

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Institutt for plantevitenskap

Masteroppgave 2014  
30 stp

# **Kartlegging av *Phytophthora* i vann og vassdrag i områder i og rundt byer og tettsteder på Sunnmøre**

Margit Otterlei

# Forord

Denne oppgaven ble skrevet som en del av mastergradstudiet ved Institutt for Plantevitenskap (IPV) ved Norges Mijø- og Biovitenskaplige Universitet (NMBU), Ås. Feltforsøkene ble utført på Sunnmøre, i Ålesund, Ulsteinvik, Fosnavåg og Ørsta. Laboratoriearbeidet ble utført ved Bioforsk Plantehelse, Ås.

Jeg vil først og fremst takke forsker Venche Talgø for konstruktive tilbakemeldinger og raske avgjørelser, godt driv, initiativ og god hjelp. Takk til Maria Luz Herrero som kan svare på ethvert spørsmål om *Phytophthora* uten å måtte tenke seg om og til Arne Stensvand som veileder på en faglig og profesjonell måte og alltid med et smil på lur. Og så stor takk til energibunten Trude Slørstad som tryller praktiske løsninger ut av ermet.

Så vil jeg takke min familie som har gitt meg muligheten til å følge mine drømmer.

Norges Mijø- og Biovitenskaplige Universitet

Ås, den 15. mai 2014

Margit Otterlei

# Sammendrag

Undersøkelsene for å påvise *Phytophthora* ble i hovedsak gjennomført ved bruk av blader av *Rhododendron* 'Cunninghams White' som agn i vann og vassdrag. På engelsk heter metoden "baiting", et vanlig innarbeidd uttrykk i det norske fagmiljøet, og derfor brukt i teksten i denne oppgaven. Det ble baitet i 4 kommuner på Sunnmøre; Ålesund, Ulstein, Herøy og Ørsta.

I denne undersøkelsen ble det valgt å kartlegge *Phytophthora* ved hjelp av baiting i vann og vassdrag rundt byer og tettsteder på Sunnmøre. Området ble valgt fordi tilsvarende undersøkelser ikke hadde blitt gjennomført tidligere i dette området. I tillegg til baiting ble det også tatt ut en jordprøve og vevsprøver fra trær som viste symptomer på angrep av *Phytophthora*. Isolater ble grupperte etter morfologisk karaktertrekk og et utvalg isolater ble identifisert ved hjelp av DNA-analyse, nærmere bestemt ved sekvensering av ITS (Internal Transcribed Spacer) området.

Det ble påvist 6 arter av *Phytophthora* og 1 art *Halophytophthora*. De påviste *Phytophthora*-artene var *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. riparia*, *P. taxon PgChlamydo*, *P. cambivora* og en ukjent *Phytophthora*-art som fikk navnet *Phytophthora* sp. Ørsta, etter stedet den ble funnet. *P. cambivora* ble kun isolert fra stammen av en blodbøk, (*Fagus sylvatica* 'Atropunicea') *Halophytophthora* sp. var en ukjent art som ble påvist i brakkvann i Ålesund kommune. Videre undersøkelser av *Halophytophthora* ble ikke utført i denne oppgaven.

I Ålesund kommune ble det lagt ut bait en gang i måneden i juni, august og oktober 2013. Ved de øvrige uttakstedene ble det kun foretatt et utlegg, i august 2013. Det ble funnet *Phytophthora* på 17 av 20 uttaksteder i Ålesund kommune, noe som utgjør 85 % av lokalitetene. De påviste artene var *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. riparia*, *P. taxon PgChlamydo*, *P. cambivora* og *Halophytophthora*. I Ulstein og Herøy ble det kun påvist *P. gonapodyides*. I Ørsta kommune ble det påvist *P. gonapodyides* og den hittil ukjente arten *Phytophthora* sp. Ørsta.

# Abstract

This *Phytophthora*-survey was mainly carried out by baiting with leaves from *Rhododendron* 'Cunninghams White' in ponds, rivers and lakes in 4 municipalities in the area of Sunnmøre, in northwestern Norway. No such studies have previously taken place in this area before. In addition to baiting, a soil sample and samples from symptomatic trees were analyzed for *Phytophthora*. Selected isolates were sequenced using Internal Transcribed Spacer (ITS) regions.

A total of 6 species of *Phytophthora* and one species from the genus *Halophytophthora*, were found. The *Phytophthora* species were *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. riparia*, *P. taxon* PgChlamydo, *P. cambivora* and a not yet identified species of *Phytophthora* preliminary was named *Phytophthora* sp. Ørsta after the municipality where it was found. *P. cambivora* was only isolated from stem tissue from a copper beech (*Fagus sylvatica* 'Atropunicea'), not by baiting. The *Halophytophthora* species was also an unknown species (no match in the GenBank). It was found in brackish water in Ålesund municipality. Further studies of the *Halophytophthora* sp. were not a part of this thesis.

In Ålesund municipality, baiting was carried out 3 times during the season, in June, August and October 2013. In the remaining municipalities, Ulstein, Herøy and Ørsta, fewer baits were used and baiting was only performed in August 2013. *Phytophthora* was isolated from 17 of 20 locations in Ålesund municipality, which represents 85 % of the sites. There *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. riparia*, *P. taxon* PgChlamydo, *P. cambivora* and *Halophytophthora* sp. were found. In Ulstein and Herøy municipalities, only *P. gonapodyides* was found. In Ørsta, *P. gonapodyides* and the yet unknown species *Phytophthora* sp. Ørsta were detected.

# Innholdsfortegnelse

Forord.....	i
Sammendrag .....	ii
Abstract.....	iii
<b>1. Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Teori og litteratur.....</b>	<b>2</b>
2.1. HISTORIE .....	2
2.2. TAXONOMI .....	3
2.3. BIOLOGI.....	4
2.3.1. Formering.....	4
2.3.2. Hybridisering .....	6
2.4. SPREDNING .....	7
2.5. SYMPTOMER.....	8
2.6. PRØVEUTTAK.....	9
2.6.1. Baiting i vann.....	9
2.6.2. Jordprøver .....	10
2.6.3. Plantemateriale .....	11
2.6.4. Vannfiltrering.....	11
2.7. BEKJEMPELSE .....	12
2.7.1 Forebyggende tiltak .....	12
2.7.2. Kjemisk bekjempelse .....	13
<b>3. Materialer og metoder .....</b>	<b>15</b>
3.1 MATERIALER.....	15
3.2. METODER .....	15
3.2.1. Baiting i vann.....	16
3.2.2. Bating fra jordprøver .....	17
3.2.3. Isolering fra plantemateriale .....	18
3.3. IDENTIFISERING.....	19
3.3.1. Morfologisk .....	21
3.3.2. Molekylært .....	23
3.4. PATOGENITETSTEST .....	24
3.5. MORFOLOGISKE UNDERSØKELSER .....	25
3.5.1 Veksthastigheter .....	25

3.5.2. Ukjønna strukturer i vann .....	26
3.5.3. Ukjønna strukturer i agar .....	27
3.5.4. Dannelse av kjønna strukturer med kryssningstyper .....	27
3.6. BESKRIVELSE AV UTTAKSTEDENE .....	27
3.6.1. Ålesund, Ålesund kommune .....	27
3.6.2. Ulsteinvik, Ulstein kommune .....	32
3.6.3. Fosnavåg, Herøy kommune .....	33
3.6.4. Ørsta, Ørsta kommune .....	33
4. Resultater .....	35
4.1. IDENTIFISERING .....	35
4.1.1. Morfologisk .....	36
4.1.2. Molekylært .....	37
4.2. PATOGENITETSTEST .....	44
4.3. MORFOLOGISKE UNDERSØKELSER .....	44
4.3.1. Veksthastigheter .....	44
4.3.2. Ukjønna strukturer i vann .....	45
4.3.3. Ukjønna strukturer i agar .....	49
4.3.4. Kjønna strukturer i vann .....	49
4.3.5 Kjønna strukturer i agar .....	49
5. Diskusjon .....	52
6. Litteraturliste .....	58

# 1. Innledning

Siden Heinrich Anton de Bary beskrev og satte navn på den første arten av *Phytophthora*; *Phytophthora infestans* de Bary 1876 (Zentmyer et al. 1983) er det beskrevet over 120 arter i slekta *Phytophthora* (Kroon et al. 2012; Scott et al. 2013). Særlig i de siste 20-30 årene har antall beskrevne *Phytophthora*-arter steget raskt og forårsaket sykdom på en rekke planter, både lignoser og urter, og mange av disse er både økonomisk og økologisk viktige planter. Antall vertplanter for *Phytophthora*-artene varierer sterkt. For eksempel har *P. ramorum* vertplanter i over 21 plantefamilier (Herrero & Sletten), og *P. cinnamomi* er parasitt på mer enn 1000 plantearter (Erwin & Ribeiro 1996). Mens for eksempel *P. alni*, kun angriper arter av or (*Alnus* spp.) (Brasier et al. 2004).

Global handel med planter og plantemateriale er anerkjent som årsak til spredning av *Phytophthora*, og skadegjøreren har dermed spredd seg med menneskelig hjelp langt ut over det som er dens naturlige spredningspotensiale (Goss et al. 2009; Moralejo et al. 2009). Dette så en første gang ved hungersnøden i Irland i 1845-1850 da potettørråte (*P. infestans*) ble innført til Europa fra Sør-Amerika med potetknoller. Selv i dag er potettørråte et problem i potetdyrkingen både i Norge og på verdensbasis, og aggressiviteten har vært økende de senere årene (Erwin & Ribeiro 1996).

En har ved flere anledninger sett at *Phytophthora*-arter har etablert seg under oppal i planteskoler og andre produksjonssteder, spredd seg derfra med smittet plantemateriale, jord og/eller emballasje til beplantede områder (grøntanlegg o.a.) og deretter videre til vill flora hvor de har forårsaket store økologiske endringer (Gibbs et al. 1999; Rizzo et al. 2002). "Sudden Oak Death" som er forårsaket av *P. ramorum* har ført til eikedød (*Quercus* spp. og *Lithocarpus densiflorus*) i store områder i USA. *P. ramorum* var en av de første *Phytophthora*-artene som ble påvist i grenseområdene mellom urbane og ville habitater (Gibbs et al. 1999; Jung & Blaschke 2003; Rizzo et al. 2002).

Både *P. infestans* og *P. ramorum* er blant de få *Phytophthora*-artene som kan spre seg raskt lokalt ved hjelp av luftbårne sporer. De fleste plantepatogene artene i denne slekten spres ved hjelp av vannbårne sporer. Angrep av *Phytophthora* er derfor ofte synonymt med jord som er vass-sjuk; myrområder, flomområder eller vegetasjon ved elver og innsjøer (Gibbs et al. 1999; Newton et al. 2010; Szabó et al. 2000).

Det er vanskelig å finne effektive tiltak mot denne skadegjøreren når den først har etablert seg, og det er all grunn til å anta at det skadeomfanget en ser av *Phytophthora* i dag vil øke i takt med økende plantehandel.

I Norge har det ved flere anledninger blitt funnet *Phytophthora* på importerte pryddplanter. Infiserte planter har også stått til salgs ved hagesenter der deler av partiene allerede har blitt solgt. Vi regner med at smitte fra slike sjuke planter er opphavet til spredning av *Phytophthora* til urbane skoger både i Stavanger- og Larvik-området. Det er gjennomført kartlegging av spredning av *Phytophthora* i urbane skoger og vassdrag både i Rogaland, Hordaland og Vestfold (Talgø et al. 2012a; Telfer 2013). Med unntak av påvisning av *P. gonapodyides* på en bøk (*Fagus sylvatica*) i byparken i Ålesund (Talgø 2012) har det ikke tidligere vært gjennomført systematisk kartlegging av *Phytophthora* så langt nord som på Sunnmøre. I denne masteroppgaven ble det derfor kartlagt utbredelse av *Phytophthora* i vann og vassdrag i og rundt tettsteder og bynære områder på Sunnmøre, i tillegg ble noen få jord- og planteprøver analyserte.

Hypotesen det ble arbeidet ut fra i oppgaven var at *Phytophthora* er utbredt i vann og vannveier på Sunnmøre.

## 2. Teori og litteratur

### 2.1. HISTORIE

Den første arten av *Phytophthora* som ble beskrevet, var *P. infestans* (Mont.) de Bary. Charles Montagne, en pensjonert fransk militærlege, beskrev arten som *Botrytis infestans* på et møte i Society Philomatique i Paris den 30. august 1845. I 1876 beskrev den tyske forskeren Anton de Bary livssyklusen (Dowley 1997) og ga den navnet *Phytophthora infestans* (Zentmyer et al. 1983). *P. infestans* var den første *Phytophthora*-arten som ble beskrevet og er ennå betegnet som en notorisk planteødelegger, snart 170 år etter at den forårsaket hungersnød i Irland ("The Irish Famine"). Selv i dag står den for årlige ødeleggelse anslått 1 milliard € i EU (Haverkort et al. 2008), og den ligger på topp 10 lista over plantepatogener som truer verdens matsikkerhet (Pennisi 2010). Senere har *P. ramorum* forårsaket store økologiske ødeleggelse av eik og *L. densiflorus* i USA, kjent som "Sudden oak death", og lerk (*Larix kaempferi*) i Storbritannia. Videre ser en stadig nye ødeleggelse på avlinger, grøntanleggsplanter og skogsområder forårsaket av andre *Phytophthora* (Brasier et al. 2002; Brasier et al. 2005; Gibbs et al. 1999; Hansen 2007; Jung & Blaschke 2003; Saude et al. 2008; Talgø et al. 2010; Tucker & Milbrath 1942). En annen art, *P. cinnamomi*, blir kalt en biologisk bulldoser. Av knappe 6000 undersøkte plantearter ble nesten 2300 klassifisert som mottakelige



eller lett mottakelige for *P. cinnamomi* (Shearer et al. 2004). For 20 år siden ble det årlige økonomiske avlingstapet i Australia anslått til å være over 200 milliarder australske dollar (Cahill et al. 1993). *P. cinnamomi* befinner seg på topp 100 lista over verdens verste fremmede arter (GISD 2014).

Flere arter i slekten *Phytophthora* har etterhvert blitt beskrevet. Særlig har den teknologiske utviklingen av molekylære metoder de siste 20-30 årene gjort artsbestemmelsen enklere og mer presis. Antall arter passerte 121 i 2012 og øker hvert år (Scott et al. 2013).

