradajz)	250 ml
CaCO ₃	5 g
agar	15 g
destilovana voda	1000 ml

Priprema: U sok od smrznutog, oguljenog paradajza je dodavan CaCO₃ uz dobro miješanje od 15 minuta, a zatim centrifugiranje na 5000 rpm tokom 20 minuta i podešavanje pH vrijednosti na 7,5. Dodavala se destilovana voda do ukupne zapremine od 1000 ml i autoklaviralo na 120°C tokom 20 minuta. Antibiotici: piramicin, ampicilin i rifampicin su se rastvarali u 1ml 95% etanola, dok su PCNB i hymexazol se rastvarali u 10 ml sterilne, destilovane vode. Pripremljeni antibiotici su dodavani u prohladenu podlogu.

FBA - French Bean Agar (Dhingra and Sinclair, 1985)

crveni pasulj (prethodno potopljen 10h u vodi)	50 g
agar	15 g
destilovana voda	1000 ml

Priprema: Zrna crvenog pasulja su se potapali u 500 ml destilovane vode najmanje 10 sati. Zatim se blenderom izmrvo, dodan je agar i ostatak vode do ukupnog volumena. Autoklaviralo se na 121°C, 15 minuta, vodeći računa da se u tikvice stavi manja količina da bi se izbjeglo curenje podloge izvan tikvice. Antibiotici: piramicin, ampicilin i rifampicin su se rastvarali u 1ml 95% etanola, dok su PCNB i hymexazol se rastvarali u 10 ml sterilne, destilovane vode. Pripremljeni antibiotici su dodavani u prohladenu podlogu.

CPA – Carrot Peace Agar (Werres et al., 2001)

mrkva	50 g
agar	22 g
destilovana voda	1000 ml

Priprema: Svježa, izrendana mrkva se zajedno sa agarom dodavala i dobro promiješala u 1000 ml destilovane vode i autoklavirala na 121°C u trajanju 15 minuta. Antibiotici: piramicin, ampicilin i rifampicin su se rastvarali u 1ml 95% etanola, dok su PCNB i hymexazol se rastvarali u 10 ml sterilne, destilovane vode. Pripremljeni antibiotici su dodavani u prohladenu podlogu.

5.4.2. Izolacija patogena iz zemljišta na hranljivu podlogu

Izolacija patogena iz zemlje je obavljana primjenom mamaca (Parke and Lewis, 2007; Shishkoff, 2007), a kao mamac biljke korišćeni su listovi *Rododendrona*: *R. variegatum* (pontium group), *R. morgenrot* (yarush group), *R. hybrid* (Cosmopolitan), biljaka koje su od ranije poznate kao osjetljive (Bulajić *et al.*, 2009, Themann and Werres, 1998, Themann *et al.*, 2002). Listovi rododendrona korišćeni u ovu svrhu ne smiju prethodno biti tretirani pesticidima.

Osjetljivost biljke *Rododendron* na *Phytophthora* spp., se ispoljava tako što pokazuje određene simptome u slučaju infekcije. Na listovima *Rododendrona* se pojavljuju difuzne smeđe do tamno smeđe tačke ili pjeg, najviše na vrhovima listova ili cijeli list poprimi smeđu do crnu boju i dolazi do prijevremenog opadanja (OEPP/EPPO, 2006).

Tokom pripreme uzoraka biljnog materijala, količina zemljišta koja se spira prilikom pranja korijenja maline je stavljana u plastične posude sa dovoljnom količinom vode. Uzorak saprane zemlje se prelije sa vodom u sloju od oko 1 cm iznad zemlje, tako da omogućiti plutanje lišća rododendrona na površini. Nakon potapanja uzoraka zemlje u vodu, bez miješanja, posude su stavljane nekoliko sati (2-3h) na ravnu površinu da se istaloži (zemlja slegne). Listovi rododendrona (5-6) su polagani na površinu vode, okrenuti sa naličjem lista prema zemlji (Slika 2) jer se na naličju nalazi veći broj stominih otvora i time se olakšava prodor patogena. Ovako postavljeno lišće je ostavljano na sobnoj temperaturi.

Nakon 5-7 dana, listovi su vađeni iz posude sa zemljom i vodom, ispirani sterilnom, destilovanom vodom i stavljani u Petrijeve posude u vlažne uslove (vlažni filter papir) i ostavljani na sobnoj temperaturi na inkubaciju. Tokom perioda inkubacije vršeno je dodatno vlaženje filter papira po potrebi, a lišće je povremeno pregledano radi provjere pojave nekrotičnih pjega. Simptomi nekroze listova rododendrona postajali su vidljivi nakon inkubacije (5-7 dana) u vlažnim i mračnim uslovima (Slika 3).



Slika 2. Listovi rododendrona postavljeni kao mamac biljka u posudi sa zemljom i vodom radi izolacije patogena iz zemlje, izvor: originalna fotografija

Ukoliko se u uzorku zemlje nalaze vitalne reproduktivne forme *Phytophthora* spp. (oospore, sporangije ili micelija u biljnim ostacima), u prisustvu odgovarajuće količine vode ostvaruje se zaraza listova rododendrona (pojava nekrotičnih pjega) iz kojih je tada moguće izvršiti izolaciju patogena. Dijelovi nekrotičnih pjega lista rododendrona, zajedno sa dijelom zdravog tkiva lista, su isijecani sterilnim nožem i stavljani na izolaciju na selektivnu ili neselektivnu hranljivu podlogu.



Slika 3. Početak inkubacije listova rododendrona u vlažnim uslovima i pojava nekroze nakon perioda inkubacije od 5-7 dana, izvor: originalne fotografije

Porast micelije se pratio u narednih 5-7 dana u inkubatoru na temperaturi 19,5°C u mraku. Nakon porasta micelije, vršen je vizuelni pregled Petrijevih posuda, mikroskopski pregled morfoloških karakteristika micelije, uzgoj čistih kultura i formiranje kolekcije.

5.5. Mikroskopiranje

5.5.1. Mikroskopiranje biljnih dijelova u laktofenolu

Tokom 2008. godine mikroskopski pregled obojenih preparata u laktofenolu zaraženog korjenja maline vršen je pomoću mikroskopa Olympus model CX41 u Laboratoriji za virusologiju i mikologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

Laktofenol (Lactophenol Cotton Blue, LCB) se koristi za pripremu preparata za mikroskopski pregled gljiva. Laktofenol je plava, kisela boja koja se koristi za posmatranje inficiranih dijelova biljnog tkiva. Djeluje tako što fenol ubija živi organizam, mliječna kiselina čuva gljivičnu strukturu, dok pamuk plava boja, hitin koji je prisutan u ćelijskim zidovima gljiva, boji u intenzivnu plavu boju.

Na biljnom tkivu gdje je došlo do napredovanja nekrotičnih lezija, žiletom su isječeni tanki dijelovi i stavljeni na predmetno staklo na koje je prethodno nanijeta kap 70% alkohola. Uzorak se uroni u kap alkohola što dovodi do izbacivanja vazduha zarobljenog između hifa, i dodaje se 1-2 kapi laktofenola (LCB) prije nego što se alkohol osuši. Pokrovno staklo se lagano spusti uz izbjegavanje stvaranja vazdušnih mjehurića. Preparat se na mikroskopu najprije posmatra pod manjim, a zatim pod većim uvećanjem. Prilikom posmatranja, tražene su okrugle oospore sa zadebljanim zidovima, unutar zaraženog biljnog tkiva.

Pravljenje preparata od zaraženog dijela korjena maline u laktofenolu je vršeno radi prosvjetljavanja i pregleda prisustva oospora. Laktofenol je pogodan fluid za preparovanje jer ne dovodi do bubrenja niti plazmolize biljnog tkiva (Booth, 1971).

Priprema laktofenola je vršena po sljedećoj recepturi (Siddiq, 2000):

Laktofenol (Amann, 1896)

mliječna kiselina	20 g
kristali fenola	20 g
glicerol	40 g
destilovana voda	20 ml

Priprema: Kristali fenola su se pomiješali u vodi i zagrijavali da se rastope, a zatim se dodavala mliječna kiselina i glicerol. Po potrebi, dodavano je malo boje, npr. 0,05 g/100 ml pamuk plave (cotton blue) ili tripan plave (trypan blue). Laktofenol se čuvao u tamnoj boci jer je toksična supstanca.

5.5.2. Mikroskopski pregled izolata sa hranljivih podloga

Mikroskopski pregled razvijenih micelija na hranljivim podlogama vršen je u Laboratoriji za virusologiju i mikologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, pomoću mikroskopa marke Olympus model CX41 i aparata za snimanje Camedia C-7070, 7.1 mega pixels, dok je u Laboratoriji za mikroskopiju, Poljoprivrednog fakulteta u Banjaluci korišćen mikroskop marke Nikon SMZ 745T digital Sight DS Type 104.

Mikroskopskim pregledom praćene su morfološke karakteristike razvijene micelije u Petrijevim posudama i na privremenim mikroskopskim preparatima. Mikroskopski je pregledan 381 izolat patogena iz biljnog materijala maline i 348 izolata patogena iz zemlje.

Vizuelnim pregledom Petrijevih posuda i mikroskopskim pregledom morfoloških osobina, praćeni su: izgled, struktura, boja micelije i pojava micelijarnih konstrukcija, hlamidospora (bespolnih spora) i oospora (polnih spora). Tokom eksperimenta nije vršeno praćenje brzine porasta micelije, jer se morfologijom obuhvatio pregled izgleda micelije, a krajnji cilj je bio ovladati novim, savremenijim i bržim metodama detekcije.

5.6. Izolacija čistih kultura i formiranje kolekcije izolata

Čista kultura vodi porijeklo od jedne ćelije uzete sa vrha hife i zasijane na hranljivu podlogu u epruvetu na kosi agar (CPA), i može da se čuva u uslovima frižidera nekoliko mjeseci (oko 3 mjeseca na -4°C).

Za izolaciju čistih kultura uzimana je micelija sa CPA hranljive podloge koja je bila stara nekoliko dana (2-3 dana). Pod mikroskopom su odabirane pojedinačne, izdvojene hife i pomoću sterilnog nastavka za pipetu zajedno sa malim komadom agara se izdvajao vrh hife (hyphal tip). Vrh hife se prebacivao na drugu sterilnu CPA hranljivu podlogu u novu Petrijevu posudu.

Nakon nekoliko dana (2-3 dana) porasta micelije iz vrha hife, sterilnim skalpelom se isjecao komadić (0,5 x 0,5 mm) i prebacivao na kosi agar u epruvetu, koja se zatvori čepom i dobijena kolekcija se čuvala u uslovima frižidera nekoliko mjeseci. Protokol za formiranje kolekcije izolata je jednostavan, mala je mogućnost kontaminacije, a za izvođenje procedure potrebni su lako dostupni materijal i laboratorijski aparati.

Dobijena kolekcija (187 izolata iz korijena i 62 izolata iz mamac biljaka) je korišćena za čuvanje određenih izolata, njihovo dodatno testiranje, a obnavljala se na svaka 3 mjeseca.

5.7. Serološke metode

Serološkom ELISA metodom detektovana je prisutnost i rasprostranjenost *Phytophthora* spp. tokom 2011-2013. godine u proizvodnim zasadim ali i u rasadnicima.

5.7.1. Imunoenzimska metoda na ploči (DAS–ELISA)

Metode detekcije različitih patogena zasnovane na njihovim antigenim osobinama imaju veliki značaj i primjenu, naročito imunoenzimske kao što je standardna, direktna DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay).

Princip ELISA testa za detekciju fitopatogenih organizama zasniva se na primjeni antitijela specifičnih za patogene (IgG) koja se vezuju za površinu mikrotitrarske ploče, za njih se selektivno vezuje antigen iz uzorka, a zatim se nanose specifična antitijela povezana sa enzimom. Prisustvo enzima (alkalna fosfataza ili peroksidaza) detektuje se odgovarajućom promjenom boje supstrata.

Za detekciju *Phytophthora* spp. korišćena je standardna, DAS–ELISA prema uputstvima proizvođača 2 dijagnostička ELISA kita:

1. *Phytophthora* PathoScreen Kit - AGDIA Incorporated, Indiana USA
<http://www.agdia.com>
2. AGRISCREEN – *Phytophthora* spp. 96 WELL ELISA DETECTION KIT -
ADGEN Phytodiagnostics Ltd, United Kingdom; <http://www.neogeneurope.com>.

Zajednička osobina oba ELISA kita je da su namijenjena za detekciju *Phytophthora* na nivou roda i ne mogu se izvršiti detekcija na nivou vrste.

Razlika između ova dva testa ogleda se u upotrebi različitih enzima (alkalna fosfataza ili peroksidaza), obojenosti pozitivnih uzoraka (žuta ili plava boja), korišćenje na spektrofotometru različitih filtera za očitavanje apsorpcije na različitim talasnim dužinama (405nm ili 605-650nm) i dužini trajanja cjelokupne procedure.

Šematski prikaz procedure AGDIA i ADGEN ELISA testa u koracima, prikazan je u Tabeli 5.

Tabela 5. Šematski prikaz procedure AGDIA i ADGEN ELISA testa

AGDIA	ADGEN
Bunarčići na polistirenskoj mikrotitartskoj ploči su prethodno obloženi sa specifičnim poliklonalnim antitijelima ↓ Doziranje uzoraka i svih kontrola, inkubacija (2h ili preko noći na -4°C) ↓ ispiranje ploče 7x Doziranje monoklonalnog antitijela konjugovanih alkalnom fosfatazom, inkubacija (2h) ↓ ispiranje 8x Doziranje u bunarčiće pNPP supstrata (zaštititi od izvora svjetlosti) ↓ inkubacija (60 min.) Očitavanje (nakon 1h, 2h, sutradan) vizuelno ili spektrofotometrom (na 405nm)	Bunarčići na polistirenskoj mikrotitartskoj ploči su prethodno obloženi prečišćenim, specifičnim antitijelima ↓ Doziranje uzoraka i svih kontrola, inkubacija (30 min. na sobnoj temperaturi) ↓ ispiranje ploče 3x Doziranje konjugata hrenove peroksidaze (HRP – horseradish) enzima, inkubacija (30 min. na sobnoj temperaturi) ↓ ispiranje ploče 4x Doziranje u bunarčiće supstratnog rastvora, inkubacija (30 min. na sobnoj temperaturi) ↓ dodati stop-rastvor Lagano ručno miješati 10 sekundi Očitavanje (30, 60, 90 min.) vizuelno ili spektrofotometrom (na 605-650nm)
Razvijanje žute boje u bunarčićima	Razvijanje plave boje u bunarčićima
Cjelokupna procedura se završava u 2 dana	Cjelokupna procedura se završava u 1 danu

5.7.1.1. AGDIA

AGDIA kit je namijenjen za detekciju pseudogljiva roda *Phytophthora* u biljnim uzorcima (lišće, peteljka, stabljika, korijenov vrat) i za testiranje uzoraka micelije gljive razvijene na hranljivim podlogama.

DAS–ELISA izvedena je po sljedećem postupku, preporučenom od strane proizvođača, a za analizu su korišćeni simptomatični biljni dijelovi kao i strugotina gljive sa hranljive podloge. Biljno tkivo se macerira u vrećicama za ekstrakciju ili u avanu sa ekstrakcionom puferu u omjeru 1:10 (g biljnog tkiva : ml zapremine pufera). Ukoliko se koristila micelija gljiva, pravio se omjer 1:50 tako da se gljiva sastruže sa 1cm² hranljive podloge i razrijedi u 500 µl ekstrakcionog pufera. Test bunarčići na mikrotitartskoj ploči su prethodno oblagani sa prečišćenim, specifičnim poliklonalnim antitijelima specifičnim za rod *Phytophthora*. Na ploču se nanosilo po 100µl pripremljenog ekstrakta u 2 bunarčića, za svaki uzorak, za pozitivnu i negativnu kontrolu, kao i za rastvor ekstrakcionog pufera. Nanešena ploča se ostavljala da inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi ili se stavi preko noći u frižideru

na 4°C. Uzorci višegodišnjih biljaka daju jače obojenje ukoliko se inkubiraju tokom noći. Po završetku inkubacionog perioda, ploča se ispere 7 puta puferom za ispiranje. Potom se dodaju monoklonalna antitijela povezana (konjugovana) sa alkalnom fosfatazom i ona se vezuju za antigene *Phytophthora* iz uzorka. Konjugovani enzim alkalne fosfataze se uvijek priprema 10 minuta prije upotrebe, a rastvara se u ECl puferu u omjeru 1:100 (100µl enzima: 10 ml pufera) i obavezno promućka. U bunarčiće se unosi po 100µl enzim konjugovane alkalne fosfataze i inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, vrši se ispiranje 8 puta i na kraju se u ploču dodaje supstrat. U supstratnom puferu se rastvori pNPP tableta (p-nitrofenilfosfat), dodaje 100 µl po bunarčiću i inkubira 60 min., vodeći računa da se ne izlaže svjetlosti jer može doći do bojenja negativnih uzoraka.

Ukoliko je u bunarčiću prisutna alkalna fosfataza, odnosno ukoliko se konjugat vezao za antigene *Phytophthora* iz uzorka, doći će do bojenja bunarčića. Nakon inkubacije u trajanju od 60 minuta, vrši se vizuelizacijom i mjerenjem apsorpcije na 405nm, pomoću spektrofotometra (ChroMate Multichannel Microplate Reader). Očitavanje rezultata se vrši nakon 1h, 2 h i sutradan. Očitavanje rezultata se može vršiti sve dok su bunarčići sa negativnom kontrolom vizuelno bez promjene boje.

Receptura pufera za AGDIA DAS-ELISA test se nalazi u Prilogu 6.

Testiranjem *Phytophthora* PathoScreen Kit - AGDIA (Icorporated, Indiana USA) moguće je detektovati sljedeće vrste roda *Phytophthora*: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. dechsleri*, *P. erythroseptica*, *P. fragariae*, *P. infestans*, *P. megasperma*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. ramorum* i *P. sojae*.

AGDIA kit ne reaguje na vrste roda: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* i *Sclerotinia*, kao i na sljedeće vrste roda *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. heterothalicum*, *P. irregulare*, *P. oligandrum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. torulosum*, *P. ultimum* i *P. ultimum* var. *ultimum*.

Umjerena unakrsna reakcija (10-35%) je moguća kod čistih kultura vrsta roda *Pythium*: *P. aristosporum*, *P. arrhenomanes*, *P. graminicola*, *P. paroecandrum* i *P. violae*. Slaba unakrsna reakcija (<10%) je moguća kod čistih kultura vrsta roda *Pythium*: *P. multisporum*, *P. myriotylum*, *P. sylvaticum*, *P. tardicrescens* i *P. vanterpooli*.

5.7.1.2. ADGEN

ADGEN kit je namijenjen za detekciju *Phytophthora* spp. koristeći biljni materijal (oko 5 cm korijena) ili micelija gljive razvijene na hranljivim podlogama. Prema preporuci proizvođača, uzorci su pripremani homogenizacijom materijala za testiranje u ekstrakcionim vrećama sa filterom, u koje se doda 4 ml ekstrakcionog pufera u razrijeđenju 1:5 (g biljnog tkiva: ml zapremine pufera). Nakon toga vrši se nanošenje ekstrakta ispitivanih uzoraka, komercijalna negativna i pozitivna kontrola na polistirensku ploču. Na ploči, svaki ispitivani uzorak, negativna i pozitivna kontrola su unijete u 2 bunarčića po 100µl ekstrakta. Nanešena ploča se ostavi da inkubira najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacionog perioda, ploča se ispere 3 puta puferom za ispiranje. Posle ispiranja, u bunarčiće se unosi po 100µl konjugovanih antitijela. U ovom slučaju, enzim-konjugat je hrenova peroksidaza (HRP) - horseradish. Ploča se ostavi da inkubira najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi. Poslije inkubacije, mikrotitarske ploče ispiraju 3 puta puferom za ispiranje, a zatim je u svaki bunarčić unosi po 100µl komercijalno pripremljenog supstratnog rastvora. Ploča se inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta. Enzimska aktivnost je mjerena dodavanjem supstrata, kada se razvija plava boja u prisustvu enzima. Razvoj boje je direktno proporcionalan količini patogena u početnom ekstraktu ispitivanog uzorka. Na kraju se u svaki bunarčić dodaje stop-rastvor u količini 100µl i lagano se ručno promućka 10 sekundi. Očitavanje rezultata praćeno je vizuelno i merenjem apsorpcije na 605-650nm na spektrofotometru (ChroMate Multichannel Microplate Reader). Očitavanje se vrši poslije 30 min, 60 min i 90 min, a obavezno se završava 90 minuta od nanošenja stop-rastvora.

Za ekstrakciju uzoraka iz biljnog materijala ili micelije sa hranljive podloge, koristi se univerzalni pufer za ekstrakciju, kao i pufer za ispiranje pločica, koji su isti za oba DAS-ELISA testa, recepture ostalih pufera u Prilogu 7.

Testiranjem AGRISCREEN – *Phytophthora* spp. 96 WELL ELISA DETECTION KIT - ADGEN Phytodiagnostics Ltd (United Kingdom) moguće je detektovati vrste roda *Phytophthora* kao što su: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. syringae*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. dechsleri*, *P. erythrosetica*, *P. fragariae*, *P. infestans*, *P. megasperma*, *P. boehmeriae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. ilicis*, *P. lateralis*, *P. quininea*, *P. vignae*, *P. gonapodyides*, *P. pseudotsugae*, *P. parasitica* var. *nicotiana*, *P. megasperma* f.sp. *glycinae*, *P. megasperma* f.sp. *trifolii* i *P. megasperma* f.sp. *medicaginis*.

ADGEN kit je visoko specifičan za vrste roda *Phytophthora* i ne reaguje na druge rodove gljiva kao što su: *Rhizopus*, *Mortierella*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* i većina

vrsta roda *Pythium*. Značajnu unakrsnu reakciju moguće je dobiti kod čistih kultura *Pythium coloratum* i *P. vexans*, dok slabu reakciju moguće je dobiti kod *P. aphanidermatum*, *P. dissotomum* i *P. ultimum*.

5.7.2. Specifičnost i senzitivnost korišćenih ELISA kitova i analiza ROC krive

Specifičnost se definiše kao sposobnost instrumenta da pokaže negativan rezultat kod uzoraka koji zaista posjeduju odsustvo patogena.

Specifičnost se izražava kao proporcija negativnih uzoraka, koji su na instrumentu postigli rezultat ispod graničnog rezultata, tj. kao proporcija tačnih negativnih rezultata u odnosu na negativan uzorak (negativnu kontrolu).

$$\text{specifičnost} = \frac{\text{br. stvarno negativnih uzoraka (SN)}}{\text{ukupan br. zdravih biljaka (SN + LP)}}$$

SN – stvarno negativni uzorci

LP - lažno pozitivni uzorci

Senzitivnost (osjetljivost) je definisana kao sposobnost instrumenta da pokaže pozitivan rezultat kod uzoraka koji zaista posjeduju prisustvo patogena.

Senzitivnost se izražava kao proporcija pozitivnih uzoraka, koji su na instrumentu postigli rezultat iznad graničnog rezultata, tj. kao proporcija tačnih pozitivnih rezultata u odnosu na negativan uzorak (negativnu kontrolu).

$$\text{senzitivnost} = \frac{\text{br. stvarno pozitivnih uzoraka (SP)}}{\text{ukupan br. bolesnih biljaka (SP + LN)}}$$

SP – stvarno pozitivni uzorci

LN - lažno negativni uzorci

Statistička tehnika koja ima za cilj utvrđivanje granične vrijednosti nekog testa koji daje najbolji odnos specifičnosti i senzitivnosti, naziva se analiza ROC krive (Engl. Receiver Operating Characteristic Curve - ROC kriva). ROC kriva je grafički prikaz senzitivnosti i specifičnosti za svaki mogući granični rezultat na testu u koordinatnom sistemu gdje su na ordinati (y) prikazane vrijednosti senzitivnosti, a na apscisi (x) vrijednosti specifičnosti oduzete od 1 (Raslich *et al.*, 2007).

ROC kriva (statistička tehnika koja ima za cilj utvrđivanje granične vrijednosti nekog testa) se upotrijebila za odabir optimalne granične vrijednosti koja minimalno smanjuje

postotak lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Na ROC krivoj optimalna tačka smještena na položaju koja je na krivoj najbliža gornjem lijevom uglu dijagrama. Odnosno, potpune performanse dijagnostičke metode su veće što je površina ispod ROC krive bliža jedinici. Grafički prikaz ROC krive izražava uticaj variranja vrijednosti na specifičnost i senzitivnost testova (Raslich *et al.*, 2007).

Ako je pojava koju mjerimo takva da se ne razlikuje, onda naš test ima šanse 50:50% da slučajno „pogodi“ koji je uzorak pozitivan, a koji negativan, i koju god graničnu vrijednost na testu da uzmemo, proporcija ispravno klasifikovanih ostaje ista. Ova situacija bi na ROC grafikonu bila predstavljena dijagonalnom linijom koja spaja donji lijevi i gornji desni ugao, odnosno dvije nulte tačke. Ova dijagonala se obično zove *dijagonala slučajnog ishoda* (engl. chance diagonal) (Krzanowski and Hand, 2009).

Analizom ROC krivom obuhvaćeni su rezultati oba komercijalna ELISA testa (AGDIA i ADGEN) dobijena testiranjem izolata iz micelije zasijavanjem korijena maline i micelije iz mamac biljaka radi izolacije patogena iz zemlje.

Obrada rezultata svih analiza je rađena u statističkom programu SPSS Statistics (The Software Package for Statistical Sciences) verzija 21.

5.8. Molekularne metode

Da bi se skratilo vrijeme analize, razvijene su brojne metode zasnovane na (lančanoj reakciji polimeraze) PCR koje mogu specifično i dovoljno osjetljivo da utvrde prisustvo i naprave razliku između srodnih vrsta roda *Phytophthora* (Tomlinson *et al.*, 2005). Metode zasnovane na PCR mogu da otkriju veoma male količine ciljane DNK tako što se više puta umnožava dio (fragment) DNK koji se nalazi između dva regiona poznate nukleotidne sekvence u prisustvu DNK polimeraze kao katalizatora.

Nakon ekstrakcije ukupne DNK iz biljnog materijala i micelije, rađen je PCR (konvencionalni, nested, za direktno sekvenciranje) poslije čega je elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu vršena vizuelizacija rezultata pod lampom sa UV svjetlom.

Nakon toga, vršeno sekvenciranja amplifikovanih fragmenata, utvrđena je njihova filogenetska sličnost sa sekvencama dostupnim u NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) bazi podataka.

5.8.1. Ekstrakcija ukupne DNK

Ukupne DNK su ekstrahovane sa sljedećim metodama:

1. Ekstrakcija ukupne DNK iz korijena i micelije pomoću Qiagen kita
2. Ekstrakcija DNK iz micelije po protokolu Cooke and Duncan (1997)
3. Ekstrakcija ukupne DNK iz korijena maline i prečišćavanje (Koprivica *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2000)

5.8.1.1. Ekstrakcija ukupne DNK pomoću Qiagen kita

Ekstrakcija ukupne DNK iz zaraženog biljnog tkiva upotrebom DNEasy Plant Mini kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) je vršena tako što se biljni materijal ili micelija gljive smrvi u fini prah uz upotrebu tučka i avana nanoseći tečni azot. Prah se prebacivao u kolekcionu tubu i ostavljan da tečni azot ispari, vodeći računa da se uzorak ne otopi i odmrzne. Dodavano je 400 µl pufera AP1 i 4 µl RNase A stok rastvora (100 mg/ml) na 100 mg vlažnog tkiva ili 20 mg suvog praha, zatim je jako promiješano na vorteksu ili su pipetiranjem razbijani fragmenti čije prisustvo dovodi do nižeg prinosa DNK. Mješavina je inkubirana na 65°C u trajanju od 20 min uz miješanje 2-3 puta okretanjem mikrotuba, u ovom koraku je dolazilo do raspadanja membrane biljne ćelije. Zatim je lizatu dodavano 130 µl AP2 pufera,

promiješano i inkubirano 5 min. na ledu. Ovaj korak služi za taloženje deterdženata, proteina i polisaharida. Centrifugiranje 5 min. na 20 000 g ili 14 000 rpm, a poslije centrifugiranja, lizat je pipetiran u QIAshredder mini spin kolone (lila boje) i centrifugiran 2 min. na 20 000 g ili 14 000 rpm. QIAshredder spin mini kolonama se uklanjala većina taloga i ostataka biljnog tkiva, ali manja količina je prolazila i formirala talog na dnu kolekcione tube. U sljedećem koraku se pazilo da se talog ne dodirne.

Supernatant iz prethodnog koraka se prebacivao u novu kolekcionu tubu, dobijano je oko 450 µl lizata, a zatim se dodavala 1,5 zapremina AP3/E pufera u lizat i miješalo pipetiranjem. Pipetirano je 650 µl mješavine iz prethodnog koraka, u DNeasy mini spin kolonu od 2 ml, centrifugirano 1 min. na brzini većoj od 6 000 g ili 8 000 rpm, a tečnost koja prođe kroz filter je odbacivana. Ista kolekciona tuba je korišćena i za ostatak uzorka. Tečnost koja prođe kroz filter je odbacivana, a DNeasy mini spin kolona je stavljana u novu kolekcionu tubu od 2 ml. Dodavano je 500 µl AW pufera i centrifugirano na brzini većoj od 6 000 g ili 8 000 rpm. Tečnost koja prođe kroz kolonu je odbacivana, a tuba korišćena u sljedećem koraku.

Dodavano je 500 µl pufera AW u DNeasy mini spin kolonu i centrifugirano 2 min. na 20 000 g ili 14 000 rpm radi sušenja membrane. Važnost sušenja membrane u koloni je što etanol koji ostane, može ometati dalje reakcije. Odbacivana je tečnost, a poslije centrifugiranja, DNeasy mini spin kolone su pažljivo vađene iz kolekcione tube, da ne bi došlo do kontakta sa tečnošću koja je prošla kroz kolonu.

DNeasy mini spin kolona je prebacivana u 1,5 ili 2 ml tubu za mikrocentrifugiranje i pipetirano je 100 µl AE pufera direktno na membranu. Inkubirano je 5 min. na sobnoj temperaturi (15-20°C), a zatim centrifugirano 1 min. na brzini većoj od 6 000 g ili 8 000 rpm da bi došlo do rastvaranja. Prethodni korak je ponavljan, s tim da je za drugi krug rastvaranja, korišćena odvojena kolekciona tuba. Ekstrahovana DNK je čuvana na -20°C.

5.8.1.2. Ekstrakcija DNK iz micelije

Prema protokolu Cooke and Duncan (1997) u sterilne 2 ml mikrotube je stavljano 0,1 g svježe micelije, vodeći računa da se struganjem zahvati što manja količina hranljivog agara. U mikrotube je dodavano 10 mg PPVP (polyvinilpolypyrrolidone) i 750 µl pufera za ekstrakciju (0,2M Tris-HCl pH 8, 0,25M NaCl, 0,025M EDTA pH8, 0,5% SDS). Sterilnim, plastičnim mikro-tučkom je macerirano nekoliko minuta, dodavano je 500 µl fenol/hloroform/izoamil alkohola u omjeru 25:24:1 i lagano je mućkano 2 minute. Nakon

toga, centrifugirano je 5 min. na 13 000 rpm i tečna faza je prebacivana u nove mikrotube (oko 650 µl). Mikrotuba je dopunjavana sa isopropanolom (ohlađenim na -20°C) do vrha (oko 650 µl) i lagano mućkana. Centrifugirano je 10 min. na 13 000 rpm i odstranjivan je supernatant. Talog je ispiran dodavanjem 1 ml 70% etanola i laganim mućkanjem mikrotube. Ponovno centrifugiranje 2 min. na 13 000 rpm i pažljivo je odlivan etanol iz mikrotube, a sušenjem (1-2h) na papiru na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori eliminisan je ostatak etanola.

U mikrotubu sa peletom je dodavano 100 µl sterilne, destilovane vode i čuvano na temperaturi -20°C.

5.8.1.3. Ekstrakcija ukupne DNK iz korijena maline i prečišćavanje

Najprije je korijen maline opran pod tekućom vodom, da bi se uklonili ostaci zemlje, kamenja i druga prljavština i stavljen na papir da se osuši. Odvagano je 2,5-3,0 g čistog korijenja, birani su sitni korjenčići sa mjesta na kojem su uočavane ružičasto mrke promjene boje sa jasnom razlikom između zdravog i oboljelog dijela tkiva. Usitnjavano je korijenje u avanu, korišćenjem tečnog azota, do dobijanja finog praha. Usitnjeni korijen je stavljan u mikrotubu i čuvan na -20°C.

Za ekstrakciju ukupne DNK iz korijena maline, najprije je u sterilnu mikrotubu od 2 ml stavljano 0,02-0,04 g nerastvorenog PPVP (polyvinylpolypyrrolidon) vodeći računa da ne dodiruje zidove jer je statičan. U mikrotubu je dodavano 0,05-0,08 g usitnjenog korijenja i 1,2 ml ekstrakcionog pufera. Mikrotube su ručno prevrtane 10 min., a zatim centrifugirane 5 min. na 13 000 rpm. Supernatant (oko 750 µl) je prebacivan u nove mikrotube vodeći računa da se ne otpipetira čvrsti dio. Percipitacija DNA je nastajala dodavanjem u supernatant jednake količine 100% isopropanola (ohlađen na temp. -20°C), zatim se mikrotuba 3-4 puta prevrne da bi se sadržaji izmješali, nakon čega je slijedila inkubacija 10 min. na -20°C. Centrifugirano je 5 min. na 13 000 rpm, eliminisan je supernatant i provjeravano da li se talog nalazi na jednoj strani mikrotube. Resuspendovanje taloga u 70% etanola (mikrotuba se punila skoro do vrha) uz miješanje da bi se odvajao od zida mikrotube. Ponovno centrifugiranje 2 min. na 13 000 rpm i pažljivo je odlivan etanol iz mikrotube, a sušenjem (1-2h) na papiru na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori eliminisan je ostatak etanola. Potpuno osušeni talog je resuspendovan u 500 µl sterilne, destilovane vode i čuvan na -20°C (Schlenzig *et al.*, 2005; Koprivica *et al.*, 2009).

Prečišćavanje DNK nakon ekstrakcije iz korijena maline je vršeno tako da je u mikrotube od 1,5 ml sa ekstrahovanom DNK, dodavano 400 µl 24:1 hloroform:izoamil alkohol, promućkano 20x i centrifugirano 5 min. na 10 000 rpm. Prečišćene, tečne faze 400 µl je odpipetirano u novu mikrotubu i dodano 200 µl 5M NaCl i 600 µl isopropanola (ohlađenog na -20°C). Sve je promućkano 20x i ohlađeno 15 min. na -20°C da bi DNA percipitirala. Centrifugirano je 5 min. na 10 000 rpm, eliminisana tečna faza, a talog je resuspendovan u 400 µl etanola uz miješanje da bi se odvajao od zida mikrotube. Ponovno centrifugiranje 5 min. na 10 000 rpm i pažljivo je odliven etanol iz mikrotube, a sušenjem (1-2h) na papiru na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori eliminisan je ostatak etanola. Talog je resuspendovan u 100 µl sterilne, destilovane vode i čuvan na -20°C (Koprivica *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2000).

5.8.2. PCR (Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimeraze)

Za detekciju *Phytophthora* su upotrijebljene sljedeće PCR metode:

1. Konvencionalni PCR (sa PureTaq Ready-To-Go tubicama)
2. Nested PCR (sa PureTaq Ready-To-Go tubicama)
3. PCR bez PureTaq Ready-To-Go tubica.

5.8.2.1. Konvencionalni PCR

Metoda konvencionalnog PCR je korišćena za testiranje DNK uzoraka primjenom „univerzalnih“ *Phytophthora* prajmera (Tabela 6), gdje ITS6 prajmer, zajedno sa dva ITS7 i ITS8 prajmera, daje produkt veličine fragmenta 820 bp, koji je specifičan samo za vrste roda *Phytophthora*. Modifikovani „Univerzalni“ *Phytophthora* prajmeri amplifikuju ITS (Internal Transcribed Spacers) sekvence od gotovo svih *Phytophthora* vrsta i ni jednog drugog roda. ITS sekvence predstavljaju dio gena koji kodira ribozomalnu DNK (rDNA) i varira između različitih vrsta (Koprivica *et al.*, 2009). ITS sekvenca predstavlja dio gena koji kodira 18S ribozomalnu DNK (rDNK) i razlikuju se među vrstama.