## 2.2. TAXONOMI

Slekten *Phytophthora* hører til riket Stramenopila, rekke Oomycota, klasse Oomycetes, orden Peronosporales og familie Pythiaceae.

*Phytophthora* ble frem til midten av 1980-tallet ført til soppriket (Myceteae). Fordi Oomycetes etter hvert viste seg å være forskjellig fra ekte sopp, passet de ikke inn i soppriket (Cavalier-Smith 1986). *Phytophthora* ble derfor overført til det nye riket, Chromista (Erwin & Ribeiro 1996), men har deretter blitt overført en gang til, nå til riket Stramenopila (Dick 2001), hvor slektskap kan ses blant annet på grunn av zoosporenes hår (stramenopiler) på svømmetrådene (flagellene).

På grunn av likhetstrekk med sopp blir *Phytophthora* ofte omtalt som pseudosopp. Både sopp og pseudosopp danner mycel av hyfer og utvikler sporer. Morfologisk sett er likheten stor, men forskjellene er påfallende utviklingsmessig. Arter i riket Stramenopila er mer beslektet med alger og grønne planter enn dyr, mens arter i soppriket er mer beslektet med dyr. Dette ser en blant annet i oppbyggingen av celleveggene. Soppenes cellevegger består hovedsaklig av kitin, mens pseudosoppene har mest cellulose og glukose i celleveggene. Sopp har vanligvis haploide cellekjerner i vegetativ fase (somatiske celler), mens *Phytophthora* vanligvis har diploide cellekjerner i den same fasen. Unntak fra dette er for eksempel *P. infestans* som er triploid. Ved kjønnnet formering dannes det haploide, uninukleære gameter hos sopp og dyr, mens det hos *Phytophthora* dannes haploide, flerkjernede oogonier og antheridier (Kroon 2010).

*Phytophthora* er nært beslektet med bladskimmel og *Pythium*, som begge tilhører ordenen Peronosporales. Bladskimmel, den mest avanserte organismen innen oomyceter ernærer seg kun på levende celler og er dermed en obligat parasitt. *Pythium* lever hovedsakelig av dødt plantemateriale (nekrotroft levesett), mens *Phytophthora* ernærer seg først på levende vertceller (biotrof fase), deretter på dødt vev (nekrotrof fase), altså et hemibiotroft levesett (Thines 2013). Nekrotrofe arter dreper verten før de kan ernære seg av den, mens saprofyttiske arter koloniserer

verten etter at den er død og er ikke med på å drepe den. Det blir diskutert om noen *Phytophthora*-arter også har saprofyttisk levesett (Hüberli et al. 2013).

Lenge ble klassifisering og identifisering basert på Waterhouse (Waterhouse 1963) arbeid, hvor artene var inndelt etter morfologi i 6 grupper med vekt på sporangienes papill, krysningstyper og antheridienes feste til oogoniet. Denne metoden krevde mykologer med lang erfaring og ga store utfordringer når nye arter skulle beskrives og plasseres. Isolater med avvikende egenskaper og/eller morfologi var særlig vanskelige å bestemme. Denne metoden ble senere justert av Stamps og Waterhouse med flere i 1990 (Stamps et al. 1990).

DNA-sekvensering ga nye muligheter for identifisering og klassifisering av *Phytophthora*-arter, og en samlet fylogenetisk oversikt (slektstre) basert på ITS-området ble utarbeidd for over 50 beskrevne arter (Cooke et al. 2000). Artene ble delt inn i 8 slektsgrupper ("Clades" på engelsk) og det ble åpnet for at det var behov for 2 grupper til, men nærmere undersøkelser måtte foretas for å bekrefte dette. Blair (Blair et al. 2007) bekreftet inndelingen i 10 Clades.

I "The genus *Phytophthora* Anno 2012" (Kroon et al. 2012) oppsummeres alle de hittil kjente *Phytophthora*-artene i "The genus *Phytophthora* Anno 2012". Oppsummeringen ble i hovedsak basert på "Phytophthora diseases worldwide" (Erwin & Ribeiro 1996), "A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes" (Cooke et al. 2000) og "A multilocus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences" (Blair et al. 2007). Det er denne inndelingen, med 10 Clades som blir brukt i oppgaven.

## **2.3. BIOLOGI**

### 2.3.1. Formering

*Phytophthora* kan formere seg både kjønna og ukjønna. I noen arter er det ikke funne kjønna strukturer og hos andre arter er de kjønna strukturene kun observert i forsøk.

Ukjønna formering (mitose) danner klamydosporer og sporangier som produserer zoosporer. klamydosporene er vanligvis kuleformede (sferiske) og kan være pigmenterte når de eldes. Klamydosporer kan spire og danne mycel eller sporangier. For arter uten kjønna formering sørger klamydosporene for overlevelse i perioder uten vertplanter eller under ugunstige forhold (Kroon 2010).

Zoosporene frigjøres fra sporangiene. De er biflagellate, mobile og blir trukket til vertplantens fine røtter av plantenes roteksudater, stoffer som skilles ut fra planterøttene. Ved vertplanten vil zoosporen trekke tilbake eller kaste flagellene og danne en cyste. Cysten spirer ved å danne en spireslange, deretter dannes det et appressorium hvor en infeksjonspigg dannes og denne trenger inn gjennom hudlaget (epidermis) og videre inn i bladet til mesofyllet. I røtter trenger den gjennom eksoderm eller periderm i forkorkede (suberiniserte) røtter. Deretter dannes det haustorium, et nettverk inne i vertplanten som gjør parasitten i stand til å ta opp næring fra planten til videre vekst og utvikling (Erwin & Ribeiro 1996; Judelson & Blanco 2005). Hyfene vokser både mellom plantecellene (intercellulært) og inne i plantecellene (intracellulært) (Jung 2011).

Hyfene er glatte, koralloide til irregulære eller med oppsvulminger ("hyphal swellings") og er uten skillevegger (septa), men oogoniene og antheridiene skilles fra mycelet med septa (Jung 2011; Kroon 2010).

Sporangiene dannes på stilker, sporangioforer, og disse kan fortsette å vokse gjennom gamle, tomme sporangier ("extended" eller "internal nested proliferation"), eller de kan forgrene seg under et gammelt sporangium ("external proliferation") og fortsette å vokse derfra. Sporangienes form og størrelse er svært varierende. De kan for eksempel være sfæriske, ovoide, ellipsoide, pyriforme eller papillate og de kan også variere i form innenfor samme art. Sporangier kan holdes tilbake i hyfene ("non-caducous") eller lett avsnøres og dermed spres lett med vind og vann ("caducous"). De fleste artene spres med jordvann og har "non-caducouse" sporangier, men noen få arter har "caducouse" sporangier, for eksempel *P. ramorum* (Werres et al. 2001), *P. kernoviae* (Brasier et al. 2005), *P. infestans* (Erwin & Ribeiro 1996) samt en variant av *P. alni* subsp. *uniformis* funnet i Alaska (Adams et al. 2008). Disse artene spres derfor også via luft og vannsprut (Erwin & Ribeiro 1996).

Artene er enten homotalliske eller heterotalliske. I homotalliske arter finner en kjønnstrukturer når arten er i renkultur, det vil si uten andre arter av *Phytophthora* tilstede, mens heterotalliske arter ikke danner kjønnstrukturer i renkulturer. De heterotalliske artene har 2 krysningstyper ("mating types"),  $A_1$  og  $A_2$ . Når disse blandes, utveksles hormonell kommunikasjon, og kjønnstrukturer dannes. Eksempelvis er *P. infestans* og *P. ramorum* heterotalliske arter og begge krysningstypene må være tilstede for å danne oosporer, kjønne hvilespor. Krysningstypene trenger ikke å være fra samme *Phytophthora*-art. Eksempler på homotalliske arter er *P. plurivora* (Jung & Burgess 2009) og *P. kernoviae* (Brasier et al. 2005). Fordelingsmessig er omlag halvparten av artene homotalliske og den andre halvparten heterotalliske. Noen få arter er sterile, det vil si at de produserer svært sjelden eller aldri oosporer, for eksempel *P. pinifolia* (Duràn et al. 2008), *P.*

taxon *Pgchlamydo* (Brasier et al. 2003), *P. gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman 1927 (Kroon et al. 2012) og *P. lacustris* (Nechwatal et al. 2012).

Ved kjønna formering (meiose) skjer det en reduksjonsdeling i antheridier og oogonier, hvor det diploide genomet reduseres og haploide kjerner dannes. Antheridiet kan omslutte stilken til oogoniet helt ("amphigynous") eller delvis ("paragynous"). Ved delvis omslutning sitter antheridiet ved siden av oogoniet, festet til oogoniet nært festet til mycelet (Erwin & Ribeiro 1996). Ved meiosen skjer det en reduksjonsdeling slik at kjernene blir haploide. En kjerne fra antheridiet overføres til oogoniet gjennom en befruktningskanal og denne smelter sammen med en kjerne i oogoniet og danner en zygote. Som et resultat av kjønna formering dannes oosporer (Kroon 2010).

Oosporer er tykkveggete overlevelsestrukturer som kan overleve 10-15 år i vann eller jord. Ved ugunstige forhold som høy eller lav temperatur, tørke, dårlig næringstilgang, døende vertplante eller stor konkurranse fra sekundære parasitter vil oosporer dannes for å sikre overlevelsen av organismen (Erwin & Ribeiro 1996; Jung 2011). Når oosporen sanser utskilte stoffer (roteksudater) fra vertplanten og det er rikelig med jordvann tilstede, vil oosporene spire og danne sporangier som frigjør zoosporer. Spirende oosporer kan også danne hyfer.

### 2.3.2. Hybridisering

En utfordring ved *Phytophthora* er at de kan krysses med hverandre og danne arter med nye egenskaper. Et eksempel på dette er *P. alni* som først ble oppdaget i Sør-England i 1993 (Brasier et al. 2004) og innen få år ble årsaken til at nesten 8 % av oretrærne var døde eller skrantet (Gibbs et al. 1999). Årsaken til dette ble først antatt å være en hybrid mellom den heterotalliske *P. cambivora* og en homotallisk *P. fragariae*-lignende art. Ingen av disse er patogener på or. Den nye arten fikk navnet *P. alni* og tre underarter ble beskrevet; *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis* og *P. alni* subsp. *multiformis* (Brasier et al. 2004). En nyere teori er at *P. alni* subsp. *alni* kan være et resultat av hybridisering mellom *P. alni* subsp. *uniformis* og *P. alni* subsp. *multiformis* (Ioos et al. 2006).

Andre hybrider har ikke blitt navnsatt, men blir beskrevet med opphavets navn for eksempel *P. nicotianae* × *P. cactorum* (Man in 't Welt et al. 1998).

Hybridisering mellom arter kan forekomme som kjønna hybridisering eller somatisk hybridisering. Kjønna hybridisering kan forekomme ved vanlig kjønna formering, der antheridiet fra en krysningstype overfører en kjerne til oogoniet fra en annen krysningstype. Når dette skjer mellom to forskjellige arter, kan nye hybrider dannes. Kjønna hybridisering kan også forekomme mellom homotalliske arter. I et forsøk med hybridisering mellom *P. sojae* og *P. vignae* kunne avkommet

infrisere begge vertplanter, men hybridene viste mindre aggressivitet enn foreldrene (May et al. 2003).

Ved somatisk hybridisering skjer det en sammensmelting av zoosporer fra to arter. Zoosporene er skjøre, og kjemikalier eller elektriske impulser kan slå sprekker i membranen som omslutter sporen. Slike zoosporer kan reagere med hverandre og kan utvikle en felles membran rundt begge ene kjerne. Slike hybrider har blitt dannet mellom *P. nicotianae* og *P. capsici* og avkommet hadde samme vertplantespekter som begge foreldrene (Èrsek et al. 1995). Hyfer kan også danne somatiske hybrider ved fusjon, men det er uklart hvilken rolle dette spiller i naturen (Brasier et al. 2004).

Med økende handel med planter og plantemateriale gjør menneske det mulig å føre sammen *Phytophthora*-arter som ellers ikke ville hatt kontakt med hverandre. To forskjellige arter kan reagere med hverandre og utveksle genetisk materiale i jorda, i vann eller i plantematerialer. Disse hybridene kan arve egenskaper fra begge foreldrene og føre til utvikling av nye, hittil ukjente arter som kan gi nye utfordringer (Èrsek & Nagy 2008).

## 2.4. SPREDNING

Det er alminnelig akseptert at menneskelig aktivitet er hovedårsaken til spredning av *Phytophthora*. I hovedsak er det utilsiktet innførsel ved handel med planter og plantemateriale som er den viktigste spredningsveien over lengre avstander, mens flytting av organisk materiale og jord i tillegg til bruk av infisert vanningsvann ofte er årsak til spredning av *Phytophthora* lokalt (Hulme 2009).

Spredning på verdensbasis har forårsaket både store økonomiske tap og store endringer i plantesammensetningen i naturlig vegetasjon (Brasier et al. 2002; Haverkort et al. 2008; Pennisi 2010). *Phytophthora* har blitt rapportert på alle kontinentene, bortsett fra Antarktis (Scott et al. 2013).

Norge importerer mer og mer plantemateriale, mens andelen egenproduserte planter går ned. En har sett en stor økning av importerte planter som har stått utendørs på friland i opprinnelseslandet, det vil si flerårige trær, busker og urter med jordklump (jfr. tolltariff varenummer 06029021 i 2012), ble importen tredoblet i perioden 1997 til 2011, fra 5200 tonn til 15800 tonn. Hovedsakelig kommer plantene fra Nederland (62 %), Tyskland (25 %) og Danmark (9 %) (Hagen et al. 2012). På grunn av årlige påvisninger av *P. ramorum* (Talgø et al. 2012a) har Norge innført en godkjenningssystem for planteskoler fra Tyskland og Nederland som ønsker å eksportere

vertplanter til Norge. I vekstsesongene 2013-2014 var det 4 planteskoler fra Tyskland og 28 fra Nederland som var godkjente (Mattilsynet 2014). Også Norsk Institutt for Naturforskning så en sammenheng mellom import og spredning av fremmede arter og påviste en tilnærmet lineær sammenheng mellom importvolum og antall påvisninger av introduserte fremmede arter (Hagen et al. 2012).

*P. alni*, en relativ ny art som ble oppdaget i Storbritannia på 1990-tallet, er antatt å ha spredd seg dit med plantemateriale. Underarten *P. alni* subsp. *uniformis* som er påvist i Alaska, antas å komme fra turister som har bragt med smitten på skotøy, eventuelt at underarten har sitt opphav der (Adams et al. 2008). Denne underarten ble også nylig funnet i Norge (Strømeng et al. 2012).

Det kan også være en utfordring å finne ut hvor *Phytophthora*-artene er spredd fra. En antar at i områder hvor artene har vært lenge, har de utviklet genetisk diversitet. Mens der hvor de nylig har blitt introdusert er den genetiske variasjonen liten. Eksempelvis ble *P. cactorum* isolert fra innsamlede jordbærplanter fra store deler av verden. Det viste seg at 16 av 23 isolater fra Europa, Japan, Australia og New Zealand var like, mens isolatene fra Tyskland, Canada og USA var ulike. Isolatene fra Nord-Amerika hadde så stor genetisk diversitet at det antas at *P. cactorum* har sitt opphav der, mens likheten i isolatene fra Europa, Japan, Australia og New Zealand gjør at en kan anta at dette har vært en genotype som har spredd seg ved hjelp av handel med foredlingsmateriale (Eikemo et al. 2004; Hantula et al. 2000; Huang et al. 2004).

Plantehelsemessig er det ikke bare spredningen og etableringen i nye områder som er en utfordring, men også det at nye arter presenteres for hverandre og utveksler genetisk materiale (hybridiserer) eller opptrer som krysningstyper for hverandre.

## 2.5. SYMPTOMER

Symptomene varierer etter *Phytophthora*-art og vertplante, men de generelle symptom baserer seg på at patogenet ødelegger røttene og ledningsvevet, både xylemet og floemet i plantene (Jung et al. 2007), noe som fører til mangel på vann og næringstoffer. I trær vises dette ved at krona får små og færre blader som gir en transparent krone, ofte gulaktige blader, visning i krona, rot og rothals-råte, få lateral- og finrøtter, blødende sår ("canker") på stammen, unormalt lite lengdevekst i vegetative skudd og unormalt mye fruktsetting (Jung et al. 2005).

I de angrepne områdene er ledningsvevet ødelagt slik at det ikke lengre transporterer vann og næring. Vannet tas opp av røttene, og vannpotensialet ( $\psi$ ) fører vann oppover i planten gjennom

vedvevet (xylemet). Det meste av vannet fra rota går ut av planten via bladene ved fordamping for å holde vannpotensialet oppe, men en del vann returneres til rota via silvevet (floemet) og tar med seg næringsstoffene produsert ved fotosyntesen tilbake til rota. Ødelagt ledningsvev stopper transporten i ved- og/eller silvevet, trykket bygger seg opp inne i stammen og væsken presses ut og kan observeres som blødende sår med mørk utflod på stammen. Dette er et vanlig symptom ved *Phytophthora*-infeksjon på trær. Blødende sår kan finnes opp til 20 m over bakken (Jung et al. 2005; Talgø et al. 2012a).

I urteaktige planter vil rotsystemet bli angrepet, og bladene får et grågrønt skjær og vekststagnasjon i tørre perioder på grunn av vannmangel. Planter med angrep viser tidligere tegn på vannmangel enn andre planter i bestandet, for eksempel er dette ofte tydelig i jordbærplanter med angrep av rød marg (*P. fragariae*).

De *Phytophthora*-artene som har "caducouse" sporangier som spres i luft, gir primærinfeksjoner på bladene som får vanntrukne, mørke flekker. Disse blir deretter brune og utvikler seg til nekroser. Hele eller deler av bladene visner og dør. Kvister og grener får også mørke flekker. Når disse omslutter hele kvisten eller grenen, stopper vanntilførselen og kvisten eller grenen dør (Jung 2011). Sporangier kan utvikle seg i kanten av nekrosene etter 2-3 dager, men klimatiske forhold har innvirkning på utviklingshastigheten. Sporangiene spres med vind og gir primærinfeksjoner på andre planter. Ved gode forhold kan zoosporer renne nedover planten i regndråper og gi infeksjon lengre ned på planten eller på knollene som hos potet (Kroon 2010).

## **2.6. PRØVEUTTAK**

Forskjellige metoder har blitt beskrevet for å innhente opplysninger og kartlegge tilstedeværelsen av *Phytophthora*-arter, for eksempel baiting med blader og frukt, jordprøver, plantemateriale eller vannfiltrering (Reeser et al. 2010).

### 2.6.1. Baiting i vann

Ved baiting legges det ut blader eller annet aktuelt plantemateriale i grøfter, elver, bekker, vann eller innsjøer for å fange opp *Phytophthora*. Dersom det er *Phytophthora*-arter til stede, og en treffer med den typen bait som brukes, vil de kunne infisere plantematerialet og begynne å utvikle seg på dette. Fra de infiserte stedene på plantematerialet kan biter skjæres ut og legges på kunstig vekstmedium for å påvise patogenet.

(Reeser et al. 2010) sammenlignet bruken av vannfiltrering, baiting med frukt (pære) og diverse blader for å se om metodene gav forskjellige resultater. Ved baiting med blader ble det ikke

observert forskjell i artsammensetningen av de påviste *Phytophthora*-artene, selv om en baitet med blader av forskjellige vertplanter som sypress (*Chamaecyparis* sp.), *Rhododendron catawbiense*, *Lithorcarpus* sp. og melbær (*Arctostaphylos uva-ursi*). Ved sammenligning av bating og vannfiltrering ga ikke disse to metodene merkbare forskjeller på resultatene, men baiting med pære gav færre antall isolater, særlig fra clade 6, men ga andre arter enn det som ble fanget opp av andre baitingmetoder.

Det har også vært brukt frukt av sitron for å kartlegge *Phytophthora*-arter fra vanningskanaler i sitrushager (Klotz et al. 1959). For påvisning av *Phytophthora* Taxon Walnut, ble det i Nord-Italia brukt baiting med eple (*Malus* sp.), noe som gav positive resultater (Ginetti et al. 2014).

Huai (Huai et al. 2013) brukte blader av *Rhododendron* sp. og eik til baiting i elver i eikeskogen i Yunnan-provinsen i Kina, for å registrere hvilke *Phytophthora*-arter som fantes. Det ble påvist totalt 8 arter. Fra baitene med blader av *Rhododendron* sp. ble det isolert 7 arter *Phytophthora* og fra eikebladene 5 arter. *P. taxon Pgchlamydo* ble påvist flest ganger i den kinesiske undersøkelsen, 43 av 73 isolater, men også *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. Salixsoil* (*P. Salixsoil* har nå blitt beskrevet og navnsatt til *P. lacustris* (Nechwatal et al. 2012)), *P. cryptogea*, *P. gretata* samt to ukjente arter ble påvist. I Norge ble blader av *Rhododendron* 'Cunninghams White' blant annet brukt ved baiting i bøkeskogen i Larvik. Denne kultivaren er kjent for å være svært mottakelig for angrep av *Phytophthora* (Talgø et al. 2012a).

Når storbladete arter benyttes til baiting kan flere infiserte områder på bladene flyte sammen og gjøre isolering av *Phytophthora*-artene vanskelig og resultatet kan være at en blir sittende igjen med bare ett isolat. Det er derfor en fordel at partiene som tas ut er fra adskilte flekker på bladene. Reeser og hans kolleger (Reeser et al. 2010) erfarte at det var lettere å ta ut bladbiten med flekker fra småbladete arter, som melbær, fordi de infiserte områdene på bladene var mer avgrenset.

Ved baiting med blader blir det vanligvis brukt nettingposer med flottør, slik at posene holder seg flytende i vannskorpen (Huai et al. 2013; Hüberli et al. 2013; Reeser et al. 2010). Ved baiting med frukt er det beskrevet bruk av bokser med huller og flytelement (Reeser et al. 2010).

### 2.6.2. Jordprøver

Ved isolering fra jordprøver, blir jorden ofte lagt i beholdere med vann og baitet. Baitet kan være av forskjellige plantearter eller -materiale. For eksempel ble modne epler (*Malus*) av sorten Golden Delicious brukt for å kartlegge *Phytophthora*-arter i skog av eik, *Rhododendron* sp., *Larix potaninii*, *Sorbus* sp., *Picea* sp. og *Pinus* sp. i Kina (Huai et al. 2013). I USA ble *Rhododendron* sp. brukt for å



påvise *P. ramorum* i skog av amerikansk eik (*L. densiflorus*) og kystsequoia (*Sequoia sempervirens*) (Brasier et al. 2006). Szabò (Szabó et al. 2013) brukte blader av laurbærhegg (*Prunus laurocerasus*) og *Rhododendron* sp. for påvisning av *Phytophthora*-arter i jord fra bredbladet lausskog i Ungarn. Fra 137 jordprøver ble det påvist *Phytophthora* i 110 av prøvene og 10 *Phytophthora*-arter ble isolert; *P. gonapodyides*, *P. plurivora*, *P. lacustris*, *P. gregata*, *P. inundata*, *P. megasperma*, *P. cactorum*, *P. multivora*, *P. taxon hungarica* og en ukjent art *P. sp.1* som var nært beslektet med *P. gonapodyides*.

### 2.6.3. Plantemateriale

For å påvise *Phytophthora* i or (*Alnus glutinosa* og *Alnus incana*) i Tyskland, har det blitt tatt ut prøver fra ore-stammer med synlige sår på stammer med utflod. Noen flekker ble vurdert som gamle og inaktive fordi de hadde mørkere brunfarge enn de som var aktive og lysere brune. Stammeprovne med de inaktive flekkene ble lagt i destillert vann og tilsatt 2-7 dager gamle eikeblader fra små eiketrær. Etter 3-7 dager ble bladbiten med infiserte, mørke flekker på bladene overført til *Phytophthora*-selektiv agar. Fra disse flekkene ble det påvist *Phytophthora* (nærmere bestemt det som på engelsk kalles "Alder *Phytophthora*"). Prøvene med aktive lesjoner ble plassert direkte på selektiv agar for *Phytophthora* (Jung & Blaschke 2003). I Norge har en også erfart at ved direkte isolasjon fra plantemateriale på selektiv *Phytophthora*-agar, må en ta prøve fra nylig infisert vev for at *Phytophthora* til å vokse (Strømeng et al. 2012).

### 2.6.4. Vannfiltering

Reeser (Reeser et al. 2010) filtrerte vann rett fra kilden ved hjelp av en håndfiltrator. Det ble filtrert 700 ml pr. prøve, fordelt på 6 nitrocellulose filter (Millipore), med porestørrelse på 45 µm og diameter på 47 mm. Siden tettheten av oomycetes i vannet var ukjent, varierte filtrert vannmengde pr. filter variert (50, 100 og 200 ml) for å oppnå avlesbare resultater. Filtrene ble lagt opp ned på selektivt agar for inkubering og fjernet etter 24 timer. Resultatet viste at antall *Phytophthora*-arter isolert fra filtrene var omvendt proporsjonal med mengde filtrert vann, det vil si at dess mer vann som var filtrert, dess færre arter ble påvist. Det ble derfor antatt at rasktvoksende arter av *Phytophthora* og *Pythium*, som kunne vokse i medier med hymexazol, påvirket deteksjonen av de mer sentvoksende artene. Dersom det er ønskelig å detektere bredden av *Phytophthora*-arter i et vannsystem kan antall påviste arter økes ved å dele ønsket filtrert vannmengde på flere filter.

## 2.7. BEKJEMPELSE

*Phytophthora* spp. har egenskaper som gjør at de er vanskelige å bekjempe når de først er introdusert til et område. For eksempel danner de både kjønna og ukjønna overlevelses-strukturer. Ved kjønna formering dannes oosporer, disse har tykke vegger som gjør at de er svært motstandsdyktige for ytre påvirkning som sterk tørke eller frost. De kan overleve i årevis i jorda i påvente av rett vertplante. Andre *Phytophthora*-arter danner klamydosporer (ukjønna), en annen overlevelsesstruktur. De fleste artene sprer sporene sine under fuktige jordforhold, mens noen få kan spre seg i luft. Dessuten kan ulike arter krysse seg og gi opphav til hybrider som i verste fall er mer aggressive enn artene de stammer fra.

### 2.7.1 Forebyggende tiltak

Forebyggende tiltak for å hindre videre smittespredning er det desidert beste tiltaket for å kontrollere *Phytophthora*. Dette inkluderer planting av friske planter i frisk jord, vekstskifte, bruk av rent vanningsvann, drenering for å fjerne bort overflødig vann og ikke minst bruk av resistente eller lite mottakelige planter.

Plantene har et naturlig forsvar som beskytter dem mot patogene mikroorganismer. Dess bedre en plante trives, dess mer motstandsdyktig er den som regel. Viktige faktorer for plantenes trivsel er planting i rett klimasone, godt jordsmonn, riktig pH, passe mengde vann, balansert gjødsling og riktige lysforhold. Planter som sturer og mistrivs får svekket motstandsevne og gjør det lettere for patogener å infisere plantene. For mye gjødsling fører til rask vekst og svakere cellestruktur som lettere angripes av patogener som *Phytophthora*.

Også en kombinasjon av en svært våt periode etterfulgt av en svært tørr, så ut til å ha innvirkning på infeksjonsraten hos *Phytophthora* spp. I Bayern i Tyskland så en store skader på eldre bøketrær etter 2003. Da hadde 2002 vært et uvanlig vått år og 2003 uvanlig tørt, noe som økte frekvensen av trær med synlige symptomer etter 2003. (Jung 2008). Det som trolig skjer er at det i våte år blir så store rotskader at trærne ikke tåler lengre tørkeperioder. Drenering for å fjerne overskytende vann er derfor viktig.