Pajmeri ITS6, ITS7, ITS8 su verzija „univerzalnih“ ITS prajmera ITS5, ITS2 i ITS3 (White *et al.*, 1990) koji su modifikovani od strane D. E. L. Cooke i unaprijeđeni za amplifikaciju rDNA *Oomyceta* (Koprivica *et al.*, 2009).

Tabela 6. Modifikovani „univerzalni“ *Phytophthora* prajmeri za konvencionalni PCR

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS region	ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	820 bp	Cooke <i>et al.</i> , 2000
ITS region	ITS7	AGCGTTCTTCATCGATGTGC		
ITS region	ITS8	GCACATCGATGAAGAACGCT		

PCR reakcije su obavljane u finalnoj koncentraciji od 25 µl, a reakciona mješavina (master mix) se dodavala u PureTaq Ready-To-Go-PCR tubice (Thermo Fisher Scientific), a sadržavala je 19 µl sterilne destilovane vode, 1 µl ITS6 prajmera (10 µM), 0.5 µl ITS7 (10µM) i ITS8 (10 µM) prajmera, 5 µl ekstrahovane DNK (razrijeđene 10 puta).

Umnožavanje je obavljano u termosajkleru (ABI Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700) po sljedećem protokolu: početna denaturacija 2 min. na 94°C, slijedi 35 ciklusa denaturacije 30 s na 95°C, vezivanje prajmera za jednolančanu DNK (aniling) 30 s na 59°C, izduživanje (elongacija) 1 min. na 72°C i završno izduživanje 10 min. na 72°C.

5.8.2.2. Nested PCR (Nested Polymerase Chain Reaction)

Za nested PCR korišćena su dva seta prajmera (ITS4/DC6 i DC1/DC5) za dvije PCR reakcije. Prvi set prajmera (ITS4 i DC6) je specifičan za sve vrste roda *Phytophthora* i druge srodne rodove kao što su *Pythium* i prouzrokovaca plamenjače, koje pripadaju redu *Peronosporales* u okviru klase *Oomycetes* (Lacourt *et al.*, 1997; Hawksworth *et al.*, 1995) bez amplifikacije biljne DNK (Cooke *et al.*, 2000). Dakle, prajmeri ITS4 i DC6 (Tabela 7) za prvi krug PCR reakcije daje produkt veličine fragmenta 1 310 bp bilo koje vrste roda *Phytophthora*, uključujući i druge *Oomycetes* (Schlenzig *et al.*, 2005, Koprivica *et al.*, 2009). Ovim parom prajmera amplifikuju se dijelovi 18S i 28S podjedinica i cjelokupni ITS1 i ITS2 region, kao i 5.8S podjedinica (Cooke *et al.*, 2000).

Tabela 7. Opšti (generic) prajmeri za direktni PCR (prvi ciklus)

Genski region	Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS region	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	1 310 bp	White <i>et al.</i> , 1990
ITS region	DC6	GAGGGACTTTTGGGTAATCA		Bonnants <i>et al.</i> , 1997

Univerzalni prajmeri za nested PCR reakciju (drugi ciklus), DC1 i DC5 amplifikuju produkt dužine 533 bp (Tabela 8) specifičan samo za *Phytophthora fragariae* za malinu i jagodu (Duncan *et al.*, 1990, Schlenzig *et al.*, 2005).

Tabela 8. „Univerzalni“ prajmeri za nested PCR (drugi ciklus)

Genski region	Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS region	DC1	CTTAGTTGGGGGCTGTCT	533 bp	Bonnants <i>et al.</i> , 1997
ITS region	DC5	CGCCGACTGGCCACACAG		

Prva PCR reakcija je obavljena u finalnoj koncentraciji od 25 µl, a reakciona mješavina (master mix) je dodavana u PureTaq Ready-To-Go-PCR tubice, a sadržavala je 19 µl sterilne destilovane vode, 0,5 µl DC6 (10µM) prajmera i 0,5 µl ITS4 (10 µM) prajmera, 5 µl ekstrahovane DNK (razrijeđene 10 puta).

Druga, nested PCR reakcija je obavljena u finalnoj koncentraciji od 25 µl, a reakciona mješavina je dodavana u PureTaq Ready-To-Go-PCR tubice, a sadržala je 19 µl sterilne destilovane vode, 0,5 µl DC1 (10µM) prajmera i 0,5 µl DC5 (10µM) prajmera, 5 µl DNK iz prvog ciklusa (razrijeđene 50 puta).

Umnožavanje produkata za nested PCR (za oba ciklusa) je vršeno u termosajkleru po sljedećem programu: početna denaturacija 2 min. na 94°C, slijedi 35 ciklusa denaturacije 30 s na 95°C, vezivanje prajmera za jednolančanu DNK (aniling) za prvi ciklus PCR na 56°C, a za drugi ciklus PCR na 66°C u trajanju od 30 s, izduživanje (elongacija) 30 s na 72°C i završno izduživanje (elongacija) 10 min. na 72°C.

5.8.2.3. PCR bez PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica

PCR protokol bez upotrebe PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica je korišćen za identifikaciju *Phytophthora* spp. iz inficiranog biljnog tkiva. Ekstrakcija DNK iz zaraženog biljnog tkiva vršena je klasičnim protokolom za ekstrakciju ili upotrebom DNEasy Plant Mini kit-a (Qiagen, Hilden, Germany).

PCR za direktno sekvenciranje se odvijao u dva ciklusa, gdje je u prvom ciklusu korišćen DC6/ITS4 par prajmera, a za drugi ciklus je korišćen PCR produkt iz prvog ciklusa razrijeđen 1:500 u RNase-free vodi i ITS6/ITS4 par prajmera (Tabela 9).

Prajmeri DC6/ITS4 daju fragment specifičan za *Pythium*, *Phytophthora* i prouzrokovaca pepelnice (Bonants *et al.*, 1997). Prajmeri ITS6 i ITS4 daju produkt veličine fragmenta od 862 bp do 941bp, koji je specifičan samo za vrste roda *Phytophthora*.

Tabela 9. Prajmeri za drugi ciklus PCR

Genski region	Naziv prajmera	Sekvenca 5' – 3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS region	ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	od 862 bp do 941 bp	Cooke <i>et al.</i> , 2000
ITS region	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White <i>et al.</i> , 1990

PCR reakcije (za oba ciklusa) su obavljane u finalnoj koncentraciji reakcione mješavine od 50 μ l. Svi korišćeni prajmeri su koncentracije 5 μ M (5 pmol/ μ l) što se dobija rastvaranjem u TNE puferu (50 mM Tris pH 7.5, 140 mM NaCl, 5mM EDTA). Receptura reakcione mješavine (Master Mix) za I i II ciklus PCR je navedena u Prilogu 8.

Umnožavanje je obavljano u termosajkleru po sljedećem protokolu: početna denaturacija 3 min. na 94°C, slijedi 35 ciklusa denaturacije 30 s na 94°C, vezivanje prajmera za jednolančanu DNK (aniling) 30 s na 55°C, izduživanje (elongacija) 1 min. na 72°C i završno izduživanje (elongacija) 10 min. na 72°C.

5.8.3. Analiza PCR produkta

Detekcija i identifikacija dobijenih (konvencionalni i nested) PCR produkata obavljena je razdvajanjem u 1% agaroznom gelu u 1X TAE puferu (40 mM Tris baza, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA) sistemom elektroforeze. Za PCR bez upotrebe PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica pravi se agarozni 2% gel sa 0,5X TBE puferom (5X TBE pufer, pH 8,3 sadrži 1.1 M Tris, 900 mM Borate, 25 mM EDTA).

Agarozni gel pripreman je rastvaranjem agaroze u odgovarajućem puferu i zagrijavanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Kad se ohladilo do temperature od 60°C, dodavano je 2 μ l etidijum bromida i razlivano u kalupu za horizontalnu elektroforezu, u koji je prethodno postavljan češalj. Nakon razlivanja, gel je ostavljan na sobnoj temperaturi pola sata da se ohladi i očvrсне. Nakon očvršćavanja gela i uklanjanja češlja, kalup se uranjao u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa odgovarajućim puferom. Uzorci su pripremani tako da je na parafilmu miješano 5 μ l produkta PCR reakcije i 1 μ l boje

6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i odmah su unošeni u bunarčiće po prethodno utvrđenom rasporedu.

Vizuelizacija amplifikovanih fragmenata vršena je bojenjem gela sa 0,05% etidijum bromidom i posmatranjem gela u mračnoj komori na transiluminatoru (High Performance Ultraviolet Transilluminators, UVP, UK) pod UV svjetlošću.

Amplifikovani produkti određene veličine fragmenata vide se u gelu. Za određivanje veličine amplifikovanih produkata PCR korišćen je marker GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela.

5.9. Sekvenciranje i obrada sekvenci

BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) je bioinformatički algoritam za upoređivanje nukleotida traženih sekvenci DNK sa bazom podataka sekvenci, ovaj program izračunava statističku značajnost i identifikuje sekvencu koja liči na traženu sekvencu iznad određenog praga (Altschul *et al.*, 1997). Danas postoje različite varijacije BLAST programa (Blastn i Blastx).

U toku 2013. godine, 3 izolata su poslana na sekvenciranje u Macrogen Europe, Amsterdam (Nizozemska), obrađeni u Blastn programu (Nukleotid nukleotid BLAST), a zatim pohranjene u Banku gena. Amplifikacija 3 PCR produkta predviđene veličine dobijeni su primjenom sljedećih parova prajmera i izvedeni iz sljedećih izolata:

IZOLATI	Korišćeni par prajmera:
31a	DC1/DC5
31b	ITS6/ITS4
48a	DC1/DC5

Tokom 2017. godine, amplifikacija 12 PCR produkata (od izolata: 21, 22, 55, 56, 69, 71, 72, 73, 4, 11, 34, 53, 57) predviđene veličine su dobijeni primjenom DC1/DC5 para prajmera i poslano je na sekvenciranje u Macrogen Europe, Amsterdam (Nizozemska), obrađeni u programima: Blastn (Nukleotidni nukleotid BLAST) i Blastx (Nukleotidni 6-okvirni prevodni protein) i upoređeni su sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka. Svim sekvencama su dodijeljeni pristupni brojevi (Accession numbers), pohranjene su u Banku gena NCBI i postaju dostupni u bazi podataka.

Za poravnavanje sekvenci korišćen je program BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor), čime je vršeno spajanje revers i forward sekvenci.

Tabela 10. Dio nukleotidne NCBI kolekcije korišćene za Blastn

Izolat, soj, uzorak, varijetet	Geografsko porijeklo	Patogen	Pristupni broj	Literatura
strain "BBA 93"	Njemačka	<i>Phytophthora rubi</i>	KJ755094	nije publikovano
strain "BBA L1	Njemačka	<i>Phytophthora fragariae</i>	KJ755093	nije publikovano
isolate "PH_48"	Hrvatska	<i>Phytophthora rubi</i>	KJ508825	nije publikovano
specimen_voucher "P6406"	Francuska	<i>Phytophthora fragariae</i>	HQ261562	Robideau <i>et al.</i> (2011)
specimen_voucher "CBS109892"	UK, Škotska	<i>Phytophthora rubi</i>	HQ643341	Robideau <i>et al.</i> (2011)
specimen_voucher "CBS96795"	UK, Škotska	<i>Phytophthora rubi</i>	HQ643340	Robideau <i>et al.</i> (2011)
specimen_voucher "CBS30962"	UK, Škotska	<i>Phytophthora fragariae</i>	HQ643231	Robideau <i>et al.</i> (2011)
strain "ATCC 11107"	SAD	<i>Phytophthora fragariae</i>	HQ026727	nije publikovano
strain "P6406"	SAD	<i>Phytophthora fragariae</i>	GU258896	nije publikovano
strain "P6467"	SAD	<i>Phytophthora alni</i>	GU258800	nije publikovano
strain "P11804"	SAD	<i>Phytophthora fragariae</i>	FJ801623	nije publikovano
strain "ATCC 64968"	SAD	<i>Phytophthora rubi</i>	FJ746641	nije publikovano
strain "ATCC MYA-4164"	SAD	<i>Phytophthora rubi</i>	FJ196750	nije publikovano
strain "ATCC MYA-3894"	SAD	<i>Phytophthora fragariae</i>	FJ172257	nije publikovano
frag-rubi 666	Francuska	<i>Phytophthora rubi</i>	AJ344549	nije publikovano
strain "FVR=93"	UK	<i>Phytophthora rubi</i>	AF266761	Cooke <i>et al.</i> (2000)
variety "fragariae P822"	Francuska	<i>Phytophthora fragariae</i>	AF139370	Brasier <i>et al.</i> (1999)
strain "P11807"	SAD	<i>Phytophthora fragariae</i>	GU259468	nije publikovano

Tabela 11. Dio kolekcije NCBI sekvenci korišćene za Blastx

Protein	Geografsko porijeklo	Organizam	Taxonomska vrsta	Pristupni broj	Literatura
PHYSODRAFT 288363	SAD	<i>Phytophthora sojae</i>	pseudogljiva	XP009534206	Tyler <i>et al.</i> (2006)
RHOBADRAFT 19417	SAD	<i>Rhodotorula graminis</i>	kvasac	KPV71441	Firrincieli <i>et al.</i> (2015)
ART3	Kina	<i>Valsa mali</i>	gljiva	KUI63360	nije publikovano
ART3	Kina	<i>Valsa mali</i> var. <i>pyri</i>	gljiva	KUI52546	nije publikovano
PHACADRAFT 107112	SAD	<i>Phanerochaete carnosus</i> HHB10118-sp	gljiva	XP007402184	Suzuki <i>et al.</i> (2012)
G7K 1410-t1	Japan	<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y17804	kvasac	GAO47200	Nishida <i>et al.</i> (2011) Nishida <i>et al.</i> (2014) Yamauchi <i>et al.</i> (2015)
OIDMADRAFT 139563	SAD	<i>Oidiodendron maius</i> Zn	gljiva	KIM92494	nije publikovano
MYCGRDRAFT 44591	SAD	<i>Zymoseptoria tritici</i> IPO323	gljiva	XP003851052	Goodwin <i>et al.</i> (2011)
GLOINDRAFT 73108	SAD	<i>Rhizophagus irregularis</i> DAOM 181602	gljiva	ESA24016	nije publikovano
NEUTE2DRAFT 35700	SAD	<i>Neurospora tetrasperma</i> FGSC 2509	gljiva	EGZ74213	Ellison <i>et al.</i> (2011)

5.10. Test patogenosti

Kao biljni materijal za provjeru testa patogenosti korišćene su kontejnerske sadnice crvene maline (*Rubus idaeus* L.) sorte Willamette uzgojene iz korijenovih reznica u komercijalnom rasadniku. Nakon preuzimanja iz rasadnika, biljke su najprije održavane nekoliko dana u uslovima staklenika radi aklimatizacije i porasta sadnica, korijena i nadzemnog dijela biljke (Slika 4). Inokulacija sadnica je uslijedila kada su biljke imale visinu 100-200 mm. Po pet biljaka je inokulisano sa svakim pojedinačnim izolatom (ukupno 10 izolata), vodeći računa da u svakoj pojedinačnoj grupi izolata budu zastupljene biljke različitih visina nadzemnog dijela. Inokulacija je vršena suspenzijom micelij uzgojene na agaru (hranljiva podloga CPA), koja je nanošena u blizini korijenovog sistema test biljke. Pet biljaka je držano u istim uslovima bez inokulacije i korišćene su kao kontrola testa patogenosti. Sve test biljke su svakodnevno zalijevane sa količinom vode koja je održavala vlažnost zemlje u saksijama. Biljke su čuvane u uslovima staklenika u režimu 12 sati svjetlo/mrak i temperature 15-23°C. Test patogenosti je sproveden u trajanju 2 sedmice, na kraju je vršen pregled biljaka na: pojavu simptoma na nadzemnom dijelu (Slika 5) i korijenovom sistemu, kao i nested PCR izabranih izolata.



Slika 4. Test biljke prije inokulacije, u toku adaptacije na uslove staklenika, izvor: originalna fotografija

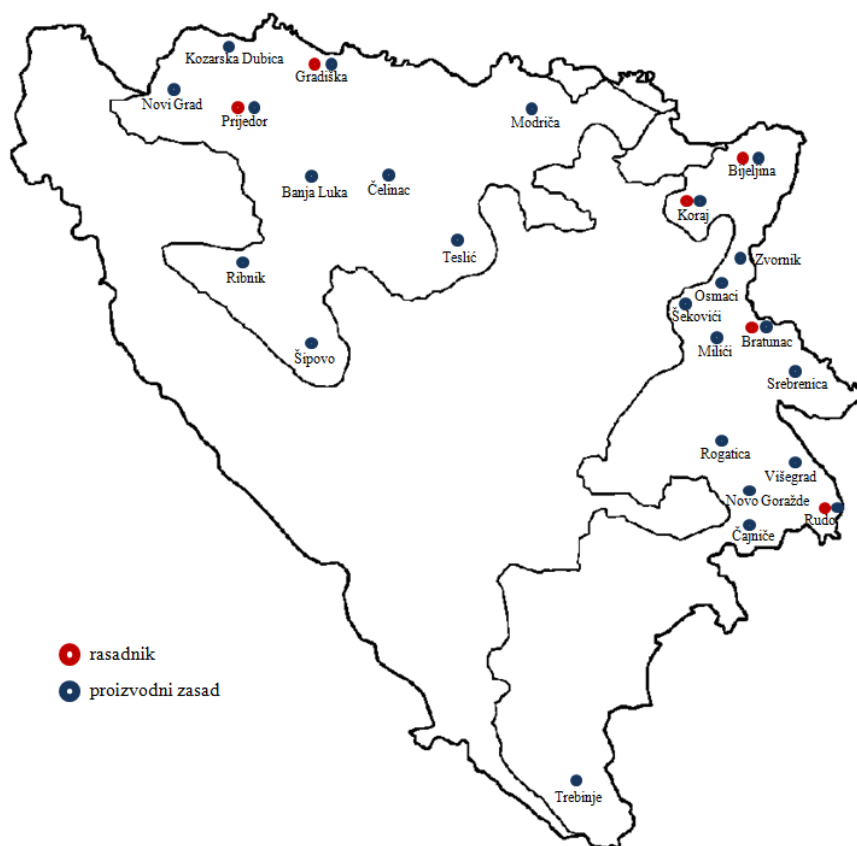


Slika 5. Test biljke inokulisane sa micelijom uzgojene na hranljivom agaru, izvor: originalna fotografija

6. REZULTATI

6.1. Praćenje simptoma pojave bolesti i uzorkovanje

U periodu od 2008. do 2016. godine, u rasadnicima i u proizvodnim zasadima maline u Republici Srpskoj, vršeni su pregledi na prisustvo simptoma bolesti izazvanih od strane *Phytophthora* spp. Pregled proizvodnih malinjaka i uzimanje uzoraka za laboratorijsku analizu je vršeno na sljedećim lokalitetima: Bratunac, Srebrenica, Zvornik, Banja Luka, Gradiška, Prijedor, Novi Grad, Kozarska Dubica, Teslić, Čelinac, Modriča, Šipovo, Ribnik i Trebinje, a sa širenjem proizvodnih zasada, tokom 2016. godine uključeni su i lokaliteti: Rudo, Čajniče, Novo Goražde, Rogatica, Višegrad, Milići, Šekovići i Osmaci (Slika 6). Tokom navedenog perioda, vršena je kontrola pojave bolesti u rasadnicima i uzimanje uzoraka za laboratorijsku analizu na sljedećim lokalitetima: Prijedor, Gradiška i Bratunac. Od 2015. godine u redovnu godišnju, kontrolu sadnog materijala maline uključen je i rasadnik u Rudom, a tokom 2016. godine, pored gore navedenih, Programom posebnog nadzora obuhvaćeni su i rasadnici u Srebrenici, Bijeljini i Koraju.



Slika 6. Mapa lokaliteta na kojima su uzimani uzorci tokom 2008-2016. godine, izvor: <https://www.google.ba/mapa BiH>, oznaka lokaliteta: Autor

6.1.1. Simptomi zabilježeni u proizvodnim zasadima

U periodu 2008-2016. godine, od maja do oktobra, na svim lokalitetima pregledani su proizvodni zasadi u kojima su zabilježeni simptomi koji su ukazivali na prouzrokovaoce *Phytophthora* spp.



Slika 7. Pojedinačno zaražene biljke i širenje bolesti unutar reda, Bratunac, jun 2008. godina, izvor: originalna fotografija



Slika 8. Potpuno sušenje proizvodnog zasada maline, selo Dragočaj kod Banjaluke, jun 2008. godina, izvor: originalna fotografija



Slika 9. Potpuno sušenje proizvodnog zasada maline, Rogatica, jul 2016. godina, izvor: originalna fotografija

Ispoljavanje simptoma u proizvodnim zasadima maline je odgovaralo simptomima koji se navode kod opisa bolesti izazvane kompleksom *Phytophthora* spp. Uočeno je sušenje pojedinačno zaraženih biljaka u zasadu ili po nekoliko biljaka u grupi unutar redova (Slika 7), a kako nije dolazilo do stvaranja novih izdanaka, javljala su se prazna mjesta zbog propadanja biljaka.

Praćenjem simptoma u proizvodnim zasadima tokom jedne vegetacije ili tokom par uzastopnih godina, uočeno je da se od tih pojedinačno zaraženih biljaka bolest sukcesivno širi dalje i rezultira potpunim propadanjem zasada. Zavisno od vremenskih uslova, ekspozicije terena, intenziteta pojave bolesti ili nekih drugih uslova, od pojedinačno zaraženih biljaka, dolazilo je do sušenja velikog broja okolnih biljaka, čitavih redova, pa i cijelih malinjaka (Slika 8).

Neki zasadi maline u posmatranom periodu od 2008. do 2016. godine na lokalitetima: Banja Luka, Bratunac, Srebrenica, Zvornik, Čelinac, Teslić, Šipovo i Rogatica, zbog potpunog propadanja biljaka, su iskrčeni i uništeni (Slika 8 i 9).

6.1.2. Simptomi na biljkama u proizvodnim zasadima

U proizvodnim zasadima vršen je pregled biljnih dijelova: vršni dio izdanka, list, prizemni dio izdanka, glavni korijen, korijenov vrat i korjenčići. Simptomi na nadzemnom dijelu biljke su rezultat propadanja (truljenja) korijenovog sistema, a simptomi na korijenu imaju dijagnostički karakter (Ivanović i Ivanović, 2004).

6.1.2.1. Simptomi na nadzemnim dijelovima maline

Jedan od zabilježenih simptoma na nadzemnim dijelovima u proizvodnim zasadima je savijanje vršnog dijela izdanaka maline u obliku „pastirskog štapa“ (Slika 10). Ovaj simptom nije često uočavan i nema dijagnostički karakter jer može biti izazvan drugim činiocima (oštećenja korijena, nedostatak vode u zemljištu i sl.).

Stewart *et al.* (2014) navodi da plodovi zaraženih biljaka ostaju znatno sitniji i brže dozrijevaju u odnosu na plodove zdravih biljaka, što se zapažalo tokom juna i jula.



Slika 10. Savijanje vrha izdanka u obliku „pastirskog štapa“, izvor: originalna fotografija



Slika 11. Simptomi prijevremenog sušenja, hloroza i nekroza oboda lista, potpuna nekroza, izvor: originalna fotografija



Slika 12. Simptomi hloroze i nekroze izdanaka maline i potpuno poropadanje biljaka u jednom dijelu reda proizvodnog zasada, izvor: originalna fotografija

Promjene na listu uočavane su na zaraženim biljkama od početka proljeća, a najočigledniji simptomi su uočavani tokom ljeta. Promjene na listu su se ispoljavale u obliku žućkastih svijetl-zelenih pjega, najčešće po ivici lista, zatim hlorotičnih i nekrotičnih zona, što je na kraju rezultiralo potpunim sušenjem listova.

Ovaj tip simptoma na lišću nema dijagnostički karakter jer može biti izazvan brojnim drugim činiocima kao što su suša, nedostatak hranljivih elemenata (nedostatak kalijuma), virusna oboljenja maline i drugo. Potpuno osušeno i uvijeno lišće ostajalo je pričvršćeno za izdanak tokom vegetacije (Slika 11 i 12).



Slika 13. Nekrotične promjene prizemnog dijela izdanka u proizvodnom zasadu, izvor: originalna fotografija

U zaraženim proizvodnim zasadima uočavano je sušenje prizemnog dijela izdanaka maline od proljeća do kraja vegetacije kada je dolazilo do promjene zelene u tamno-smeđu boju (Slika 13). Ipak, navedeni simptom treba razlikovati od pojave odrvenjavanja izdanka maline koje se dešava kod izdanaka pred kraj vegetacije koji su donijeli rod. Naime, nadzemni dio izdanka maline živi nepune 2 godine, sazrijeva od osnove ka vrhu, kada dolazi do odrvenjavanja i promjene boje, a nakon berbe se suši, pa se radi održavanja zdravstvenog stanja novih izdanaka, moraju ukloniti rezidbom.

6.1.2.2. Simptomi na podzemnim dijelovima maline

Simptomi na glavnom korijenu, korijenovom vratu i korjenčićima zaraženih biljaka u proizvodnim zasadima su uočavani kroz različite promjene. Uočeno je smanjenje ukupne mase podzemnog dijela biljke, odnosno smanjenje broja korjenčića.

Sekundarni korijenov sistem je bio uništen, osušen i ne dolazi do njegovog obnavljanja (Slika 14), a više je izraženo kod mladih, nego kod starijih biljaka maline. Kod mladih biljaka, truljenje je počinjalo sa vrha korjenčića.



Slika 14. Simptomi smanjene ukupne mase korijenovog sistema, izvor: originalne fotografije



Slika 15. Promjena boje zaraženog tkiva na poprečnom presjeku korijena maline, izvor: originalne fotografije



Slika 16. Nekroza tkiva poprečnog presjeka korijena maline, izvor: originalne fotografije

U literaturi se ovakav simptom korijena opisuje kao „rep od štakora“ („rattail“), a nastaje usljed brzog truljenja kada je lateralno korijenje uništeno (Maas, 1984). Između ostalog, ovaj simptom može biti uslovljen starošću biljaka maline.

Značajan simptom na korijenu maline je promjena boje tkiva od svijetle do tamno nekrotične zone ispod epidermisa. To je uočavano pravljenjem poprečnog presjeka korijena ili skidanjem kore korijena, korijenovog vrata i korjenčića kada postaje vidljiva ružičasto-mrka do cigla-crvena promjena boje zaraženog tkiva (Slika 15). Uklanjanjem kore korijena laganim struganjem ili pravljenjem poprečnog presjeka, uočavana je jasna linija razdvajanja između svijetlog, neinficiranog i zaraženog, nekrotičnog dijela tkiva korijena maline (Slika 16). Pojava nekroze korijenovog vrata, granica između zaraženog i zdravog dijela tkiva, se jasnije uočavala. Trulež korijena zaražene maline negativno se odražavala na dužinu formiranog izdanka, ukoliko je dolazilo do formiranja u narednoj vegetaciji.

6.1.3. Simptomi bolesti u rasadnicima

Praćenje simptoma vršeno je pregledom nadzemnih i podzemnih dijelova maline u matičnjacima u zatvorenom prostoru i otvorenom polju (Slika 17 i 18), kao i proizvodnja sadnica iz korijenovih reznica i u kontejnerskoj proizvodnji (Slika 19 i 20).

Tokom redovne kontrole rasadničke proizvodnje od strane stručnjaka Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Banjaluci, vršena je kontrola pojave bolesti u rasadnicima u: Prijedoru, Gradišci i Rudom, a eksperimentalno, za potrebe ovog rada je vršena analiza sadnica i jednog rasadnika u Bratuncu. Kontrolom sadnog materijala u periodu 2010-2015. godine, utvrđena su 4 pozitivna uzorka u rasadniku Gradiška i svi vode porijeklo iz istog rasadnika.

Od 2015. godine u redovnu godišnju kontrolu rasada maline, Programom posebnog nadzora, obuhvaćeni su i rasadnici u: Srebrenici, Bijeljini, Koraju i Rudom, gdje je uzorkovanje vršeno od strane fitosanitarne inspekcije (Inspektorat Republike Srpske). Jedan pozitivan uzorak u 2016. godini uzorkovan je od strane inspektora (Inspektorat Republike Srpske) tokom realizacije Programa posebnog nadzora nad prisustvom *Phytophthora fragariae* var. *rubi* na području Republike Srpske, a takođe vodi porijeklo iz navedenog rasadnika.

U rasadnicima, vizuelnim pregledom nije evidentirano postojanje karakterističnih simptoma na malini koji bi ukazivali na pojavu bolesti. Osim pojave neujednačenog

porasta sadnica, što može biti posljedica velikog broja različitih faktora, ostali simptomi koji se vezuju za *Phytophthora* spp. nisu bili vidljivi, a potvrda fitoftoroze sadnog materijala je bila moguća tek nakon laboratorijskog testiranja.



Slika 17. Matičnjak maline u zatvorenom prostoru, Prijedor 2016., izvor: originalna fotografija



Slika 18. Matičnjak maline na otvorenom polju, Rudo 2016. godina, izvor: originalna fotografija



Slika 19. Proizvodnja sadnica iz korijenovih reznica i kontejnerskih sadnica, Bratunac 2009. godina, izvor: originalna fotografija



Slika 20. Neujednačen porast kontejnerskih sadnica, Prijedor 2015. godina, izvor: originalna fotografija

6. 2. Klasične laboratorijske metode

6.2.1. Zasiјavanje korijenčica uzoraka maline na hranljive podloge

U periodu od 2008-2010. godine, vršen je pregled i analiza uzoraka maline praćenjem porasta i izgleda micelije na različitim hranljivim podlogama. Uspostavljanje ovog dijela laboratorijskih analiza vršeno je zasiјavanjem ukupno 381 uzorka korijenčica maline. Odabrane su 4 hranljive podloge (CMA, V8A, FBA i CPA) na kojima je praćen rast i morfologija micelija *Phytophthora* spp.

Za dalju analizu dobijenih rezultata odabran je 241 izolat, čija selekcija je izvršena nakon zasiјavanja korijena na sve 4 različite hranljive podloge (CMA, V8A, FBA i CPA), a morfologija i praćenje porasta micelije je vršeno 5-7 dana nakon zasiјavanja (Tabela 12).

Tabela 12. Stanje učestalosti pojave micelije na različitim hranljivim podlogama koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp.

	CMA		V8A		FBA		CPA	
	učestalost	%	učestalost	%	učestalost	%	učestalost	%
NEMA micelije	132	54.8	139	57.7	123	51.0	61	25.3
IMA micelije	109	45.2	102	42.3	118	49.0	180	74.7
UKUPNO	241	100.0	241	100.0	241	100.0	241	100.0

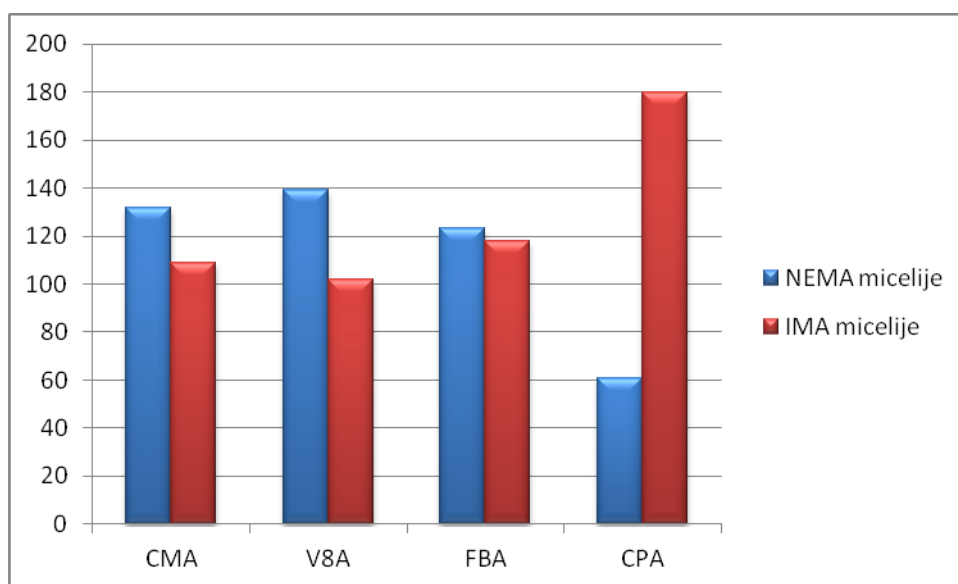
Analizom dobijenih rezultata vizuelnim i mikroskopskim pregledom micelije, koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp., odlučeno je da se za nastavak rada koristi hranljiva podloga CPA. Hranljiva podloga CPA se pokazala kao najjednostavnija tokom pripreme i imala je najveći broj Petrijevih posuda, 180 od pregledanih 241 u tri ponavljanja, sa prisutnom micelijom koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp.

Analizom dobijenih rezultata nakon zasiјavanja korijenčica na svim podlogama, procentualna zastupljenost razvoja micelije koja izgledom odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp. se razvila na hranljivoj podlozi FBA sa 49%, dok se na 51% zasiјanih podloga nije došlo do razvoja micelije koja izgledom odgovara miceliji *Phytophthora* spp. Na hranljivoj podlozi CMA u 45.2% došlo je do razvoja micelije koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp., dok je u 54.8% Petrijevih posuda razvoj odgovarajuće micelije izostao. Na hranljivoj podlozi V8A odgovarajuća micelija se

razvila na 42.3%, dok je u većem procentu (57.7%) razvoj micelije koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp. izostao (Tabela 12).

Najveća zastupljenost pojave micelije koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp. se razvila na hranljivoj podlozi CPA u relativnoj vrijednosti 74.7%. S druge strane, kod određenog broja uzoraka zasijanih na CPA podlozi nije došlo do razvoja micelije koja odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp., u vrijednosti od 25.3%. Ovakav omjer broja uzoraka kod kojih je došlo do razvoja micelije koja izgledom liči na miceliju *Phytophthora* spp. u odnosu na broj uzoraka kod kojih je izostao razvoj micelije, uslovalo je opredjeljenost CPA podloge za dalje korišćenje.

Na grafikonu 2. je prikazana učestalost pojave tj. razvoja micelije istih uzoraka na 4 različite hranljive podloge (CMA, V8A, FBA, CPA). Na svim hranljivim podlogama je izvršen vizuelni i mikroskopski pregled micelije koja po svojim osobinama odgovara izgledu micelije *Phytophthora* spp.



Grafikon 2. Učestalost pojave micelije koja izgledom odgovara miceliji *Phytophthora* spp.

Na osnovu dobijene frekvencije sumnje da se na CPA podlozi razvila micelija kod najvećeg broja Petrijevih posuda, da micelija izgledom odgovara miceliji *Phytophthora* spp. i da podloga ima jednostavan način pripreme, opredjelilo je korišćenje CPA hranljive podloge za dalju analizu u nastavku rada.

6.2.2. Mamci i zasijavanje mamaca na hranljivu podlogu

U periodu 2008-2013. godine vršena je analiza prisustva patogena u zemlji upotrebom mamac biljaka *Rhododendron* (*R. variegatum*, *R. morgenrot*, *R. hybrid*). Mamcima je ukupno testirano 348 uzoraka zemljišta, od čega je 241 uzorak zemlje dobijen prilikom pranja korijenja maline iz proizvodnih zasada i rasadnika, te 15+92 uzoraka zemlje uzetih iz proizvodnih zasada u kojima je registovana pojava sušenja, a sa ciljem utvrđivanja prisustva patogena u zemlji. Nakon ispiranja listova rododendrona u destilovanoj vodi, uslijedila je inkubacija listova u vlažnim i mračnim uslovima u Petrijevim posudama na vlažnom filter papiru.