Ved bruk av resistente sorter av planten minsker virulensen til patogener, som for eksempel *Phytophthora*, mens mottakelige sorter gir patogenet mulighet til å bli mer virulent. Planter kan også bli mer resistente (ontogenetisk resistens) mot *Phytophthora* med økende alder. *Prunus*-arter så ut til å være mottakelige opp til 35 år, og trær mellom 3 og 8 år ble hyppigst infisert. Utviklingen av sykdommen er i tillegg til alderen på vertplanten, avhengig av klimatiske forhold, *Phytophthora*-art og vertplante. Ved bruk av resistente plantearter og -sorter må en vite hvilken *Phytophthora*-art

som er problemet i jorda, det er lite sannsynlig å finne planter som er resistente mot alle artene av *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro 1996).

Fra 1970 til 1990-tallet finnes det en del artikler om undertrykkende ("suppressiv") jord, jord der sjukdomsorganismer ikke trives, men etter antall nyere artikler å dømme, er ikke dette lenger et aktuelt tema. Malajczuk og hans kolleger undersøkte naturlig tilstedeværelse av mikroorganismer i "suppressiv" jord som inneholdt *P. cinnamomi* og fant blant annet ut at arter av *Pseudomonas*, *Bacillus* og *Streptomyces* økte lyseringen (skade på cellemembran) av hyfene hos *P. cinnamomi*, i tillegg til at bakteriene hindret zoosporeproduksjon, nedsatte vekst og utvikling hos *P. cinnamomi*, samt økte nedbrytningen av sporangier (Malajczuk et al. 1977). I Australia ble utvikling av *P. cinnamomi* undersøkt i vanlig, "suppressiv" og dampet "suppressiv" jord. I naturlig "suppressiv" jord dannet *P. cinnamomi* få sporangier og mycelet vokste dårlig. Både dannelse av sporangier og mycelvekst var bedre i vanlig jord og dampet "suppressiv" jord. En kan derfor anta at det er mikrofloraen i "suppressiv" jord som er årsaken til forskjellene, ikke næringstilgangen (Broadbent & Baker 1974). I et forsøk fra 2009 ble blader av rhododendron og laurbær (*Laurus nobilis*) som var smittet med *P. ramorum* gravd ned i jord hvor det vokste henholdsvis *L. densiflorus*, kystsequoia (*Sequoia sempervirens*) og laurbær. Resultet viste at i de fleste tilfeller hindret fuktig jord ved kystsequoia dannelsen av klamydosporer av *P. ramorum* (Fichtner et al. 2009), men ikke i jord hvor de to andre treslagene vokste. Dette kan tyde på at mikroorganismer i jorden påvirket utviklingen av *P. ramorum*.

Siden det er påvist en nærmest lineær sammenheng mellom spredning av fremmede arter av plantepatogener og økning av import, vil økt produksjon og bruk av planter med innenlands opprinnelse dempe denne utviklingen (Hagen et al. 2012). Australia og New Zealand har mest sannsynlig den strengeste importkontrollen. Der er enhver import av plantematerialer med jord forbudt. Det er også obligatorisk kontroll av alle innreisende og deres bagasje (Scott et al. 2013).

### 2.7.2. Kjemisk bekjempelse

Det eksisterer ikke kjemiske midler tilgjengelige i Norge som fullt ut er effektive mot *Phytophthora*, men det finnes kjemiske midler som er godkjente, også i Norge, som har en viss virkning gjennom å dempe utviklingen av *Phytophthora*. For sykdommer som lærråte og rotstokkråte i jordbær, rotåte i frukt og prydplanter, samt bleikråte i eple og ringråte i gulrot forårsaket av *P. cactorum*, er de godkjente midlene kopperoksyd, metalaxyl-M, azoksystrobin, fludioksonil, cyprodinil, fosetyl aluminium, dimetomorf, mankozeb, pyraklostrobin og boskalid. Godkjente midler per 1.1.14 mot *P. infestans* var cyazofamid, mandipropamid, dimetomorf, mankozeb, fenamidon, propamokarber, zoksamid og metalaxyl.

Selv om midlene har forskjellige virkningsmekanismer er utvikling av fungicidresistens et problem en må være klar over. For eksempel hindrer kopperoksyd algesoppene i å trenge inn i planten, azoksystrobin hemmer soppens åndingsprosesser mens fosetyl aluminium hindrer spiring av sopp sporer. Etiketten til midlene regulerer bruken. For eksempel er metalaksyl-M oppgitt med maksimalt en sprøyting pr. vekstsesong pr. kultur for matnyttige planter. Azkosystrobin inneholder strobiluriner og er derfor svært utsatt for resistensutvikling, og etiketten angir at det ikke må sprøytes mer enn 3 ganger pr. sesong i vekster som løk, purre og jordbær.

Preparatene som er tillatt brukt i Norge, er i hovedsak godkjente til matnyttige kulturer, men noen er også godkjente til planteskoleplanter og bare ett middel, fosetyl-aluminium, er godkjent til bruk mot *Phytophthora* i prydplanter i grøntanlegg ([www.plantevernguiden.no](http://www.plantevernguiden.no)).

Resistens har vært mye diskutert i forbindelse med bruk av metalaxyl. Dette var et effektivt middel mot potettørråte (Davidse et al. 1981; Dowley & O'Sullivan 1985), men resistensutvikling førte til at dette middelet ble trukket fra markedet i mange land. I Irland ble middelet trukket fra markedet før sesongen 1981 og en undersøkelse samme høst viste at i 75 % av de undersøkte potetavlingene var potettørråten resistent mot metalaxyl, men at resistensandelen var kommet ned i 6 % allerede i 1983 (Dowley & O'Sullivan 1985). Også i Finland ble det rapportert lignende tall, 59 % resistens i perioden 1990-1995 og 2 % i 1996 (Hermansen et al. 2000). I Norge er det i dag kun ett godkjent middel med metalaxyl-M mot tørråte i potet og dette er et kombinasjonsmiddel med mankozeb. Dette middelet kan også brukes mot papirfleck (*P. porri*) i løk. Utenom dette kan metalaxyl-M kun brukes som beisemiddel i frø eller setteløk. I grøntanleggsplanter i Norge er metalaxyl-M kun lovlig brukt som jordmiddel ved innplanting og som jordmiddel i produksjon av pyntegrønt og juletre. Kobberoksyd brukes i bartrær i planteskoler og juletre- og pyntegrønt felt (<http://www.plantevernguiden.no>).

I mange land blir kaliumfosfitt-gjødsel brukt som forebyggende middel mot *Phytophthora*. *Phytophthora* fører til ødeleggelse av de fine røttene i rotsystemet, krona blir mer glissen, bladene mindre og ofte gule. Fosfitt stimulerer dannelsen av nye røtter og revitaliserer gulnende kroner. Den aktive komponenten er fosforsyre (fosforsyring), som trolig også har en direkte fungicid-effekt. I Australia har denne metoden vært brukt i mer enn 20 år mot *P. cinnamomi*. I USA har den de siste 10 år brukt fosfitt mot *P. ramorum*. I Europa er det færre eksempler på fosfittbehandling, men i Spania ble helsetilstanden til steineik (*Q. ilex*) og korkeik (*Q. suber*) som var angrepet av *P. cinnamomi*, forbedret etter to års behandling (Jung 2011).

## 3. Materialer og metoder

### 3.1 MATERIALER

Blader fra *Rhododendron* 'Cunninghams White' - årsblader og fjorårsblader

Nettingposer med flyte-element og hyssing til lukking, laget ved Bioforsk, Ås, Norge

9 cm sterile Petriskåler med:

V8-agar, se vedlegg 1

PARPH-agar, se vedlegg 1

PARP-agar, se vedlegg 1

PDA, se vedlegg 1

Gulrotagar, se vedlegg 1

Prøvemateriale fra trestammer og jord

Pocket Diagnostic kit (serologisk test for *Phytophthora*), Forsite Diagnostics, Sand Hutton, UK

Autoklavert og filtrert vann fra Andedammen, NMBU (Norges Miljø- og Bioteknologiske Universitet), Ås

Membranfilter, porestrørrelse 0.45 µm, diameter 47 mm fra Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA

DNeasy Plant Mini Kit for oomycetes, fra QIAGEN Sample & Assay Technologies, Hilden, Tyskland

*Phytophthora cryptogea* A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> krysningstyper (BBA 65909 A1(=M120) og BBA63651 A2 (=M121))

Autoklaverte frø fra paprika (*Capsicum annuum*)

PCR-utstyr

Mikroskop

Sterilbenk

Lupe

Laboratorieutstyr

Inkubatorskap

### 3.2. METODER

Det ble i hovedsak benyttet baiting i vann, men også baiting fra jordprøver, poding av prøver fra trestammer og serologisk test av plantemateriale ble brukt. I vassdragene hvor baitene ble lagt ut, ble vegetasjonen også visuelt undersøkt for symptom på *Phytophthora*.

### 3.2.1. Baiting i vann

Det ble lagt ut bait bestående av nettingposer med flyte-element og 4-5 blader av *Rhododendron* 'Cunninghams White' (Figur 3.2.1).



Figur 3.2.1. Baiting ble utført ved hjelp av Rhododendron-blader i nettingposer med flyteelement. Posene ble lukket med hyssing.

I serien som ble lagt ut i juni 2013 ble det brukt fjorårsblader, mens i de andre seriene ble det brukt årsblader. Bladene ble høstet på Fjørtoft, Møre og Romsdal, fra busker plantet på 1960-tallet. Posene ble utlånt fra Bioforsk plantehelse. De ble lukket og festet med hyssing til steiner eller trær. Ved alle seriene ble det tatt 2 negativ-prøver, 1 lagt i springvann og 1 i kokt vann.

Prøvene ble lagt i elver og vann i ca. 1 uke. Ved innsamling av baitene ble det brukt engangshansker, ett nytt hanskepar pr. prøve. Prøvene ble lagt i lukkbare plastposer i kjølebag som holdt omtrent 10°C. Prøvene ble samlet inn lørdager, lagt i kjøleskap (4-5°C) natten over og transportert med fly til Ås søndag, lagt i kjøleskap igjen og analysert påfølgende mandag. Nettingposene ble vasket i vaskemaskin på bomullsprogram, 60°C.

Baitene ble lagt ut i Ålesund (Ålesund kommune, omlag 44 000 innbyggere pr. 2012), Fosnavåg (i Herøy kommune som hadde omlag 8 800 innbyggere pr. 2012), Ulsteinvik (i Ulstein kommune som hadde omlag 7 800 innbyggere pr. 2012) og Ørsta (i Ørsta kommune som hadde omlag 10 400 innbyggere pr. 2012), se figur 3.2.2. Detaljkart med målestokk over uttakstedene, se vedlegg 2. Kartene som ble brukt i oppgaven ble hentet fra [www.norgeskart.no](http://www.norgeskart.no).



Figur 3.2.2. Oversiktskart som viser byene og tettstedene hvor kartleggingen ble utført. De blå ringene angir stedene Ålesund, Ulsteinvik, Fosnavåg og Ørsta.

#### Baitingperioder:

Ålesund	Serie 1, fra 8. til 15. juni 2013. Serie 2, fra 5. til 10. august 2013. Serie 3, fra 5. til 12. oktober 2013.
Ulsteinvik	Fra 24. til 31. august 2013.
Fosnavåg	Fra 24. til 31. august 2013.
Ørsta	Fra 24. til 31. august 2013.

#### 3.2.2. Bating fra jordprøver

Det ble tatt ut omkring 500 gram av jorden ved en blodbøk ved Brusdalshagen i Ålesund. Bøka hadde blødende sår på stammen og prøven ble tatt fra jorda under det laveste blødende såret, som lå omlag 30 cm fra bakken. Omkring 250 gram av jorden ble lagt i en 2 liters plastbeholder og tilsatt destillert vann til omlag 2 cm over jorden, se figur 3.2.3. Plastbeholderen stod natten over og bladene ble lagt på vannet dagen etter og inkubert i romtemperatur med et lokk som lå løst over plastbeholderen. Bladene ble kontrollert for angrep av *Phytophthora* jevnlig og analysert etter ca. 14 dager.



Figur 3.2.3. Bladene av *Rhododendron* ble lagt forsiktig i plastbeholderen etter at jorden hadde sunket ned.

### 3.2.3. Isolering fra plantemateriale

Trær med mørk utfloed på stammen ble valgt ut og prøven ble skåret ut fra områdene på stammen hvor utfloed var synlig. Flisene var så store at overgangen mellom frisk og død ved kom med. Knivene ble desinfisert med 70 % etanol. Treflisene ble lagt i zip-posere og ble behandlet som prøver fra baitingen. Der hvor det var mulig, ble bark fjernet fra prøven før den ble stukket ned i 9 cm Petriskåler med PARPH-agar. Trær som hadde blødende sår på stammen ble prøvetatt. Det ble tatt ut prøver fra selje (*Salix caprea*), gråor, bøk og blodbøk, se tabell 3.2.1.

Tabell 3.2.1. Oversikt over plantearter med blødende sår på stammen som ble prøvetatt, alle prøvene ble tatt i Ålesund kommune. Nummereringen på uttakstedene er den samme som blir brukt under 4. Resultater.

Dato	Uttaksted	Plantearart	Materiale	Merknad
10.08.13	10a. Brusdalsvatnet	Selje	Stamme	
10.08.13	14a. Brusdalsvatnet	Gråor	Stamme	
10.08.13	19a. Ekornås	Selje	Stamme	
10.08.13	3a. Byparken i Ålesund	Bøk	Stamme	
10.08.13	3a. Byparken i Ålesund	Bøk	Stamme	Serologisk test
12.10.13	3a. Byparken i Ålesund	Bøk	Stamme	
12.10.13	3b. Brusdalshagen i Ålesund	Blodbøk	Stamme	
12.10.13	3b. Brusdalshagen i Ålesund	Blodbøk	Stamme	Serologisk test



### 3.2.4. Serologisk test fra plantemateriale

Serologiske tester kan brukes til prøvetaking av forskjellige typer plantemateriale. Her ble det brukt biter av stammen. Trær med mørk utflod på stammen ble valgt ut og prøven ble skåret ut fra områdene på stammen hvor utflod var synlig i områdene mellom syk og frisk ved, se tabell 3.2.1.

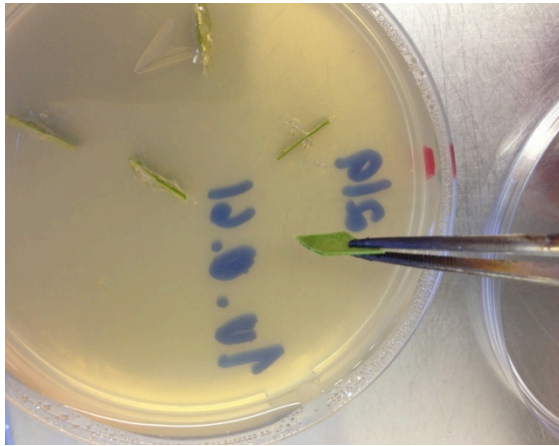
### 3.3. IDENTIFISERING

For å isolere eventuelle *Phytophthora*-arter fra de baitede *Rhododendron*-bladene ble det brukt selektiv agar for *Phytophthora*. De selektive agarene, PARPH og PARP hindrer vekst av andre mikroorganismer. Der det kan forventes å finne *Pythium* ble det brukt PARPH i stedet for PARP, da PARPH inneholder fungicidet hymexazol, som er toksisk for mange arter av *Pythium*. Hymexazol kan også ha noe innvikning på vekst av noen *Phytophthora*-arter (Masago et al. 1977).

Bladene ble skylt i springvann, tørket lett av og plassert på trekkpapir i sterilbenk (Figur 3.3.1.). Det ble valgt ut områder på bladene som var mørke og vasstrukne, noe som kunne tyde på infeksjon av *Phytophthora*. Områder på bladene med flekker av forskjellig utseende og størrelse ble valgt ut, og bitene ble skåret ut med skalpell og satt på høykant i 9 cm Petriskåler med PARPH-agar, 7 stk i hver skål. Bitene ble satt så dypt at de akkurat kom under overflaten på agaren, se figur 3.3.2. Petriskålene ble holdt lukket så mye som mulig, bare åpnet for å sette ned bladbiter. Skålene ble merket og satt i lukkede plastposer til inkubering ved romtemperatur og naturlig belysning. Skålene ble kontrollert regelmessig for vekst av mycel. En bit av agaren, omtrent 3 × 5 mm, ble overført til V8-agar når kolonien dekte omtrent 2/3 av skålen, etter 1- 3 uker.



Figur 3.3.1. Etter baiting ble bladene lagt på trekkpapir i sterilbenk. Til venstre bladene med mørke og vantrukne flekker med infeksjoner. Til høyre, de samme bladene hvor biter med flekker har blitt skåret ut.



Figur 3.3.2. Bladbiter med mørke, vasstrukne flekker ble plassert i selektiv agar for *Phytophthora*.

Etter at det var oppnådd renkultur ble en bit av V8-agaren fra ytterkant av vekstsonen med hyfer overført til PDA skåler, inkubert ved romtemperatur og lagret mørkt på kjølerom, 13°C.

### Rensing

De isolatene som ikke oppnådde renkultur, eller ble forurenset i etterkant, ble rensset. 4 teknikker ble brukt til rensing:

a. En bit (omtrent  $3 \times 5$  mm) av agaren i ytterkant av kolonien, uten synlig kontaminasjon, ble overført til PARP, inkubert i naturlig lys i romtemperatur, og overført til PDA dersom renkultur ble oppnådd. I motsatt fall ble teknikk nr. b, c eller d benyttet.

b. Dersom skålene var forurenset av bakterier, vokste bakteriene kun på overflaten av agaren, mens hyfene til *Phytophthora* vandret ned gjennom hele agaren. Deler av agaren i den forurensete skålen ble derfor snudd opp ned, og overflaten av agaren (tidligere bunn) ble skåret av med steril nål. Det var viktig at nålen ikke kom i kontakt med den kontaminerte bunnen (tidligere toppen) av agaren. Agarbiten ble enten overført til nytt medium; PARP, PARPH eller V8.

c. En bit fra det forurensete isolatet (omtrent  $3 \times 5$  mm) med en tykkelse på ca.  $\frac{1}{2}$  parten av agartykkelsen, ble skåret ut i ytterkant av kolonien. Stedet som ble valgt var uten synlig forurensing. I en ren skål med agar (V8, PDA eller PARP/PARPH) ble det skåret en firkant (omtrent  $4 \times 4$  cm) med nål. Firkanten ble løftet opp slik at en fikk mulighet å legge agar-biten under med hyfesiden opp. Skålen ble satt til inkubering i romtemperatur og naturlig belysning. Etter en dag eller to hadde hyfene vokst opp og gjennom agaren, mens bakteriene fortsatt befant seg på undersiden av agaren. Steril nål ble brukt for å skrape av agaren og hyfene i overflaten. Disse ble overført til en ny skål (V8, PDA, PARP eller PARPH).

d. Agarskåler (PARP eller V8) ble laget med en plastring (diamter omlag 12 mm indre mål) i midten. Ringen var så høy at den stakk godt over agaren, men ikke så høy at den hindret at lokket til Petrisålen ble satt på. En agar-bit med det forurensede isolatet ble lagt i ringen. Bakterienes radiale vekst ble hindret av ringen, mens hyfene vokste under ringen og ut i agaren utenfor. En steril nål ble brukt til å skjære ut biter fra agaren med hyfer utenfor ringen. Agarbitene ble deretter overført til V8, PARP, PARPH eller PDA.

### 3.3.1. Morfologisk

Det var ikke økonomiske mulig å sende alle de 98 isolatene, se tabell 3.5.1., til ITS- sekvensering (Internal Transcribed Spacer). Det måtte derfor gjøres et utvalg av representatnive isolater som skulle sendes inn.

Ved utvelgelse av isolatene som skulle sendes til sekvensering ble isolatene sammenlignet i hovedsak på V8 og PDA agar, men også på PARP. Isolatene på V8 og PDA var inkubert i mørke i romtemperatur, 21°C. Isolatene på PARP var inkubert i naturlig belysning i romtemperatur, omlag 20°C.

Tabell 3.3.1. Antall isolater med vekst på selektivt agar, sortert etter uttaksted. Av disse ble 33 isolater valgt ut for sekvensering.

Uttaksteder Ålesund	Antall isolater
1. Byparken vest, avløp	6
2. Byparken kunstig dam	3
3. Byparken avløp v/hovedport	5
3a. Byparken	1
3b. Brusdalslagen	1
3c. Brusdalslagen	1
4. Aksla kunstig dam	1
5. Gåseiddammen	6
6. Ratvika, elv	6
7. Gåseiddammen	5
8. Lerstadvatnet	5
9. Olsvika	0
10. Brusdalsvatnet nordsiden mot øst	7
10a. Brusdalsvatnet nordsiden mot øst	0
11. Brusdalsvatnet nordsiden mot vest	3
12. Brusdalsvatnet innløp	0
13. Brusdalsvatnet sørsiden	5
14. Brusdalsvatnet utløp	6
14.a Brusdalsvatnet	1
15. Litlevatnet	7
16. Litlevatnet utløp	6
17. Spjelkavikelva	1
18. Myrland, elv	6
19. Ekornås, elv	4
19a. Ekornås	1
20. Emblemsanden, elv	2
<b>Sum</b>	<b>89</b>

Uttaksteder Ulsteinvik	Antall isolater
1. Sauneselva	1
2. Sauneselva, utløp	1
3. Vikelva	0
4. Vikelva	0
5. Skeide, elv	0
6. Raudeelva	0
<b>Sum</b>	<b>2</b>

Uttaksteder i Fosnavåg	Ant. isolater
7. Myklebustvatnet	1
8. Myklebustvatnet	1
<b>Sum</b>	<b>2</b>

Uttaksteder i Ørsta	Ant. isolater
9. Hovdevatnet	3
10. Hovdeelva	0
11. Rystefeltet, øverst	0
12. Rystefeltet, nederst	0
13. Storelva	0
14. Storelva	0
15. Follestadelva ved Daleveien	0
16. Follestadelva ved Daleteigane,	0
17. Storelva ved Dalevegen	2
<b>Sum</b>	<b>5</b>

Der det var flere isolater med lik vekst, ble disse satt sammen i grupper, og et isolat ble valgt ut for å representere de andre skålene i gruppen.

For å se om vurderingene som ble foretatt under den morfologiske utvelgelsen var riktige, ble det foretatt 7 kryssjekker. Da ble et ekstra isolat fra 7 grupper sekvensert, se tabell 4.1.5.

I følge Jung & Burgess (Jung & Burgess 2009) danner *Phytophthora plurivora* oogonier i V8-agar. De isolatene som dannet oogonier i V8-agar ble samlet i en gruppe, hvorav 2 isolater ikke hadde

samme vekstmønster på agarene som resten av gruppen. Det ble derfor valgt ut 3 isolater med oogonier i V8-agar som ble sekvensert, se tabell 3.3.2. Isolatene hadde også dannet oogonier i PDA.

Tabell 3.3.2. Som et ledd i den morfologiske utvelgelsen ble *Phytophthora*-isolater med oogonier i V8 og PDA gruppert etter vekstmønster på agarene. Isolatene er sortert etter uttaksted.

Uttaksted Ålesund	Antall isolater med oogonier fra uttakstedet	Isolatene gruppert (a,b,c) etter vekstmønster på V8 agar
1. Byparken vest, avløp	1	a
3. Byparken avløp ved hovedport	2	b
6. Ratvika elv	2	b
10. Brusdalsvatnet nordsiden mot øst	1	b
17. Spjelkavikelva	1	b
20. Storelva på Emblem	1	C

Alle vannsystemene ble representert med minst ett innsendt isolat, bortsett fra de stedene der det ikke var oppnådd vekst på selektiv agar (PARPH og PARP) i det hele tatt, samt de uttakstedene hvor veksten ikke var forenlig med *Phytophthora*, for eksempel isolater som hadde hyfer med septa. Det ble valgt ut 33 isolater som ble ITS-sekvensert.

### 3.3.2. Molekylært

For å ekstrahere DNA fra cellene og gjøre det tilgjengelig for videre artsbestemmelse ble DNeasy Plant Mini Kit for oomycetes benyttet.

ITS er områder på DNA sekvensene som er ikke-funksjonelle, eller retttere sagt er funksjonen ukjent. Det antas at de har noe med ribosom-syntesen å gjøre, og de ligger mellom de strukturelle områdene på ribosomalt DNA i kjernen i cellen. Dersom en fjerner ITS-områdene i DNA blir organismen ikke levedyktig. ITS-sekvensene varierer mellom de forskjellige artene, mer enn andre deler av DNA og en kan derfor bruke disse sekvensene for å skille mellom arter (Thines 2007). ITS-sekvensering er anbefalt brukt ved miljøprøver, men også sekvensering av andre områder som COX (områder på mitokondrisk DNA) kan brukes (Martin 2013; Scibetta et al. 2012).

Ved PCR analysen, mangfoldigjøres ønsket DNA-sekvens slik at mengden blir stor nok til detektering. Først ble DNA basene dATP, dCTP, dGTP og dTTP, DNA-primere (kort, kjent DNA sekvens), *Taq* DNA-polymerase og magnesium ( $Mg^{2+}$ ) tilsatt. Deretter ble blandingen varmet opp til 94 - 98°C for å denaturere dobbeltrådet DNA til enkeltråder, deretter ble den nedkjølt til 40 - 65°C for at primeren skulle kunne feste seg til det enkeltrådede prøve-DNAet. Blandingens ble varmet opp

til 72°C, en temperatur hvor *Taq*-polymerase er aktivt. *Taq*-polymerase bruker primerne som start og stopp tegn på sekvensene ved mangfoldiggjøringen. Deretter gikk syklusen om igjen. Dette gjør at antall ønskede DNA-sekvenser dobles for hver runde, vanligvis går PCR i 35 runder. Primerene som ble brukt, var spesifikke for DNA sekvensen som man ønsket å oppformere. Endene av ønsket DNA-sekvens må derfor være kjent for å kunne tilsette komplementære primere. (Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet 2011; NBCI 2014).

Etter at PCR-analysen var avsluttet, ble gelelektorforese med agarosegel bruk for å se størrelsen sammensetningen på DNA-sekvensene, målt i basepar. Dersom prøven inneholdt kun de ønskede sekvensene, ville prøven samle seg på ett sted i gelen. Agarosegelen har porer som DNA-sekvensene vandrer i. De store sekvensene vil bli mest hindret av gelen og vil vandre minst, mens de korteste DNA-sekvensene vil møte minst motstand i gelen og vandre lengst. DNA er negativt ladet og denne egenskapen benyttes for å få de til å vandre i gelen ved hjelp av strøm. En vil få en vandring mot den positive polen gjennom agarosegelen (Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet 2011). I disse analysene ble det brukt primere for ITS 1 og ITS 4, og det var derfor forventet at DNA-sekvensene var 900 – 1000 basepar lange (Cooke et al. 2000). For å kunne lese av størrelsen på sekvensene i gelen ble det ved siden av prøvene amplisert en kontroll med basepar fra 100 til 1000, med trinn på 100 basepar. I tillegg ble det tilsatt ekstra basepar på 1000 og 500 i stigen slik at disse trinnene i stigen ble klarere og lettere å se. For å kontrollere at vandringen i gelen ble som forventet, ble det tilsatt en positiv kontroll på 550 basepar, se figurene 4.1.5 og 4.1.6.

Etter at DNA isolatene var ferdig ekstrahert, polimerisert og kjørt på gelelektroforese, ble de sendt til GATC Biotech, Tyskland for ITS-sekvensering.

Etter ITS-sekvenseringen var utført ble artene bestemt ved å gjøre oppslag i databaser, NBCI GenBank (NBCI 2014) ble brukt i denne oppgaven. Artsbestemmelen ble utført av May Bente Brurberg, Bioforsk plantehelse, Ås, Norge. Se tabellene 4.1.1. – 4.1.4.

### **3.4. PATOGENITETSTEST**

Det ble foretatt patogenitetstest for å fullføre på Koch`s postulat for alle *Phytophthora*-artene som ble påvist ved sekvensering, det var *P. plurivora* (Isolatnr. 250 289), *P. cambivora* (Isolatnr. 250 312), *P. gonapodyides* (Isolatnr. 250293), *P. riparia* (Isolatnr. 250 304), *Phytophthora*. sp. Ørsta (Isolatnr 250 316) og *P. taxon Pgchlamydo* (Isolatnr. 250 286).

Siden baitingen ble utført med blader av *Rhododendron* `Cunninghams White`, ble disse også brukt for å fullføre Koch`s postulat. Bladene som ble brukt var fjorårsblader.