Napravljena je skala intenziteta pojave nekroze listova rododendrona, gdje je:

1. Nema nekroze listova - nema nekroze ni na jednom listu
2. Vrlo slaba nekroza listova – nekroza na 1-2 lista
3. Slaba nekroza listova – nekroza na 2-3 lista
4. Srednje jaka nekroza listova – nekroza na 3-4 lista
5. Jaka nekroza listova – nekroza na svim listovima, na 4-5 (6) listova

Nakon perioda inkubacije, pregledano je sve lišće mamac biljaka u svim uzorcima zemlje radi utvrđivanja zastupljenosti nekrotičnih pjega na njima. Na osnovu napravljene skale za utvrđivanje intenziteta nekroza listova rododendrona, dobijeni su sljedeći rezultati:

1. Nema nekroze	92 uzorka	-
2. Vrlo slaba nekroza	113 uzoraka	113 izolata
3. Slaba nekroza	73 uzorka	73 izolata
4. Srednje jaka nekroza	41 uzorak	41 izolat
5. Jaka nekroza	29 uzoraka	29 izolata
UKUPNO		348 uzoraka 256 izolata

Nakon praćenja pojave nekroze, uslijedilo je zasijavanje 256 izolata sa ispoljenim simptomima nekroze na CPA hranljivu podlogu i praćenje pojave razvoja micelije. Za potrebe dalje analize dobijenih izolata korišćene su laboratorijske tehnike: mikroskopski pregled izgleda micelije i serološke analize.

6.2.3. Prosvjetljavanje bilnog materijala u laktofenolu

Pravljenje mikroskopskih preparata od zaraženog dijela korijena maline u laktofenolu je vršeno radi prosvjetljavanja bilnog tkiva i pregleda prisustva oospora. Laktofenol je pogodan fluid za preparovanje jer fenol ubija živi organizam, mliječna kiselina čuva gljivičnu strukturu, a ne dolazi do bubrenja niti plazmolize bilnog tkiva.

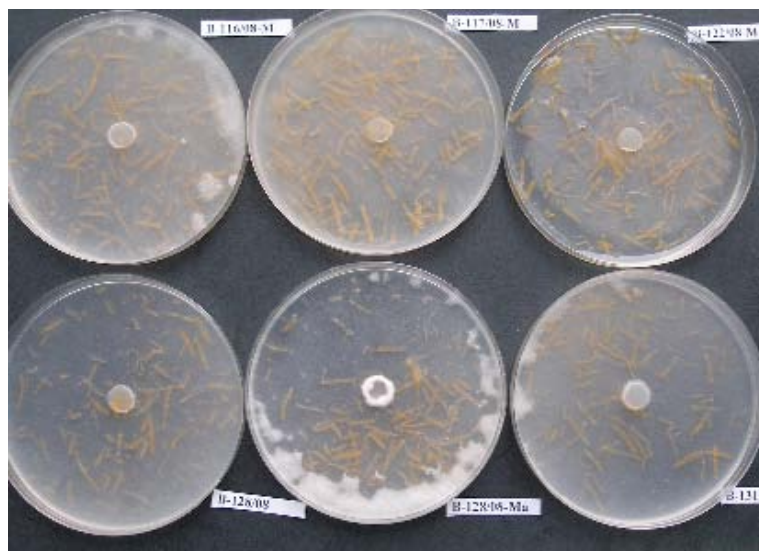
Tokom 2008. godine mikroskopski pregled obojenih preparata zaraženog korijenja maline vršen je pomoću mikroskopa Olympus model CX41 u fitopatološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu bez uspjeha, pa je ova metoda napuštena za dalji rad.

6.2.4. Makroskopski i mikroskopski pregled izolata na hranljivim podlogama

Makroskopski i mikroskopski pregled izolata na hranljivim podlogama vršen je u periodu 2008-2013. godine, odnosno u periodu kada su rađene klasične laboratorijske analize zasijavanja korjenčića maline i mamac biljaka i izolacija patogena na hranljivim podlogama. Mikroskopski pregled je urađen na 381 uzorak korijena maline zasijane na različite hranljive podloge u 3 ponavljanja. Takođe je mikroskopski pregledano zasijanih mamac biljaka od 256 uzoraka zemljišta, od čega je 241 uzorak zemlje koja je saptana sa korijenja maline iz proizvodnih zasada i rasadnika, te 106 uzoraka zemljišta uzetih iz proizvodnih zasada u kojima je registrovano sušenje. Preko mamac biljaka vršena je izolacija iz zemljišta, a nakon zasijavanja i odgajanje micelije na CPA hranljivoj podlozi.



Slika 21. Lijevo: Izolat 102-08 slabog porasta micelije; Srednja: Izolat 106-08 srednje razvijena vazdušna micelija umjerenog porasta; Desno: Izolat 103-08 bujna vazdušna micelija brzog porasta na CPA podlogama, izvor: originalne fotografije



Slika 22. Različit izgled i brzina porasta micelija *Phytophthora* spp. izolata dobijenih od mamac biljaka, izvor: originalna fotografija

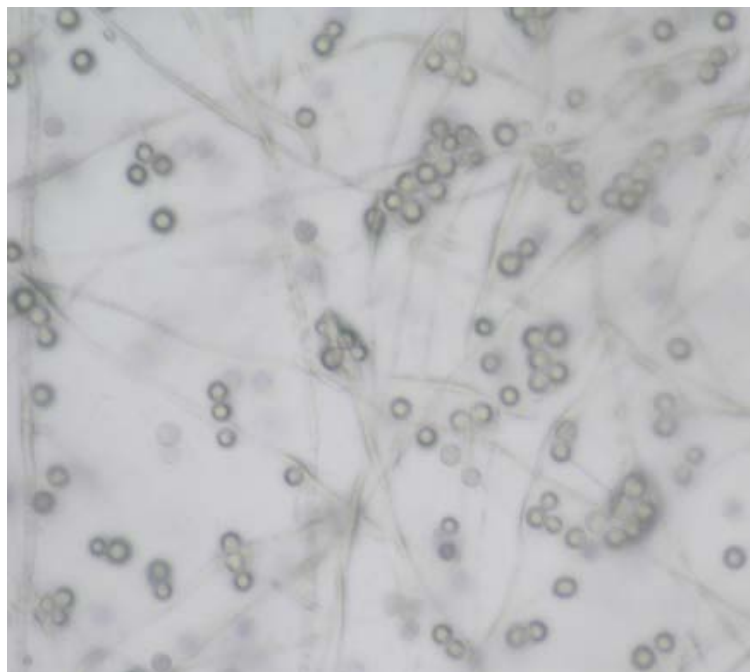
Makroskopske morfološke osobine karakteriše porast micelija peperjastog izgleda, bijele boje djelomično u vazduhu, a dijelom uronjena u podlogu (Slika 21 i 22).

Mikroskopskim pregledom morfoloških osobina micelija, utvrđeno je da su hife nerazgranate i bez poprečnih pregrada (Slika 23), a septe su uočavane sa starenjem micelije. Takođe, može se vidjeti uvrtnanje micelije i stvaranje coils konstrukcija.

Hlamidospore su spore sa zadebljalim zidom tamne boje i sposobnošću dugoročnog preživljavanja (Slika 24). Hlamidospore se obrazuju direktno na hifama od vršnih ćelija. Imaju jednu zadebljalu opnu koja ih štiti od raznih nepovoljnih faktora spoljašnje sredine. Hlamidospore su vrlo otporne i zato se zovu i trajne spore. Zadržavaju se na biljnim ostacima i u zemljištu, a često mogu očuvati klijavost i duži niz godina.

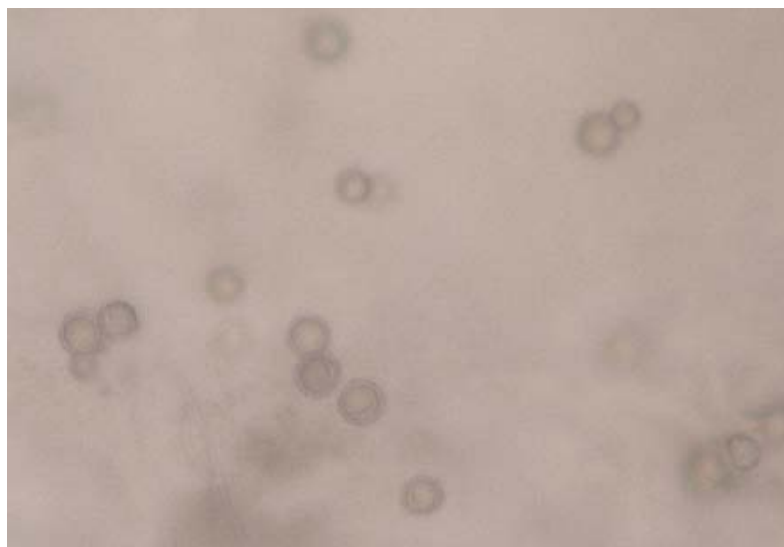


Slika 23. Mikroskopski izgleda micelije *Phytophthora* spp. na hranljivoj podlozi, uvrtnje micelije i stvaranje coils konstrukcija (Olympus CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels), izvor: originalna fotografija



Slika 24. Hlamidospore *Phytophthora* spp. (Olympus model CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels, izvor: originalna fotografija)

Od ostalih morfoloških formi na miceliji pseudogljiva roda *Phytophthora*, tokom eksperimenta vršeno je praćenje formiranje oospora (slika 25).



Slika 25. Oospore *Phytophthora* spp. (Olympus model CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels, izvor: originalna fotografija)

Oospore se formiraju u mraku, na nižoj temperaturi od optimalne (inkubacija na 20° C) i uz dodatak sterola. Obično se oogonija i anteridija formiraju za 7 dana, a oospore za 14 dana, mada ih je preporučljivo ostaviti 4-6 nedjelja da se razviju. Izolati koji ne formiraju oospore su vjerovatno heterotalusni i za njihovo stvaranje neophodno je da dođe do unakrsnog parenja kompatibilnih tipova.

Od ostalih morfoloških formi kolonija pseudogljive *Phytophthora* spp., tokom eksperimenta nije vršeno praćenje porasta sporangija.

Za uzgoj sporangije je preporučeno koristiti tečnu podlogu (npr. nesterilni rastvor zemljišnog ekstrakta), a od čvrstih može V8A ili CA (agar od mrkve, carrot agar) i uz prisustvo svjetlosti (24-48h).

Tokom eksperimenta nije vršeno praćenje njihovog porasta jer je morfologija bazirana na pregledu micelije, a krajnji cilj je bio razviti nove, savremenije i brže metode detekcije.

6.3. Serološke laboratorijske metode

Za potvrdu prisustva *Phytophthora* spp. u uzorcima maline korišćena je direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS–ELISA) prema uputstvima proizvođača dijagnostičkih ELISA kitova od 2 proizvođača: AGDIA Incorporated (*Phytophthora* PathoScreen, Indiana, USA) i ADGEN Phytodiagnosics (Neogen Europe Ltd, Scotland, UK).

Ukupno je testirano 228 uzoraka DAS-ELISA testom, koji predstavljaju izolat patogena u formi micelije iz korijena biljke i uzgojenih na hranljivoj CPA podlozi i micelije iz mamac biljaka nastalih izolacijom patogena iz zemljišta i uzgojenih na hranljivoj CPA podlozi. Serološke metode DAS-ELISA testa su korišćene za utvrđivanje prisustva *Phytophthora* spp. kod (Tabela 13):

- 137 izolata - micelija dobijena zasijavanjem korijena maline na CPA hranljivoj podlozi,
- 91 izolat – micelija dobijena zasijavanjem nekrotičnih listova mamac biljke (nakon izolacije iz zemlje) na CPA hranljivoj podlozi.

Tabela 13. Rezultati DAS-ELISA testova na prisustvo *Phytophthora* spp.

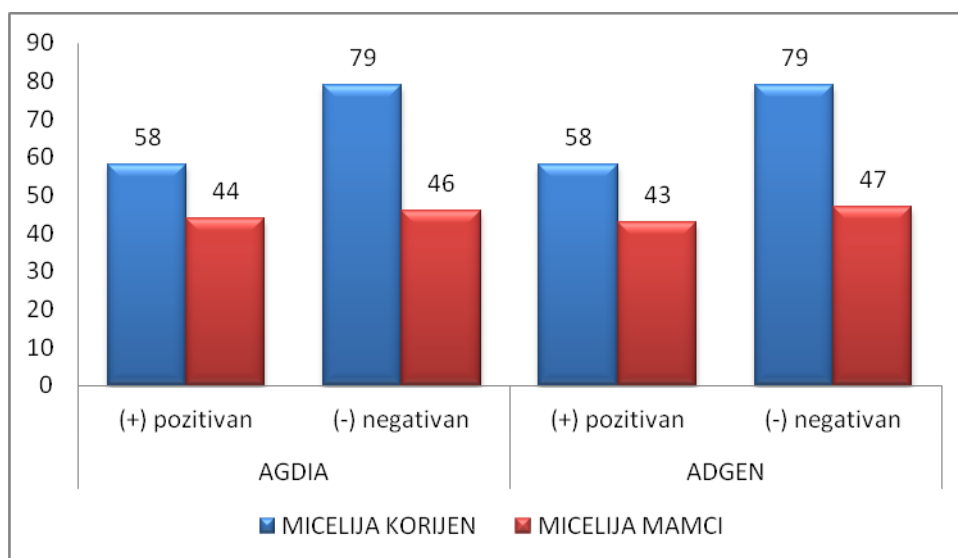
ELISA kitovi		MICELIJA iz KORIJENA	%	MICELIJA iz MAMACA	%
AGDIA	(-) negativan	79	57.7	47	51.65
	(+) pozitivan	58	42.3	44	48.35
UKUPNO		137		91	
ADGEN	(-) negativan	79	57.7	48	52.75
	(+) pozitivan	58	42.3	43	47.25
UKUPNO		137		91	

Na grafikonu 3. se mogu vidjeti rezultati analiza micelije koja se razvila na hranljivoj CPA podlozi nakon:

- zasijavanja korijena i izolacije patogena iz biljke i
- nakon zasijavanja nekrotičnih listova mamac biljaka i izolacije patogena iz zemlje.

Evidentan je isti broj pozitivnih i negativnih izolata iz korijena dobijenih testiranjem sa oba ELISA kita (AGDIA i ADGEN). Od ukupno testiranih 137 izolata, prisustvo patogena je potvrđeno kod 58 izolata, a kod 79 izolata je potvrđeno odsustvo patogena *Phytophthora* spp.

Što se tiče analize micelije izolacijom iz zemlje preko mamac biljaka, od ukupno testiranih 91 izolata, kod 44 izolata je potvrđeno prisustvo patogena AGDIA kitom, dok je kod 43 izolata potvrđeno prisustvo patogena ADGEN kitom. Kod 47 izolata je potvrđeno odsustvo patogena AGDIA kitom, dok je kod 48 izolata potvrđeno odsustvo patogena ADGEN kitom. Razlika od jednog izolata je utvrđena kod analize uzoraka zemljišta preko mamac biljaka.



Grafikon 3. Rezultati DAS-ELISA kitova na prisustvo *Phytophthora* spp.

Daljim poređenjem rezultata različitih ELISA kitova (AGDIA i ADGEN), bilo je neophodno utvrditi kod kojeg broja izolata je potvrđeno prisustvo patogena sa oba komercijalna ELISA kita.

U tabeli 14 vidimo da su sa oba komercijalna ELISA kita, kada je rađena analiza micelije iz korijena maline, prisustvo patogena je potvrđeno kod 44 izolata, dok je kod 64 izolata potvrđeno odsustvo patogena *Phytophthora* spp.

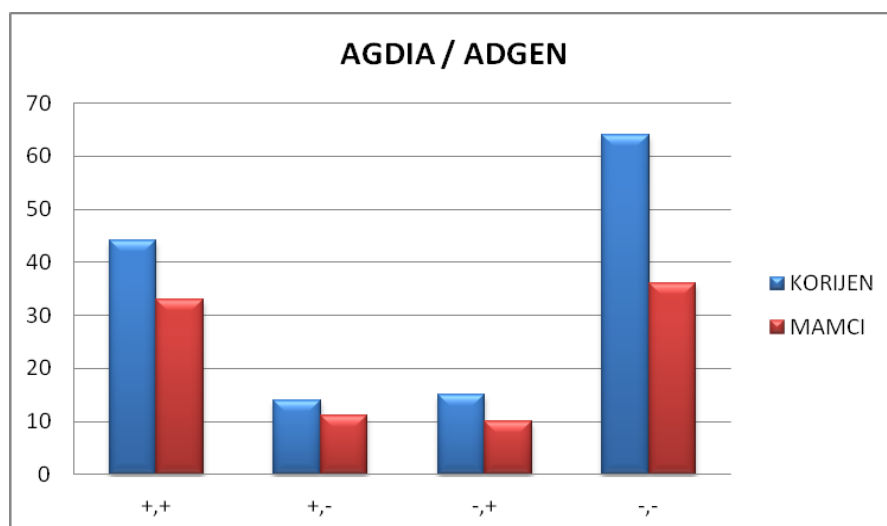
Kod 29 izolata iz korijena maline i 21 izolata iz zemlje dobijenih preko mamac biljke, je pokazao neujednačene rezultate dobijene testiranjem sa oba komercijalna ELISA kita.

Tabela 14. Poređenje AGDIA i ADGEN rezultata

	AGDIA / ADGEN				UKUPNO
	+ / +	+ / -	- / +	- / -	
MICELIJA iz KORIJENA	44	14	15	64	137
MICELIJA iz MAMACA	33	11	10	37	91
UKUPNO	77	25	25	101	228

Serološkim analizama, testiranjem sa oba komercijalna ELISA kita, kada je rađena analiza micelije iz mamac biljaka, prisustvo patogena je potvrđeno kod 33 izolata, dok je kod 37 izolata potvrđeno odsustvo patogena *Phytophthora* spp.

Kod 21 uzorka micelije iz mamac biljaka ostalo je nejasno prisustvo, odnosno odsustvo patogena, zbog činjenice da su pokazivali nejednake rezultate testiranjem sa oba komercijalna ELISA kita.



Grafikon 4. Poređenje AGDIA i ADGEN rezultata iz biljaka i iz zemljišta

Na grafikonu 4. je prikazan odnos pozitivnih i negativnih rezultata dobijenih sa oba komercijalna ELISA testa, kao i ukupnu vrijednost izolata koji imaju nejednake rezultate dobijene testiranjem sa oba komercijalna ELISA kita.

6.3.1. Rezultati DAS-ELISA testa direktno iz korijena

Pored testiranja micelije patogena izolovane iz korijena i micelije patogena izolovane iz zemlje preko mamac biljaka, vršeno je i DAS-ELISA testiranje prisustva patogena iz uzorka tkiva korijena biljaka sa simptomima bolesti. Ukupno 32 uzorka korijena maline su analizirana sa oba komercijalna ELISA kita.

U cilju provjere mogućnosti upotrebe ELISA kitova, a da bi se izbjegao korak zasijavanja na hranljivim podlogama i time ubrao postupak laboratorijske analize, vršeno je testiranje prisustva patogena direktno iz korijena maline. Nakon pranja u vodi i dezinfekcije u alkoholu, korijenje maline je testirano ELISA kitovima (AGDIA i ADGEN). Ukupno je analizirano 32 uzorka korijena maline sa oba ELISA kita.

Rezultati DAS-ELISA testa direktno iz korijena su imali veliki broj pozitivnih rezultata, koji su se pokazali kao lažno pozitivni, pa su kao takvi navedeni u tabeli 15. Ovi rezultati nisu obuhvaćeni za dalji rad, ni uvršteni u dalje analize, niti u poređenja rezultata seroloških analiza.

Tabela 15. Rezultati analiza direktno iz korijena maline dobijeni različitim ELISA kitovima

Rezultati	DIREKTNO iz KORIJENA			
	AGDIA	%	ADGEN	%
(-) negativan	3	9.38	6	18.75
(+) pozitivan	29	90.63	26	81.25
UKUPNO	32		32	

Ovaj tip analize je rađen sa malim brojem uzoraka, ukupno 32, jer se nastojalo ispitati efikasnost detekcije patogena direktno iz korijena, bez prethodne izolacije na hranljive podloge. Od ukupno 32 analizirana uzorka, AGDIA kitom je potvrđeno prisustvo patogena kod 29, a ADGEN kitom kod 26 uzoraka korijenja maline.

Ipak, zbog velikog broja dobijenih pozitivnih rezultata tokom analize, smatra se da se radi o lažno pozitivnim rezultatima koji ne odgovaraju stvarnom zdravstvenom stanju uzoraka maline. To je osnovni razlog zašto se nije nastavilo sa serološkom analizom direktno iz korijena.

U prilog ovoj tvrdnji stoji činjenica da se u uputstvu za korišćenje dijagnostičkih sredstava oba proizvođača navodi da reaguju, u izvesnom stepenu, i sa vrstama roda *Pythium*. U okviru roda *Pythium* ima preko 100 različitih vrsta. Radi se o veoma polifagnoj skupini biljnih patogena, prisutnih na svim kontinentima. Isto kao i *Phytophthora* spp., tako i *Pythium* spp. pripadaju razdjelu Oomycota ili klasi Oomycetes, što znači da su svrstani u pseudogljive (gljivama slične organizme), a do infekcije dolazi preko korijena ili stabla ispod površine zemlje. Pretpostavka je da bi prisustvo i detekcija vrsta roda *Pythium* mogao biti razlog velikog broja lažno pozitivnih rezultata kod analize prisustva patogena direktno iz korijena.

Zbog nedovoljne preciznosti dobijenih rezultata ovakav tip analize direktno iz korijena nije se dalje sprovodio sa većim brojem uzoraka, niti su isti uvršteni u dalje analize i poređenja sa rezultatima koji su dobijeni testirajući miceliju iz korijena i miceliju iz mamac biljaka.

6.3.2. Statistička obrada seroloških analiza

Od ukupno 228 uzoraka micelije izolovane iz korijena i uzoraka iz zemlje, izdvojeno je 72 izolata za dalju statističku obradu. Ova 72 izolata su testirana sa oba ELISA kita kod oba tipa uzorka, i iz korijena i iz zemlje. Cilj je bilo utvrditi odnos rezultata iz istih uzoraka sa namjerom određivanja koji ELISA kit je preporučljiviji za koji tip uzoraka za dalju analizu.

Ukupno 72 izolata su testirana sa oba ELISA komercijalna kita i izvršeno je poređenje dobijenih rezultata, gdje oznaka:

a) micelija iz korijena - označava izolat gdje se na hranljivoj podlozi razvila micelija zasijavanjem korijena maline, nakon površinske dezinfekcije u alkoholu. Micelija iz korijena maline, koja se razvila na CPA hranljivoj podlozi, je testirana sa oba ELISA kita (AGDIA i ADGEN).

b) micelija iz mamac biljaka - označava izolat gdje preko mamac biljaka vršena izolacija patogena iz uzorka zemlje, a koji je nastao sapiranjem korijena maline ili iz uzoraka zemlje uzetih iz proizvodnih zasada. Listovi mamac biljaka su držani potopljeni u vodi zajedno sa uzorkom zemlje nekoliko dana (3-5). Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, narednih nekoliko dana listovi mamac biljaka su držani u vlažnim uslovima (5-7) tokom kojih je dolazilo do razvoja nekroze na njima, nakon čega su komadići listova zasijavani na hranljivu CPA podlogu. Micelija koja se razvila na hranljivoj podlozi iz nekrotičnih listova mamac biljaka, a koja je po izgledu odgovarala izgledu micelije *Phytophthora* spp., testirana je sa oba ELISA kita (AGDIA i ADGEN).

Tabela 16. Rezultati testova izolata od micelija iz korijena i iz mamac biljaka, kao i njihova procentualna zastupljenost, dobijena različitim ELISA kitovima

ELISA kitovi		MICELIJA iz KORIJENA	%	MICELIJA iz MAMACA	%
AGDIA	(-) negativan	33	45.83	36	50.00
	(+) pozitivan	39	54.17	36	50.00
UKUPNO		72		72	
ADGEN	(-) negativan	32	44.44	37	51.39
	(+) pozitivan	40	55.56	35	48.61
UKUPNO		72		72	

U statističku obradu su uključeni rezultati ukupno 72 analizirana izolata. Vršeno je poređenje rezultata dobijenih različitim ELISA kitovima, gdje „plus” označava

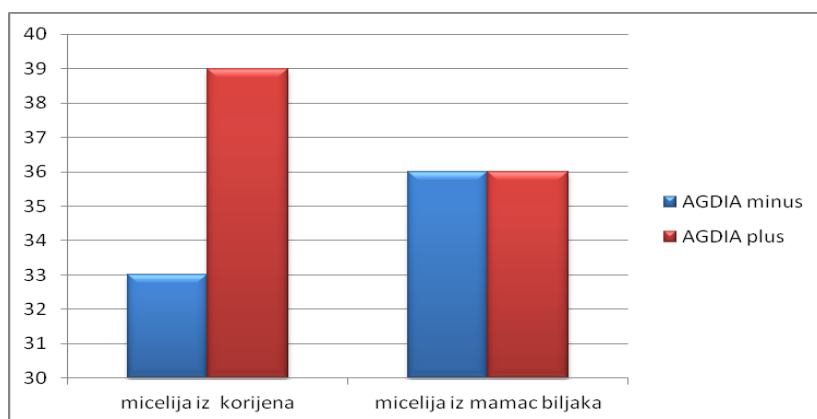
pozitivne rezultate (prisustvo *Phytophthora* spp.) i „minus“ označava negativne rezultate (odsustvo *Phytophthora* spp.) (Tabela 16).

6.3.2.1. Rezultati AGDIA ELISA kit

AGDIA ELISA kitom je vršena analiza micelije koja je dobijena izolacijom patogena na CPA hranljivoj podlozi, zasijavanjem korijena maline i nekrotičnih listova mamac biljaka.

Od ukupno analizirana 72 izolata, AGDIA ELISA kitom potvrđeno je prisustvo patogena kod 39 izolata iz micelije dobijenih nakon zasijavanja korijena maline na hranljivu podlogu, u odnosu na 33 negativna (minus) rezultata (Grafikon 5).

Od ukupno analizirana 72 izolata, poredeći rezultate dobijene AGDIA ELISA kitom, potvrđeno je jednako prisustvo i odsustvo patogena iz micelije nastale zasijavanjem nekrotičnih listova mamac biljaka, po 36 izolata (Grafikon 5).



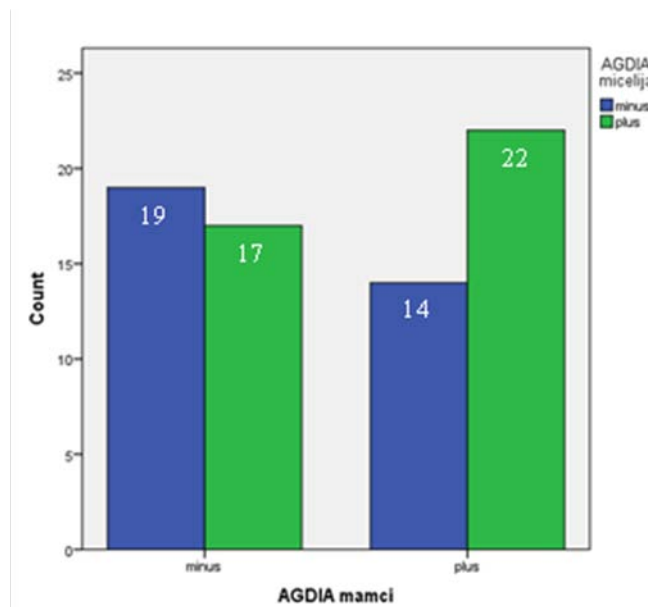
Grafikon 5. Zastupljenost pozitivnih (plus) i negativnih (minus) izolata analizom micelije iz korijena maline i iz zemlje preko mamac biljaka dobijenih AGDIA kitom

Dalje je bio cilj utvrditi kakav je odnos pozitivnih i negativnih rezultata dobijenih AGDIA ELISA kitom, kada poredimo iste uzorke koji su analizirani iz korijena biljke i iz zemljišta, preko mamac biljaka (Tabela 17).

Tabela 17. Odnos rezultata AGDIA kita micelije iz: mamac biljke / korijen maline

AGDIA ELISA kit		MICELIJA iz korijena		UKUPNO
		(-) minus	(+) plus	
MICELIJA iz mamac biljke	(-) minus	19	17	36
	(+) plus	14	22	36
UKUPNO		33	39	72

Poređenje je vršeno testirajući miceliju uzoraka gdje je izolacija patogena vršena na hranljivu podlogu na 2 načina: 1) iz korijena zaražene biljke i 2) iz zemlje preko mamac biljaka. Testirajući 72 izolata AGDIA ELISA kitom, zabilježeno je 39 pozitivnih izolata iz micelije korijena i 36 pozitivnih izolata iz micelije mamac biljaka (Grafikon 6).



Grafikon 6. Odnos rezultata dobijenih AGDIA ELISA kitom istih uzoraka iz korijena maline i iz zemljišta preko mamac biljaka

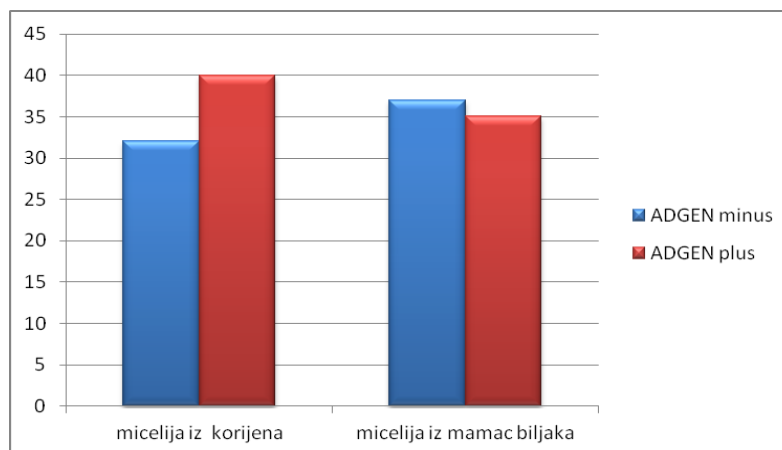
Zaključujemo da je AGDIA ELISA kitom potvrđen veći broj pozitivnih uzoraka analizirajući miceliju iz korijena, nego preko mamac biljaka.

6.3.2.2. Rezultati ADGEN ELISA kit

ADGEN ELISA kitom je vršena analiza micelije koja je dobijena izolacijom patogena na CPA hranljivoj podlozi, izolacijom iz korijena maline i nekrotičnih listova mamac biljaka.

Od ukupno analizirana 72 izolata, ADGEN ELISA kitom potvrđeno je prisustvo patogena kod 40 izolata, iz micelije dobijene nakon zasijavanja korijena maline na hranljivu podlogu, u odnosu na 32 negativna (minus) izolata (Grafikon 7).

Od ukupno analizirana 72 izolata, poredeći rezultate dobijene ADGEN ELISA kitom potvrđeno je mala razlika prisustva i odsustva patogena iz micelije nastale zasijavanjem nekrotičnih listova mamac biljaka, odnosno utvrđeno je 37 negativnih (minus) i 35 pozitivnih (plus) izolata (Grafikon 7).



Grafikon 7. Zastupljenost pozitivnih (plus) i negativnih (minus) izolata analizom micelije iz korijena maline i iz zemlje preko mamac biljaka dobijenih ADGEN kitom

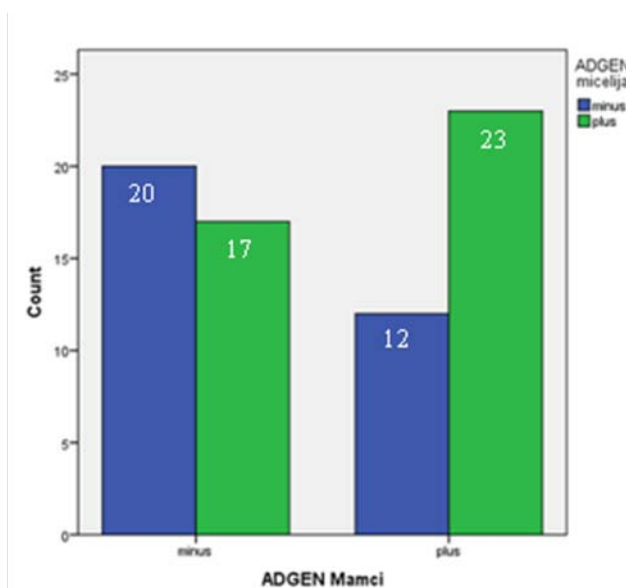
Dalje je bio cilj utvrditi kakav je odnos pozitivnih i negativnih rezultata dobijenih ADGEN ELISA kitom, kada poredimo iste izolate koji su analizirani iz korijena biljke i iz zemljišta, preko mamac biljaka (Tabela 18).

Tabela 18. Odnos rezultata ADGEN kita micelije iz: mamac biljke / korijen

ADGEN ELISA kit		MICELIJA iz korijena		UKUPNO
		(-) minus	(+) plus	
MICELIJA iz mamac biljke	(-) minus	20	17	37
	(+) plus	12	23	35
UKUPNO		32	40	72

Poređenje je vršeno testirajući miceliju uzoraka gdje je izolacija patogena vršena na hranljivu podlogu na 2 načina: 1) iz korijena iz zaražene biljke i 2) iz zemlje preko mamac biljaka. Testirajući 72 izolata ADGEN ELISA kitom, zabilježeno je 40 pozitivnih izolata iz micelije korijena i 35 pozitivnih izolata iz micelije mamac biljaka (Grafikon 8).

Zaključujemo da je ADGEN ELISA kitom potvrđen veći broj pozitivnih uzoraka analizirajući miceliju iz korijena, nego preko mamac biljaka.



Grafikon 8. Odnos rezultata dobijenih ADGEN ELISA kitom istih uzoraka iz korijena maline i iz zemljišta preko mamac biljaka

6.3.3. Upoređivanje rezultata dobijenih različitim ELISA kitovima

Bilo je neophodno utvrditi kakav je odnos rezultata istih izolata dobijenih različitim ELISA kitovima.

Upoređivanje rezultata je vršeno kod istih izolata koji predstavljaju: 1) miceliju uzgojenu na hranljivoj podlozi koja je dobijena izolacijom patogena iz korijena zaražene maline; 2) miceliju uzgojenu na hranljivoj podlozi koja je dobijena izolacijom patogena iz zemlje preko nekrotičnih listova mamac biljaka.

6.3.3.1. Upoređivanje rezultata prilikom testiranja izolata iz korijena različitim ELISA kitovima

Upoređivanje rezultata dobijenih različitim ELISA kitovima je vršeno kod istih uzoraka dobijenih od micelije prilikom izolacije patogena iz korijena zaražene maline na hranljivoj podlozi.

Tabela 19. Odnos rezultata različitih ELISA kitova (ADGEN/AGDIA) analizirajući miceliju iz korijena maline

MICELIJA IZ KORIJENA		AGDIA		UKUPNO
		(-) minus	(+) plus	
ADGEN	(-) minus	25	7	32
	(+) plus	8	32	40
UKUPNO		33	39	72

Testirajući 72 izolata različitim ELISA kitovima na prisustvo patogena u korijenu maline preko micelije dobijene nakon izolacije na hranljivu podlogu, zabilježeno je 40 pozitivnih izolata sa ADGEN kitom, a 39 pozitivnih sa AGDIA kitom. Odsustvo patogena je zabilježeno kod 32 izolata testirana ADGEN kitom i 33 izolata testirana AGDIA kitom (Tabela 19).

Zaključujemo da je poređenjem rezultata testiranja različitim ELISA kitovima potvrđen jedan uzorak razlike, prilikom testiranja micelije dobijene nakon izolacije patogena iz korijena maline na hranljivu podlogu.

6.3.3.2. Upoređivanje rezultata prilikom testiranja izolata iz zemlje preko mamac biljaka različitim ELISA kitovima

Upoređivanje rezultata dobijenih različitim ELISA kitovima je vršeno kod istih uzoraka dobijenih od micelije prilikom izolacijom patogena iz zemlje preko mamac biljaka.

Tabela 20. Odnos rezultata različitih ELISA kitova (ADGEN/AGDIA) analizirajući miceliju iz mamac biljaka

MICELIJA IZ MAMAC BILJKE		AGDIA		UKUPNO
		(-) minus	(+) plus	
ADGEN	(-) minus	27	10	37
	(+) plus	9	26	35
UKUPNO		36	36	72

Testirajući 72 izolata različitim ELISA kitovima na prisustvo patogena u zemlji preko mamac biljke, čiji nekrotični listovi su zasijani na hranljivu podlogu gdje se razvila micelija, zabilježeno je 36 pozitivnih izolata sa AGDIA kitom, a 35 pozitivnih izolata sa ADGEN kitom. Odsustvo patogena je zabilježeno kod 37 izolata testirana ADGEN kitom i 36 izolata testirana AGDIA kitom (Tabela 20).