Ved første forsøk ble bladene dyppet i 70 % etanol i ca. 5 sekunder, deretter skylt i destillert vann i ca. 5 sekunder. Deretter ble de lagt oppned på trekkpapir i 18 cm Petriskåler, 2 blader pr. skål. Trekkpapiret ble fuktet med omlag 3 ml destillert vann.

Ved andre forsøk ble bladene kun skylt i destillert vann og lagt på trekkpapir. Under trekkpapiret var et gitter, slik at destillert vann kunne fylles til toppen av gitteret slik at bladene ble liggende fuktig, men ikke i fritt vann.

Ved begge forsøkene ble det stemplet ut plugger på 5 mm i diameter fra ytterkanten av isolatene på PDA. Renkulturene fra PDA var podet samme dag og inkuberte ved romtemperatur (20°C), i mørke og deretter oppbevart i kjølerom (13°C) slik at alle kulturene hadde vokst under samme forhold. Det ble overført to plugger fra hver *Phytophthora*-art til hver av de to bladene i Petriskålen. Det ble laget 3 paralleller for hver *Phytophthora*-art, totalt ble det brukt 12 plugger. For å kontrollere at analysen gikk som forventet, ble det i tillegg stemplet ut 12 plugger fra en ren Petriskål med PDA som ikke var podet med *Phytophthora*, og disse ble behandlet på samme måte som pluggene fra isolatene. Petriskålene ble lagt en og en i plastposer med zip-lås. Deretter ble parallellene plassert randomisert på benk med vekstlys (lysstoffrør), ved 20°C og kontrollert regelmessig for symptomer på bladene.

### **3.5. MORFOLOGISKE UNDERSØKELSER**

#### 3.5.1 Veksthastigheter

Det ble utført temperaturtester for å finne minimum-, optimum og maksimums-temperaturene til tre isolater; *P. gonapodyides* (Isolatnr. 250 293), begge sekvenserte isolatene av *P. riparia* (Isolatnr. 250 304 og 250 305) og *Phytophthora* sp. `Ørsta` (Isolatnr. 250 316).

Det ble tatt ut 5 mm plugger fra ytterkanten av koloniene fra PDA og plassert på nye skåler med PDA. Alle PDA-morskålene var inkubert i mørke ved romtemperatur, omlag 20°C, og var i god vekst. Det ble laget 3 paralleller fra hver *Phytophthora*-art, det vil si 21 skåler fra hver art. Disse ble satt i mørke på benk over natten for at mycelet skulle feste pluggene i underlaget. Deretter ble de inkubert i mørke ved henholdsvis 5, 10, 15, 20, 25, 30 og 35°C. Isolatene stod 2 dager ved disse temperaturene før forsøket startet. Vekstkanten på koloniene ble merket med svart tusj ved starten av forsøket, etter 5 dager og 11 dager.

Alle skålene ble tatt ut av inkubatoren når ett av isolatene var omtrent 1 cm fra kanten av Petriskålen.

### 3.5.2. Ukjønna strukturer i vann

De artene som ble undersøkt for ukjønna strukturer i vann var: *P. cambivora* (Isolatnr. 250 312), *P. riparia* (Isolatnr. 250 304) og *Phytophthora* sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316).

Det ble skjært ut biter (omlag 1 × 2.5 cm) av kolonier fra V8-agar lagt i 4 tomme 9 cm Petriskåler, 7 skåler for hver art. V8 morskålene var inkubert i mørke ved romtemperatur ved omlag 20°C og var i god vekst.

Petriskålene med biter fra V8-agar ble deretter tilført henholdsvis destillert vann, autoklavert vann fra andedammen, filtret vann fra andedammen, og ett sett med destillert vann ble inkubert 2 dager ved naturlig dagslys og romtemperatur om lag 20°C, før de ble tilført 7-9 autoklaverte frø fra paprika, se tabell 3.5.1. for fullstendig oversikt.

Tabell 3.5.1. For å fremme ukjønna strukturer i vann ble tre isolater fra tre forskjellige *Phytophthora*-arter tilsatt forskjellige typer vann, samt frø av paprika og inkubert ved forskjellige forhold.

Arter av <i>Phytophthora</i>	Type vann og tilsetninger	Inkuberingsforhold	Variasjon av inkuberingsforhold
<b>P. cambivora (Isolatnr. 250 312)</b> <b>P. riparia (Isolatnr. 250 304)</b>  <b><i>Phytophthora</i> sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316)</b>	Destillert vann	Lyst, ved omlag 20°C	
	Autklavert vann fra andedammen		
	Filtret vann fra andedammen		
	Destillert vann med autoklaverte frø av paprika		
<b>P. cambivora (Isolatnr. 250 312)</b> <b>P. riparia (Isolatnr. 250 304)</b>  <b><i>Phytophthora</i> sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316)</b>	Destillert vann	Mørkt, ved omlag 13°C	Etter 1 uke ble isolatene satt 4 timer romtemperatur ved omlag 20°C, deretter 4 timer ved omlag 7°C og deretter plassert natten over ved omlag 13°C. Dette ble gjentatt 3 ganger (3 døgn).
	Autklavert vann fra andedammen		
	Filtret vann fra andedammen		
	Destillert vann med autoklaverte frø av paprika		

Det ble forsøkt å endre temperaturene for å se om dette hadde innvirkning på dannelse av strukturer. De isolatene som ble oppbevart ved 13°C ble satt 4 timer i romtemperatur ved om lag 20°C, deretter 4 timer ved om lag 7°C og plassert natten over ved omlag 13°C igjen. Dette ble gjentatt i 3 ganger.



### 3.5.3. Ukjønna strukturer i agar

Ett isolat ble artsbestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo* ved sekvensering. I tillegg ble 7 andre isolater fra V8 og PDA, morfologisk bestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo*. Brasier beskrev at *P. taxon Pgchlamydo* danner klamydosporer i gulrotagar hvor gulrøttene ble filtrert bort (Brasier 1967; Brasier 1969), særlig ved høyere temperaturer (Brasier et al. 2003) For å fremme dannelse av klamydosporer ble det i dette forsøket også brukt gulrotagar, men med finraspet gulrot i agaren. Isolatene ble inkubert i mørke ved 23°C.

### 3.5.4. Dannelse av kjønna strukturer med krysningstyper

De artene som ble undersøkt for dannelse av kjønna strukturer med krysningstyper var: *P. cambivora* (Isolatnr. 250 312), *P. riparia* (Isolatnr. 250 304) og *Phytophthora* sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316).

For å fremme dannelse av kjønna strukturer ble *P. cryptogea* A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> krysningstyper brukt.

Det ble skjært ut en bit omtrent 5 × 7 mm, fra vekstkanten på koloniene fra PDA, og disse ble podet på en Petriskål med gulrotagar. Biten ble lagt på skålens venstre halvdel, deretter ble gulrotagaren inokulert med *Phytophthora cryptogea* A<sub>1</sub> på den andre siden. Dette ble gjentatt med *P. cryptogea* A<sub>2</sub>. Det ble tatt to paralleller, til sammen 4 skåler for hver art. I tillegg ble en Petriskål med gulrotagar tilført kun en plugg fra den *Phytophthora*-arten som en ønsket undersøkt. En kontrollskål ble tilført *P. cryptogea* A<sub>1</sub> på den ene siden av skålen og A<sub>2</sub> på den andre siden.

## **3.6. BESKRIVELSE AV UTTAKSTEDENE**

### 3.6.1. Ålesund, Ålesund kommune

#### Byparken i Ålesund. Uttaksted 1-3

Parktrærne var hovedsakelig store, eldre trær, som spisslønn (*Acer platanoides*), bøk, alm (*Ulmus glabra*), eik, hestekastanje (*Aesculus hippocastanum*), asal (*Sorbus* sp.), bjørk (*Betula pubescens*), samt buskplantinger som snøbær (*Symphoricarpos albus*), berberis (*Berberis thunbergii*), barlind (*Taxus* sp.) og kristtorn (*Ilex aquifolium*). Det var lite innplanting av nye busker og trær.

Det ble observert blødende sår på stammen på en bøk som allerede var prøvetatt, samt en annen bøk (kommunens nummerering, nr. 0011) som ble prøvetatt i forbindelse med oppgaven. Det er tidligere funnet *Phytophthora* på bøk i parken (Talgø 2012).

I juni 2013 var et område rundt et tidligere prøvetatt tre avsperrert på grunn av nysådd plen. Det så ut til at nye jordmasser var tilført stedet.

#### Aksla. Uttaksted 4.

Prøven ble tatt i et eldre vannmagasin på Aksla som ble restaurert for noen år siden. Det er en mye trafikkert gangsti ved dammen. Av de 3 utleggene som var gjort i dammen, var det kun 1 bait som ble funnet igjen.

På oversiden av dammen ble det for noen år siden plantet *Rhododendron* i regi av Ålesund kommune. De plantene som er igjen (mange planter ble stjålet av privatpersoner de første årene etter planting), hadde en del frostskafer etter vinteren 2012/2013, en vinter som var usedvanlig kald med mye barfrost.

Ellers bestod den naturlige vegetasjonen av plantearter som furu (*Pinus sylvestris*), røsslyng (*Calluna vulgaris*), blåbærlyng (*Vaccinium myrtillus*) og melbær.

#### Gåseiddammen. Uttaksted 5



Figur 3.6.1. Uttaksted 5, Gåseiddammen.

Gåseidsammen er en liten kunstig dam på Gåseid. Bak dammen er det blandingsvegetasjon som furu, bjørk, selje, lerk (*Larix* sp.), pors (*Myrica gale*) og forvillede hageplanter som fredløs (*Lysimachia vulgaris*) og toppspirea (*Spiraea billardii* 'Triumphans'). På kanten frem mot dammen stod det to *Rhododendron*-planter, en 'Cunninghams White' og en 'Catawbiense Grandiflorum'.

### Ratvika. Uttaksted 6

Prøvene ble tatt ut i en liten elv som har tilsig hovedsakelig fra eldre etablert bebyggelse av eneboliger. Det er noen nye boenheter med små hager langs nedre del av elva. Naturlig vegetasjon var stort sett fjernet, men noe selje og rogn (*Sorbus aucuparia*) vokste langsmed kanten av elva.

### Gåseidvatnet. Uttaksted 7



Figur 3.6.2. Uttaksted 7, Gåseidvatnet

Gåseidvatnet er et gjengroings-tjern med avsig fra etablert bebyggelse av eneboliger med relativt store hager. På vei ned til vannet ble det observert en privat avfallsplass for hageavfall. Det var blant annet mye *Rhododendron* i planteavfallet. Vegetasjon ved vannet var bjørk, selje, furu, vannliljer (*Nuphar* sp.), siv (*Juncus* sp.), vier (*Salix* sp.), bukkeblad (*Menyanthes trifoliata*) og undervegetasjon som bregner (*Pteridopsida* sp.), pors og forvillede hageplanter som toppspirea. Bunn-vegetasjonen i området var ikke godt nok etablert til at den bar vekten av en voksen person, Kartleggingen var derfor vanskelig.

### Lerstadvatnet. Uttaksted 8

Lerstadvatnet har avsig fra bebyggelse med relativt store hager rundt hele vannet. Naturlig vegetasjon ved vannet bestod av gråor, furu, einer (*Juniperus communis*), pors, røsslyng, rogn, bjørk, vannliljer, sneller (*Equisetum* sp.), bukkeblad og dunkjevle (*Typha latifolia*).

### Olsvika. Uttaksted 9



Figur 3.6.3. Uttaksted 9, Olsvika

Det er avsig til elva fra etablert boligområde. Store deler av elva var lagt i rør, mest sannsynlig i forbindelse med boligutbygging. Ved prøveuttaket var det ikke mulig å få lagt baitet over flomålet og det ble derfor liggende i brakkvann ved flo sjø.

### Brusdalsvatnet. Uttakstedene 10-14



Figur 3.6.4. Uttakstedene 10-14, Brusdalsvatnet

Brusdalsvatnet er hovedvannkilden til Ålesund kommune. Den indre delen av vannet ligger i Skodje kommune, den ytre delen i Ålesund kommune.

Vegetasjonen i den indre delen av vannet består stort sett av furuskog med lyngvegetasjon, området er stort sett ubebodd. Ved den sørlige, ytre delen av vannet, er det en del eldre

hyttebebyggelse og noen industribygg. Den naturlige vegetasjonen består av blandet løvskog med mye blåbærlyng som undervegetasjon. Blåbærlyngen hadde en del frostskafer på grunn av at vinteren 2012/2013 hadde vært usedvanlig kald med mye barfrost. Langs den nordlige, ytre delen av vannet er det noen eldre gårdsbruk, eneboliger og et hagesenter. Mot vest går en elv til Litlevatnet, fra Litlevatnet går Spjelkavikelva ned til sjøen.

#### Litlevatnet. Uttakstedene 15 og 16

Litlevatnet har vanntilførsel fra Brusdalsvatnet og utløp til Spjelkavikelva som går ned til sjøen. Vannet har avsig fra etablert bebyggelse av eneboliger med relativt store hager. Det er bebygd rundt hele vatnet. Ved utløpet fra Litlevatnet til Spjelkavikelva var det en relativt stor privat avfallshaug for hageavfall.

#### Spjelkavikelva. Uttaksted17

Spjelkavikelva leder vannet fra Litlevatnet til sjøen. Det er avsig fra bebyggelse langsmed hele elva. Nederst er det et grøntområde og et industribygg ved utløpet til sjøen. Uttakstedet ble plassert ved en mye brukt gangsti mot grøntområdet i nedre delen av elva. Vegetasjonen langs elvekanten var av blandet løvskog, mye gråor, lønn og rogn.