Zaključujemo da je poređenje rezultata testiranja različitim ELISA kitovima potvrđen jedan uzorak razlike, prilikom testiranja micelije dobijene nakon zasijavanja nekrotičnih listova mamac biljaka.

6.3.3.3. Specifičnost i senzitivnost AGDIA kita

ROC kriva je grafički prikaz specifičnosti i senzitivnosti AGDIA kita za svaki mogući granični rezultat na testu u koordinatnom sistemu gdje su na apscisi (x) vrijednosti specifičnosti oduzete od 1 (1 - specifičnost), a na ordinati (y) prikazane vrijednosti senzitivnosti (proporcija tačnih pozitivnih), čime se dobija proporcija lažno pozitivnih rezultata. Iz tabele 21. na osnovu svih vrijednosti specifičnosti i senzitivnosti može se odrediti optimalan granični rezultat za testiranje AGDIA kitom.

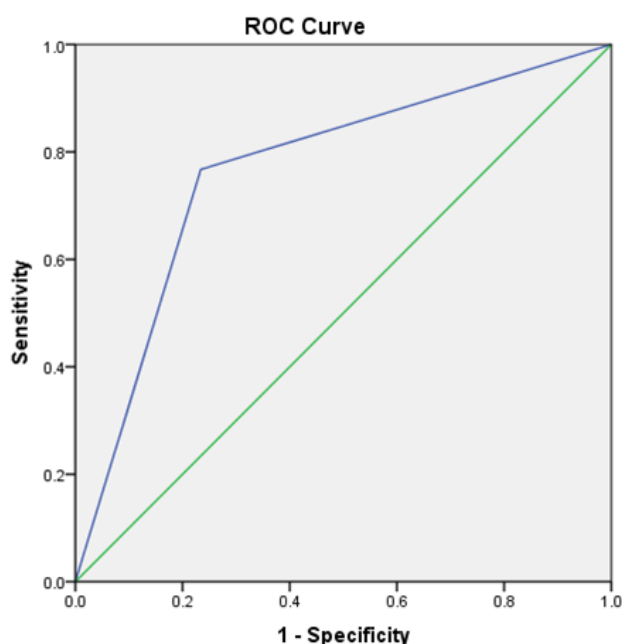
Tabela 21. Vrijednosti varijabli ROC analize za AGDIA kit

Površina iznad krive				
Površina	Standardna greška ^a	Signifikantnost ^b	95% interval pouzdanosti	
			Donja granica	Gornja granica
0.767	0.052	0.000	0.665	0.868

The test result variable(s): AGDIA has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption b. Null hypothesis: true area = 0.5

Koristeći ROC analizu za AGDIA kit, rezultati testiranja specifičnosti i senzitivnosti, dijagonala slučajnog ishoda (engl. *chance diagonal*) prikazana je zelenom linijom na grafikonu 11. ROC analiza je pokazala da su vrijednosti površine ispod krive na nivou značajnosti $P=0,05$ u vrijednosti 0,0767 uz standardnu grešku 0,052 i prikazuje da je vrijednost površine umjereno značajna i test nije dovoljno senzitivan (osjetljiv).



Grafikon 9. ROC analiza rezultata testiranja specifičnosti i senzitivnosti AGDIA kit

6.3.3.4. Specifičnost i senzitivnost ADGEN kita

ROC kriva je grafički prikaz specifičnosti i senzitivnosti ADGEN kita za svaki mogući granični rezultat na testu u koordinatnom sistemu gdje su na apscisi (x) vrijednosti specifičnosti oduzete od 1 (1 - specifičnost), a na ordinati (y) prikazane vrijednosti senzitivnosti (proporcija tačnih pozitivnih), čime se dobija proporcija lažno pozitivnih rezultata. Iz tabele 22. na osnovu svih vrijednosti specifičnosti i senzitivnosti može se odrediti optimalan granični rezultat za testiranje ADGEN kitom.

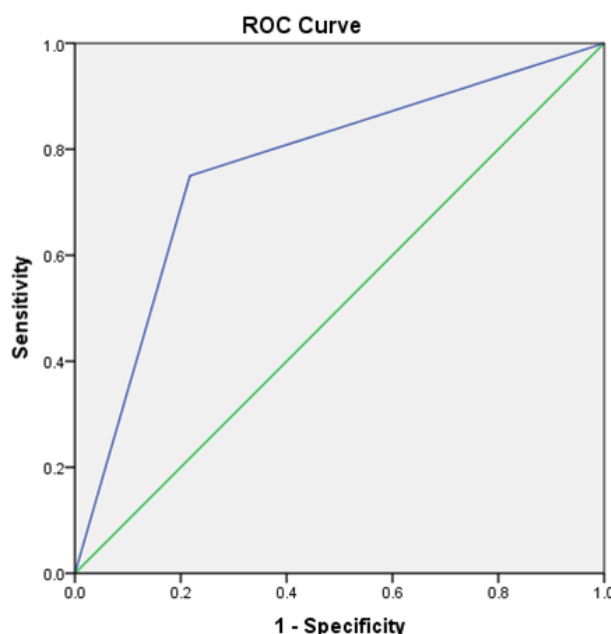
Tabela 22. Vrijednosti varijabli ROC analize za ADGEN kit

Površina iznad krive				
Površina	Standardna greška ^a	Signifikantnost ^b	95% interval pouzdanosti	
			Donja granica	Gornja granica
0.766	0.052	0.000	0.665	0.868

The test result variable(s): ADGEN has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption b. Null hypothesis: true area = 0.5

Koristeći ROC analizu za ADGEN kit, rezultati testiranja specifičnosti i senzitivnosti, dijagonala slučajnog ishoda (engl. *chance diagonal*) prikazana je zelenom linijom na grafikonu 12. ROC analiza je pokazala da su vrijednosti površine ispod krive na nivou značajnosti $P=0,05$ u vrijednosti 0,0766 uz standardnu grešku 0,052 i prikazuje da je vrijednost površine umjereno značajna i test nije dovoljno senzitivnan (osjetljiv).



Grafikon 10. ROC analiza rezultata testiranja specifičnosti i senzitivnosti ADGEN kit

6.4. Molekularne metode

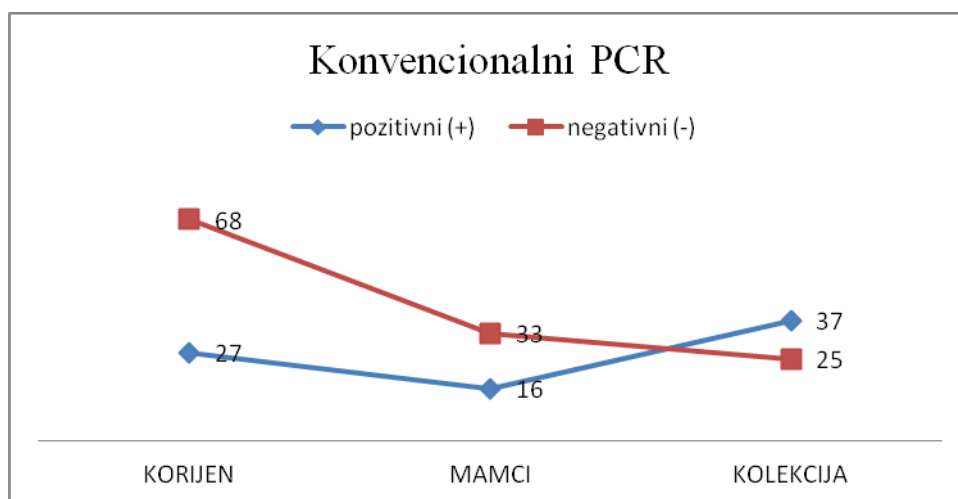
Molekularne analize koje su korišćene za analizu prisustva *Phytophthora* spp. u uzorcima maline su: konvencionalni PCR, nested PCR i PCR bez PureTaq Ready-To-Go tubica.

6.4.1. Konvencionalni PCR

Konvencionalni PCR je specifičan za *Phytophthora* spp. rađen je sa univerzalnim prajmerima (ITS6, ITS7, ITS8). Univerzalni *Phytophthora* prajmeri daju produkt od 820bp i specifični su samo za rod *Phytophthora*. Konvencionalnim PCR testirano je ukupno 206 uzoraka koji su predstavljali analizu prisustva patogena nakon ekstrakcije DNK direktno iz korijena maline, analizu prisustva patogena u zemlji sa izolacijom preko mamac biljaka na hranljivu CPA podlogu i izolati iz kolekcije. Od toga, analizom je obuhvaćeno 95 uzoraka korijena maline, 49 izolata micelije iz mamac biljaka i 62 izolata iz kolekcije (Tabela 23).

Tabela 23. Konvencionalni PCR sa univerzalnim prajmerima (ITS6, ITS7, ITS8)

KONVENCIONALNI PCR	pozitivni (+)	negativni (-)	UKUPNO
KORIJEN	27	68	95
MAMCI	16	33	49
KOLEKCIJA	37	25	62
UKUPNO	80	126	206



Grafikon 11. Rezultati analize konvencionalnim PCR sa univerzalnim prajmerima

Od ukupnog broja analiziranih uzoraka korijena maline konvencionalnim PCR, dobijeno je 27 pozitivnih i 68 negativnih uzoraka.

Izolacijom patogena iz zemljišta preko mamac biljaka i zasijavanjem na hranljivu podlogu, te analizom konvencionalnim PCR obuhvaćeno je 49 izolata, od čega je bilo 16 pozitivnih, a 33 negativna izolata.

Od ukupnog broja izolata sačuvanih u kolekciji, 62 izolata su analizirani, od čega je 37 bilo pozitivno, a 25 bilo negativno na prisustvo *Phytophthora* spp. (Grafikon 13).

Najveći broj pozitivnih u odnosu na broj negativnih izolata je dobijen konvencionalnim PCR iz kolekcije. Ovakvi rezultati su bili očekivani jer su u kolekciji čuvani izolati koji su izolovani na selektivnoj podlozi, pregledani mikroskopski i po morfološkim osobinama najviše su odgovarali vrstama roda *Phytophthora*, a neki od njih su potvrđeni i serološkim metodama.



Slika 26. Konvencionalni PCR produkti dobijeni sa modifikovanim „univerzalnim” ITS prajmerima ITS6, ITS7 i ITS8 na 1% agaroznom gelu, M-100 bp marker

6.4.2. Nested PCR

Nested PCR je korišćen da bi se povećala specifičnost detekcije. Za prvi krug nested PCR korišćeni su prajmeri (ITS4 i DC6) koji daju produkt dužine 1310 bp i značajni su za amplifikaciju dijela ITS sekvence bilo koje *Phytophthora* vrste, uključujući sve *Omycetes*. Za drugi krug korišćeni su prajmeri (DC1 i DC5) koji daju produkt dužine 533 bp i značajni su za amplifikaciju produkta specifičnog samo za *Phytophthora fragariae* na malini.

Nested PCR je testirano ukupno 386 uzoraka, od toga je analizom obuhvaćeno: 265 izolata direktno iz korijena maline, 59 izolata micelije iz mamac biljaka (provjera prisustva patogena u zemlji sa izolacijom preko mamac biljaka) i 62 izolata iz kolekcije (micelija iz kolekcije) (Tabela 24).

Tabela 24. Nested PCR korijena maline i micelije iz mamac biljaka i iz kolekcije

Nested PCR	pozitivni (+)	negativni (-)	UKUPNO
KORIJEN	36	229	265
MAMCI	18	41	59
KOLEKCIJA	20	42	62
UKUPNO	74	312	386

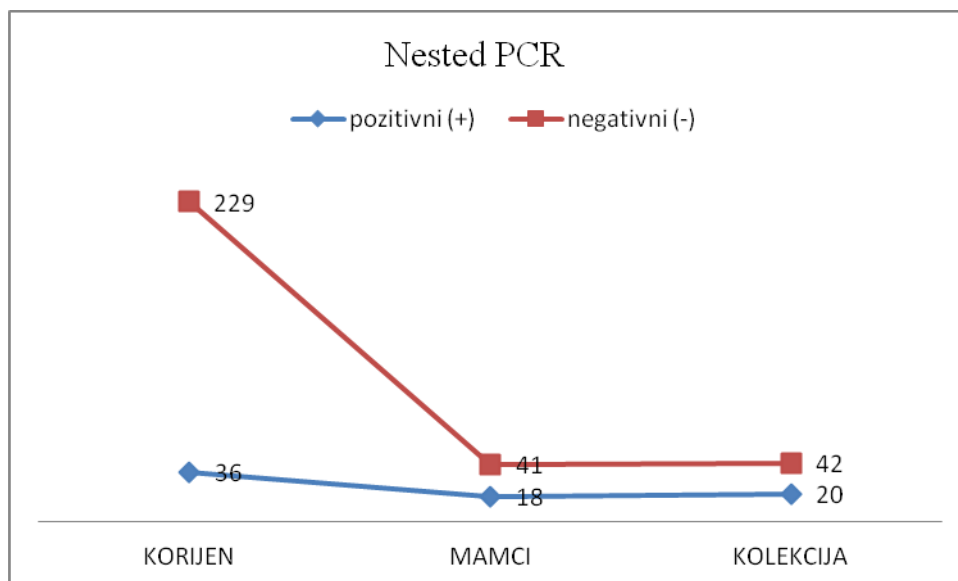
Od ukupnog broja analiziranih uzoraka korijena maline nested PCR, dobijeno je 36 pozitivnih i 229 negativnih rezultata.

Izolacijom patogena iz zemljišta preko mamac biljaka i zasijavanjem na hranljivu CPA podlogu, te analizom nested PCR obuhvaćeno je 59 izolata, od čega je bilo 18 pozitivnih, a 41 negativan izolat.

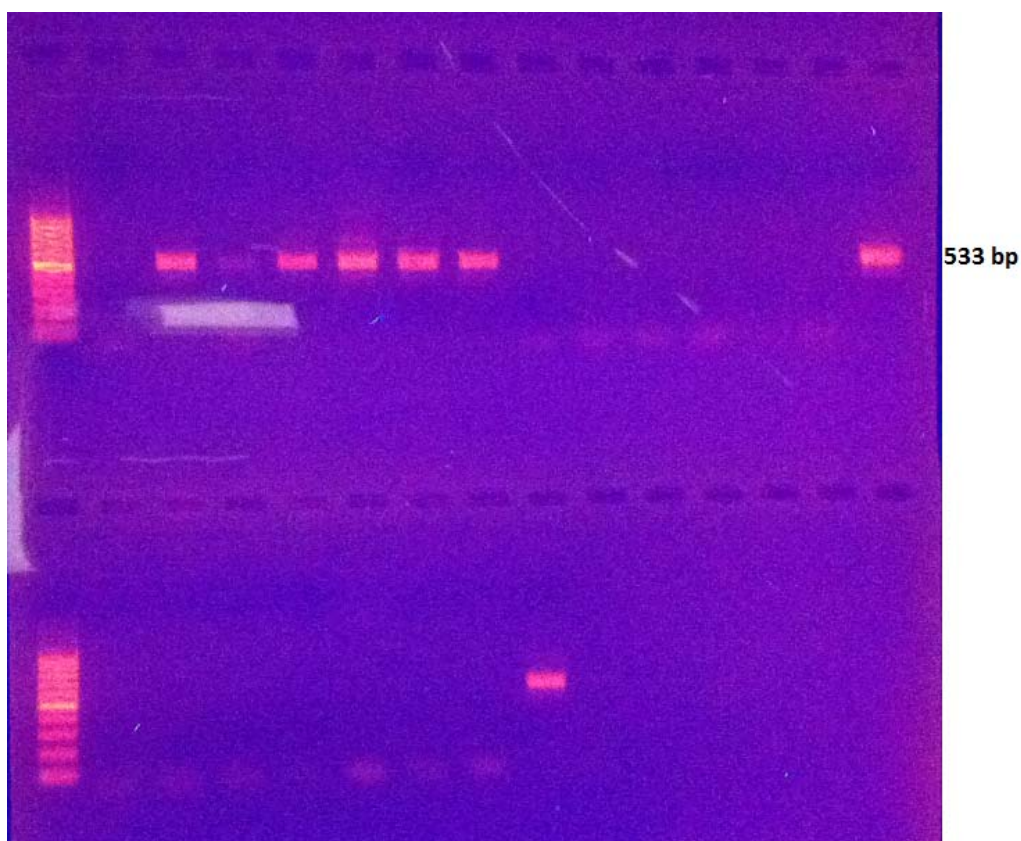
Nested PCR su analizirani izolati koji su čuvani u kolekciji, od čega je 20 pozitivnih, a 42 negativna izolata na prisustvo *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (Grafikon 14).

U rasadnicima je ukupno analizirano 73 uzorka maline iz matičnjaka na otvorenom polju i u zatvorenoj proizvodnji, kao i kontejnerskih sadnica. Na prisustvo *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, ukupno 5 uzoraka je potvrđeno pozitivno na prisustvo patogena, i svih 5 vode porijeklo iz istog rasadnika u Gradišci.

U okviru redovne, godišnje kontrole sadnog materijala sprovedenog od strane Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Banjaluci utvrđena su 4 pozitivna uzorka u periodu 2010-2015. godine u rasadniku Gradiška, a jedan pozitivan uzorak vodi porijeklo iz istog rasadnika, a uzorkovan je od strane inspektora (Inspektorat Republike Srpske) tokom realizacije Programa posebnog nadzora nad prisustvom *Phytophthora fragariae* var. *rubi* na području Republike Srpske u 2016. godini.



Grafikon 12. Rezultati analize nested PCR sa specifičnim prajmerima

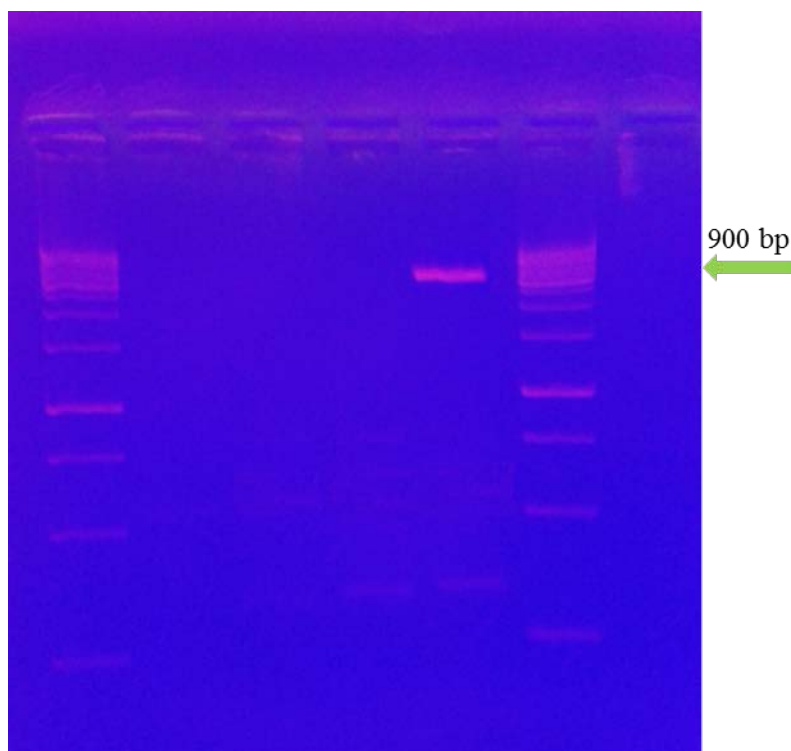


Slika 27. Nested PCR produkti dobijeni sa 2 seta prajmera (za prvi krug ITS4/DC6; za drugi krug DC1/DC5) na 1% agaroznom gelu. Prvi red: 100 bp marker, izolati: 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, pufer, voda, + kontrola; Drugi red: 100 bp marker, izolati: 79, 80, 81, 82, pufer, voda, voda, + kontrola.

6.4.3. PCR bez PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica

Ovaj PCR je korišćen za identifikaciju *Phytophthora* spp. iz inficiranog korijenja maline. To je efikasna metoda za rad bez upotrebe PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica, sa većom ekonomskom opravdanošću, manjim laboratorijskim radom, a sa kojom se dobija više podataka za sekvenciranje.

Ovom metodom su potvrđeni izolati: 21, 22, 31, 34, 48, 53, 55 i 57 prije slanja na sekvenciranje.



Slika 28. PCR produkti dobijeni sa 2 seta prajmera (za prvi krug ITS4/DC6; za drugi krug ITS6/ITS4) na 2% agaroznom gelu, 100 bp marker.

6.5. Sekvenciranje, BLAST i pohranjivanje podataka u banku gena

U 2013. godini, PCR produkti tri izolata: 31a, 31b i 48a su poslani na sekvenciranje u Macrogen Europe, Amsterdam (Nizozemska). Pristupni brojevi (accession number) nukleotidnih sekvenci su dodijeljeni 23. septembra 2013. godine (Tabela 25).

Tabela 25. Pristupni brojevi (accession number) izolata iz Bratunca i Šipova

Izolat		Godina uzorkovanja	Lokacija	Dodijeljeni pristupni brojevi (accession number)	Identifikacija vrste
1.	31a	2010.	Bratunac	KF130875	<i>Phytophthora rubi</i>
2.	48a	2010.	Šipovo	KF130876	<i>Phytophthora rubi</i>
3.	31b	2010.	Bratunac	KF130877	<i>Phytophthora rubi</i>

Izolati 31a i 31b predstavljaju uzorak korijena maline uzorkovane u 2010. godini na lokalitetu Bratunac i poslani su na sekvenciranje, s tim da je za:

- 1) 31a – amplifikacija PCR produkta vršena primjenom DC1/DC5 prajmera
- 2) 31b – amplifikacija PCR produkta vršena primjenom ITS6/ITS4 prajmera

Nakon sekvenciranja i pohranjivanja sekvenci u banku gena (The GenBank Bethesda, Maryland USA), dodijeljeni su pristupni brojevi KF130875 (31a) i KF130877 (31b).

Izolat 48a predstavlja uzorak korijena maline uzorkovane u 2010. godini na lokalitetu Šipova, za amplifikaciju PCR produkta korišćeni su DC1/DC5 par prajmera. Nakon sekvenciranja i pohranjivanja sekvenci u banku gena (The GenBank Bethesda, Maryland USA), dodijeljen je pristupni broj KF130876.

Svi sekvencirani izolati su identifikovani kao vrsta *Phytophthora rubi*.

U 2017. godini, PCR produkti dvanaest izolata: 34, 69, 71, 72, 73, 4, 21, 22, 53, 55, 57 i 11, gdje su se za amplifikaciju PCR produkata koristili DC1/DC5 par prajmera i poslani su na sekvenciranje u Macrogen Europe, Amsterdam (Nizozemska). Pristupni brojevi nukleotidnih sekvenci su dodijeljeni 21. novembra 2017. godine (Tabela 26).

Nakon sekvenciranja i obrade dobijenih sekvenci, upoređene su sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka i obrađeni u Blastn programu (Nukleotidni nukleotid BLAST) i Blastx programu (Nukleotidni 6-okvirni prevodni protein) (Tabela 27).

Tabela 26. Sličnost izolata sa raspoloživim sekvencama u NCBI banci gena i njihovo geografsko porijeklo, obrađeno u Blastn programu

Izolat		Lokacija	Godina uzorkovanja	Dodijeljeni pristupni brojevi (accession number)	Poređenje sekvenci u Blastn programu		
					% identičnosti	Vrsta	Geografsko porijeklo
1.	21	Bratunac	2010.	KY784993	99%	<i>P. rubi</i>	Njemačka KJ755094
2.	22	Bratunac	2010.	KY784994	98-99%		
3.	55	B. Luka	2010.	KY784992	99-100%		
4.	69	Šipovo	2012.	KY785001	99%		
5.	71	Ribnik	2012.	KY784998	99%		
6.	72	Ribnik	2012.	KY784999	96-99%		
7.	73	Ribnik	2012.	KY785000	99%		
8.	4	B. Luka	2014.	KY784991	99%		
9.	11	Srebrenica	2016.	KY785002	99%		
10.	34	Bratunac	2010.	KY784995	99%	<i>P. rubi</i>	Njemačka KJ755094
11.	53	Gradiška	2010.	KY784996		<i>P. fragariae</i>	USA FJ172257
12.	57	Gradiška	2010.	KY784997			

Program Blastn poredi sekvencu tražene DNK sa najsličnijim sekvencama DNK iz baze podataka koja se specificira (Tabela 10). U tabeli 26 prikazani su rezultati sekvenciranih izolata obrađenih u Blastn programu, a koji su podijeljeni u 2 grupe:

1. ukupno 9 izolata imaju procentualnu sličnost od 96-100% sa *Phytophthora rubi* koja vodi porijeklo iz Njemačke;
2. ukupno 3 izolata imaju sličnost sa *Phytophthora rubi* koja vodi porijeklo iz Njemačke i *P. fragariae* sa porijeklom iz USA. Ove dvije vrste su morfološki i fiziološki slične, a razlikuju se u biljkama domaćinima (Tabina *et al.*, 2017). Procentualna sličnost izolata je 99% sa specifičnim sekvencama iz Banke gena.

Program Blastx (Nukleotid 6-okvirni prevodni protein, Nucleotide 6-frame translation-protein) poredi šest okvira konceptualnom translacijom nukleotida tražene sekvence sa proteinom iz baze podataka (Tabela 11).

Tabela 27. Grupisanje izolata prema % sličnost sa raspoloživim sekvencama u NCBI banci gena i geografsko porijeklo, obrađeno u Blastx programu

Izolat		Lokacija	Godina uzorkovanja	Dodijeljeni pristupni brojevi (Accession number)	Poređenje sekvenci u Blastx programu		
					% identičnosti	Protein organizma	Geograf. porijeklo i Acc.No.
1.	53	Gradiška	2010.	KY784996	100	<i>Phytophthora sojae</i>	SAD XP009534206
	55	Gradiška		KY784996	- 69	- <i>Rhodotorula graminis</i>	SAD KPV71441
2.	69	Šipovo	2012.	KY785001	97 - 69	<i>Phytophthora sojae</i> - <i>Rhodotorula graminis</i>	SAD XP009534206
	71	Ribnik		KY784998			
	72	Ribnik		KY784999			SAD KPV71441
	21	Bratunac	2010.	KY784993			
	22	Bratunac		KY784994			
3.	57	Gradiška	2010.	KY784997	93 - 69	<i>Phytophthora sojae</i> - <i>Rhodotorula graminis</i>	SAD XP009534206 SAD KPV71441
	4	B. Luka	2014.	KY784991			
4.	73	Ribnik	2012.	KY785000	90 - 69	<i>Phytophthora sojae</i> - <i>Rhodotorula graminis</i>	SAD XP009534206 SAD KPV71441
	34	Bratunac	2010.	KY784995			
5.	11	Srebrenica	2016.	KY785002	80 - 76	<i>Phytophthora sojae</i> - <i>Rhodotorula graminis</i>	SAD XP009534206 SAD KPV71441

U tabeli 27 prikazani su rezultati sekvenciranih izolata obrađenih u Blastx programu, a koji su podijeljeni u 5 grupa na osnovu procentualne sličnosti sa proteinima (*Phytophthora sojae* i *Rhodotorula graminis*) koje vode porijeklo iz SAD:

1. sličnost od 100-69% za izolate: 53 i 55 koji su iz Gradiške
2. sličnost od 97-69% za izolate: 69, 71, 72, 21 i 22 koji su iz Šipova, Ribnika i Bratunca
3. sličnost od 93-69% za izolate: 57 i 4 koji su iz Gradiške i Banjaluke
4. sličnost od 90-69% za izolate: 73 i 34 koji su iz Ribnika i Bratunca
5. sličnost od 80-76% za izolat 11 koji je iz Srebrenice.

6.6. Provjera patogenosti

Test biljke za provjeru patogenosti korišćene su kontejnerske sadnice crvene maline (*Rubus idaeus* L.) sorte Willamette uzgojene iz korijenovih reznica u komercijalnom rasadniku. Izabrano je 10 izolata iz 2010. godine za sprovođenje testa patogenosti i potvrde Kochovih postulata. Vještačka inokulacija test biljaka je sprovedena i praćena u kontrolisanim uslovima staklenika.

Za svaki pojedinačni izolat, inokulisano je pet biljaka sa suspenzijom micelije uzgojene na hranljivoj CPA podlozi, koja je nanošena u blizini korijenovog sistema test biljke. Test patogenosti je sproveden u trajanju 2 sedmice u uslovima: redovnog zalijevanja, 12-satni dnevni režim i temp. 15-23°C. Na kraju eksperimenta je vršen pregled nadzemnog dijela test biljaka i korijenovog sistema.

Kod nadzemnih dijelova svih test biljaka utvrđeni su simptomi različitog intenziteta: hloroza i nekroza listova, sušenje nadzemnog dijela, hloroza stabljike u prizemnom dijelu i potpuno sušenje stabljike. Ovi simptomi se dovode u vezu i uočavani su tokom pregleda zaraženih komercijalnih zasada.

Kod podzemnih dijelova test biljaka, nakon pranja i uklanjanja zemlje, utvrđen je simptom hloroze pojedinačnih korjenčića, a koji su uočavani u laboratoriji tokom pregleda simptoma maline iz komercijalnih zasada. Ostali simptomi, kao smanjenje ukupne korijenove mase, je bilo teško utvrditi zbog dužine trajanja eksperimenta (2 sedmice), jer se navedeni simptom razvija u toku dužeg perioda.

Kod test biljaka koje su služile za kontrolu, nije izvršena inokulacija, nisu uočeni simptomi na nadzemnom dijelu biljke niti nekroza korjenčića.

Molekularnom metodom je potvrđeno prisustvo *Phytophthora rubi* kod 3 izolata (31, 21 i 22) pri vještačkoj inokulaciji test biljaka. Kod navedenih izolata, molekularnom metodom (nested PCR) su potvrđeni pozitivni rezultati prisustva bolesti, u odnosu na kontrolne test biljke, koji su imali negativne rezultate. Dobijeni rezultati testa patogenosti predstavljaju potvrdu Kochovih postulata.

Tabela 28. Rezultati analiza odabranih izolata sekvenciranim u 2013. godini

Izolat		Lokacija	CPA	MAMCI	ELISA						PCR						Dodijeljeni pristupni brojevi (Accession number)	Potvrda identičnosti sa sekvencama iz Banke gena	Provjera patogenosti na test biljkama
					micelija iz korijena		micelija iz mamaca		direktno iz korijena		micelija iz kolekcije/korijena		micelija iz mamaca		direktno iz korijena				
					AGDIA	ADGEN	AGDIA	ADGEN	AGDIA	ADGEN	Konve-ncional	Nested	Konve-ncional	Nested	Konve-ncional	Nested			
1.	31a	Bratunac	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KF130875	<i>Phytophthora rubi</i>	S+, +
2.	48a	Šipovo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	KF130876	<i>Phytophthora rubi</i>	NT
3.	31b	Bratunac	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KF130877	<i>Phytophthora rubi</i>	S+, +

+ pozitivan rezultat, - negativan rezultat, NT –nije testirano, S+ simptomi prisutni

Tabela 29. Rezultati svih sprovedenih analiza odabranih izolata sekvenciranim u 2017. godini

Izolat		Lokacija	CPA	MAMCI	ELISA						PCR						Dodijeljeni brojevi (Acc. No)	Poređenje identičnosti sa sekvencama iz Banke gena		Provjera patogenosti na test biljkama	
					micelija iz korijena		micelija iz mamaca		direktno iz korijena		micelija iz kolekcije/korijena		micelija iz mamaca		direktno iz korijena			% identičnosti	Geografsko porijeklo vrsta i Acc.No.		
					AGDIA	ADGEN	AGDIA	ADGEN	AGDIA	ADGEN	Konve-ncional	Nested	Konve-ncional	Nested	Konve-ncional	Nested					
1.	21	Bratunac	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	KY784993	99%	Njemačka <i>P. rubi</i> KJ755094	S+,+
2.	22	Bratunac	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	KY784994	98-99%		S+,+
3.	55	B.Luka	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KY784992	99-100%		S+
4.	69	Šipovo	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	NT	NT	NT	+	KY785001	99%		NT
5.	71	Ribnik	+	+/-	NT	+	NT	NT	+	+	+	+	NT	NT	NT	+	KY784998	99%	NT		
6.	72	Ribnik	+	+/-	NT	+	NT	NT	+	+/-	+	+	NT	NT	NT	+	KY784999	96-99%	NT		
7.	73	Ribnik	+	+/-	NT	-	NT	NT	+	+	+	+	NT	NT	NT	+	KY785000	99%	NT		
8.	4	B.Luka	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	KY784991	99%		NT
9.	11	Srebrenica	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	KY785002	99%		NT
10.	34	Bratunac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KY784995	99%	Njemačka <i>P. rubi</i> KJ755094	S+	
																			USA <i>P.fagariae</i> KJ172257		
11.	53	Gradiška	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	KY784996	99%	Njemačka <i>P. rubi</i> KJ755094	S+	
																			USA <i>P.fragariae</i> FJ172257		
12.	57	Gradiška	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	KY784997	99%	Njemačka <i>P. rubi</i> KJ755094	S+	
																			USA <i>P.fragariae</i> FJ172257		

NT –nije testirano, + pozitivan rezultat, - negativan rezultat, +/- sumnjiv rezultat, S+ simptomi prisutni

7. DISKUSIJA

Najveći svjetski proizvođač maline je Rusija, dok je u Evropi najveći proizvođač Poljska. Poljska ovako visoku poziciju postiže zahvaljujući najvećim površinama pod proizvodnim zasadima maline, dok je prema ostvarenom prinosu ploda maline po jedinici površine (4,4 t/ha) ispod prosječne vrijednosti, pa se na svjetskoj ljestvici nalazi tek na 24. mjestu (FAOSTAT, 2016).

Ukoliko se posmatraju podaci ostvarenog prinosa po jedinici površine, najveći proizvođač je Meksiko (18 t/ha), zatim SAD (15,7 t/ha) i Belgija (15 t/ha). Bosna i Hercegovina (BiH) je na 11. mjestu sa prosjekom od 8,4 t/ha, nalazi se ispred i Rusije i Poljske. U BiH je evidentan stalani porast ukupne proizvodnje. Od zemalja u okruženju, Srbija ima najdužu tradiciju gajenja maline. Iako se navodi da se u uslovima Srbije granična rentabilnost proizvodnje maline postiže visinom prinosa ploda od oko 10 t/ha (Petrović i Milošević, 1996), prema statističkim podacima visina prinosa iznosi oko 5,6 t/ha i time zauzima 17. mjesto svjetskog ostvarenog prinosa (FAOSTAT, 2016). Ovakvim sagledavanjem malinarske proizvodnje, BiH bi sa povećanjem proizvodnih malinjaka u narednih nekoliko godina mogla postati konkurentna na Evropskom, ali i na svjetskom tržištu. Ipak, za kontinuirano stabilan prinos, neophodan je odgovarajući sortiment i kvalitetan sadni materijal, a ograničavajući faktor uspješne proizvodnje maline predstavlja prisustvo *Phytophthora* spp. jer veliki gubici nastaju usljed truljenja korijenovog sistema i propadanja čitavih zasada, takvi zasadi se ne mogu obnavljati, jer se patogen duži niz godina zadržava u zemljištu.

Više vrsta roda *Phytophthora* su potvrđeni kao patogeni maline u različitim zemljama: *P. citricola* (Waterston, 1937), *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. erythroseptica*, *P. fragariae* var. *rubi*, *P. megasperma*, *P. syringae* (Brien and Dingley, 1959; Converse and Schwartze, 1965, 1968; Duncan *et al.*, 1987, 1990; Nourisseau and Baudry, 1987; Seemüller *et al.*, 1986; Washington, 1988; Wilcox and Duncan, 1993; Wilcox, 1989), *P. ramorum* (Werres and Kaminski, 2005), *P. fragariae* var. *fragariae* (Wilcox, 1989) i *P. idaei* (Kennedy and Duncan, 1995). U većini zemalja, od svih 13 navedenih vrsta, *Phytophthora rubi* je najznačajni prouzrokovatelj bolesti korijena maline (Harrison *et al.*, 1998, Stewart *et al.*, 2014). Ovaj rad predstavljao je prvo istraživanje i ujedno prvi nalaz prisustva *Phytophthora rubi* u Republici Srpskoj i Bosni i Hercegovini.

Glavni izvor zaraze su zaražene sadnice (Bonants *et al.*, 1997; Heiberg, 1995; Duncan *et al.*, 1987), pa je ova bolest uvršćena u sertifikacionu šemu da bi se osigurala proizvodnja sadnica maline odgovarajućeg fitosanitarnog kvaliteta (Schlenzig *et al.*, 2005). U Škotskoj za potrebe sertifikacione šeme, inspekcija se vrši na godišnjem nivou, da bi se potvrdila ispunjenost zahtjeva sertifikacije i odsustvo svih glavnih bolesti maline. Svi uzorci se dostavljaju tako da porijeklo i sertifikaciona kategorija sadnog materijala ostane nepoznata laboratoriji koja sprovodi testiranje. Prema toj sertifikacionoj šemi za *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, uzorci korijena maline se uzimaju sistematično na svakih 9 m iz svakog četvrtog reda, što iznosi oko 300 uzoraka po hektaru (Schlenzig *et al.*, 2005).

U Republici Srpskoj nije uspostavljena sertifikaciona šema za proizvodnju sadnica maline ali se sprovode redovne, godišnje kontrole rasadničke proizvodnje kada se uzimaju uzorci za laboratorijsku analizu. Uzorci su cijele biljke, uzimaju se tako da se zaštiti podatak porijekla sadnica (vrši se dodjela inspektorskih i/ili laboratorijskih šifri). Takođe u Srbiji ne postoji razrađena šema uzorkovanja, niti definisan broj uzoraka po jedinici površine (Koprivica *et al.*, 2009). Kako broj uzoraka po jedinici površine nije standardizovan, praktikovano je da se uzima što više uzoraka, svaki uzorak treba da se sastoji od većeg broja pojedinačnih biljaka, a značajno je da budu obuhvaćene sve prisutne sorte maline u rasadniku.

Prema EPPO (The European and Mediterranean Plant Protection Organization) i pravilima Evropske unije (EU) za izdavanje biljnog pasoša, ova pseudogljiva ima status karantinskog organizma i ne toleriše se infekcija u propagativnom materijalu (Bonants *et al.*, 1997). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potrebu uvršćavanja *P. fragariae* var. *rubi* na karantinsku listu na nivou RS i BiH, uz obaveznu kontrolu prisustva patogena prilikom uvoza sadnog materijala na graničnim prelazima, kao i u rasadnicima tokom proizvodnje unutar zemlje.

Pojava simptoma je moguća od početka do kraja vegetacije, ali proljeće je najbolji period godine za vizuelni pregled i uzorkovanje za laboratorijsku analizu jer se tokom ljeta pseudogljiva inaktivira (u obliku oospora) zbog visokih temperatura (Bonants *et al.*, 1997). Ako nastupi vrijeme kišnog ljeta, pseudogljiva se ponovo aktivira i može inficirati korijenje ali tada uzorkovanje mora biti pažljivo sprovedeno zato što naknadna infekcija ne može biti detektovana čak ni PCR metodom (Koprivica *et al.*, 2009). Tokom pregleda rasadničke proizvodnje maline na teritoriji RS nije evidentirano postojanje vidljivih

simptoma koji bi ukazivali na prisustvo patogena, a moguće je detektovati pojavu bolesti samo ukoliko se uradi laboratorijska analiza. U prilog ovoj tvrdnji je podatak da je 5 uzoraka iz istog rasadnika (Gradiška) bilo pozitivno na prisustvo bolesti, što je potvrđeno molekularnim metodama (nested PCR), dok je na osnovu simptoma bolest godinama ostajala nezapažena.

Izolacija kao klasični put dijagnoze patogena je jednostavna, jeftina metoda i ne zahtijeva skupu opremu. Ipak, u literaturi se navode brojni nedostaci ove metode: izolacija *Phytophthora* iz uzoraka korijena zahtijeva intenzivan rad, a dodatno je zahtijevna zbog usporenog rasta i zajedničkog naseljavanja drugih gljiva i pseudogljiva (Stewart *et al.*, 2014). Dalje, nedostaci se odnose na neophodnost ekspertskog znanja i stručnosti, kao i dugog trajanja testa (Hayden *et al.*, 2004; Ristaino *et al.*, 1998), potrebni su dani ili nedjelje za identifikaciju prouzrokovala oboljenja. Drugi značajan nedostatak klasičnih metoda je nepouzdanost jer se mnogi mikroorganizmi teško mogu razlikovati na osnovu morfoloških ili drugih pokazatelja koji su često promjenljivi pod uticajem uslova spoljašnje sredine (Ivanović i sar., 2004). U ovoj doktorskoj disertaciji, mikroskopski pregled obojenih preparata zaraženog korijena maline je prošao bez uspjeha, pa je ova metoda napuštena.

U literaturi se navodi da izolacija *Phytophthora rubi* direktno iz izdanaka maline (strugotine kambijuma izdanka sa povredama, veličine 2-5 mm) se pokazala kao najuspješnija i najmanje je zahtijevna za intenzivan rad. Navodi se da je najviše izolata upravo izolovano pomoću ove metode direktno iz izdanka u poređenju sa izolacijom iz korijena ili iz zemljišta preko mamac biljaka (Stewart *et al.*, 2014). Takođe se navodi da je izolacija direktno iz izdanka jednostavna i čista metoda, koja se može koristiti i za druge zemljišne vrste roda *Phytophthora*, gdje povrede na korijenu vode do korijenovog vrata ili izdanka (Stewart *et al.*, 2014). U ovom radu nije rađena metoda direktne izolacije iz izdanka jer se polazilo od pretpostavke da nadzemni simptomi nemaju dijagnostički karakter, isti ili slični simptomi mogu biti izazvani različitim činiocima. Na terenu nisu zapaženi simptomi povrede nadzemnog izdanka, te je zbog toga rađena izolacija iz korijena i iz zemlje preko mamac biljaka.

Izolacija *Phytophthora* spp. se vrši preko ispranih korjenčića maline (Koprivica *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2005; Wilcox, 1989; Duncan *et al.*, 1987) i iz zemljišta preko mamac biljaka (Koprivica *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2005). Praćenje porasta i izgleda micelije izolovane na različitim hranljivim podlogama (CMA, V8A, FBA i CPA) koje su

predložene u literaturi (Stewart *et al.*, 2014; Koprivica *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2005; Wilcox, 1989; Duncan *et al.*, 1987). Tokom izvođenja laboratorijskog rada ovog doktorata, hranljiva CPA podloga se pokazala kao najjednostavnija tokom pripreme i dala je najveći broj Petrijevih posuda sa micelijom koja je morfološki odgovarala izgledu micelije *Phytophthora* spp. Zbog toga je odlučeno koristiti CPA hranljivu podlogu za daljnji nastavak istraživanja.

U skladu sa navodima Hughes *et al.* (2006), dijagnostika *Phytophthora* bazirana na kombinaciji mikroskopskog pregleda korijenčića maline i izolacije na selektivne podloge su nepouzdati i dugotrajni. Ovo je posebno važno za proizvodnju sadnog materijala u rasadnicima jer se na taj način mogu otkriti različite vrste roda *Phytophthora* (Koprivica *et al.*, 2009). Navodi se da nekoliko raspoloživih morfoloških karakteristika, zbog polimorfnosti vrsta, ne mogu biti osnova za sistem klasifikacije (Cooke and Duncan, 1997). Različiti izolati *Phytophthora* spp. crvene maline se ne mogu jasno morfološki razlikovati, a razlike postoje i u osobinama poput: krajnje temperature rasta, brzina porasta micelije, morfologija kolonije, veličina sporangija (Wilcox, 1989; Duncan *et al.*, 1987). Tokom izrade doktorske teze, jedan od ciljeva je bio razviti savremene, brze i efikasne metode detekcije, tako da pregled micelije pseudogljiva roda *Phytophthora*, praćenje njihovog porasta i drugih morfoloških osobina je vremenski zahtjevno i nepraktično za potrebe rutinske kontrole. Osim morfologije micelije *Phytophthora* spp., drugim osobinama se nije pridavao značaj.

Treba naglasiti da je u literaturi navedeno da hlamidospore nisu zapažene kod *Phytophthora rubi*, dok se formiraju kod nekih *Phytophthora* vrsta (Gallegly and Hong, 2008). Tokom ovih istraživanja, kod određenog broja izolata je utvrđena pojava hlamidospora *Phytophthora rubi*, koje se često nazivaju trajne spore jer mogu održati klijavost duži niz godina. U istim literaturnim navodima, rečeno je da *Phytophthora rubi* formira plerotične oospore, što znači da u potpunosti ispunjavaju oogoniju, što je potvrđeno mikroskopskim pregledom oospora određenog broja dobijenih izolata.

Iako je proučavanje fitopatogenih gljiva klasičnim, standardnim laboratorijskim testovima i dalje u primjeni, uvijek je postojala težnja istraživača za razvojem pouzdanijih, bržih i automatizovanih metoda u cilju potvrde identiteta patogena. Danas se u detekciji gljiva u velikoj mjeri koriste serološke metode koje se zasnivaju na enzimskim reakcijama kao što su DAS-ELISA. Primjena ELISA testa može poslužiti za testiranje velikog broja uzoraka istovremeno (Hayden *et al.*, 2004), a vremenski je manje zahtjevna

u odnosu na klasične metode zasijavanja i odgajanja na hranljivim podlogama. Navodi se da je nakon inokulacije, ELISA metodom moguće detektovati pozitivan materijal 6-8 dana ranije u odnosu na makroskopsku pojavu simptoma (Mohan, 1988). Pozitivna osobina ELISA testa je mogućnost da se dobiju rezultati nakon 2-3 dana, što ubrzava laboratorijski postupak kada se radi o velikom broju uzoraka.

Od seroloških analiza za identifikaciju *Phytophthora* spp. korišćena je DAS-ELISA od 2 proizvođača (AGDIA i ADGEN). Od ukupno 228 serološki analiziranih izolata (137 izolata od micelije iz korijena i 91 izolat od micelije iz mamac biljaka), izdvajanjem 72 izolata gdje se uočavaju male razlike u dobijenim rezultatima, kada se posmatraju zbirno kod testiranja sa oba ELISA kita (Tabela 13). Međutim, dobijeni rezultati se značajno razlikuju ako se porede isti, pojedinačni izolati iz korijena i mamaca, kao i kod testiranja istih izolata različitim ELISA kitom. Kao potvrda ove tvrdnje je izolat 31a i 31b (Tabela 28) gdje je rezultat sa oba ELISA kita iz micelije korijena negativan, a pozitivan sa oba ELISA kita iz micelije od mamac biljke. Ukoliko poredimo rezultate različitih ELISA kitova, analizom izolata 48a mogu se vidjeti (Tabela 28) pozitivni rezultati kod izolata iz korijena i preko mamac biljaka sa oba ELISA kita, dok je negativan rezultat dobijen kod testiranja direktno iz korijena sa AGDIA kitom, a pozitivan ADGEN kitom. Ovaj rezultat je dodatno sumnjiv, a kao potvrda nedovoljne senzitivnosti je i direktno testiranje 32 uzorka direktno iz korijena maline sa oba komercijalna ELISA kita, bez prethodne izolacije patogena na hranljivu podlogu. Zbog velikog broja dobijenih pozitivnih rezultata (AGDIA 29/32 i ADGEN 26/32) (Tabela 15). Pretpostavka je da se radi o lažno pozitivnim rezultatima, tako da se nije nastavilo sa serološkim analizama direktno iz korijena.

U prilog tvrdnji nedovoljne senzitivnosti i specifičnosti, a prema uputstvima proizvođača oba ELISA kita, navedeno je da se pored *Phytophthora* spp. mogu detektovati umjereno unakrsna i slabo unakrsna reakcija za neke druge vrste gljiva iz roda *Pythium* (veoma brojna i polifagna skupina biljnih patogena). Isto kao i *Phytophthora* spp., tako i *Pythium* spp. pripadaju razdjelu Oomycota ili klasi Oomycetes, što znači da su svrstani u pseudogljive (gljivama slične organizme), a do infekcije dolazi preko korijena ili stabla ispod površine zemlje. Pretpostavka je da bi prisustvo i detekcija vrsta roda *Pythium* mogao biti razlog lažno pozitivnih rezultata kod analize prisustva patogena direktno iz korijena. U literaturi se navodi da je detekcija gljiva u biljnom materijalu zahtijevna, naročito ako se radi o maloj količini prisutnog patogena i prije

pojave simptoma, te se zbog toga od korišćene metode zahtjeva i senzitivnost i specifičnost, da bi se izbjegli problemi unakrsne reakcije sa drugim gljivama (Bonants *et al.*, 1997).

Bonants *et al.* (1997) i Olsson (1995) navode da rezultati detekcije ELISA testom na prisustvo *Phytophthora rubi*, nisu pouzdani jer se javlja nedostatak senzitivnosti i specifičnosti, dok Hayden *et al.* (2004) ističe mogućnost unakrsne reakcije sa drugim vrstama. Postoje i drugi literaturni navodi gdje se kaže da serološke metode zasnovane na poliklonalnim antitijelima imaju značajnu senzitivnost (osjetljivost) ali generalno se javlja nedostatak specifičnosti (Hayden *et al.*, 2004; Mohan, 1988). Antitijela djeluju kao strukturalna komponenta na nivou roda (Mohan, 1988) i zajednički antigeni postoje kod različitih vrsta roda *Phytophthora* (Merz *et al.*, 1969; Halsall, 1976), tako da ELISA testom nije moguće identifikovati vrstu, odnosno test nije dovoljno specifičan.

U toku istraživanja rađena je analiza ROC krivom rezultata koji su dobijeni ELISA testom za oba komercijalna kita od izolata iz micelije dobijenih iz korijena i iz zemlje preko mamac biljaka, kada je potvrđena nedovoljna senzitivnost i specifičnost serološke metode za detekciju *Phytophthora* spp., što je u saglasnosti sa literaturnim navodima. U tabeli 29, određenom broju izolata sa oba komercijalna kita (AGDIA i ADGEN) dodijeljen je status sumnjivog rezultata, što dodatno potvrđuje nedovoljnu senzitivnost i specifičnost ELISA testa, čak i kod tumačenja dobijenih rezultata, pa je postojala potreba za uspostavljanje osjetljivih i pouzdanih metoda za rutinsko testiranje.

Navedeno je da za detekciju *Phytophthora rubi* DAS-ELISA ima nedovoljnu senzitivnost i specifičnost, za razliku od molekularnih PCR metoda. Potvrdu ove tvrdnje možemo vidjeti prateći rezultate u tabeli 27 kod izolata 31a i 31b, gdje su rezultati DAS ELISA testa oba kita (AGDIA i ADGEN) bili negativni, dok su konvencionalni PCR i nested PCR iz istih izolata bili pozitivni.

Molekularne metode se primjenjuju za detekciju patogena u biljnom materijalu sa ispoljenim simptomima, ali i u uslovima latentne infekcije (Reeves, 1998), i kod ispitivanja prisustva karantinskih patogena (Ward *et al.*, 2004). Redovnim godišnjim kontrolama sadnog materijala u periodu 2010-2015. godine, sprovedenih od strane Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Banjaluci i od strane inspektora (Inspektorat Republike Srpske) u 2016. godini tokom realizacije Programa posebnog nadzora nad prisustvom *Phytophthora fragariae* var. *rubi* na području Republike Srpske utvrđeno je 5 pozitivnih uzoraka u jednom rasadniku Gradiška. U navedenom periodu, sadnice maline

nisu ispoljavale karakteristične simptome i bolest je prolazila nezapaženo, a uzorci su uzimani nasumično.

PCR je postala uobičajena metoda za identifikaciju i detekciju biljnih patogena i u mnogim slučajevima služi kao zamjena tradicionalnih metoda kao što su mikroskopiranje ili biološki testovi (Schlenzig *et al.*, 2005), a prednost ove metode je kraće vrijeme trajanja analize (Schlenzig *et al.*, 2005; Tomlinson *et al.*, 2005). Dok je za izvođenje klasičnih metoda bilo neophodno 6-10 dana, za serološke metode 2-3 dana, za molekularne metode je bilo neophodno 1-2 dana ako mjerimo od momenta unošenja uzoraka u laboratoriju do dobijanja rezultata. Skraćivanje vremena trajanja analiza značajno je za pravovremeno donošenje odluka kada se radi o uzorcima sa graničnih prelaza ili iz rasadnika.

Više autora navodi da morfološke razlike glavnih vrsta roda *Phytophthora* ne odgovaraju obavezno genetskim razlikama među vrstama (Ristaino *et al.*, 1998; Cooke and Duncan, 1997; Oudemans *et al.*, 1994; Oudemans and Coffey 1991). U prilog ovoj tvrdnji ide činjenica da je u ovom istraživanju prilikom formiranja kolekcije vršeno praćenje morfoloških karakteristika micelije odabranih izolata, a naknadnim molekularnim testiranjem utvrđeno je da neki od njih ne pripadaju rodu *Phytophthora*. U rezultatima je navedeno da od 62 izdvojena izolata iz kolekcije, konvencionalnim PCR je potvrđeno da 37 izolata pripadaju rodu *Phytophthora* (Tabela 23), dok je nested PCR potvrđeno da 20 izolata predstavljaju vrstu *Phytophthora rubi* (Tabela 24).

Za detekciju *Phytophthora* spp. preporučuje se konvencionalni PCR, koristeći „univerzalne“ *Phytophthora* prajmere (ITS6, ITS7, ITS8) (Koprivica *et al.*, 2009; Bonants *et al.*, 1997). Takođe, PCR bez upotrebe PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica je korišćen za identifikaciju *Phytophthora* spp. gdje su korišćena 2 seta prajmera DC6/ITS4 i ITS6/ITS4. Ukoliko je neophodno izvršiti detekciju do nivoa vrste (*Phytophthora rubi*), preporučuje se nested PCR (sa 2 seta prajmera ITS4/DC6 i DC1/DC5) (Koprivica *et al.*, 2009; Bonants *et al.*, 1997).

Posebno interesantan je izolat 31 koji je podijeljen na 2 podizolata: 31a i 31b. Izolat 31b je testiran PCR bez upotrebe PureTaq Ready-To-Go-PCR tubica sa 2 seta prajmera (DC6/ITS4 i ITS6/ITS4), sekvenciranjem se željelo provjeriti prisustvo vrsta iz roda *Phytophthora*. Izolat 31a je testiran nested PCR metodom korišćenjem „univerzalnih“ prajmera (ITS4/DC6 i DC1/DC5) koji je specifičan za *Phytophthora rubi*. Oba sekvencirana izolata su identifikovana kao vrsta *Phytophthora rubi*. Od dodatnih 12

izolata, Blastn programom je potvrđeno 9 izolata koji imaju visoku sličnost (96-100%) sa *Phytophthora rubi* što ide u prilog činjenici da je *P. rubi* najzastupljenija vrsta u kompleksu *Phytophthora* koje su izolovane i identifikovane na malini.

Dodatna ispitivanja, kao nastavak ovog rada, su neophodna kako bi se posvetila pažnja razvoju dijagnostičkih metoda za detekciju i identifikaciju drugih vrsta roda *Phytophthora*, posebno *P. ramorum* čije prisustvo je potvrđeno u ukrasnim biljkama i šumskim vrstama u Srbiji, Hrvatskoj i Sloveniji, pa postoji opravdana prijetnja njihovog unošena na prostor Republike Srpske.

8. ZAKLJUČAK

Za postizanje visokih prinosa, a u cilju konkurentnosti na svjetskom tržištu, neophodan je kvalitetan i zdravstveno ispravan sadni materijal maline. Na osnovu rezultata višegodišnjih istraživanja fitoftoroze maline na području Republike Srpske, može se zaključiti sljedeće:

- Fitoftoroza maline u Republici Srpskoj je utvrđena u proizvodnim zasadima i u jednom rasadniku.
- Na teritoriji Republike Srpske potvrđeno je prisustvo *Phytophthora rubi*, a to je najznačajniji zemljišni prouzrokovatelj bolesti maline u svijetu.
- Pregledom različitih lokaliteta proizvodnih zasada, zabilježena je pojava simptoma koji su se manifestovali u vidu pojedinačnog propadanja biljaka ili potpunog sušenja redova, pa i čitavih zasada, ali koji nemaju dijagnostički karakter.
- Pregledom različitih lokaliteta rasadnika, izostala je pojava simptoma iako je bolest laboratorijski potvrđena tri godine uzastopno u jednom rasadniku.
- Detektovanje fitoftoroze maline na osnovu simptoma nije precizno, te zahtjeva laboratorijsku analizu.
- Od svih metoda korišćenih tokom ovog istraživanja, za detekciju *Phytophthora* spp. najosjetljivije i najpouzdanije su se pokazale molekularne metode.
- Uspostavljen je validan protokol u laboratorijskom kompleksu Poljoprivrednog fakulteta za potrebe sprovođenja programa posebnog nadzora nad ovim štetnim organizmom.
- Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu da se *P. rubi* uvrsti na karantinsku listu na nivou RS i BiH.
- U daljem nastavku rada treba posvetiti pažnju razvoju dijagnostičkih metoda za detekciju i identifikaciju drugih vrsta roda *Phytophthora*, kao i usavršavanju postojećih, omogućavajući identifikaciju genetičke varijabilnosti *P. rubi*.

9. LITERATURA

- Abad, Z. G., Abad, J. A., Coffey, M. D., Oudemans, P. V., Man in 't Veld, W. A., Cunnington, J. and Louws, F. J. (2008): *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the Rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents, *Mycologia*, 100 (1): 99-110.
- Agrios, N. G. (2004): Plant pathology, Fifth edition, Elsevier Academic Press: 952.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- APHIS (2007): https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/phytophthora-ramorum/ct_updates
- Atkinson, D. (1973): Seasonal changes in the length of white unsuberized roots of raspberry plants grown under irrigation, *Journal of Horticultural Science*, 48: 413-419.
- Barr, D. J. S. (1980): An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, Spizellomycetales, *Canadian Journal of Botany*, 58: 2380-2394.
- Barritt, B. H., Crandall, P. C., Bristow P. R. (1979): Breeding for root rot resistance in red raspberry, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104: 92-94.
- Benson, D. R. and Silvester, W. B. (1993): Biology of *Frankia* strains, actinomycetes symbionts of actinorhizal plants, *Microbiology*, 57: 293-319.
- Bolay, A., Ducort, V. (1990): Traitments fongicides contre le phytophthora du framboisier, *Revue Suiss de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 22: 93-97.
- Bolton, A. T. (1978): Effects of amending soilless growing mixtures with soil containing antagonistic organisms on root rot and black leg of geranium (*Pelargonium hortorum*) caused by *Pythium spendens*, *Canadian Journal of Plant Science*, 58: 93-95.
- Bolton, A. T. (1980): Control of *Pythium aphanidermatum* in poinsettia in a soilless culture by *Trichoderma viridae* and a *Streptomyces* sp., *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2: 379-383.
- Bonants, P., Hagenaar-de Weerd, M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., Duncan, J. (1997): Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction, *European Journal of Plant Pathology*, 103: 345-355.
- Booth, C. (1971): *Methods in Microbiology*, Academic Press, Volume 4: 795.
- Brasier, C. M. (2008): The biosecurity threat to the UK and global environment from international plant trade, *Plant Pathology*, 57: 792-808.
- Brasier, C., Kirk, S., Rose, J. (2007a): Differences in phenotypic stability and adaptive variation between the main European and American lineages of *Phytophthora ramorum*. *Forest Research*, Chapter 39. <http://rapra.csl.gov.uk/objectives/wp1/AdaptiveDifferencesCh39.pdf>
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5878-5883.
- Brasier, C. M. (1992): Evolutionary biology of *Phytophthora*: I. Genetic system, sexuality and the generation of variation, *Annual Review of Phytopathology*, 30:153-171.

- Brien, R. M. and Dingley, J. M. (1959): A revised list of plant disease recorded in New Zealand, New Zealand Journal of Agricultural Research, 2: 406-413.
- Bristow, P. R. and Windom, G. E. (1992): The effect of sodium tetrathiocarbonate and fosetyl- Al in controlling phytophthora root rot of red raspberry in the Pacific Northwest, Phytopathology, 82: 1132.
- Bristow, P. R., Windom, G. E., Cameron, J. S. (1989): The impact of *Phytophthora erythroseptica* and winter soil flooding on „Willamette“ red raspberry, Acta Horticulturae, 262: 167-173.
- Broadbent, P., Baker, K. F., Waterworth, Y. (1971): Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils, Australian Journal of Biological Sciences, 24: 925-944.
- Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Đekić, I., Krstić, B. (2009): First report of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* sp. in Serbia, Plant Pathology, 58: 804.
- Bulajić, A. i Krstić, B. (2008): Standardna operativna procedura za fitopatološke dijagnostičke laboratorije za *Phytophthora ramorum*, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za fitomedicinu, Verzija 1.0.: 115.
- Buisman, C. J. (1927): Root rots caused by Phycomycetes. Pp. 51 in: Meded. Phytopathol. Lab. Univ. Utrecht, Willie Commelin Scholten. (Rev. Appl. Mycol. 6: 380).
- Carlile, M. J. (1983): Mortality, taxis, and tropism in *Phytophthora*, In: Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P. H. (eds.), *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*: 95-107.
- Carris, L. M. and Bristow, P. R. (1987): Absorption and translocation of metalaxyl in cabbage, red raspberry, and strawberry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 851-855.
- Causin, R., Scopel, C., Grendene, A., Montecchio L. (2005): An improved method for detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schöter in infected plant tissues using scar markers, Journal of Plant Pathology, 87 (1): 25-35.
- Clayton, C. M. and Haasis, F. A. (1964): Blueberry root-rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in North Carolina, Plant Disease Reporter, 48: 460-461.
- Cohen, S. D. and Venette, R. C. (2005): Predicting the Potential for Establishment of *Phytophthora ramorum* in the Oak Forests of the North Central States, USA. Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our Knowledge, January 18–21, 2005, Monterey, California: 497 – 499.
- Converse, R. H. and Schwartze, C. D. (1968): A root rot of red raspberry caused by *Phytophthora erythroseptica*, Phytopathology, 58: 56-59.
- Converse, R. H. and Schwartze, C. D. (1965): *Phytophthora* sp. from Washington pathogenic on roots of red raspberry, Phytopathology, 55: 503.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes, Fungal Genetics and Biology, 30: 17-32.
- Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA, Mycological Research, 101: 667-677.
- Cother, E. J. and Griffin, D. M. (1974): Chlamidospore germination in *Phytophthora drehsleri*, Transaction of the British Mycological Society, 63: 273-279.
- Cother, E. J. and Griffin, D. M. (1973b): Formation of chlamydospores by *Phytophthora drehsleri*, Transaction of the British Mycological Society, 61: 379-383.

- Crawford, D. L., Lynch, J., M., Whipps, J. M., Ousley, M. A. (1993): Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen, *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3899-3905.
- Davidović Gidas, J., Đurić, G., Mičić, N. (2017): Fruit planting material structure produced in the Republic of Srpska (BiH) in the relation to the requirements of fruit producers, *Zbornik referatov 4. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo*, Krško: 265-272.
- Davidović, J. (2015): Usklađenost regulatornih okvira za rasadničku proizvodnju u Republici Srpskoj i Bosni i Hercegovini sa regulatornim okvirom Evropske Unije, *Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci*: 160.
- Daubeney, H. A. (1987): 'Chilliwick' and 'Comox' red raspberries, *Horticultural Science*, 22: 1343-1345.
- Deacon, J. W. and Donaldson, S. P. (1993): Molecular recognition in the homing responses of zoospores of fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*, *Mycological Research*, 97: 1153-1171.
- de Silva, A., Patterson, K., Rothrock, C. and McNew, R. (1999): *Phytophthora* root rot of blueberry increases with frequency of flooding, *HortScience*, 34 (4): 693-695.
- DeVay, J. E. (1991): Historical review and principles of soil solarization, Pages: 1-15 in *Soil solarization*, J. E. DeVay, J. J. Stapleton and C. L. Elmore, eds. *FAO Plant Protocol Bulletin*.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson T. H. (1980): *Compendium of soil fungi*, Academic Press, London: 860.
- Donaldson, S. P. and Deacon J. W. (1993): Changes in motility of *Pythium* zoospores induced by calcium and calcium-modulating drugs, *Mycological Research*, 97: 877-883.
- Doster, M. A. and Bostock, R. M. (1988a): Incidence distribution and development of pruning wound canker caused by *Phytophthora syringae* in almond orchards in California, *Phytopathology* 78 (4): 468-472.
- Drechsler, C. (1931): A crown rot of hollyhocks caused by *Phytophthora megasperma* n. sp., *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 21:513-526.
- Duncan, J. M., (1990): *Phytophthora* species attacking strawberry and raspberry, *EPPO Bulletin*, 20: 107-115.
- Duncan, J. M. and Kennedy, D. M. (1989): The effect of waterlogging on *phytophthora* root rot of red raspberry, *Plant Pathology*, 38: 161-168.
- Duncan, J. M., Kennedy, D. M. and Seemüller E. (1987): Identities and pathogenicities of *Phytophthora* spp., causing root rot of red raspbbery, *Plant Pathology*, 36 (2): 276-287.
- Duniway, J. M. (1983): Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases, In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S and Tsao PH (eds) *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (pp. 175–187), *American Phytopathological Society*: 392.
- Ellis, M. A. (2008): *Phytophthora* Root Rot of Raspberry, Fact Sheet, Agriculture and Natural Resources, The Ohio State University: 3.
- Ellis, M. A., Converse, R. H., Williams, R. N., Williamson, B. (1991): *Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects*, *American Phytopathological Society Press*, St Paul, Minnesota: 100.
- Ellison, C. E., Stajich, J. E., Jacobson, D. J., Natvig, D. O., Lapidus, A., Foster, B., Aerts, A., Riley, R., Lindquist, E. A., Grigoriev, I. V., Taylor, J. W. (2011): Massive Changes in Genome Architecture Accompany the Transition to Self-Fertility in the Filamentous Fungus *Neurospora tetrasperma*, *Genetics*, 189 (1), 55-69.

- EPPO (2017) <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>
- EPPO (2009): EPPO Reporting Service – Pest & Diseases, No.8: 16. www.eppo.org
- EPPO/CABI (1997): *Phytophthora fragariae*, Quarantine Pests for Europe. 2nd edition. Edited by Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M. CABI, Wallingford, UK: 1425
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*, The American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota: 562.
- FAOSTAT (2016): <http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity>
- Filnow, A. B. and Lockwood, J. L. (1985): Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biocontrol agents of *Phytophthora* root rot of soybean, *Plant Disease*, 69: 1033-1036.
- Firringiceli, A., Otilar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Khan, Z., Redman, R. S., Fleck, N. D., Lindquist, E., Grigoriev, I. V. Doty, S. L. (2015): Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1, *Frontiers Microbiology*, 6: 978.
- Focke, W. O. (1910): *Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus*. *Bibliotheca Botanica*, 17: 1–120.
- Focke, W. O. (1914): *Species Ruborum monographiae generic Rubi prodromus*. *Bibliotheca Botanica*, 17: 1–124.
- Gallegly, M. E. and Hong, C. (2008): *Phytophthora*, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota USA: 1-158.
- Goode, P. M. (1956): Infection of strawberry roots by zoospores of *Phytophthora fragariae*, *Transactions of the British Mycological Society*, 39: 367-377.
- Graberg, M. (1994): Raspberry root rot in Sweden, *Vaxtskyddsnotiser*, 58:116–117.
- Grünwald, N. J., Gross, E. M., Larsen, M. M., Press, C. M., McDonald, V. T., Blomquist, C. L., Thomas, S. L. (2008a): First Report of the European Lineage of *Phytophthora ramorum* on *Viburnum* and *Osmanthus* spp. in a California Nursery, *Plant Disease*, 92: 314.
- Grünwald, N. J., Kitner, M., McDonald, V., Gross, E. M. (2008b): Susceptibility of *Viburnum* to *Phytophthora ramorum*. *Plant Disease*, 92: 210 – 214.
- Halsall, D. M. (1976): Specificity of cytoplasmic and cell-wall antigens from four species of *Phytophthora*, *Journal of General Microbiology*, 94: 19-158.
- Hansen, E., Sutton, W., Parke, J., Linderman, R. (2002): *Phytophthora ramorum* and Oregon forest tree-one pathogen, three diseases, Sudden Oak Death, A Science Symposium (Abstract), Monterey (US):78.
- Harris, D. C. (1991): The *Phytophthora* diseases of apple, *Journal of Horticultural Science*, 66 (5): 513-544.
- Harrison, R. E., McNicol, R. J., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. (1998): Recent developments in *Phytophthora fragariae* var. *rubi* research at the Scottish Crop Research Institute, *Acta Horticulturae*, 505: 327-340.
- Haskell, G. (1961): Genetics and the distribution of the British Rubi, *Genetica*, 32: 118-132.
- Haskell, G. (1954): Correlated responses to polygenic selection in animals and plants, *American Naturalist*, 88: 5-20.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. (1995) In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (eight edition), CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

- Hayden, K. J., Rizzo, D., Tse, J., Garbelotto, M. (2004): Detection and Quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests Using Real – Time Polymerase Chain Reaction Assay, *Phytopathology*, 94: 1075 – 1083.
- Heiberg, N. (1995): Control of root rot of red raspberries caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, *Plant Pathology*, 44: 153-159.
- Heiberg, N., Duncan, J. M., Kennedy, D. M., Semb, L. (1990): Raspberry root rots in Norway, *Proceedings of the 5th International Rubus-Ribes Symposium*, *Acta Horticulturae*, 262: 189-191.
- Hickman, C. J. (1940): The red core root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae* n.sp. *Journal of Pomology and Horticultural Science*, 18: 89-118.
- Hill, A. E.; Grayson, D. E. and Deacon, J. W. (1998): Suppressed germination and early death of *Phytophthora infestans* sporangia caused by pectin, inorganic phosphate, ion chelators and calcium-modulating treatments, *European Journal of Plant Pathology*, 104: 367-376.
- Ho, H. H. and Jong, S. C. (1993): *Phytophthora hibernalis* and *P. syringae*, *Mycotaxon*, 47: 439-460.
- Ho, H. H. and Jong, S. C. (1991): Species concepts of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri*, *Mycotaxon*, 40: 35-40.
- Ho, H. H. (1986): Notes on the Heterothallic behavior of *Phytophthora megasperma* from alfalfa, *Mycologia*, 78: 306-309.
- Hoashi-Erhardt, W. K., Moore, P. P., Windom, G. E. and Bristow, P. R. (2008): Field and greenhouse response of red raspberry genotypes to root rot, *HortScience* 43:1367-1370.
- Hughes, K. J. D., Giltrap, P. M., Barton, V. C., Hobden, E., Tomlinson, J. A., Barber, P. (2006) On – site real – time PCR detection of *Phytophthora ramorum* causing dieback of *Parrotia persica* in the UK, *Plant Pathology*, 55: 813.
- Ilieva, E., Arulappan, F. X., Pieters, R. (1995): *Phytophthora* root and crown rot of raspberry in Bulgaria, *European Journal of Plant Pathology*, 101: 623-626.
- Inman, A. J., Beales, P. A., Lane, C. R., Brasier, C. M. (2002): Comparative pathogenicity of European and American isolates of *Phytophthora ramorum* to leaves of ornamental, hedgerow and woodland under-storey plants in the UK. In: *Sudden Oak Death Science Symposium: the State of Our Knowledge*, 15–18 December, 2002, Monterey, CA, USA
<http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/posters.html>, USDA-Forest Service and University of California, Berkeley, CA.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2004): Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu: 400.
- Ivanović, M., Korivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004): Primena molekularnih metoda u dijagnostici biljnih bolesti, *Pesticidi i fitomedicina*, 19: 223-231.
- Ivić, D., Fazinić, T. (2011): Certifikacijske sheme za proizvodnju sadnog materijala značajnih voćnih vrsta u Hrvatskoj, *Pomologia Croatica*, Vol. 17, br. 1-2: 31-36.
- Jeffers, S. N. and Caruso, F. L. (1995): *Phytophthora* root rot and runner rot, *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*, The American Phytopathological Society: 28-29.
- Johnson, F., Crandall, P. C. and Fisher, J. R. (1973): Soil fumigation and its effect on raspberry root rot, *Plant Disease Report*, 56: 467-470.