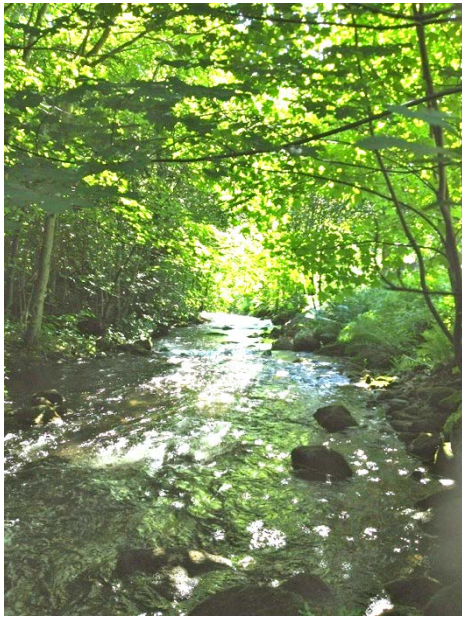
#### Myrland. Uttaksted 18

I elva der uttaket av prøver fant sted, var det avrenning fra spredt bebyggelse, eldre gårder, to boligfelt og et gravsted. Også her var naturlig vegetasjon blandet løvskog med blant annet gråor, bjørk, blåbærlyng, furu og røsslyng.

#### Ekornåsen. Uttaksted 19

En liten elv med avsig fra naturområder og boligfelt av både nyere og eldre dato. Den naturlige vegetasjonen langsmed elva var blandet lauvskog med urter som undervegetasjon, samt blåbærlyng og røsslyng.

### Storelva på Emblem. Uttaksted 20



Figur 3.6.5. Uttaksted 20, Storelva på Emblem

Storelva på Emblem har sitt opphav i Røssevollelva og Østremselva og munner ut på Emblemssanden. Det er avrenning til elva fra jordbruksområder og byggefelt.

Den naturlige vegetasjonen i området var blandingsskog av løvskog som gråor, selje, hegg (*Prunus padus*) og bjørk, med mye bregner og gress som undervegetasjon.

### 3.6.2. Ulsteinvik, Ulstein kommune

#### Sauneselva. Uttakstedene 1 og 2

Elva renner langs hovedveien ned mot Ulsteinvik og drenerer vann fra et myrområde og industriområde lengst oppe og bebyggelse lengre nede. Den naturlige vegetasjonen lagsmed elva består av blandet løvskog med urter som undervegetasjon.

#### Vikeelva. Uttaksted 3 og 4

Elva ligger vest for Sauneselva og drenerer fra et myrområde lengst oppe. Deretter går den gjennom et byggefelt under utbygging og eldre bebyggelse lengre nede. Butikkområder og et grøntområde lengst nede ved munningen av elva. Den naturlige vegetasjonen bestod av blandet løvskog og med urter som undervegetasjon.

#### Skeide, elv. Uttaksted 5

Dette er ei lita elv som ligger vest for sentrum av Ulsteinvik. Den drenerer fra spredt bebyggelse og eldre gårdsbruk.

### Raudeelva. Uttaksted 6

Denne elva ligger vest for Uttaksted 5 og drenerer også fra spredt bebyggelse og eldre gårdsbruk. Mye eldre eng langsmed elva.

### 3.6.3. Fosnavåg, Herøy kommune

#### Myklebustvatnet. Uttakstedene 7 og 8



Figur 3.6.6. Uttakstedene 7 og 8, Myklebustvatnet

Dette er et gjengroingsvann som ligger i lavt i terrenget med bebyggelse av forskjellig art rundt, for eksempel boliger, forretningslokaler, en skole og en barnehage.

Vegetasjonen rundt kantene holdt ikke vekten av en person og det var vanskelig å komme til såpass mye vann at baitene kunne legges ut. Baitene ble derfor lagt i nærheten av hverandre, der det var mulig å komme til fritt vann.

### 3.6.4. Ørsta, Ørsta kommune

#### Hovdevatnet. Uttaksted 9

Hovdevatnet ligger med løvskog og litt spredt, eldre bebyggelse rundt. Undervegetasjonen består av urter.

#### Hovdeelva. Uttaksted 10

Hovdeelva renner fra Hovdevatnet, gjennom et etablert byggefelt med eneboliger med relativt store hager og ut i sjøen.

### Rystefeltet. Uttaksted 11 og 12

Elva renner fra fjellet og på utsiden av et etablert byggefelt med relative store hager. Ved enden av boligfeltet, ned mot elva var det en stor privat avfallsplass for hageavfall. Det ble lagt ut to bait i elva, en over avfallsplassen og en nedenfor avfallsplassen.

### Storelva i Ørsta. Uttaksted 13, 14 og 17



Figur 3.6.7. Storelva i Ørsta, ved uttaksted 17

Som navnet sier, er dette den største elva i Ørsta. Elva munner ut i Ørsta sentrum og samler opp vann fra flere småelver, blant annet Follestadelva. Øverst er det en del eldre gårder og spredt bebyggelse, nærmere sentrum er det et byggefelt og et handelssenter nederst. Ved prøveuttakstedet var det en eldre allè av bøk mot veien. Naturlig vegetasjon langs elva var blandet løvskog og undervegetasjon med urter.

### Follestadelva. Uttaksted 15 og 16

Elva kommer ned fra fjellet på nordsiden av Ørsta sentrum. Først er bebyggelesen spredt med eldre gårder, deretter renner elva gjennom etablerte byggefelt, gjennom Ørsta sentrum og munner ut i Storelva.

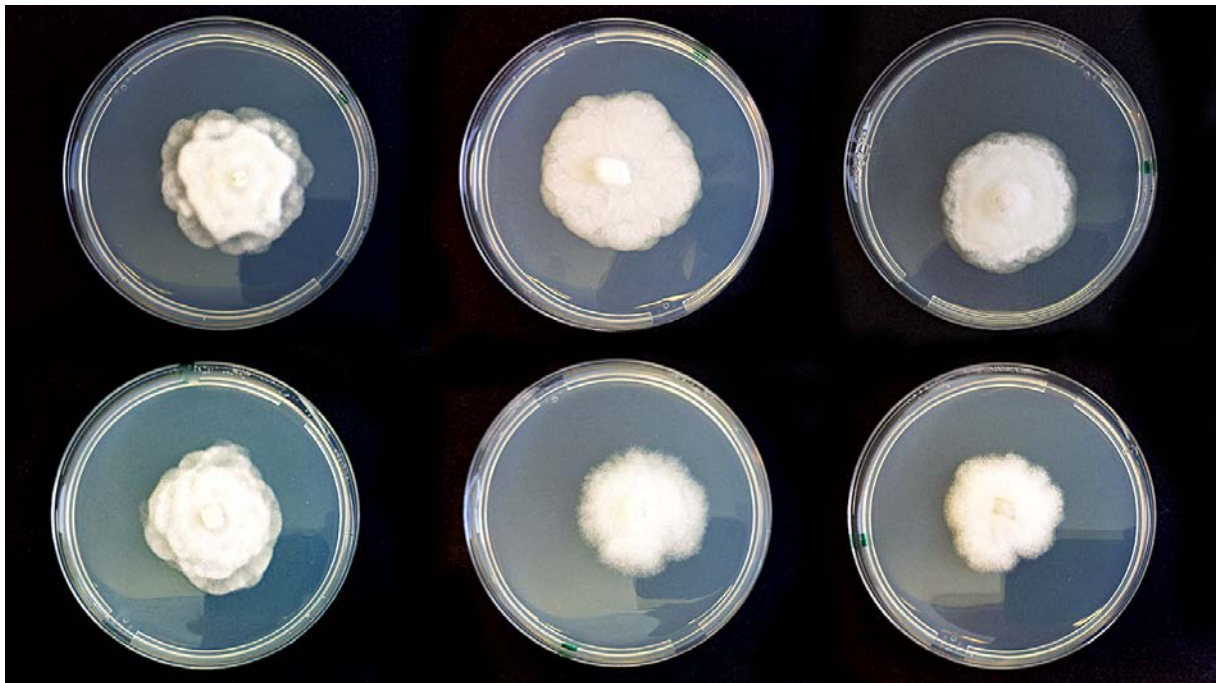


## 4. Resultater

*Phytophthora*-arter påvist ved hjelp av ITS sekvensering er merket med (s), mens arter fastsatt ved hjelp av morfologi er merket med (m).

### 4.1. IDENTIFISERING

Det ble påvist 6 arter av *Phytophthora*, disse var *P. gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman, *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess, *P. riparia* Reeser, Sutton and E Hansen, *P. taxon* Pgchlamydo, *P. cambivora* (Petri) Buisman og en hittil ukjent art av *Phytophthora* som hadde opptil 94 % sekvenslikhet med isolater av *P. lateralis* og *P. ramorum* (oppgitt som kommentar fra Brurberg, Bioforsk, som utførte artsbestemmelsen. Ikke oppgitt andre steder i oppgaven). I denne oppgaven blir navnet *Phytophthora* sp. Ørsta brukt om denne arten, etter stedet den ble funnet. I tillegg ble det funne en hittil ukjent art av *Halophytophthora* i brakkvann i Ålesund kommune. Figurene 4.1.1 – 4.1.2 viser bilder av ett isolat fra hver av de 6 *Phytophthora*-artene som ble funne, henholdsvis på PDA og V8. Figur 4.1.3 viser bilder av den hittil ukjente arten av *Halophytophthora* også på PDA og V8.



Figur 4.1.1. Alle *Phytophthora*-artene som ble påvist i undersøkelsen, inkubert ca. 2 uker ved 13°C i mørke. Fra venstre øverst: *P. gonapodyides* (Isolat nr. 250 285), *P. plurivora* (Isolat nr. 250 287) *P. riparia* (isolat nr. 250 304). Fra venstre nederst: *P. taxon* Pgchlamydo (Isolat nr. 250 286), *P. cambivora* (Isolat nr. 250 312), *Phytophthora* sp. Ørsta (Isolat nr. 250 316).



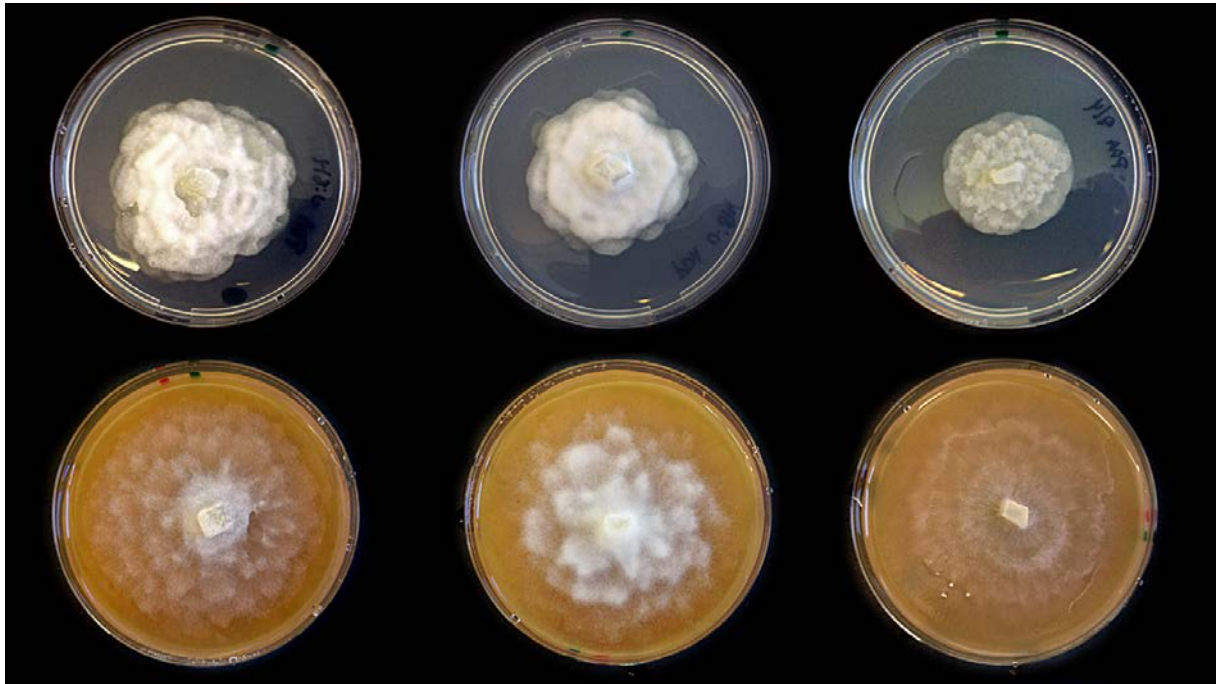
Figur 4.1.2. Alle *Phytophthora*-artene som ble påvist i undersøkelsen, inkubert ca. 2 uker ved 13°C i mørke. Fra venstre øverst: *P. gonapodyides* (Isolat nr. 250 285), *P. plurivora* (Isolat nr. 250 287), *P. riparia* (Isolat nr. 250 304). Fra venstre nederst: *P. taxon Pgchlamydo* (Isolat nr. 250 286), *P. cambivora* (Isolat nr. 250 312), *Phytophthora*. sp. Ørsta (Isolat nr. 250 316).



Figur 4.1.3. Den hittil ukjente arten *Halophytophthora* (Isolat nr. 250 306) som ble funnet i brakkvann i Ålesund kommune. Til venstre på PDA, på V8 til høyre. Begge skålene ble inkubert ca. 2 uker ved 13°C i mørke.

#### 4.1.1. Morfologisk

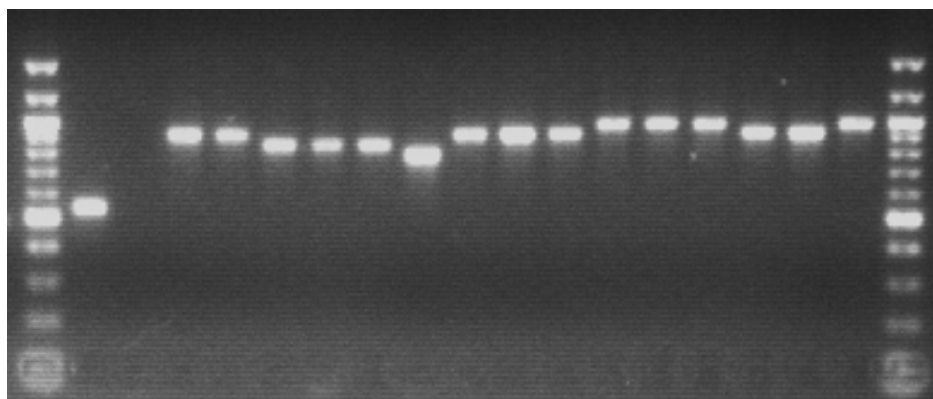
Figur 4.1.4. viser isolatene fra ett uttaksted, nr. 11 fra Brusdalsvatnet. Selv om de var morfologisk ulike, hører alle isolatene til *P. gonapodyides*.