- Jones, S. W., Donalson, S. P., Deacon, J. W. (1991): Behaviour of zoospores and zoospore cysts in relation to root infection by *Pythium aphanidermatum*, New Phytologist, 117: 289-301.
- Kaminski, K., Wagner, S., Werres, S. (2007): Susceptibility of Selected Ornamental Plants to *Phytophthora ramorum*, Proceedings of the Sudden Oak Third Science Symposium, Mach 5–9, 2007, Santa Rosa, California.
<http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/>
- Katan, J. (1981): Solar heating (solarization) of the soil for control of soilborne pests, Annual Review of Phytopathology, 19: 211-236.
- Kennedy, D. M. and Duncan, J. M. (1995): A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*, Mycological Research, 99: 57-68.
- Kennedy, D. M. and Duncan, J. M. (1991): Methods for assessing the resistance of raspberry genotypes to *Phytophthora* root rot, Plant pathology, 40: 387-394.
- Klebahn, H. (1909): Die neue Zweig- und Knospenkrankheit (A new twig and bud disease), Krankheiten flieders, Berlin, Page 18-75 (Cited in Tucker, 1931).
- Klebahn, H. (1905): Eine neue Pilzkrankheit der Syringen. (A new fungal disease of syringae), Zbl. Bakt. 15: 335-336 (Cited in Tucker, 1931).
- Klisiewicz, J. M. (1977): Identity and relative pathogenicity of some heterothallic *Phytophthora* species associated with root and stem rot of safflower, Phytopathology, 67: 1174-1177.
- Kloczko, M., Graf, H., Knesel, D. (1990): Untersuchungen zum *Phytophthora* – Himbeersterben und zu den Möglichkeiten seiner Bekämpfung, Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes, 9: 298-307.
- Knauss, J. S. (1976): *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Pythium* and *Phytophthora*, Plant Disease Reporter, 60: 846-850.
- Ko, W. H. (1978): Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction, Journal of General Microbiology, 107:15-18.
- Koprivica, M., Dulić-Marković, I., Jevtić R. and Cooke, D. E.L. (2009): Methods for detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* on raspberry, Pesticidi i fitomedicina, 24(3): 177-184.
- Krzanowski W. J. and Hand D. J. (2009): *ROC curves for continuous data*. Boca Raton, FL: CRC/Chapman and Hall., Journa of Biopharmaceutical Statistics, 20: 485-487.
- Lacourt, I., Bonants, P. J. M., Van Gent-Pelzer, M. P., Cooke, D. E. L., Hagenaar De Weerd, M., Surplus, L. and Duncan, J. M. (1997): The use of nested primers in the Polymerase Chain Reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry, Acta Horticultura 439, Vol. 2.: 829-838.
- Latorre, B. A. and Muñoz, R. (1993): Roor rot of red raspberry caused by *Phytophthora citricola* and *P. citophthora* in Chile, Plant Disease, Vol. 77, No. 7: 715-718.
- Lebert, H. and Cohn, F. (1870): On the road of cactus stem, Beitrage zur Biologie der Pflanzen, 1: 51-57.
- Lilja, A. T., Parikka, P. K., Pääskynkivi, E. A., Hantula, J. I., Vainio, E. J., Vartiamäki, H. A., Lemmetty, A. H., Vestberg, M. V. (2006): *Phytophthora cactorum* and *Colletotrichum acutatum*: Survival and Detection, Agriculturae Conspectus Scientificus, Vol. 71, No. 4: 121–128.
- Lim, T. M., Jerie, P., H. and Merriman, P. R. (1990): Evaluation of phosphonic (phosphorous) acid for controlling phytophthora crown and trunk rot of peach and apricot, Australasian Plant Pathology, 19: 134-136.
- Locci, R. (1994): Actinomycetes as plant pathogens, European Journal of Plant Pathology, 100: 179-200.

- Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S., Cooke, L. R. (1991): *Phytophthora*, British Mycological Society, Cambridge University press: 447.
- Lučić, P., Đurić, G., Mičić, N. (1996): Voćarstvo I (Pomology I). Nolit, Agricultural Research Institute Serbia.
- Maas, J. L. (1984): Compendium of Strawberry Diseases, The American Phytopathological Society: 78-85.
- Maas, J. L. (1973): *Phytophthora fragariae* race characterization with gas-liquid chromatographic lipid analysis, Mycologia, 65: 1259-1265.
- Maloney, K., Pritts, M., Wilcox, W., Kelly, M. J. (2005): Suppression of *Phytophthora* root rot in red raspberries with cultural practices and soil amendments, Horticultural Science, 40 (6): 1790-1795.
- Maloney, K. E., Wilcox, W. F. and Sanford, J. C. (1993): Raised beds and metalaxyl for controlling phytophthora root rot of raspberry, Horticultural Science, 28: 1106-1108.
- Man in 't Veld, W. A. (2007): Gene flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* comb. nov., Mycologia, 99: 222 - 226.
- McKeen, W. E. (1958): Red stele root disease of the loganberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, Phytopathology, 48: 129-132.
- Merz, W. G., Burrell, R. G. and Gallegly, M. E. (1969): A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*, Phytopathology, 59: 367-370.
- Mičić, N., Mičić, G. (2016): Biološke osnove gajenja maline (*Rubus idaeus* L.), Fructus, Vol.1, Br.1: 3-18.
- Milholland, R. D. and Galletta, G. J. (1967): Relative susceptibility of blueberry cultivars to *Phytophthora cinnamomi*, Plant Disease Reporter, 51: 998-1001.
- Miller, S. A. and Martin, R. R. (1988): Molecular diagnosis of plant disease, Annual Review of Phytopathology, 26: 409-432.
- Mircetich, S. M and Matheron, M. E. (1976): *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees, Phytopathology, 66: 549-558.
- Mišić, P. (1998): Malina, Beograd.
- Mišić, P., Nikolić, M. (2003): Jagodaste voćke, Beograd.
- Mohan, S. B. (1988): Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detection the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Plant Pathology, 37: 20-216.
- Morris, B. M. and Gow, N. A. R. (1993): Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi, Phytopathology, 83: 877- 882.
- Nickerson, N. L. (1990): Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora fragariae* in Nova Scotia, Strawberry newsletter No. 4, Department of Agriculture and Marketing: 5.
- Nikolić, M., Milivojević, J. (2010): Jagodaste voćke tehnologija gajenja, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak: 592.
- Nikolić, M., Fotirić, M., Milivojević, J., Radivojević, D. (2006): Preliminary results of raspberry selection with yellow fruits, Proceeding of International Conference of Perspectives in European Fruit Growing, Ledice, Czech Republic: 197-201.
- Nishida, H., Matsumoto, T., Kondo, S., Hamamoto, M., Yoshikawa, H. (2014): The early diverging ascomycetous budding yeast *Saitoella complicata* has three histone deacetylases belonging to the Clr6, Hos2, and Rpd3 lineages, Journal of General and Applied Microbiology, 60 (1): 7-12.
- Nishida, H., Hamamoto, M., Sugiyama, J. (2011): Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*, Journal of General and Applied Microbiology, 57 (4): 243-246.

- Nourrisseau, J. G. and Baudry, A. (1987): Un *Phytophthora* cause de dépérissement du framboisier en France, *Phytoma*, 384: 39-41.
- Olsson, C. H. B. (1995): Diagnosis of *Phytophthora* infections in raspberry and strawberry plants by ELISA tests, *Journal of Phytopathology*, 143: 3017-310.
- Oudemans, P. V. (1999): *Phytophthora* species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey, *Plant Disease*, 83: 251-258.
- Oudemans, P., Forster, H. and Coffey, M. D. (1994): Evidence of distinct isozyme subgroups within *Phytophthora citricola* and close relationships with *P. capsici* and *P. citrophthora*, *Mycological Research*, 98: 189-199.
- Oudemans, P. and Coffey, M. D. (1991a): A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis, *Mycological Research*, 95: 1025– 1046.
- OEPP/EPPO (2006): Diagnostics *Phytophthora ramorum*, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 145-155.
- OEPP/EPPO (2005): Normes OEPP, EPPO Standards, Diagnostics, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 271–273.
- Patterson, D. J. and Sogin, M. L. (1992): Eukaryotic Origins and Protistan Diversity: 13-46. In: *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eucaryotic Cells*. Eds. H. Hartman and K. Matsuno. World Scientific, Singapore.
- Pegg, K. G., Whaley, A. W. and Hargreaves, P. A. (1990): Phosphonic (phosphorous) acid treatments control *Phytophthora* diseases in avocado and pineapple, *Australasian Plant Pathology*, 19: 122-124.
- Parke, J. L. and Lewis, C. (2007): Root and Stem Infection of *Rhododendron* from Potting Medium Infested with *Phytophthora ramorum*, *Plant Disease*, 91: 1265–1270.
- Pepin, H. S. (1967): Susceptibility of members of the Rosaceae to races of *Phytophthora fragariae*, *Phytopathology*, 57: 782-784.
- Pethybridge, G. H. (1913): On the rotting of potato tubers by a new species of *Phytophthora* having a method of sexual reproduction hitherto undescribed, *The Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society*, 13: 529-565 (Cited in Tucker 1931).
- Pethybridge, G. H. and Lafferty, H. R. (1919): A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*, *The Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society*, 15: 487-503 (Cited in Tucker 1931).
- Petri, L. (1917): Research on the morphology and biology of *Blepharospora cambivora*, a parasite from chestnut, *Atti. R. Acad. Lincei. Rend. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Ser. 5*, 26: 297-299 (see Waterhouse, 1956).
- Petrović, S., Leposavić, A. (2016): Malina, nove tehnologije gajenja, zaštite i prerade, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
- Petrović, S., Leposavić, A. (2009): Savremena proizvodnja maline, Drugo izmijenjeno i dopunjeno izdanje, Institut za voćarstvo, Čačak.
- Petrović, S., Milošević, T. (2002): Malina, tehnologija i organizacija proizvodnje, drugo dopunjeno i izmijenjeno izdanje, Agronomski fakultet, Čačak.
- Petrović, S., Milošević, T. (1996): Uslovi i ograničenja za proizvodnju maline i kupine u Republici Srbiji, *Savremena poljoprivredna tehnika*, 22(3):140-146.
- Pinkerton, J. N., Ivors, K. L., Reeser, P. W., Bristow, P. R., Windom, G. E. (2002): The use of soil solarization for the management of soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production, *Plant Disease*, 86: 645-651.
- Raftoyannis, Y. and Dick, M. W. (2006): Effect of oomycete and plant variation on zoospore cover and disease severity, *Journal of Plant Pathology*, 88 (1): 95-101.

- Rands, R. D. (1922): Stripe canker of cinnamom caused by *Phytophthora cinnamomi* n. sp. (English version of: Streepkanker van Kaneel, veroorzaakt door *Phytophthora cinnamomi* n. sp.), Meded. Inst. voor Plantenziekten, Dep. Landb. Nijv. en Handel, No. 54.
- Raslich, M. A., Markert, R. J., Stutes, S. A. (2007): Odabir i tumačenje dijagnostičkih pretraga, *Biochemia Medica*, 17(2):151-161.<http://www.biochemia-medica.com/odabir-i-tumacenje-dijagnostickih-pretraga>
- Reeves, J. C. (1998): Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 33-39.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. and Parra, G. (1998): PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 948-954.
- Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. And Koike, S. T. (2002): *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality in *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California, *Plant Disease*, 86: 205-214.
- Robideau, G. P., de Cock, A.W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C.-H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., Lévesque, C. A. (2011): DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer, *Molecular Ecology Resources*, Vol. 11, No. 6: 1002-1011.
- Rose, D. H. (1924): Leather rot of strawberries, *Journal of Agricultural Research*, 28: 357-376.
- Ross, R. G. and Gourley, C. O. (1969): *Phytophthora syringae* fruit rot of apples in Nova Scotia, *Canadian Plant Diseases Survey*, 49:33-35.
- Rossmann A. Y. and Palm, M. E. (2006): Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi?, *Outlooks on Pest Management*, 17: 217-219.
- Royle, D. J. and Hickman C. J. (1963): *Phytophthora cinnamomi* on highbush blueberry, *Plant Disease Reporter*, 47: 266-268.
- Sánchez Hernández M. E, Ruíz-Dávila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M. A., Trapero-Casas A. (1998): Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain, *European Journal of Plant Pathology*, 104: 347-357.
- Sawada, K. (1927): Descriptive catalogue of the Formosan fungi. Part III. (In Japanese.) Report of the Department of Agriculture Research Institute of Formosa, 27: 1-62. (Cited by Tucker, 1931).
- Scheer, W. P. A. and Garren, R. (1981): Commercial red raspberry production, *Pacific Northwest Bulletin*, 176: 32.
- Scherer, W. von and Riedel, M. (1990): Die *Phytophthora*-Wurzelfaule der Himbeere, *Obstbau*, 10: 426 - 430.
- Schröter, J. (1886): Kryptogamen-Flora von Schlesien, Cramer, Lehre, 3-1(2): 129-256.
- Schlenzig, A., Cooke D. E. L., Chard, J. M. (2005): Comparison of a baiting method and PCR for detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in certified raspberry stocks, *Bulletin OEPP/EPPO*, 35: 87-91.
- Schmitthenner, A. F. and Cannaday, C. H. (1983): Role of chemical factors in development of *Phytophthora* diseases, p. 189-198. In: Irwin, D. C. Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds.): *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Scott, D. H., Jeffers, W. E., Darrow, G. M. and Ink, D. P. (1950): Occurrence of strains of the strawberry red stele fungus *Phytophthora fragariae* Hickman, as shown by differential varietal response, *Phytopathology*, 40: 194-198.

- Secor, G. A. and Gudmestad, N. C. (1999): Managing fungal diseases of potato, Canadian Journal of Plant Pathology, 21: 213-221.
- Seemüller, E., Duncan, J. M., Kennedy, D. M., Riedel, M. (1986): A *Phytophthora* sp. causing root rot of raspberry, Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 38 (2): 17-21.
- Shahidi Bonjar, G. H., Barkhordar, B., Pakgohar, N., Aghighi, S., Biglary, S., Rashid Farrokhi, P., Aminaii, M., Mahdavi, M. J. and Aghelizadeh, A. (2006): Biological Control of *Phytophthora drechsleri* Tucker, the Causal Agent of Pistachio Gummosis, under Greenhouse Conditions by Use of Actinomycetes, Plant Pathology Journal, 5 (1): 20-23.
- Shishkoff, N. (2007): Persistence of *Phytophthora ramorum* in Soil Mix and Roots of Nursery Ornamentals, Plant Disease, 91:1245–1249.
- Siddiqi, R. M. (2000): Tylenchida Parasites of Plants and Insects, CABI Publishing 2nd Edition, UK: 813.
- Snowdon, A. L. (1990): Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, A Color Atlas of Postharvest Diseases. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, Volume 1.
- Spotts, R. A. (2002): First repost of *Phytophthora syringae* causing rot on apples in cold storage in the United States, Plant Disease, Volume 86 (6): 693.
- Stapleton, J. J. and DeVay, J. E. (1982): Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings, Phytopathology, 72: 323-326.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., Hall, G. S. (1990): Revised tabular key to the species of *Phytophthora*, Mycological papers, CAB International, Wallingford Oxon, 162: 1-28.
- Stamps, D. J. (1978b): *Phytophthora cryptogea*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 592.
- Stewart, J. E., Kroese, D., Tabima, J. F., Larsen, M. M., Fieland, V. J., Press, C. M., Zasada, I. A., and Grünwald, N. J. (2014): Pathogenicity, fungicide resistance, and genetic variability of *Phytophthora rubi* isolates from raspberry (*Rubus idaeus*) in the Western United States, Plant Disease, Volume 98 (12): 1702-1708.
- Sutherland, E. D. and Papavizas, G. C. (1991): Evaluation of oospore hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of papper, Journal of Phytopathology, 131: 33-39.
- Suzuki, H., Macdonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., Henrissat, B., Wiebenga, A., Vankuyk, P. A., Barry, K., Lindquist, E., Labutti, K., Lapidus, A., Lucas, S., Coutinho, P., Gong, Y., Samejima, M., Mahadevan, R., Abou-Zaid, M., de Vries, R. P., Igarashi, K., Yadav, J. S., Grigoriev, I. V., Master, E. R. (2012): Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosus* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize, BMC Genomics, 13: 444.
- Tanaka, Y. and Omura, S. (1993): Agroactive compounds of microbial origin, Annual Review of Microbiology, 47: 57-87.
- Themann, K., Werres, S., Diener, H. A. and Lüttmann, R. (2002): Comparioson of different methods of detecting *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries, Journal of Plant Pathology, 84: 41-50.
- Themann, K. and Werres, S. (1998): Use of rhododendron leaves to test for *Phytophthora* spp. in root and water samples, Nachrichtenblatt Des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 50: 37-45.

- Tjosvold, S. A., Koike, S. T., Davidson, J. M., Rizzo, D. M. (2002c): Susceptibility of *Azalea* (*Rhododendron*) to *Phytophthora ramorum* [abstract], p. 86 in Proceedings of Sudden Oak Death, A Science Symposium, USDA Forest Service and University of California, Berkeley.
<http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymposium.html>
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., Hughes, K. J. D., Griffin, R. L., Barker, I. (2005): On – Site DNA Extracton and Real – Time PCR for Detection of *Phytophthora ramorum* in the Field, Applied and Environmental Micrbiology, 71: 6702 – 6710.
- Tooley, P. W. and Kyde, K. L. (2007): Susceptibility of some Eastern forest species to *Phytophthora ramorum*, Plant Disease, 91: 435-438.
- Tooley, P. W., Kyde, K. L., Englander, L. (2004): Susceptibility of selected Ericaceous ornamental host species to *Phytophthora ramorum*, Plant Disease, 88: 993-999.
- Tooley, P. W., Englander, L. (2002): Infectivity of *Phytophthora ramorum* on selected ericaceous host species, Phytopathology, 92: 81.
- Tucker, C. M. (1931): Taxonomy of the Genus *Phytophthora* de Bary, University of Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin: 153.
- Turhan, G. and Turhan, K. (1989): Suppression of damping-off on papper caused by *Pythium ultimum* Trow and *Rhizoctonia solani* Kühn by some new antagonists in comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai, Journal of Phytopathology, 126: 175-182.
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M., Dorrance, A. E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S. G., Govers, F., Grunwald, N. J., Huang, W., Ivors, K. L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M. K., McDonald, W. H., Medina, M., Meijer, H. J., Nordberg, E. K., Maclean, D. J., Ospina-Giraldo, M. D., Morris, P. F., Phuntumart, V., Putnam, N. H., Rash, S., Rose, J. K., Sakihama, Y., Salamov, A. A., Savidor, A., Scheuring, C. F., Smith, B. M., Sobral, B.W., Terry, A., Torto-Alalibo, T. A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H. , Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S, Boore, J. L. (2006): Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis, Science 313 (5791): 1261-1266.
- Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C. (1996): Glucanolytic Actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, No. 5: 1630-1635.
- van West, P., Appiah, A. A., Gow, N. A. R. (2003): Advances in research on oomycete root pathogens, Physiological and Molecular Plant Pathology, 62: 99-113.
- von Broembsen, S. L. and Deacon, J. W. (1997): Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions, Phytopathology, 87: 522-528.
- Warburton, A. J. and Deacon, J. W. (1998): Transmembrane Ca² fluxes associated with zoospore encystment and cyst germination by the phytopathogen *Phytophthora parasitica*, Fungal Genetics and Biology, 25: 54-62.
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and McCartney, H. A. (2004): Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches, Annals of Applied Biology, 145: 1-6.
- Wardlaw, C. W (1926): Lanarkshire strawberry disease, A report for the use of growers, Botany Department, University of Glasgow: 38.

- Washington, W. S. (1988): *Phytophthora cryptogea* as a cause of root rot of raspberry in Australia; resistance of raspberry cultivars and control by fungicides, *Plant Pathology*, 37: 225-230.
- Waterhouse, G. M. and Waterston, J. M. (1966): *Phytophthora cactorum*, C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 111: 1-2.
- Waterhouse, G. M. and Waterston, J. M. (1964a): *Phytophthora syringae* Description of pathogenic fungi and bacteria, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England: 2.
- Waterhouse, G. M. (1963): Key to the species of *Phytophthora* de Bary, *Mycological Papers*, 92: 1-22.
- Waterston, J. M. (1937): A note on the association of a species of *Phytophthora* with a die-back disease of raspberry, *Transactions of the Botanical Society, Edinburgh*, 32: 251-259.
- Weller, D. M. (1988): Biological control of soilborne pathogens in the rhizosphere with bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Werres, S. and Kaminski, K. (2005): Characterisation of European and North American *Phytophthora ramorum* isolates due to their morphology and mating behaviour in vitro with heterothallic *Phytophthora* species, *Mycological Research*, 109: 860-871.
- Werres, S., Marwitz, R., Man i't Veld, W. A., de Cook A. W. A. M., Bonants, P. J. M., De Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E., Baayen, R. P. (2001): *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*, *Mycological Research*, 105: 1155-1165.
- Weste, G. (1983): Population dynamics and survival of *Phytophthora*, 237-257. In: Irwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds): *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: *PCR Protocol: A guide to methods and applications* (Innis, M. A., Gelhand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. ecd.), Academic Press, San Diego, USA: 315 – 322.
- Wicks, T. and Hall, B. (1990): Evaluation of phosphonic (phosphorous) acid for the control of *Phytophthora cambivora* on almond and cherry in South Australia, *Australasian Plant Pathology*, 19: 132-133.
- Wilcox, W. F. and Latorre B. A. (2002): Identities and geographic distributions of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry in Chile, *Plant Disease*, 86: 1357-1362.
- Wilcox, W. F., Pritts, M. P., Kelly, M. J. (1999): Integrated control of *Phytophthora* root rot of red raspberry, *Plant Disease*, 83: 1149 – 1154.
- Wilcox, W. F., Pritts, M. P. and Kelly, M. J. (1999b): Integrated control of phytophthora root rot of red raspberry, *Plant Disease*, 83:1149-1154.
- Wilcox, W. F. and Duncan, J. M. (1993): *Phytophthora fragariae* Hickman var. *rubi* var. *nova*., *Mycological Research*, 97: 830.
- Wilcox, W. F., Scott, P. H., Hamm, P. B., Kennedy, D. M., Duncan, J. M., Brasier, C. M. and Hansen, E. M. (1993): Identity of *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America, *Mycological Research*, 97 (7): 817-831.
- Wilcox, W. F. (1989): Identity, virulence and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York, *Phytopathology*, 79 (1): 93-101.
- Wilcox, W. F. and Ellis, M. A. (1989): *Phytophthora* root rot and crown rots of peach trees in the Eastern Great Lakes region, *Plant Disease*, 73: 794-798.

- Wilcox, W. F. and Mircetich, S. M. (1987): Lack of host specificity among isolates of *Phytophthora megasperma*, *Phytopathology*, 77: 1132-1137.
- Wolf, D., Hartman, J. R., Brown, G. R., Strang, J. (1990): The influence of soil fumigation on strawberry yield and economics in black root rot infested fields, *Applied Agriculture Research*, 5:17-20.
- Xu-Chang and Morris, P. F. (1998): External calcium controls the developmental strategy of *Phytophthora sojae* cysts, *Mycologia*, 90: 269-275.
- Yamauchi, K., Kondo, S., Hamamoto, M., Takahashi, Y., Ogura, Y., Hayashi, T. and Nishida, H. (2015): Draft Genome Sequence of the Archiascomycetous Yeast *Saitoella complicata*, *Genome Announcements*, 3 (3): e00220-15.
- Yuan, W. M. and Crawford, D. L. (1995): Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots, *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3119-3128.
- Yuen, G. Y., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., and Hancock, J. G. (1991): Effects of soil fumigation with methyl bromide and chloropicrin on root health and yield of strawberry, *Plant Disease*, 75: 416-420.
- Zentmyer, G. A., Jefferson, L., Hickman, C. J., Yung, C. H. (1974): Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*, *Mycologia*, 66: 830–845.
- http://whatcom.wsu.edu/ag/comhort/com_berries/phytophthora.htm
- <http://www.agdia.com>
- <http://www.neogeneurope.com>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- <https://gd.eppo.int/taxon/PHYTFU>
- <http://www.phytid.org/index.htm>

PRILOZI

Prilog 1. Sistematika biljaka - botanička klasifikacija maline (Focke, 1910, 1914; Haskell, 1954, 1961; Tahtadžan, 1966):

- Odjeljak: *Magnoliophyta*
- Tip: *Angiosperme* (skrivenosjemenjače)
- Klasa: *Magnoliatae* (*Dicotyledonae*, dikotile)
- Podklasa: *Rosidae* (ruže)
- Nadred: *Rosanae* (ruže)
- Red: *Rosales* J. Lindley (ruže)
- Familija: *Rosaceae* A. L. de Jussieu (ruže)
- Podfamilija: *Rosoidae* (jagodasto voće)
- Rod: *Rubus* (Tourn.) L. (malina i kupina)
- Podrodovi: *Idaeobatus* W. O. Focke (malina), *Cylactis* (artička malina), *Anoplobatus* (cvjetna malina)
- Vrsta: *Rubus idaeus* L.

Prilog 2. Plemenite sorte maline

Latinski naziv vrste		Domaći naziv vrste	Postojbina
Podrod: <i>Idaeobatus</i>			
1.	<i>Rubus idaeus</i> L. - spp. <i>vulgatus</i> - spp. <i>strigosus</i>	crvena malina	Azija, Evropa, Sjeverna Amerika
2.	<i>R. occidentalis</i> L.	crna (američka) malina	Sjeverna Amerika
3.	<i>R. neglectus</i> Peck.	purpurna malina	Sjeverna Amerika
4.	<i>R. leucodermis</i> Dougl.	malina bijele kore	zapadni dio S. Amerike
5.	<i>R. spectabilis</i> Pursh.	žućkasto-ružičasta malina	zapadni dio S. Amerike
6.	<i>R. cockburnianus</i> Hemsl.		Azija
7.	<i>R. coreanus</i> Miq.	korejska malina	Koreja, Kina
8.	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	malina glogovog lista	Kina, Koreja, Japan
9.	<i>R. ellipticus</i> Smith	zlatna zimzelena malina	Himalaji
10.	<i>R. illecebrosus</i> Focke	jagodasta malina	Japan
11.	<i>R. kuntzeanus</i> Hemsl.	kineska malina	Kina
12.	<i>R. lasiostylus</i> Focke		centralna Kina
13.	<i>R. niveus</i> Thumb.	snježno bijela malina	Indija, Kina, Cejlon
14.	<i>R. parvifolius</i> Hemsl.	sitnolisna malina	Azija
15.	<i>R. phoenicolacius</i> Max.	japanska malina	Japan, Kina
16.	<i>R. macreci</i> A. Gray	akala (džinovska havajska malina)	Havaji (Mauna Kena)
17.	<i>R. hawaiiensis</i> A. Gray	havajska malina	Havaji
18.	<i>R. glaucus</i> Benth.	malina sa Anda	centralna i južna Amerika
Podrod: <i>Cylactis</i>			
19.	<i>R. arcticus</i> L.	arktička malina	sjeverna Evropa i Azija, sjeverni dio S. Amerike
20.	<i>R. stellatus</i> Smith	zvjezdasta malina	istočna Azija, zapadni dio Sjeverne Amerike
Podrod: <i>Anoplobatus</i>			
21.	<i>R. odoratus</i> L.	cvjetna malina	Sjeverna Amerika

Izvor: Nikolić i Milivojević, 2010.

Prilog 3. Najznačajniji prouzrokovatori bolesti maline

Mikoze maline	
<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> (Wilcox & Duncan)	pr. fitoftoroze maline
<i>Didymella applanata</i> (Niessl.)	pr. kestenjaste pjegavosti izdanaka
<i>Phragmidium rubi-idaei</i> (Winter)	pr. rđe maline
<i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary)	pr. sive truleži ploda maline
<i>Sphaerotheca macularis</i> (Wallr.), <i>S. humuli</i> (DC.) Burrill	pr. pepelinice maline
<i>Sphaerulina rubi</i> (Demaree & Wilcox)	pr. sivo-smeđe pjegavosti lista maline
<i>Leptosphaeria coniothyrium</i> (Fuckel)	pr. sušenja izdanaka maline
<i>Septoria rubi</i> (West.)	pr. pjegavosti lišća
<i>Verticillium albo-atrum</i> , Reike et Berth	pr. venjenja izdanaka
<i>Sphaerotheca macularis</i> (Fr.) Jaczewski	pr. pepelnice maline
Bakterioze maline	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith & Town.)	pr. raka korijena maline
<i>Agrobacterium rubi</i> (Hild.)	pr. raka izdanka
<i>Erwinia amylovora</i> (Burr.)	pr. bakterijske plamenjače
Viroze maline	
<i>Raspberry chlorotic leaf spot virus</i> (RCLSV)	Virus hlorotične lisne pjegavosti maline
<i>Raspberry leaf spot virus</i> (RLSV)	Virus hlorotične pjegavosti lista maline
<i>Raspberry leaf mottle virus</i> (RLMV)	Virus hlorotičnog šarenila lista maline
<i>Raspberry yellow net virus</i> (RYNV)	Virus žute mrežavosti maline
<i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV)	Virus žbunaste kržljivosti maline
<i>Raspberry ring spot virus</i> (RRSV)	Virus prstenaste pjegavosti maline
<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	Virus crne prstenaste pjegavosti paradajza
<i>Tomato ring spot virus</i> (TomRSV)	Virus prstenaste pjegavosti paradajza
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	Virus mozaika gušarke
<i>Raspberry vein chlorosis virus</i> (RVCV)	Virus hloroze nerava maline
<i>Raspberry leaf curl virus</i> (RLCV)	Virus uvijenosti lista maline
<i>Raspberry leaf blotch virus</i> (RLBV)	Virus zamrljanosti lista maline
Fitoplazmoze maline	
' <i>Candidatus Phytoplasma rubi</i> '	Kržljivost Rubusa

Izvor: Petrović i Leposavić, 2016.

Prilog 4. Štetočine maline

Specifični štetni insekti – štetni insekti maline	
<i>Byturus tomentosus</i> Fabr.	malinina buba
<i>Anthonomus rubi</i> Herbst.	malinin cvjetojed
<i>Incurvaria rubiella</i> Bjerk.	malinin moljac
<i>Agrilus rubicola</i> Abeille	malinin prstenar
<i>Bembecia hylaeiformis</i> Lasp.	malinin staklokrilac
<i>Coroebus rubi</i> Linne	malinin korebus
<i>Thomasniana theobaldi</i> Barnes	malinina mušica
<i>Aphididae</i>	lisne vaši
<i>Lasioptera rubi</i> Heeg	malinina muva galica
<i>Pegomia rubivora</i> Coqu.	malinina muva
<i>Notocelia udmanniana</i> Linne	malinin smotovac
Polifagni štetni insekti	
<i>Melolontha melolontha</i> L.	obični (majski) gundelj
<i>Tropinota hirta</i> Poda	rutava buba
<i>Oecanus pellunces</i> Scop.	italijanski popac
<i>Coccidae</i>	štitaste vaši
<i>Cicadetta montana</i> Scop. i <i>C. dimissa</i> Hagen.	krupne cikade - cvrčci
<i>Centrotus cornutus</i> L.	cikade
<i>Orthosia gracilis</i> (Denis & Schiffermüller)	sovica
<i>Saturnia pavonia</i> L.	paunovac
<i>Zeuzera pyrina</i> L.	drvesnica
<i>Lymantria dispar</i> L.	gubar
<i>Amphymallon solstitialis</i> L.	mali ljetni gundelj
<i>Rhizotrogus aequinoctialis</i> Hrbst.	mali prolječni gundelj

Izvor: Petrović i Leposavić, 2016.

Prilog 5. Ostale štetočine maline

Ostale štetočine maline	
Nematode <u>Direktna oštećenja:</u> <i>Pratylenchus penetrans</i> (Kobova nematode trava), <i>P. vulnus</i> (nematode pjegavosti korijena drvenastih biljaka) <u>Vektori virusa:</u> <i>Longidorus elonatus</i> (dugačka kopljasta nematode), <i>L. macrosoma</i>, <i>L. caespiticola</i>, <i>L. leptcephalus</i> <i>Xiphinema diversicaudatum</i> Micoletzky (evropska kopljasta nematoda), <i>X. paraelongatum</i>	Grinje <i>Tetranychus althaeae</i> V. Haust. – crveni pauk; <i>Neotetranychus rubi</i> Trag. – malinina grinja; <i>Eriophyes gracilis</i> Nalepa – grinja galica; Glodari <i>Microtus arvalis</i> L. - poljski miš, <i>Arvicola terrestris</i> L. – vodena voluharica, <i>Talpa europea</i> L. - krtica

Izvor: Petrović i Milošević, 2002.

Prilog 6. Puferi za AGDIA DAS-ELISA test, Phytophthora PathoScreen Kit

Univerzalni pufer za ekstrakciju (General Extraction buffer)

PVP (viscosity K10–K40)	20 g
ovalbumin	2 g
Na ₂ SO ₃	1,3 g
NaN ₃	0,2 g
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	1 l

Pufer za ispiranje (Wash buffer, PBST), 1X, pH 7,4

NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	1 l

Pufer za prekrivanje ploča (Carbonate Coating buffer), pH 9,6; 4°C

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g
dH ₂ O	1 l

Konjugatni pufer (ECl pufer, Conjugate buffer), pH 7,4; 4°C

Bovin serum albumin (BSA)	2,0 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	20,0 g
NaN ₃	0,2 g
1x PBST	1 l

Supstratni pufer (Substrate buffer, PNP pufer), pH 9,8; 4°C

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g
NaN ₃	0,2 g
C ₄ H ₁₁ NO ₂	97,0 ml
dH ₂ O	1 l

Prilog 7. Puferi za ADGEN DAS–ELISA test Neogen Europe Ltd:

Pufer za prekrivanje ploča (Carbonate Coating buffer), pH 9,6; 4°C

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
dH ₂ O	1 l

PBS (Phosphate buffered saline) x 10, pH 7,2

NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
KCl	2,0 g
dH ₂ O	5 l

Pufer za ispiranje (Wash buffer, PBS + Tween 20)

Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	1 l

Konjugatni pufer (Mab dilution buffer/ Conjugate buffer)

Bovin serum albumin	0,2 g
PBST	100 ml

Supstratni pufer (Substrate buffer)

C ₄ H ₁₁ NO ₂	97 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
dH ₂ O	125 ml

Prilog 8. Reakcione mješavine (Master Mix) za I i II ciklus PCR

Reakciona mješavina (Master Mix) za I ciklus PCR

DSW voda	14,5 µl
10 mM MgCl ₂	7.5 µl
Titanium Taq 10X pufer	5 µl
Bovine serum albumine 10mg/ml	5 µl
1 mM dNTP Mix	5 µl
5 µM DC 6	5 µl
5 µM ITS 4	5 µl
Titanium Taq polimeraza	1 µl
DNA ekstrakt	2 µl

Reakciona mješavina (Master Mix) za II ciklus PCR

DSW voda	14,5 µl
10 mM MgCl ₂	7.5 µl
Titanium Taq 10X pufer	5 µl
Bovine serum albumine 10mg/ml	5 µl
1 mM dNTP Mix	5 µl
5 µM ITS 6	5 µl
5 µM ITS 4	5 µl
Titanium Taq polimeraza	1 µl
DNA ekstrakt	2 µl

LISTA SLIKA		Strana
Slika 1.	Reproduktivna struktura <i>Oomycota</i> (Izvor: Rossman and Palm, 2006)	12
Slika 2.	Listovi rododendrona postavljeni kao mamac biljka u posudi sa zemljom i vodom radi izolacije patogena iz zemlje, izvor: originalna fotografija	34
Slika 3.	Početak inkubacije listova rododendrona u vlažnim uslovima i pojava nekroze nakon perioda inkubacije od 5-7 dana, izvor: originalne fotografije	34
Slika 4.	Test biljke prije inokulacije, u toku adaptacije na uslove staklenika, izvor: originalna fotografija	53
Slika 5.	Test biljke inokulisane sa micelijom uzgojene na hranljivom agaru, izvor: originalna fotografija	53
Slika 6.	Mapa lokaliteta na kojima su uzimani uzorci tokom 2008-2016. godine, izvor: https://www.google.ba/mapa BiH, oznaka lokaliteta: Autor	54
Slika 7.	Pojedinačno zaražene biljke i širenje bolesti unutar reda, Bratunac, jun 2008. godina, izvor: originalna fotografija	55
Slika 8.	Potpuno sušenje proizvodnog zasada, selo Dragočaj kod Banjaluke, jun 2008. godina, izvor: originalna fotografija	55
Slika 9.	Potpuno sušenje proizvodnog zasada, Rogatica, jul 2016. godina, izvor: originalna fotografija	55
Slika 10.	Savijanje vrha izdanka u obliku „pastirskog štapa“, izvor: originalna fotografija	57
Slika 11.	Simptomi prijevremenog sušenja u proizvodnom zasadu, hloroza i nekroza oboda lista, potpuna nekroza, izvor: originalna fotografija	57
Slika 12.	Simptomi hloroze i nekroze izdanaka maline i potpuna nekroza biljaka u jednom dijelu reda proizvodnog zasada, izvor: originalna fotografija	57
Slika 13.	Nekrotične promjene prizemnog dijela izdanka u proizvodnom zasadu, izvor: originalna fotografija	58
Slika 14.	Simptomi smanjene ukupne mase korijenovog sistema, izvor: originalne fotografije	59
Slika 15.	Promjena boje zaraženog tkiva na poprečnom presjeku korijena maline, izvor: originalne fotografije	59
Slika 16.	Nekroza tkiva poprečnog presjeka korijena maline, izvor: originalne fotografije	59
Slika 17.	Matičnjak maline u zatvorenom prostoru, Prijedor 2016., izvor: originalna fotografija	61
Slika 18.	Matičnjak maline na otvorenom polju, Rudo 2016. godina, izvor: originalna fotografija	61
Slika 19.	Proizvodnja sadnica iz korijenovih reznica i kontejnerskih sadnica, Bratunac 2009. godina, izvor: originalna fotografija	61
Slika 20.	Neujednačen porast kontejnerskih sadnica, Prijedor 2015. godina, izvor: originalna fotografija	61
Slika 21.	Lijevo: Izolat 102-08 slabog porasta micelije; Srednja: Izolat 106-08 srednje razvijena vazдушna micelija umjerenog porasta; Desno: Izolat	65

	103-08 bujna vazдушna micelija brzog porasta na CPA podlogama, izvor: originalne fotografije	
Slika 22.	Različit izgled i brzina porasta micelija <i>Phytophthora</i> spp. izolata dobijenih od mamac biljaka, izvor: originalna fotografija	66
Slika 23.	Mikroskopski izgleda micelije <i>Phytophthora</i> spp. na hranljivoj podlozi, uvrtnje micelije i stvaranje coils konstrukcija (Olympus CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels), izvor: originalna fotografija	67
Slika 24.	Hlamidospore <i>Phytophthora</i> spp. (Olympus model CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels, izvor: originalna fotografija	67
Slika 25.	Oospore <i>Phytophthora</i> spp. (Olympus model CX41 uvećanje 400x i snimak sa Camedia C-7070, 7.1 mega pixels, izvor: originalna fotografija	68
Slika 26.	Konvencionalni PCR produkti dobijeni sa modifikovanim „univerzalnim” ITS prajmerima ITS6, ITS7 i ITS8 na 1% agaroznom gelu, M-100 bp marker	82
Slika 27.	Nested PCR produkti dobijeni sa 2 seta prajmera (za prvi krug ITS4/DC6; za drugi krug DC1/DC5) na 1% agaroznom gelu. Prvi red: 100 bp marker, izolati: 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, pufer, voda, + kontrola; Drugi red: 100 bp marker, izolati: 79, 80, 81, 82, pufer, voda, voda, + kontrola.	84
Slika 28.	PCR produkti dobijeni sa 2 seta prajmera (za prvi krug ITS4/DC6; za drugi krug ITS6/ITS4) na 2% agaroznom gelu, 100 bp marker.	85

LISTA TABELA	Strana
Tabela 1. Najveći svjetski proizvođači maline (FAOSTAT, 2016) izvor: http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity , datum posjete: februar, 2018.	6
Tabela 2. Podaci širenja proizvodnje maline u RS i količine otkupa ploda, izvor: Arhiva Resora za pružanje stručnih usluga u poljoprivredi RS	6
Tabela 3. Razlike između <i>Oomycota</i> iz carstva <i>Chromista</i> i pravih gljiva, izvor: Rossman and Palm, 2006.	11
Tabela 4. Periodičnost sakupljanja uzoraka i uvođenje dijagnostičkih metoda	29
Tabela 5. Šematski prikaz procedure AGDIA i ADGEN ELISA testa	38
Tabela 6. Modifikovani „univerzalni“ <i>Phytophthora</i> prajmeri za konvencionalni PCR	47
Tabela 7. Opšti (generic) prajmeri za direktni PCR (prvi ciklus)	47
Tabela 8. „Univerzalni“ prajmeri za nested PCR (drugi ciklus)	48
Tabela 9. Prajmeri za drugi ciklus PCR	49
Tabela 10. Dio nukleotidne NCBI kolekcije korišćene za Blastn	51
Tabela 11. Dio kolekcije NCBI sekvenci korišćene za Blastx	52
Tabela 12. Stanje učestalosti pojave micelije na različitim hranljivim podlogama koja odgovara izgledu micelije <i>Phytophthora</i> spp.	62
Tabela 13. Rezultati DAS-ELISA testova na prisustvo <i>Phytophthora</i> spp.	69
Tabela 14. Poređenje AGDIA i ADGEN rezultata	70
Tabela 15. Rezultati analiza direktno iz korijena maline dobijeni različitim ELISA kitovima	72
Tabela 16. Rezultati testova izolata od micelija iz korijena i iz mamac biljaka, kao i njihova procentualna zastupljenost, dobijena različitim ELISA kitovima	73
Tabela 17. Odnos rezultata AGDIA kita micelije iz: mamac biljke / korijen maline	74
Tabela 18. Odnos rezultata ADGEN kita micelije iz: mamac biljke / korijen	76
Tabela 19. Odnos rezultata različitih ELISA kitova (ADGEN/AGDIA) analizirajući miceliju iz korijena maline	77
Tabela 20. Odnos rezultata različitih ELISA kitova (ADGEN/AGDIA) analizirajući miceliju iz mamac biljaka	78
Tabela 21. Vrijednosti varijabli ROC analize za AGDIA kit	79
Tabela 22. Vrijednosti varijabli ROC analize za ADGEN kit	80
Tabela 23. Konvencionalni PCR sa univerzalnim prajmerima (ITS6, ITS7, ITS8)	81
Tabela 24. Nested PCR korijena maline i micelije iz mamac biljaka i iz kolekcije	83
Tabela 25. Pristupni brojevi (accession number) izolata iz Bratunca i Šipova	86
Tabela 26. Sličnost izolata sa raspoloživim sekvencama u NCBI banci gena i njihovo geografsko porijeklo, obrađeno u Blastn programu	87
Tabela 27. Grupisanje izolata prema % sličnost sa raspoloživim sekvencama u NCBI banci gena i geografsko porijeklo, obrađeno u Blastx programu	88
Tabela 28. Rezultati analiza odabranih izolata sekvenciranim u 2013. godini	90
Tabela 29. Rezultati svih sprovedenih analiza odabranih izolata sekvenciranim u 2017. godini	91

LISTA GRAFIKONA		Strana
Grafikon 1.	Prikaz deset najvećih svjetskih proizvođača maline, izvor: FAOSTAT 2016, http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity , datum posjete: februar, 2018.	5
Grafikon 2.	Učestalost pojave micelije koja izgledom odgovara miceliji <i>Phytophthora</i> spp.	63
Grafikon 3.	Rezultati DAS-ELISA kitova na prisustvo <i>Phytophthora</i> spp.	70
Grafikon 4.	Poređenje AGDIA i ADGEN rezultata iz biljaka i iz zemljišta	71
Grafikon 5.	Zastupljenost pozitivnih (plus) i negativnih (minus) izolata analizom micelije iz korijena maline i iz zemlje preko mamac biljaka dobijenih AGDIA kitom	74
Grafikon 6.	Odnos rezultata dobijenih AGDIA ELISA kitom istih uzoraka iz korijena maline i iz zemljišta preko mamac biljaka	75
Grafikon 7.	Zastupljenost pozitivnih (plus) i negativnih (minus) izolata analizom micelije iz korijena maline i iz zemlje preko mamac biljaka dobijenih ADGEN kitom	76
Grafikon 8.	Odnos rezultata dobijenih ADGEN ELISA kitom istih uzoraka iz korijena maline i iz zemljišta preko mamac biljaka	77
Grafikon 9.	ROC analiza rezultata testiranja specifičnosti i senzitivnosti AGDIA kita	79
Grafikon 10.	ROC analiza rezultata testiranja specifičnosti i senzitivnosti ADGEN kita	80
Grafikon 11.	Rezultati analize konvencionalnim PCR sa univerzalnim prajmerima	81
Grafikon 12.	Rezultati analize nested PCR sa specifičnim prajmerima	84

BIOGRAFIJA AUTORA

Biljana Lolić je rođena 20. septembra 1975. godine u Banjaluci. Osnovnu školu, Gimnaziju i Poljoprivredni fakultet, opšti smjer, završila je u Banjaluci. Diplomski rad je odbranila iz oblasti pčelarstva na temu „Uticaj bakar glukonata na količinu varoe u pčelinjem društvu“. Tokom studiranja dobila je dva puta stipendiju WUS-Austria i jednom stipendiju Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske. Dobitnik je Zlatne plakete Univerziteta u Banjaluci.

Postdiplomski magistarski studij u oblasti Integralni menadžment voćaka mediteranskih voćnih vrsta (IPM-Integrated Pest Management of Mediteranean Fruit Tree Crops) završila je na Mediteranskom Agronomskom Institutu u Bariju (Italija). Magistarsku tezu pod nazivom „Virusi i viroidi jabučastih voćaka u Bosni i Hercegovini" uspješno je odbranila 2006. godine, i time stekla zvanje magistra nauka.

Odlukom Nastavno-naučnog vijeća Poljoprivrednog fakulteta u Banjaluci 2005. godine izabrana je u zvanje asistenta, 2007. godine u zvanje višeg asistenta za nastavni predmet Fitopatologija, a 2012. godine za nastavne predmete: Opšta fitopatologija, Bolesti voćaka i vinove loze, Bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka, Dijagnostičke metode u fitopatologiji, Karantinske bolesti i štetočine i fitosanitarna kontrola.

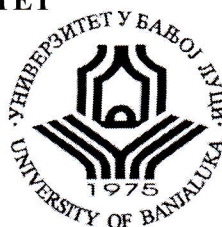
U periodu 2007-2008. godine učestvuje u realizaciji međunarodnog projekta INTEGRA koji je realizovan i podržavan od strane ERDF (European Regional Development Fund). Kontinuirano, od 2007. godine učestvovala je u realizaciji Programa posebnog nadzora više različitih karantinskih štetnih organizama koji su finansirani od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske.

Tokom 2008. godine dobija Cochran stipendiju kada odlazi u Michigan State University na usavršavanje iz oblasti poljoprivredne biotehnologije. U 2011. godini odlazi u Tel Aviv (Volkani Centar) na usavršavanje iz oblasti Istraživanja i razvoj integralnog menadžmenta nad štetočinama, u organizaciji Izraelske agencije za međunarodnu saradnju (MASHAV) i Centar za međunarodnu poljoprivrednu saradnju i razvoj (CINADCO). U periodu 2008-2017. godine učestvuje u većem broju usavršavanja iz različitih oblasti zaštite zdravlja biljaka u mnogim Evropskim zemljama.

Duži niz godina radi kao inspektor za organsku proizvodnju za Certifikacijsku kuću Organska kontrola (OK) u Sarajevu.

Od septembra 2017. godine zaposlena je u Institutu za genetičke resurse, Univerziteta u Banjoj Luci.

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 10/3.1229/18
Датум: 20.04.18 године

ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Одлуком Наставно-научног вијећа Пољопривредног факултета, број 10/3.2424-8-113/17 од 04. 09. 2017. године именована је комисија за писање извјештаја о оцјени урађене докторске дисертације и за одбрану докторске дисертације кандидата мр Биљане Лолић под насловом „Улога комплекса *Phytophthora* spp. у сушењу и пропадању малине у Републици Српској" у сљедећем саставу:

- Проф. др Гордана Ђурић, редовни професор Пољопривредног факултета, Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област: Хортикултура и Заштита и очување генетичких ресурса, председник;
- Проф. др Душка Делић, ванредни професор Пољопривредног факултета, Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област: Заштита здравља биљака и агроекологија, ментор;
- Проф. др Драго Милошевић, редовни професор Агрономског факултета у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Заштита биља, члан.

- 1) Навести датум и орган који је именовао комисију;
- 2) Навести састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, научно-наставног звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање и назива универзитета/факултета/института на којем је члан комисије запослен.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Биљана, Чедомир, Лолић;
2. Рођена 20. септембра 1975. године у Бањој Луци, Република Српска;
3. СИНЕАМ (International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies), магистарски студиј из области Интегрална заштита медитеранских воћних врста (Integrated Pest Management of Mediterranean Fruit Tree Crops), стечено звање магистар наука (Master of Science);
4. Медитерански Агрономски Институт у Барију (IAM-Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari) Италија, магистарска теза под називом „Вируси и виroidи јабучастих воћака у Босни и Херцеговини", научна област: пољопривредне науке, датум одбране: 16. октобар 2006. године.
5. Научна област: Пољопривредне науке
6. Докторска дисертације је пријављена 2009. године на Пољопривредном факултету у складу са чланом 37. Закона о измјенама и допунама Закона о високом образовању ("Службени гласник Републике Српске", број: 30/07) и члана 52. Статута Универзитета у Бањој Луци.

- 1) Име, име једног родитеља, презиме;
- 2) Датум рођења, општина, држава;

- 3) Назив универзитета и факултета и назив студијског програма академских студија II циклуса, односно послиједиписних магистарских студија и стечено стручно/научно звање;
- 4) Факултет, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране магистарског рада;
- 5) Научна област из које је стечено научно звање магистра наука/академско звање мастера;
- 6) Година уписа на докторске студије и назив студијског програма.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Наслов докторске дисертације: "Улога комплекса *Phytophthora spp.* у сушењу и пропадању малине у Републици Српској",
 2. Тема докторске дисертације прихваћена је одлуком Научно-наставног вијећа Пољопривредног факултета број 0101-2469-18-3e/09 од 01. 07. 2009. године и Сената Универзитета број 05-3527/09 од 16. 07. 2009. године,
 3. Садржај докторске дисертације по поглављима је следећи:
 - Увод: 1-2;
 - Циљ истраживања: 3-4;
 - Преглед литературе: 5-27;
 - Радна хипотеза: 28;
 - Материјал и метод рада: 29-53;
 - Резултати истраживања: 54-89;
 - Дискусија: 93-100;
 - Закључак: 101;
 - Литература: 101-113
 - Прилози: 114-119
 - Листа слика, табела и графика: 120-123
 - Биографија аутора: 124
 4. Докторска дисертација је написана на 113 странице, А4 формата. Поред тога има 7 уводних страница (поднасловница, подаци о ментору, сажетак на српском и енглеском језику, садржај) и 8 прилога. У прилозима је дато: систематско мјесто малине, гајене сорте малине, најзначајнији проузроковачи болести малине, најважније штеточине малине, остале штеточине малине, пуфери за AGDIA DAS-ELISA тест *Phytophthora PathoScreen Kit*, пуфери за ADGEN DAS-ELISA тест Neogen Europe Ltd, реакционе мјешавине за (Master Mix) за I и II циклус PCR. На 4 стране су наведене листе од 28 слика, 29 табела и 12 графика и 1 страна биографије аутора.
 Докторска дисертација обухвата следећа поглавља: Увод, Циљ истраживања, Преглед литературе, Радна хипотеза, Материјал и метод рада, Резултати истраживања, Дискусија, Закључак, Литература, Прилози, Листа слика, табела и графика и биографију аутора.
- 1) Наслов докторске дисертације;
 - 2) Вријеме и орган који је прихватио тему докторске дисертације
 - 3) Садржај докторске дисертације са страничењем;
 - 4) Истаћи основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графика, број цитиране литературе и навести поглавља.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

- 1) Комерцијална производња малине у Републици Српској има све већи пораст. Повећање површина под малином, међутим није пратио одговарајући степен развоја расадничке производње, због чега се доста засада подизао садним материјалом из увоза. Здравствено стање садног материјала је кључно за каснију успјешну комерцијалну производњу. Уназад 10 година посебно су се почели појављивати проблеми сушења и пропадања засада малине. Циљ овог истраживања био је утврдити узрок сушења малине праћењем здравственог стања

у производним засадима и у расадницима. Врсте рода *Phytophthora* на малини су регистроване у Европи и земљама у окружењу (Србија, Хрватска, Словенија), па је било неопходно утврдити појаву, присуство и распрострањеност болести и код нас. Исти или веома слични симптоми могу настати и због одређених абиотских чинилаца, па је због тога било важно утврдити узроке сушења малине. Постављена је хипотеза да одређени број засада страдао због болести, те је било потребно утврдити да ли је појава *Phytophthora* spp. значајан проузроковач појаве сушења и пропадања производних засада малине у Републици Српској.

- 2) Трулеж коријена малине проузрокована врстама рода *Phytophthora* је позната од 1930. године, када је дошло до појаве масовног ширења трулежи коријена малине у Шкотској, али није се одмах сматрала значајном болести малине. Данас се врсте рода *Phytophthora* сматрају примарним проузроковачима сушења малине у свим производним регионима у свијету. Трулеж коријена или фитофтороза малине најзначајнија је болест коријена ове биљке у свијету. Неколико врста рода *Phytophthora* (за сада 13) су потврђени као патогени малине у различитим земљама, а неке од њих имају карантински статус. Најзначајнија и најчешће изолована врста из обољеле малине је *P. fragariae* која има два варијетета која проузрокују трулеж коријена и то: трулеж коријена малине (raspberry root rot) *Phytophthora fragariae* var. *rubi* и црвенило језгре коријена јагоде (red core of strawberry) *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. Каснија истраживања су показала да *P. fragariae* var. *rubi* представљају одвојену и посебну врсту *P. rubi*. У прегледу литературе (укупно 226 литературних извора и 6 интернет страница) детаљно је приказано стање проблема у свијету и околним земљама. Не постоји прецизно објашњење зашто је велики број врста рода *Phytophthora* постао штетан према познатим биљкама домаћинима, и зашто инфицирају нове биљке домаћине. Једно од могућих објашњења за повећање разноликости и активности фитофтороза у последњих 10-20 година, могло би се довести у везу са интензивирањем међународне трговине орнаменталних биљака.

Најбоља техника за контролу било које болести јесте производња и садња отпорних сорти. Што се тиче црвене малине, ниједна сорта није потпуно имуна на фитофторозу, али бројне сорте показују различит степен осјетљивости. У литератури се наводи да у Европи ни једна значајна комерцијална сорта не показује довољан степен отпорности према фитофторози. Избор здравог садног материјала је најзначајнија превентивна мјера заштите. *Phytophthora fragariae* је за ЕУ и ЕРРО патоген А2 статуса са "nil tolerance" (0%) у садном материјалу. Карантинском листом СРЈ све до краја 2002. године није био дефинисан статус ове псеудогљиве. Према „Службеном гласнику Републике Србије“ бр. 14/2008-09 *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* налази се на А1, а *Phytophthora fragariae* var. *rubi* налази се на А2 карантинској листи штетних организама Републике Србије.

- 3) У свијету за потребе сертификационе шеме, врши се инспекција производње садница малине на годишњем нивоу, да би се потврдила испуњеност захтјева сертификације и одсуство свих главних болести. Као главни извор заразе најчешће се наводе заражене саднице, тако да у Републици Српској иако није успостављена сертификациона шема за производњу садница малине, спроводе се редовне, годишње контроле расадничке производње када се узимају узорци за лабораторијску анализу. У Републици Српској је успостављена контрола производње садног материјала последњих 8 година (од 2010. године). Међутим, доста садног материјала се унесе преко Федерације БиХ, као и из хуманитарних и/или донаторских грантова међународних организација. Здравствено стање тог садног материјала је упитно. Такође, велики проблем представља и то што се узрочник ове болести не налази на листи карантинских штетних организама у БиХ и РС те не постоји обавеза контроле земљишта прије подизања нових засада.

Најчешће се нови засади подижу на површинама које су прије тога биле под малином која је искрчена. На таквим земљиштима је потребно успоставити хигијенске мјере које подразумевају најмање 7 година без малине и биљака које су домаћини за врсте из рода *Phytophthora*. Само савјесни произвођачи који изврше већа улагања у нове засаде, врше и тестирање на присуство фитофтороза да би се осигурао фитосанитарни квалитет. За потребе овог истраживања, имајући у виду да број узорака по јединици површине који се узима за потребе анализа није стандардизован, практиковано је да се узме што већи број узорака, при чему се водило рачуна да се сваки узорак састоји од већег броја појединачних биљака, и да буду обухваћене све присутне сорте малине у расаднику и засаду. Резултати овог истраживања указују на неопходност уврштавања *Phytophthora rubi* на карантинску листу на нивоу РС и БиХ, уз обавезну контролу присуства патогена приликом увоза садног материјала на граничним прелазима, као и у расадницима током производње унутар земље, те контроле земљишта прије подизања нових засада.

- 4) Очекивани резултати су били откривени врсте рода *Phytophthora* које су присутне и које угрожавају комерцијалну и расадничарску производњу малине у земљи, као и успоставити брзе, ефикасне, осјетљиве и поуздане лабораторијске методе, за рутинско тестирање на присуство *Phytophthora* spp. Допринос тезе је потврђивање присуства врсте *Phytophthora rubi* и успостављен дијагностички протокол за брзе, ефикасне, осјетљиве и поуздане методе за рутинско тестирање узорака на присуство *Phytophthora rubi* током контроле расадничке производње, инспекцијских узорака као и приликом увоза садница малине. Уведене су молекуларне методе за детекцију патогена у биљном материјалу са испољеним симптомима, али и у условима латентне инфекције, као и за детекцију патогена у земљишту преко мамац биљака. Добијени резултати су потврдили неопходност да се *Phytophthora rubi* уврсти на карантинску листу на нивоу Републике Српске и Босне и Херцеговине.

Цитирана литература:

- Abad, Z. G., Abad, J. A., Coffey, M. D., Oudemans, P. V., Man in 't Veld, W. A., Cunnington, J. and Louws, F. J. (2008): *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the Rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents, *Mycologia*, 100 (1): 99-110.
- Agrios, N. G. (2004): Plant pathology, Fifth edition, Elsevier Academic Press: 952.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- APHIS (2007): https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/phytophthora-ramorum/ct_updates
- Atkinson, D. (1973): Seasonal changes in the length of white unsuberized roots of raspberry plants grown under irrigation, *Journal of Horticultural Science*, 48: 413-419.
- Barr, D. J. S. (1980): An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, Spizellomycetales, *Canadian Journal of Botany*, 58: 2380-2394.
- Barritt, B. H., Crandall, P. C., Bristow P. R. (1979): Breeding for root rot resistance in red raspberry, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104: 92-94.
- Benson, D. R. and Silvester, W. B. (1993): Biology of *Frankia* strains, actinomycetes symbionts of actinorhizal plants, *Microbiology*, 57: 293-319.
- Bolay, A., Ducort, V. (1990): Traitements fongicides contre le phytophthora du framboisier, *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 22: 93-97.
- Bolton, A. T. (1978): Effects of amending soilless growing mixtures with soil containing antagonistic organisms on root rot and black leg of geranium (*Pelargonium hortorum*) caused by *Pythium spendens*, *Canadian Journal of Plant Science*, 58: 93-95.
- Bolton, A. T. (1980): Control of *Pythium aphanidermatum* in poinsettia in a soilless culture by *Trichoderma viridae* and a *Streptomyces* sp., *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2: 379-383.
- Bonants, P., Hagenaar-de Weerd, M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., Duncan, J. (1997): Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction, *European Journal of Plant Pathology*, 103: 345-355.
- Booth, C. (1971): *Methods in Microbiology*, Academic Press, Volume 4: 795.
- Brasier, C. M. (2008): The biosecurity threat to the UK and global environment from international plant trade, *Plant Pathology*, 57: 792-808.
- Brasier, C., Kirk, S., Rose, J. (2007a): Differences in phenotypic stability and adaptive variation between the main European and American lineages of *Phytophthora ramorum*. *Forest Research*, Chapter 39. <http://rapra.csl.gov.uk/objectives/wp1/AdaptiveDifferencesCh39.pdf>
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5878-5883.
- Brasier, C. M. (1992): Evolutionary biology of *Phytophthora*: I. Genetic system, sexuality and the generation of variation, *Annual*

- Review of Phytopathology, 30:153-171.
- Brien, R. M. and Dingley, J. M. (1959): A revised list of plant disease recorded in New Zealand, New Zealand Journal of Agricultural Research, 2: 406-413.
- Bristow, P. R. and Windom, G. E. (1992): The effect of sodium tetrathiocarbonate and fosetyl- Al in controlling phytophthora root rot of red raspberry in the Pacific Northwest, Phytopathology, 82: 1132.
- Bristow, P. R., Windom, G. E., Cameron, J. S. (1989): The impact of *Phytophthora erythroseptica* and winter soil flooding on „Willamette“ red raspberry, Acta Horticulturae, 262: 167-173.
- Broadbent, P., Baker, K. F., Waterworth, Y. (1971): Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils, Australian Journal of Biological Sciences, 24: 925-944.
- Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Đekić, I., Krstić, B. (2009): First report of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* sp. in Serbia, Plant Pathology, 58: 804.
- Bulajić, A. i Krstić, B. (2008): Standardna operativna procedura za fitopatološke dijagnostičke laboratorije za *Phytophthora ramorum*, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za fitomedicinu, Verzija 1.0.: 115.
- Buisman, C. J. (1927): Root rots caused by Phycomycetes. Pp. 51 in: Meded. Phytopathol. Lab. Univ. Utrecht, Willie Commelin Scholten. (Rev. Appl. Mycol. 6: 380).
- Carlile, M. J. (1983): Mortality, taxis, and tropism in *Phytophthora*, In: Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P. H. (eds.), *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*: 95-107.
- Carris, L. M. and Bristow, P. R. (1987): Absorption and translocation of metalaxyl in cabbage, red raspberry, and strawberry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 851-855.
- Causin, R., Scopel, C., Grendene, A., Montecchio L. (2005): An improved method for detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schöter in infected plant tissues using scar markers, Journal of Plant Pathology, 87 (1): 25-35.
- Clayton, C. M. and Haasis, F. A. (1964): Blueberry root-rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in North Carolina, Plant Disease Reporter, 48: 460-461.
- Cohen, S. D. and Vennette, R. C. (2005): Predicting the Potential for Establishment of *Phytophthora ramorum* in the Oak Forests of the North Central States, USA. Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our Knowledge, January 18–21, 2005, Monterey, California: 497 – 499.
- Converse, R. H. and Schwartz, C. D. (1968): A root rot of red raspberry caused by *Phytophthora erythroseptica*, Phytopathology, 58: 56-59.
- Converse, R. H. and Schwartz, C. D. (1965): *Phytophthora* sp. from Washington pathogenic on roots of red raspberry, Phytopathology, 55: 503.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes, Fungal Genetics and Biology, 30: 17-32.
- Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA, Mycological Research, 101: 667-677.
- Cother, E. J. and Griffin, D. M. (1974): Chlamydospore germination in *Phytophthora drechsleri*, Transaction of the British Mycological Society, 63: 273-279.
- Cother, E. J. and Griffin, D. M. (1973b): Formation of chlamydospores by *Phytophthora drechsleri*, Transaction of the British Mycological Society, 61: 379-383.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., Ousley, M. A. (1993): Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen, Applied and Environmental Microbiology, 59: 3899-3905.
- Davidović Gidas, J., Đurić, G., Micić, N. (2017): Fruit planting material structure produced in the Republic of Srpska (BiH) in the relation to the requirements of fruit producers, Zbornik referatov 4. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško: 265-272.
- Davidović, J. (2015): Uskladenost regulatornih okvira za rasadničku proizvodnju u Republici Srpskoj i Bosni i Hercegovini sa regulatornim okvirom Evropske Unije, Magistrski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci: 160.
- Daubeny, H. A. (1987): 'Chilliwick' and 'Comox' red raspberries, Horticultural Science, 22: 1343-1345.
- Deacon, J. W. and Donaldson, S. P. (1993): Molecular recognition in the homing responses of zoospore fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*, Mycological Research, 97: 1153-1171.
- de Silva, A., Patterson, K., Rothrock, C. and McNew, R. (1999): Phytophthora root rot of blueberry increases with frequency of flooding, HortScience, 34 (4): 693-695.
- DeVay, J. E. (1991): Historical review and principles of soil solarization, Pages: 1-15 in Soil solarization, J. E. DeVay, J. J. Stapleton and C. L. Elmore, eds. FAO Plant Protocol Bulletin.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson T. H. (1980): Compendium of soil fungi, Academic Press, London: 860.
- Donaldson, S. P. and Deacon J. W. (1993): Changes in motility of *Pythium* zoospores induced by calcium and calcium-modulating drugs, Mycological Research, 97: 877-883.
- Doster, M. A. and Bostock, R. M. (1988a): Incidence distribution and development of pruning wound canker caused by *Phytophthora syringae* in almond orchards in California, Phytopathology 78 (4): 468-472.
- Drechsler, C. (1931): A crown rot of hollyhocks caused by *Phytophthora megasperma* n. sp., Journal of the Washington Academy of Sciences, 21: 513-526.
- Duncan, J. M., (1990): *Phytophthora* species attacking strawberry and raspberry, EPPO Bulletin, 20: 107-115.
- Duncan, J. M. and Kennedy, D. M. (1989): The effect of waterlogging on phytophthora root rot of red raspberry, Plant Pathology, 38: 161-168.
- Duncan, J. M., Kennedy, D. M. and Seemüller E. (1987): Identities and pathogenicities of *Phytophthora* spp., causing root rot of red raspberry, Plant Pathology, 36 (2): 276-287.
- Duniway, J. M. (1983): Role of physical factors in the development of Phytophthora diseases, In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S and Tsao PH (eds) *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (pp. 175–187), American Phytopathological Society: 392.
- Ellis, M. A. (2008): *Phytophthora* Root Rot of Raspberry, Fact Sheet, Agriculture and Natural Resources, The Ohio State University: 3.
- Ellis, M. A., Converse, R. H., Williams, R. N., Williamson, B. (1991): Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects, American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota: 100.
- Ellison, C. E., Stajich, J. E., Jacobson, D. J., Natvig, D. O., Lapidus, A., Foster, B., Aerts, A., Riley, R., Lindquist, E. A., Grigoriev, I. V., Taylor, J. W. (2011): Massive Changes in Genome Architecture Accompany the Transition to Self-Fertility in the Filamentous Fungus *Neurospora tetrasperma*, Genetics, 189 (1), 55-69.
- EPPO (2017) <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>
- EPPO (2009): EPPO Reporting Service – Pest & Diseases, No.8: 16. www.eppo.org
- EPPO/CABI (1997): *Phytophthora fragariae*, Quarantine Pests for Europe. 2nd edition. Edited by Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M. CABI, Wallingford, UK: 1425
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996): *Phytophthora* Diseases Worldwide, The American Phytopathological Society Press, St Paul,

- Minnesota: 562.
- FAOSTAT (2016): <http://www.factfish.com/statistic/raspberriesproductionquantity>
- Filnow, A. B. and Lockwood, J. L. (1985): Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biocontrol agents of *Phytophthora* root rot of soybean, Plant Disease, 69: 1033-1036.
- Firringiceli, A., Otillar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Khan, Z., Redman, R. S., Fleck, N. D., Lindquist, E., Grigoriev, I. V., Doty, S. L. (2015): Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1, Frontiers Microbiology, 6: 978.
- Focke, W. O. (1910): Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. Bibliotheca Botanica, 17: 1-120.
- Focke, W. O. (1914): Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus. Bibliotheca Botanica, 17: 1-124.
- Gallegly, M. E. and Hong, C. (2008): *Phytophthora*, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota USA: 1-158.
- Goode, P. M. (1956): Infection of strawberry roots by zoospores of *Phytophthora fragariae*, Transactions of the British Mycological Society, 39: 367-377.
- Graberg, M. (1994): Raspberry root rot in Sweden, Vaxtskyddsnotiser, 58:116-117.
- Grünwald, N. J., Gross, E. M., Larsen, M. M., Press, C. M., McDonald, V. T., Blomquist, C. L., Thomas, S. L. (2008a): First Report of the European Lineage of *Phytophthora ramorum* on *Viburnum* and *Osmanthus* spp. in a California Nursery, Plant Disease, 92: 314.
- Grünwald, N. J., Kitner, M., McDonald, V., Gross, E. M. (2008b): Susceptibility of *Viburnum* to *Phytophthora ramorum*. Plant Disease, 92: 210-214.
- Halsall, D. M. (1976): Specificity of cytoplasmic and cell-wall antigens from four species of *Phytophthora*, Journal of General Microbiology, 94: 19-158.
- Hansen, E., Sutton, W., Parke, J., Linderman, R. (2002): *Phytophthora ramorum* and Oregon forest tree-one pathogen, three diseases, Sudden Oak Death, A Science Symposium (Abstract), Monterey (US):78.
- Harris, D. C. (1991): The *Phytophthora* diseases of apple, Journal of Horticultural Science, 66 (5): 513-544.
- Harrison, R. E., McNicol, R. J., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. (1998): Recent developments in *Phytophthora fragariae* var. *rubi* research at the Scottish Crop Research Institute, Acta Horticulturae, 505: 327-340.
- Haskell, G. (1961): Genetics and the distribution of the British Rubi, Genetica, 32: 118-132.
- Haskell, G. (1954): Correlated responses to polygenic selection in animals and plants, American Naturalist, 88: 5-20.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. (1995) In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (eight edition), CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Hayden, K. J., Rizzo, D., Tse, J., Garbelotto, M. (2004): Detection and Quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests Using Real - Time Polymerase Chain Reaction Assay, Phytopathology, 94: 1075 - 1083.
- Heiberg, N. (1995): Control of root rot of red raspberries caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, Plant Pathology, 44: 153-159.
- Heiberg, N., Duncan, J. M., Kennedy, D. M., Semb, L. (1990): Raspberry root rots in Norway, Proceedings of the 5th International Rubus-Ribes Symposium, Acta Horticulturae, 262: 189-191.
- Hickman, C. J. (1940): The red core root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae* n.sp. Journal of Pomology and Horticultural Science, 18: 89-118.
- Hill, A. E., Grayson, D. E. and Deacon, J. W. (1998): Suppressed germination and early death of *Phytophthora infestans* sporangia caused by pectin, inorganic phosphate, ion chelators and calcium-modulating treatments, European Journal of Plant Pathology, 104: 367-376.
- Ho, H. H. and Jong, S. C. (1993): *Phytophthora hibernalis* and *P. syringae*, Mycotaxon, 47: 439-460.
- Ho, H. H. and Jong, S. C. (1991): Species concepts of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri*, Mycotaxon, 40: 35-40.
- Ho, H. H. (1986): Notes on the Heterothallic behavior of *Phytophthora megasperma* from alfalfa, Mycologia, 78: 306-309.
- Hoashi-Erhardt, W. K., Moore, P. P., Windom, G. E. and Bristow, P. R. (2008): Field and greenhouse response of red raspberry genotypes to root rot, HortScience 43:1367-1370.
- Hughes, K. J. D., Giltrap, P. M., Barton, V. C., Hobden, E., Tomlinson, J. A., Barber, P. (2006) On - site real - time PCR detection of *Phytophthora ramorum* causing dieback of *Parrotia persica* in the UK, Plant Pathology, 55: 813.
- Ilieva, E., Arulappan, F. X., Pieters, R. (1995): *Phytophthora rubi* and crown rot of raspberry in Bulgaria, European Journal of Plant Pathology, 101: 623-626.
- Inman, A. J., Beales, P. A., Lane, C. R., Brasier, C. M. (2002): Comparative pathogenicity of European and American isolates of *Phytophthora ramorum* to leaves of ornamental, hedgerow and woodland under-storey plants in the UK. In: Sudden Oak Death Science Symposium: the State of Our Knowledge, 15-18 December, 2002, Monterey, CA, USA <http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymp/posters.html>, USDA-Forest Service and University of California, Berkeley, CA.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2004): Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu: 400.
- Ivanović, M., Korivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004): Primena molekularnih metoda u dijagnostici biljnih bolesti, Pesticidi i fitomedicina, 19: 223-231.
- Ivić, D., Fazinić, T. (2011): Certifikacijske sheme za proizvodnju sadnog materijala značajnih voćnih vrsta u Hrvatskoj, Pomologia Croatica, Vol. 17, br. 1-2: 31-36.
- Jeffers, S. N. and Caruso, F. L. (1995): *Phytophthora* root rot and runner rot, Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases, The American Phytopathological Society: 28-29.
- Johnson, F., Crandall, P. C. and Fisher, J. R. (1973): Soil fumigation and its effect on raspberry root rot, Plant Disease Report, 56: 467-470.
- Jones, S. W., Donalson, S. P., Deacon, J. W. (1991): Behaviour of zoospores and zoospore cysts in relation to root infection by *Pythium aphanidermatum*, New Phytologist, 117: 289-301.
- Kaminski, K., Wagner, S., Werres, S. (2007): Susceptibility of Selected Ornamental Plants to *Phytophthora ramorum*, Proceedings of the Sudden Oak Third Science Symposium, March 5-9, 2007, Santa Rosa, California. <http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/>
- Katan, J. (1981): Solar heating (solarization) of the soil for control of soilborne pests, Annual Review of Phytopathology. 19: 211-236.
- Kennedy, D. M. and Duncan, J. M. (1995): A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*, Mycological Research, 99: 57-68.
- Kennedy, D. M. and Duncan, J. M. (1991): Methods for assessing the resistance of raspberry genotypes to *Phytophthora* root rot, Plant pathology, 40: 387-394.
- Klebahn, H. (1909): Die neue Zweig- und Knospenkrankheit (A new twig and bud disease), Krankheiten flieders, Berlin, Page 18-75 (Cited in Tucker, 1931).
- Klebahn, H. (1905): Eine neue Pilzkrankheit der Syringen. (A new fungal disease of syringae), Zbl. Bakt. 15: 335-336 (Cited in Tucker, 1931).
- Klisiewicz, J. M. (1977): Identity and relative pathogenicity of some heterothallic *Phytophthora* species associated with root and stem

- rot of safflower, *Phytopathology*, 67: 1174-1177.
- Kloczko, M., Graf, H., Knesel, D. (1990): Untersuchungen zum Phytophthora –Himbeersterben und zu den Möglichkeiten seiner Bekämpfung, Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes, 9: 298-307.
- Knauss, J. S. (1976): *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Pythium* and *Phytophthora*, *Plant Disease Reporter*, 60: 846-850.
- Ko, W. H. (1978): Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction, *Journal of General Microbiology*, 107:15-18.
- Koprivica, M., Dulić-Marković, I., Jevtić R. and Cooke, D. E.L. (2009): Methods for detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* on raspberry, *Pesticidi i fitomedicina*, 24(3): 177-184.
- Krzanowski W. J. and Hand D. J. (2009): *ROC curves for continuous data*. Boca Raton, FL: CRC/Chapman and Hall., *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 20: 485-487.
- Lacourt, I., Bonants, P. J. M., Van Gent-Pelzer, M. P., Cooke, D. E. L., Hagenaar De Weerd, M., Surplus, L. and Duncan, J. M. (1997): The use of nested primers in the Polymerase Chain Reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry, *Acta Horticultura* 439, Vol. 2.: 829-838.
- Latorre, B. A. and Muñoz, R. (1993): Roor rot of red raspberry caused by *Phytophthora citricola* and *P. citophthora* in Chile, *Plant Disease*, Vol. 77, No. 7: 715-718.
- Lebert, H. and Cohn, F. (1870): On the rood of cactus stem, *Beitraege zur Biologie der Pflanzen*, 1: 51-57.
- Lilja, A. T., Parikka, P. K., Pääskynkivi, E. A., Hantula, J. I., Vainio, E. J., Vartiamaäki, H. A., Lemmetty, A. H., Vestberg, M. V. (2006): *Phytophthora cactorum* and *Colletotrichum acutatum*: Survival and Detection, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 71, No. 4: 121-128.
- Lim, T. M., Jerie, P., H. and Merriman, P. R. (1990): Evaluation of phosphonic (phosphorous) acid for controlling phytophthora crown and trunk rot of peach and apricot, *Australasian Plant Pathology*, 19: 134-136.
- Locci, R. (1994): Actinomycetes as plant pathogens, *European Journal of Plant Pathology*, 100: 179-200.
- Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S., Cooke, L. R. (1991): *Phytophthora*, British Mycological Society, Cambridge University press: 447.
- Lučić, P., Đurić, G., Micić, N. (1996): Voćarstvo I (Pomology I). Nolit, Agricultural Research Institute Serbia.
- Maas, J. L. (1984): Compendium of Strawberry Diseases, The American Phytopathological Society: 78-85.
- Maas, J. L. (1973): *Phytophthora fragariae* race characterization with gas-liquid chromatographic lipid analysis, *Mycologia*, 65: 1259-1265.
- Maloney, K., Pritts, M., Wilcox, W., Kelly, M. J. (2005): Suppression of *Phytophthora* root rot in red raspberries with cultural practices and soil amendments, *Horticultural Science*, 40 (6): 1790-1795.
- Maloney, K. E., Wilcox, W. F. and Sanford, J. C. (1993): Raised beds and metalaxyl for controlling phytophthora root rot of raspberry, *Horticultural Science*, 28: 1106-1108.
- Man in 't Veld, W. A. (2007): Gene flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* comb. nov., *Mycologia*, 99: 222 - 226.
- McKeen, W. E. (1958): Red stele root disease of the loganberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, *Phytopathology*, 48: 129-132.
- Merz, W. G., Burrell, R. G. and Gallegly, M. E. (1969): A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*, *Phytopathology*, 59: 367-370.
- Micić, N., Micić, G. (2016): Biološke osnove gajenja maline (*Rubus idaeus* L.), *Fructus*, Vol.1, Br.1: 3-18.
- Milholland, R. D. and Galletta, G. J. (1967): Relative susceptibility of blueberry cultivars to *Phytophthora cinnamomi*, *Plant Disease Reporter*, 51: 998-1001.
- Miller, S. A. and Martin, R. R. (1988): Molecular diagnosis of plant disease, *Annual Review of Phytopathology*, 26: 409-432.
- Mircetich, S. M and Matheron, M. E. (1976): Phytophthora root and crown rot of cherry trees, *Phytopathology*, 66: 549-558.
- Mišić, P. (1998): Malina, Beograd.
- Mišić, P., Nikolić, M. (2003): Jagodaste voćke, Beograd.
- Mohan, S. B. (1988): Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detection the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Plant Pathology*, 37: 20-216.
- Morris, B. M. and Gow, N. A. R. (1993): Mechanism of electrotoxis of zoospores of phytopathogenic fungi, *Phytopathology*, 83: 877-882.
- Nickerson, N. L. (1990): Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora fragariae* in Nova Scotia, *Strawberry newsletter* No. 4, Department of Agriculture and Marketing: 5.
- Nikolić, M., Milivojević, J. (2010): Jagodaste voćke tehnologija gajenja, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak: 592.
- Nikolić, M., Fotirić, M., Milivojević, J., Radivojević, D. (2006): Preliminary results of raspberry selection with yellow fruits, *Proceeding of International Conference of Perspectives in European Fruit Growing*, Ledice, Czech Republic: 197-201.
- Nishida, H., Matsumoto, T., Kondo, S., Hamamoto, M., Yoshikawa, H. (2014): The early diverging ascomycetous budding yeast *Saitoella complicata* has three histone deacetylases belonging to the Clr6, Hos2, and Rpd3 lineages, *Journal of General and Applied Microbiology*, 60 (1): 7-12.
- Nishida, H., Hamamoto, M., Sugiyama, J. (2011): Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*, *Journal of General and Applied Microbiology*, 57 (4): 243-246.
- Nourrisseau, J. G. and Baudry, A. (1987): Un *Phytophthora* cause de dépérissement du framboisier en France, *Phytoma*, 384: 39-41.
- Olsson, C. H. B. (1995): Diagnosis of *Phytophthora* infections in raspberry and strawberry plants by ELISA tests, *Journal of Phytopathology*, 143: 3017-310.
- Oudemans, P. V. (1999): *Phytophthora* species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey, *Plant Disease*, 83: 251-258.
- Oudemans, P., Forster, H. and Coffey, M. D. (1994): Evidence of distinct isozyme subgroups within *Phytophthora citricola* and close relationships with *P. capsici* and *P. citrophthora*, *Mycological Research*, 98: 189-199.
- Oudemans, P. and Coffey, M. D. (1991a): A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis, *Mycological Research*, 95: 1025- 1046.
- OEPP/EPPO (2006): Diagnostics *Phytophthora ramorum*, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 145-155.
- OEPP/EPPO (2005): Normes OEPP, EPPO Standards, Diagnostics, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 271-273.
- Patterson, D. J. and Sogin, M. L. (1992): Eukaryotic Origins and Protistan Diversity: 13-46. In: *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eucaryotic Cells*. Eds. H. Hartman and K. Matsuno. World Scientific, Singapore.
- Pegg, K. G., Whiley, A. W. and Hargreaves, P. A. (1990): Phosphonic (phosphorous) acid treatments control *Phytophthora* diseases in avocado and pineapple, *Australasian Plant Pathology*, 19: 122-124.
- Parke, J. L. and Lewis, C. (2007): Root and Stem Infection of Rhododendron from Potting Medium Infested with *Phytophthora ramorum*, *Plant Disease*, 91: 1265-1270.
- Pepin, H. S. (1967): Susceptibility of members of the Rosaceae to races of *Phytophthora fragariae*, *Phytopathology*, 57: 782-784.

- Pethybridge, G. H. (1913): On the rotting of potato tubers by a new species of *Phytophthora* having a method of sexual reproduction hitherto undescribed, The Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, 13: 529-565 (Cited in Tucker 1931).
- Pethybridge, G. H. and Lafferty, H. R. (1919): A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*, The Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, 15: 487-503 (Cited in Tucker 1931).
- Petri, L. (1917): Research on the morphology and biology of *Blepharospora cambivora*, a parasite from chestnut, Atti. R. Acad. Lincei. Rend. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Ser. 5, 26: 297-299 (see Waterhouse, 1956).
- Petrović, S., Leposavić, A. (2016): Malina, nove tehnologije gajenja, zaštite i prerade, Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
- Petrović, S., Leposavić, A. (2009): Savremena proizvodnja maline, Drugo izmijenjeno i dopunjeno izdanje, Institut za voćarstvo, Čačak.
- Petrović, S., Milošević, T. (2002): Malina, tehnologija i organizacija proizvodnje, drugo dopunjeno i izmijenjeno izdanje, Agronomski fakultet, Čačak.
- Petrović, S., Milošević, T. (1996): Uslovi i ograničenja za proizvodnju maline i kupine u Republici Srbiji, Savremena poljoprivredna tehnika, 22(3):140-146.
- Pinkerton, J. N., Ivors, K. L., Reeser, P. W., Bristow, P. R., Windom, G. E. (2002): The use of soil solarization for the management of soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production, Plant Disease, 86: 645-651.
- Raftoyannis, Y. and Dick, M. W. (2006): Effect of oomycete and plant variation on zoospore cover and disease severity, Journal of Plant Pathology, 88 (1): 95-101.
- Rands, R. D. (1922): Stripe canker of cinnaom caused by *Phytophthora cinnamomi* n. sp. (English version of: Streepkanker van Kaneel, veroorzaakt door *Phytophthora cinnamomi* n. sp.), Meded. Inst. voor Plantenziekten, Dep. Landb. Nijv. en Handel, No. 54.
- Raslich, M. A., Markert, R. J., Stutes, S. A. (2007): Odabir i tumačenje dijagnostičkih pretraga, Biochemia Medica, 17(2):151-161. <http://www.biochemia-medica.com/odabir-i-tumacenje-dijagnostickih-pretraga>
- Reeves, J. C. (1998): Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 33-39.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. and Parra, G. (1998): PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*, Applied and Environmental Microbiology, 64: 948-954.
- Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. And Koike, S. T. (2002): *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality in *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California, Plant Disease, 86: 205-214.
- Robideau, G. P., de Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C.-H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., Lévesque, C. A. (2011): DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer, Molecular Ecology Resources, Vol. 11, No. 6: 1002-1011.
- Rose, D. H. (1924): Leather rot of strawberries, Journal of Agricultural Research, 28: 357-376.
- Ross, R. G. and Gourley, C. O. (1969): *Phytophthora syringae* fruit rot of apples in Nova Scotia, Canadian Plant Diseases Survey, 49:33-35.
- Rossman A. Y. and Palm, M. E. (2006): Why are Phytophthora and other Oomycota not true Fungi?, Outlooks on Pest Management, 17: 217-219.
- Royle, D. J. and Hickman C. J. (1963): *Phytophthora cinnamomi* on highbush blueberry, Plant Disease Reporter, 47: 266-268.
- Sánchez Hernández M. E., Ruiz-Dávila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M. A., Trapero-Casas A. (1998): Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain, European Journal of Plant Pathology, 104: 347-357.
- Sawada, K. (1927): Descriptive catalogue of the Formosan fungi. Part III. (In Japanese.) Report of the Department of Agriculture Research Institute of Formosa, 27: 1-62. (Cited by Tucker, 1931).
- Scheer, W. P. A. and Garren, R. (1981): Commercial red raspberry production, Pacific Northwest Bulletin, 176: 32.
- Scherer, W. von and Riedel, M. (1990): Die Phytophthora-Wurzelaule der Himbeere, Obstbau, 10: 426 - 430.
- Schröter, J. (1886): Kryptogamen-Flora von Schlesien, Cramer, Lehre, 3-1(2): 129-256.
- Schlenzig, A., Cooke D. E. L., Chard, J. M. (2005): Comparison of a baiting method and PCR for detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in certified raspberry stocks, Bulletin OEPP/EPPPO, 35: 87-91.
- Schmitthenner, A. F. and Cannaday, C. H. (1983): Role of chemical factors in development of *Phytophthora* diseases, p. 189-198. In: Irwin, D. C. Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds.): *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Scott, D. H., Jeffers, W. E., Darrow, G. M. and Ink, D. P. (1950): Occurrence of strains of the strawberry red stele fungus *Phytophthora fragariae* Hickman, as shown by differential varietal response, Phytopathology, 40: 194-198.
- Secor, G. A. and Gudmestad, N. C. (1999): Managing fungal diseases of potato, Canadian Journal of Plant Pathology, 21: 213-221.
- Seemüller, E., Duncan, J. M., Kennedy, D. M., Riedel, M. (1986): A *Phytophthora* sp. causing root rot of raspberry, Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 38 (2): 17-21.
- Shahidi Bonjar, G. H., Barkhordar, B., Pakgohar, N., Aghighi, S., Biglary, S., Rashid Farrokhi, P., Aminaii, M., Mahdavi, M. J. and Aghelizadeh, A. (2006): Biological Control of *Phytophthora drechsleri* Tucker, the Causal Agent of Pistachio Gummosis, under Greenhouse Conditions by Use of Actinomycetes, Plant Pathology Journal, 5 (1): 20-23.
- Shishkoff, N. (2007): Persistence of *Phytophthora ramorum* in Soil Mix and Roots of Nursery Ornamentals, Plant Disease, 91:1245-1249.
- Siddiqi, R. M. (2000): Tylenchida Parasites of Plants and Insects, CABI Publishing 2nd Edition, UK: 813.
- Snowdon, A. L. (1990): Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, A Color Atlas of Postharvest Diseases. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, Volume 1.
- Spotts, R. A. (2002): First report of *Phytophthora syringae* causing rot on apples in cold storage in the United States, Plant Disease, Volume 86 (6): 693.
- Stapleton, J. J. and DeVay, J. E. (1982): Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings, Phytopathology, 72: 323-326.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., Hall, G. S. (1990): Revised tabular key to the species of *Phytophthora*, Mycological papers, CAB International, Wallingford Oxon, 162: 1-28.
- Stamps, D. J. (1978b): *Phytophthora cryptogea*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 592.
- Stewart, J. E., Kroese, D., Tabima, J. F., Larsen, M. M., Fieland, V. J., Press, C. M., Zasada, I. A., and Grünwald, N. J. (2014): Pathogenicity, fungicide resistance, and genetic variability of *Phytophthora rubi* isolates from raspberry (*Rubus idaeus*) in the Western United States, Plant Disease, Volume 98 (12): 1702-1708.
- Sutherland, E. D. and Papavizas, G. C. (1991): Evaluation of oospore hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of papper, Journal of Phytopathology, 131: 33-39.
- Suzuki, H., Macdonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., Henrissat, B., Wiebenga, A., Vankuyk, P. A., Barry, K., Lindquist, E., Labutti, K., Lapidus, A., Lucas, S., Coutinho, P., Gong, Y., Samejima, M., Mahadevan, R., Abou-Zaid, M., de Vries, R. P., Igarashi, K., Yadav, J. S., Grigoriev, I. V., Master, E. R. (2012): Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosus* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize, BMC Genomics, 13: 444.

- Tanaka, Y. and Omura, S. (1993): Agroactive compounds of microbial origin, *Annual Review of Microbiology*, 47: 57-87.
- Themann, K., Werres, S., Diener, H. A. and Lüttmann, R. (2002): Comparison of different methods of detecting *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries, *Journal of Plant Pathology*, 84: 41-50.
- Themann, K. and Werres, S. (1998): Use of rhododendron leaves to test for *Phytophthora* spp. in root and water samples, *Nachrichtenblatt Des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 50: 37-45.
- Tjosvold, S. A., Koike, S. T., Davidson, J. M., Rizzo, D. M. (2002c): Susceptibility of Azalea (*Rhododendron*) to *Phytophthora ramorum* [abstract], p. 86 in *Proceedings of Sudden Oak Death, A Science Symposium*, USDA Forest Service and University of California, Berkeley. <http://danr.ucop.edu/ihrmp/sodsymposium.html>
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., Hughes, K. J. D., Griffin, R. L., Barker, I. (2005): On – Site DNA Extraction and Real – Time PCR for Detection of *Phytophthora ramorum* in the Field, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6702 – 6710.
- Tooley, P. W. and Kyde, K. L. (2007): Susceptibility of some Eastern forest species to *Phytophthora ramorum*, *Plant Disease*, 91: 435-438.
- Tooley, P. W., Kyde, K. L., Englander, L. (2004): Susceptibility of selected Ericaceous ornamental host species to *Phytophthora ramorum*, *Plant Disease*, 88: 993-999.
- Tooley, P. W., Englander, L. (2002): Infectivity of *Phytophthora ramorum* on selected ericaceous host species, *Phytopathology*, 92: 81.
- Tucker, C. M. (1931): Taxonomy of the Genus *Phytophthora* de Bary, University of Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin: 153.
- Turhan, G. and Turhan, K. (1989): Suppression of damping-off on papper caused by *Pythium ultimum* Trow and *Rhizoctonia solani* Kühn by some new antagonists in comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai, *Journal of Phytopathology*, 126: 175-182.
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M., Dorrance, A. E., Dou, D., Dickerman, A. W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S. G., Govers, F., Grunwald, N. J., Huang, W., Ivors, K. L., Jones, R. W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K. H., Lee, M. K., McDonald, W. H., Medina, M., Meijer, H. J., Nordberg, E. K., Maclean, D. J., Ospina-Giraldo, M. D., Morris, P. F., Phuntumart, V., Putnam, N. H., Rash, S., Rose, J. K., Sakihama, Y., Salamov, A. A., Savidor, A., Scheuring, C. F., Smith, B. M., Sobral, B. W., Terry, A., Torto-Alalibo, T. A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., Boore, J. L. (2006): *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis, *Science* 313 (5791): 1261-1266.
- Valois, D., Fayad, K., Barasubiyé, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C. (1996): Glucanolytic Actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 5: 1630-1635.
- van West, P., Appiah, A. A., Gow, N. A. R. (2003): Advances in research on oomycete root pathogens, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 99-113.
- von Broembsen, S. L. and Deacon, J. W. (1997): Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions, *Phytopathology*, 87: 522-528.
- Warburton, A. J. and Deacon, J. W. (1998): Transmembrane Ca²⁺ fluxes associated with zoospore encystment and cyst germination by the phytopathogen *Phytophthora parasitica*, *Fungal Genetics and Biology*, 25: 54-62.
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and McCartney, H. A. (2004): Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches, *Annals of Applied Biology*, 145: 1-6.
- Wardlaw, C. W. (1926): Lanarkshire strawberry disease, A report for the use of growers, Botany Department, University of Glasgow: 38.
- Washington, W. S. (1988): *Phytophthora cryptogea* as a cause of root rot of raspberry in Australia; resistance of raspberry cultivars and control by fungicides, *Plant Pathology*, 37: 225-230.
- Waterhouse, G. M. and Waterston, J. M. (1966): *Phytophthora cactorum*, C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 111: 1-2.
- Waterhouse, G. M. and Waterston, J. M. (1964a): *Phytophthora syringae* Description of pathogenic fungi and bacteria, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England: 2.
- Waterhouse, G. M. (1963): Key to the species of *Phytophthora* de Bary, *Mycological Papers*, 92: 1-22.
- Waterston, J. M. (1937): A note on the association of a species of *Phytophthora* with a die-back disease of raspberry, *Transactions of the Botanical Society, Edinburgh*, 32: 251-259.
- Weller, D. M. (1988): Biological control of soilborne pathogens in the rhizosphere with bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Werres, S. and Kaminski, K. (2005): Characterisation of European and North American *Phytophthora ramorum* isolates due to their morphology and mating behaviour in vitro with heterothallic *Phytophthora* species, *Mycological Research*, 109: 860-871.
- Werres, S., Marwitz, R., Man i't Veld, W. A., de Cook A. W. A. M., Bonants, P. J. M., De Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E., Baayen, R. P. (2001): *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*, *Mycological Research*, 105: 1155-1165.
- Weste, G. (1983): Population dynamics and survival of *Phytophthora*, 237-257. In: Irwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds): *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: *PCR Protocol: A guide to methods and applications* (Innis, M. A., Gelhand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. ed.), Academic Press, San Diego, USA: 315 – 322.
- Wicks, T. and Hall, B. (1990): Evaluation of phosphonic (phosphorous) acid for the control of *Phytophthora cambivora* on almond and cherry in South Australia, *Australasian Plant Pathology*, 19: 132-133.
- Wilcox, W. F. and Latorre B. A. (2002): Identities and geographic distributions of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry in Chile, *Plant Disease*, 86: 1357-1362.
- Wilcox, W. F., Pritts, M. P., Kelly, M. J. (1999): Integrated control of *Phytophthora* root rot of red raspberry, *Plant Disease*, 83: 1149 – 1154.
- Wilcox, W. F., Pritts, M. P. and Kelly, M. J. (1999b): Integrated control of *Phytophthora* root rot of red raspberry, *Plant Disease*, 83: 1149-1154.
- Wilcox, W. F. and Duncan, J. M. (1993): *Phytophthora fragariae* Hickman var. *rubi* var. nova., *Mycological Research*, 97: 830.
- Wilcox, W. F., Scott, P. H., Hamm, P. B., Kennedy, D. M., Duncan, J. M., Brasier, C. M. and Hansen, E. M. (1993): Identity of *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America, *Mycological Research*, 97 (7): 817-831.
- Wilcox, W. F. (1989): Identity, virulence and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York, *Phytopathology*, 79 (1): 93-101.
- Wilcox, W. F. and Ellis, M. A. (1989): *Phytophthora* root rot and crown rots of peach trees in the Eastern Great Lakes region, *Plant Disease*, 73: 794-798.
- Wilcox, W. F. and Mircetich, S. M. (1987): Lack of host specificity among isolates of *Phytophthora megasperma*, *Phytopathology*, 77: 1132-1137.
- Wolf, D., Hartman, J. R., Brown, G. R., Strang, J. (1990): The influence of soil fumigation on strawberry yield and economics in black

- root rot infested fields, Applied Agriculture Research, 5:17-20.
- Xu-Chang and Morris, P. F. (1998): External calcium controls the developmental strategy of *Phytophthora sojae* cysts, Mycologia, 90: 269-275.
- Yamauchi, K., Kondo, S., Hamamoto, M., Takahashi, Y., Ogura, Y., Hayashi, T. and Nishida, H. (2015): Draft Genome Sequence of the Archiascomycetous Yeast *Saitoella complicata*, Genome Announcements, 3 (3): e00220-15.
- Yuan, W. M. and Crawford, D. L. (1995): Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots, Applied and Environmental Microbiology, 61: 3119-3128.
- Yuen, G. Y., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., and Hancock, J. G. (1991): Effects of soil fumigation with methyl bromide and chloropicrin on root health and yield of strawberry, Plant Disease, 75: 416-420.
- Zentmyer, G. A., Jefferson, L., Hickman, C. J., Yung, C. H. (1974): Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*, Mycologia, 66: 830-845.
- http://whatcom.wsu.edu/ag/comhort/com_berrys/phytophthora.htm
- <http://www.agdia.com>
- <http://www.neogeneurope.com>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- <https://gd.eppo.int/taxon/PHYTFU>
- <http://www.phytid.org/index.htm>

- 1) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и представити проблем, предмет, циљеве и хипотезе;
- 2) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан (водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету);
- 3) Навести допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања;
- 4) Навести очекиване научне и прагматичне доприносе дисертације.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

- 1) Анализе присуства и распрострањености проузроковача фитофторозе малине спроведене су у расадницима и у производним засадима малине на локалитетима Републике Српске: Братунац, Сребреница, Зворник, Бања Лука, Градишка, Приједор, Нови Град, Козарска Дубица, Теслић, Челинац, Модрича, Шипово, Рибник, Требиње, Рудо, Чајниче, Ново Горажде, Рогатица, Вишеград, Милићи, Шековићи, Осмаци, Бијељина и Корај у периоду од 2009. до 2016. године. За те потребе извршен је преглед и сакупљање узорака малине са симптомима који указују на присуство проузроковача фитофторозе малине у производним засадима, као и преглед и сакупљање узорака са и без симптома у расадницима у циљу редовне годишње контроле расадничке производње коју је спроводио Пољопривредни факултет као овлашћена институција. Поред тога, извршено је тестирање присуства патогена у земљишту у производним засадима и расадницима. Узорци земљишта су узимани из дијелова парцеле гдје су испољени симптоми сушења малине.
- 2) Да би се утврдило присуство и распрострањеност проузроковача фитофторозе малине рађене су: класичне методе (изолација патогена на различитим хранљивим подлогама, изолација патогена из земље употребом мамац биљака, одгајање чистих култура и стварање колекција, визуелни и микроскопски преглед мицелија, провјера теста патогености); серолошке методе (DAS ELISA са два различита комерцијална кита) и молекуларне методе (PCR) за детекцију патогена. Све наведене анализе урађене су у узорцима малине из производних засада и расадника и у узорцима земље. Такође је извршено секвенцирање одабраних изолата и похрањивање података у банку гена.
 1. Примјењиване методе истраживања су прописане ЕРРО стандардима за испитивање, што значи да су поуздане, тачне и валидиране, односно адекватне за ову врсту истраживања.
 2. Првобитним програмом истраживања било је планирано да се истраживање обави кроз три године, од 2009. до 2012. године. Међутим, стање на терену је указало да је проблем израженији него што се очекивало, те је због тога у току двије године, на приједлог Пољопривредног факултета, као пилот програм, уведен и програм посебног надзора над овим штетним организмом (2015. и 2016. година). Током тих прегледа извршено је додатно узорковање у циљу утврђивања распрострањености штетног организма, чије присуство је

потврђено у претходном периоду. Ово додатно истраживање је допринијело ваљаности резултата и дефинисању препоруке о неопходности увођења овог штетног организма на карантинску листу, односно потпуно је оправдано, имајући у виду дугорочне фитосанитарне и економске штете које овај организам наноси у производњи малине, али много значајније су штете које настају услед непостојања редовног програма надзора.

3. Истраживање је спроведено у дугом временском периоду. Испитивани параметри добијени анализом узорака кроз три групе лабораторијских метода (класичне, серолошке и молекуларне методе) дају довољно елемената за поузданост истраживања и доношење валидних закључака. Један од циљева је био успоставити ефикасне методе анализе узорака у лабораторијским условима, па је њихово увођење и провјера ефикасности захтијевала додатно вријеме. Такође је значајан дио рада базиран на отвореном пољу у засадима и расадницима, који су због промјењивости временских услова довеле до потребе за понављањем анализа. Ово је био разлог захтијева за продужетак рока за рад и писање докторске дисертације.
4. Обрада података је одговарајућа. Обрада података свих анализа је рађена у статистичком програму SPSS Statistics (The Software Package for Statistical Sciences) верзија 21.

- 1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- 2) Дати кратак увид у применијени метод истраживања при чему је важно оцијенити следеће:
 1. Да ли су применијене методе истраживања адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
 2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
 3. Да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
 4. Да ли је статистичка обрада података адекватна.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

- 1) Симптоми надземног дијела малине је резултат пропадања (труљења) коријеновог система, али исти или слични симптоми могу бити посљедица неких абиотских фактора: гушење коријеновог система услед високог нивоа подземне воде, збијености земљишта, ниске зимске температуре или присуства других штетних организама. Визуелним прегледом садног материјала у расадницима није евидентирано постојање карактеристичних симптома на малини који би указивали на појаву болести. Осим појаве неуједначеног пораста садница, што може бити посљедица великог броја различитих фактора, остали симптоми који се везују за *Phytophthora* spp. нису били видљиви. Због тога је прецизну потврду фитифторозе малине било могуће добити тек након лабораторијског тестирања. Изолација патогена из биљног материјала или из земљишта на хранљиву подлогу као класични пут дијагнозе је једноставна и јефтина метода и не захтијева скупу опрему, али с друге стране постоје бројни недостаци: захтијева интензиван рад, постоји могућност контаминације другим гљивама и псеудогљивама, као и дуго трајање теста. Други значајан недостатак класичних метода је непоузданост јер се многи микроорганизми тешко могу разликовати на основу морфолошких или других показатеља који су често промјенљиви под утицајем услова спољашње средине. Детекција гљива серолошким методама које се заснивају на ензимским реакцијама (DAS ELISA), има своје предности као што су тестирање великог броја узорака истовремено, а временски је мање захтјевна у односу на класичне методе. Могуће је добити резултате након 2-3 дана, што убрзава лабораторијски поступак када се ради о великом броју узорака. Ипак, ова метода има своје негативне особине и није

потпуно поуздана јер се јавља недостатак сензитивности и специфичности, а такође постоји могућност унакрсне реакције са другим врстама.

Молекуларне методе се примјењују за детекцију патогена у биљном материјалу са испољеним симптомима, и у условима латентне инфекције. Неостатак молекуларних метода је цијена коштања анализе узорка, али зато има низ предности што се прије свега односи на скраћивање времена трајања анализе, прецизна сензитивност и специфичност која се постиже коришћењем специфичног пара прајмера. Молекуларне методе у овом истраживању су коришћене и за детекцију патогена након изолације из земљишта засијавањем на хранљиву подлогу. Ово је међутим и разлог да не треба занемаривати класичне методе, које требају бити саставни дио лабораторијских анализа чак и кад се ради о савременим приступима.

Два изолата у 2010. години и 12 изолата у 2017. години су послани на секвенцирање и сви су идентификовани као врста *Phytophthora rubi*. Тиме је први пут на територији Републике Српске и БиХ потврђено присуство *Phytophthora rubi*, најзначајнијег земљишног проузроковача болести малине у свијету.

2) Добијени резултати су јасно приказани, правилно и логично тумачени, кроз упоређивања са резултатима других аутора. Сазнања до којих се дошло кроз истраживање су веома добро смјештена у контексту литературе која описује сличну проблематику. Кандидат је јасно образложио како добијена достигнућа доприносе рјешавању одређене проблематике, и значај самих достигнућа са научног и практичног аспекта.

3) Најзначајнији резултати научног истраживања су:

- Ово је први налаз присуства *Phytophthora rubi* на територији РС и БиХ, која је и у свијету најзначајнији земљишни проузроковач болести малине.
- Детектовање фитопторозе малине на основу симптома није прецизно, те захтијева лабораторијску анализу, а најосјетљивије и најпоузданије су се показале молекуларне методе.
- Резултати указују на неопходност да се *Phytophthora rubi* уврсти на карантинску листу штетних организама на нивоу РС и БиХ.
- Успостављен је валидан протокол у лабораторијском комплексу Пољопривредног факултета за потребе спровођења програма посебног надзора над овим штетним организмом.

1) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;

2) Оцијенити да ли су добијени резултати јасно приказани, правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;

3) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

- 1) Дисертација кандидата мр Биљане Лолић обрађује улогу псеудогљива рода *Phytophthora* у сушењу и пропадању малине на територији Републике Српске. Прегледом доступне литературе утврђено је да нема података о успјешном сузбијању проузроковача фитопторозе малине, јер појединачне методе заштите нису ефикасне, тако да је најбоља стратегија формирање програма интегралне производње гдје би се укључиле све практичне расположиве мјере. Истраживање је обављено у лабораторијским и пољским условима, који обухватају производне засаде и расаднике отвореног и затвореног типа. У лабораторију су уведене: класичне, серолошке и молекуларне методе за

детекцију патогена у узорцима биљног материјала и у узорцима земљишта, као и секвенцирање одабраних изолата и похрањивање података у банку гена. Сви изолати су идентификовани као врста *Phytophthora rubi*, што је уједно и прва потврда овог патогена на подручју Републике Српске и БиХ. Ови резултати су прослијеђени надлежним институцијама за приједлогом да се овај штетни организам уврсти на карантинску листу.

Дисертација је јасно написана и логично документована. Резултати су јасно дефинисани, а постављена хипотеза је јасно аргументована. Закључак потврђује да је циљ истраживања успјешно реализован. Најважнији резултати истраживања су представљени на већем броју националних и интернационалних научних скупова, што је дато у прилогу овог извјештаја.

Дисертација представља висок ниво оригиналног научног рада. Провјером оригиналности дисертације, у складу са интернима актима Универзитета потврђен је индекс сличности 4%.

2) На основу спроведеног увида, анализа и закључака, Комисија једногласно предлаже Научно-наставном вијећу Пољопривредног факултета у Бањој Луци да прихвати овај позитиван извјештај и исти прослиједи у даљу процедуру Сенату Универзитета у Бањој Луци те да се кандидату одобри јавна одбрана.

1) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;

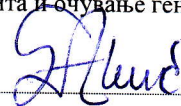
2) На основу укупне оцјене дисертације комисија предлаже:

- да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана,
- да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни или измијени) или
- да се докторска дисертација одбија.

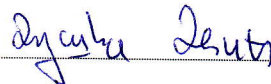
Датум: Бања Лука и Чачак,
12. 4. 2018. година

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

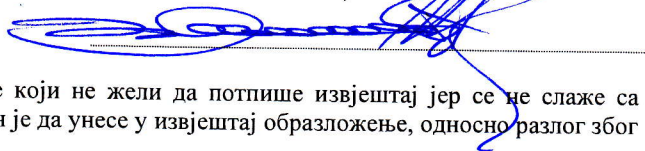
1. Проф. др Гордана Ђурић,
редовни професор Пољопривредног факултета,
Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област:
Хортикултура и Заштита и очување генетичких
ресурса, председник



2. Проф. др Душка Делић,
ванредни професор Пољопривредног факултета,
Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област:
Заштита здравља биљака и агроекологија,
ментор



3. Проф. др Драго Милошевић,
редовни професор Агрономског факултета у
Чачку, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна
област: Заштита биља, члан



ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем
да је докторска дисертација

Наслов рада Улога комплекса *Phytophthora* spp. у сушењу и пропадању малине у
Републици Српској

Наслов рада на енглеском језику The role of *Phytophthora* spp. complex in raspberry drying
and decaying in the Republic of Srpska

- ☒ резултат сопственог истраживачког рада,
- ☒ да докторска дисертација, у цјелини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- ☒ да су резултати коректно наведени и
- ☒ да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци, дана 03.7.2018. године

Потпис докторанта

Билана Ковић

Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом Улога комплекса *Phytophthora spp.* у сушењу и пропадању малине у Републици Српској која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

Докторску дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

- ☒ Ауторство
- ☐ Ауторство – некомерцијално
- ☐ Ауторство – некомерцијално – без прераде
- ☐ Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- ☐ Ауторство – без прераде
- ☐ Ауторство – дијелити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Бањој Луци, дана 03.07.2018. године

Потпис докторанта

Билана Лопић

Изјава 3

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора	Биљана Лолић
Наслов рада	Улога комплекса <i>Phytophthora</i> spp. у сушењу и пропадању малине у Републици Српској
Ментор	Проф. др Душка Делић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 03.7.2018. године

Потпис докторанта

Биљана Лолић