Figur 4.1.4. Isolater fra uttaksted nr. 11. Brusdalsvatnet, nordsiden mot øst. ITS-sekvensering viste at de tre isolatene var *Phytophthora gonapodyides*. Øverst fra venstre PDA-skåler med isolat nr. 250 300, 250 301 og 250 302. Nederste rekke V8 skåler, med de samme isolatene med samme rekkefølge. Alle skålene ble inkubert 14 dager i mørke ved 13°C.

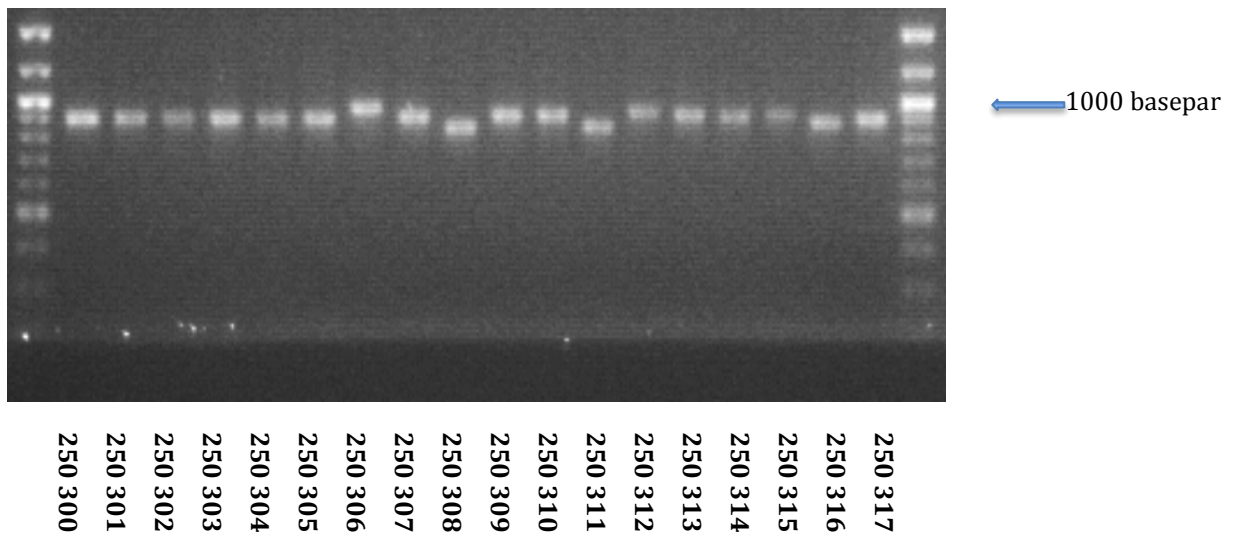
#### 4.1.2. Molekylært

Gelelektroforesen (Figur 4.1.5.) viser en positiv kontroll med DNA-sekvenser på 550 basepar. Isolatene ga bare ett bånd hver på gelelektroforesen, og båndene lå mellom 800 og 1000 basepar, se figurene 4.1.5. og 4.1.6. Isolat nr. 250 290 hadde DNA-sekvenser på omlag 800 basepar. Båndet til positivkontrollen lå ved omlag 550 basepar.



250 299  
250 298  
250 297  
250 296  
250 295  
250 294  
250 293  
250 292  
250 291  
250 290  
250 289  
250 288  
250 287  
250 286  
250 285  
Kontroll

Figur 4.1.5. De polymeriserte DNA-frekvensene (isolatnr. 250 285 til 250 299) separert ved hjelp av gelelektroforese. Stigene på kantene har trinn på 100 basepar. De brønnene i stigen som er ekstra sterke, er DNA-sekvenser med 500 basepar nederst og 1000 basepar øverst. Positivkontrollen ved siden av stigen til venstre har DNA-sekvenser på 550 basepar. En kan se at isolatenes DNA-sekvenser ligger mellom 800 og 1000 basepar.



Figur 4.1.6. De polymeriserte DNA-frekvensene (isolatnr. 250 300 til 250 317) separert ved hjelp av gelelektroforese. Stigene på kantene har trinn på 100 basepar. De brønnene i stigen som er ekstra sterke er DNA-sekvenser med 500 basepar nederst og 1000 basepar øverst. En kan se at isolatenes DNA-sekvenser ligger mellom 800 og 1000 basepar.

Tabell 4.1.1. Ålesund. *Phytophthora*-art og isolatnummer med uthevet skrift er de isolatene som ble bekreftet både ved morfologiske kjennetegn og ITS-sekvensering, mens de uten uthevet skrift ble bestemt kun ved hjelp av morfologiske kriterier. Resultatene som ikke er av interesse for oppgaven er oppført i parentes.

Uttaksted	Koordinater	Utlegg periode/ dato	Artsbestemte <i>Phytophthora</i> isolater	Materiale/ merknad	Isolat nummer
1. Byparken vest, avløp	62.47377°N - 6.16078°Ø	8-15.06.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 285</b>
		5-10.08.13	<b><i>P. taxon Pgchlamydo</i></b>	Baiting	<b>250 286</b>
		5-12.10.13	<b><i>P. plurivora</i></b> ( <i>Pythium</i> ) <i>P. taxon Pgchlamydo</i> ( <i>Pythium</i> )	Baiting Baiting Baiting Baiting	<b>250 287</b> 250 290 250 286 250 290
2. Byparken kunstig dam	62.47353°N - 6.16139°Ø	8-15.06.13	-	Bait borte	
		5-10.08.13	<i>P. taxon Pgchlamydo</i> <b>(<i>Pythium</i>)</b>	Baiting	250 286
		5-12.10.13	-	Baiting Bait borte	<b>250 288</b>
3. Byparken avløp v/hovedport	62.47471°N - 6.17992°Ø	8-15.06.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 291</b>
		5-10.08.13	<i>P. plurivora</i>	Baiting	250 289
		5-12.10.13	<i>P. plurivora</i> <b>(<i>Phytophythium</i>)</b>	Baiting Baiting	250 289 <b>250 290</b>
3a. Byparken	62.47339°N - 6.16182°Ø	12.10.13	Ikke påvist*	Stamme- materiale fra bøk	
		12.10.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Stamme- materiale fra bøk	<b>250 314</b>
3b. Brusdalshagen	62.47164°N - 6.17421°Ø	12.10.13	Påvist*	Stamme- materiale fra blodbøk	
		12.10.13	<b><i>P. cambivora</i></b>	Stamme- materiale fra blodbøk	<b>250 312**</b>
3c. Brusdalshagen	62.47164°N - 6.17421°Ø	12.10.13	Ikke påvist	Jord ved blodbøk	
4. Aksla, kunstig dam	62.47419°N - 6.17599°Ø	8-15.06.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 292</b>
		5-10.08.13	-	Bait borte	
		5-12.10.13	-	Bait borte	
5. Gåseid dammen	62.46575°N - 6.25348°Ø	8-15.06.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 293</b>
		5-10.08.13	<i>P. taxon Pgchlamydo</i> ( <i>Pythium</i> )	Baiting	250 286
		5-12.10.13		Baiting	++
6. Ratvika, elv	62.46342°N - 6.25701°Ø	8-15.06.13	<b>(<i>Phytophythium</i>)</b>	Baiting	<b>250 294</b>
		5-10.08.13	<i>P. plurivora</i> <b>(<i>Phytophythium</i>)</b>	Baiting	250 289
		5-12.10.13	-	Baiting Bait borte	<b>250 295</b>
7. Gåsdeidvatnet	62.46599°N - 6.26849°Ø	8-15.06.13	<i>P. taxon Pgchlamydo</i>	Baiting	250 286
		5-10.08.13	<i>P. taxon Pgchlamydo</i>	Baiting	250 286
		5-12.10.13	<b><i>P. gonapodyides</i></b> <i>P. taxon Pgchlamydo</i> <b>(<i>Phytophythium</i>)</b>	Baiting Baiting Baiting	<b>250 297</b> 250 286 <b>250 296</b>
8. Lerstadvatnet	62.4684°N - 6.30204°Ø	8-15.06.13	<i>P. gonapodyides</i>	Baiting	250 297
		5-10.08.13	<i>P. gonapodyides</i> <b>(<i>Phytophythium</i>)</b>	Baiting	250 297
		5-12.10.13	( <i>Pythium</i> ) <b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting Baiting	<b>250 299</b> ++ <b>250 298</b>
9. Olsvika	62.47822°N - 6.37328°Ø	8-15.06.13	Ikke påvist	Baiting	
		5-10.08.13	Ikke påvist	Baiting	
		5-12.10.13	Ikke påvist	Baiting	
10. Brusdalsvatnet nordsiden mot øst	62.47762°N - 6.43093°Ø	8-15.06.13	<i>P. plurivora</i>	Baiting	250 289
		5-10.08.13	<i>P. gonapodyides</i>	Baiting	250 297
		5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i> ( <i>Pythium</i> )	Baiting Baiting	250 297 ++

Uttaksted	Koordinater	Utlegg periode/ dato	Artsbestemte <i>Phytophthora</i> isolater	Materiale/ merknad	Isolat nummer
10a. Brusdalsvatnet nordsiden mot øst	62.48209°N - 6.45224°Ø	10.08.13	Ikke påvist	Stamme materiale fra selje	
11. Brusdalsvatnet nordsiden mot vest	62.47399°N - 6.40921°Ø	8-15.06.13  5-10.08.13 5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i>  - -	Baiting  Bait lå tørt Bait lå tørt	250 300 250 301 250 302
12. Brusdalsvatnet innløp	62.47008°N - 6.45657°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	Ikke påvist Ikke påvist -	Baiting Baiting Bait borte	
13. Brusdalsvatnet sørsiden	62.46582°N - 6.41575°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i> <i>P. gonapodyides</i> Ikke vekst	Baiting Baiting Baiting	250 297 250 297
14. Brusdalsvatnet utløp	62.46512°N - 6.38475°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i> <i>P. gonapodyides</i> <i>P. gonapodyides</i>	Baiting Baiting Baiting	250 297 250 301 250 303
14.a Brusdalsvatnet	62.46488°N - 6.38209°Ø	12.10.13	Ikke påvist	Stamme- materiale fra gråor	
15. Litlevatnet	62.46508°N - 6.37568°Ø	8-15.06.13  5-10.08.13  5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i> <b>(<i>Phytophthium</i>)</b> <i>P. gonapodyides</i> <i>P. taxon Pgchlamydo</i> <b>(<i>Pythium</i>)</b>	Baiting Baiting Baiting Baiting	250 303 250 308 250 309 250 286 ++
16. Litlevatnet utløp	62.46472°N - 6.36608°Ø	8-15.06.13  5-10.08.13 5-12.10.13	<i>P. riparia</i> ( <i>Pythium</i> ) ( <i>Pythium</i> ) <i>P. riparia</i> ( <i>Pythium</i> )	Baiting Baiting Baiting Baiting Baiting	250 304** ++ ++ 250 305** ++
17. Spjelkavikelva	62.45925°N - 6.35650°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	Ikke påvist <i>P. plurivora</i> -	Baiting Baiting Bait borte	250 289
18. Myrland, elv	62.43265°N - 6.38426°Ø	8-15.06.13+  5-10.08.13 5-12.10.13	<i>P. gonapodyides</i> <b>(<i>Halophytophthora</i>)</b> <i>P. gonapodyides</i> Ikke påvist	Baiting Baiting Baiting Baiting	250 307 250 306 250 307
19. Ekornås, elv	62.43183°N - 6.40299°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	Ikke påvist ( <i>Pythium</i> ) -	Baiting Baiting Bait borte	++
19a. Ekornås		10.08.13	Ikke påvist	Stamme- materiale fra selje	
20. Emblemsanden, elv	62.43074°N - 6.44501°Ø	8-15.06.13 5-10.08.13 5-12.10.13	Ikke påvist <i>P. plurivora</i> <i>P. gonapodyides</i>	Baiting Baiting Baiting	250 311 250 310

\*Analysert ved serologisk hurtigtest

\*\* mindre enn 99 % sikkert resultat fra sekvenseringen

+ Annet uttaksted i elva enn de to siste uttakene, uttakstedet er merket på kartet i vedlegg 2 som uttaksted 17a

++ Isolatet ble vurdert til å være *Pythium* før gruppering etter morfologi startet

- Betyr at prøvene med blader av *Rhododendron* (baitet) ble borte i løpet av de dagene de lå ute i vann og ingen analyse ble foretatt

Ved uttaksted 18, Myrland ble baitet under 1. baitingperiode plassert så nært utløpet at sjøvann kom opp til prøvestedet ved flo sjø. Siden det var usikkert om brakkvann ville påvirke resultatet, ble uttakstedet flyttet lengre opp i elva ved de to siste uttakene (se kart, vedlegg 2). Ved første uttak

i saltholdig vann ble det påvist en hittil ukjent art av *Halophytophthora* (Isolatnr. 250 306) og *P. gonapodyides* (m). Lengre oppe i elva ble *P. gonapodyides* (Isolatnr. 250 307) påvist ved andre uttak.

Av de isolatene som dannet oogonier i V8 agar (se tabellene 3.3.2 og 4.1.1), ble 3 isolater artsbestemt ved sekvensering. Sekvenseringen viste at alle 3 isolatene var *Phytophthora plurivora*, gruppe a) isolatnr. 250 287, gruppe b) isolatnr. 250 289 og gruppe c) isolatnr. 250 311.

I Ålesund ble det etter 1. baitingperiode i juni påvist *Phytophthora* i 68 % (n = 19) av baitene som ble analysert, og 3 arter ble påvist *P. gonapodyides* (s), *P. riparia* (s) og *P. plurivora* (m). I tillegg ble ett isolat morfologisk bestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo*, men dette isolatet dannet ikke klamydosporer i agar (Se tabell 4.3.1). Ved 2. baitingperiode i august ble det påvist *Phytophthora* ved 77 % (n = 18) av de analyserte baitene og 3 *Phytophthora* arter ble påvist: *P. gonapodyides* (s), *P. taxon Pgchlamydo* (s) og *P. plurivora* (s). Ved 3. baitingperiode i oktober ble det påvist *Phytophthora* ved 57 % (n = 14) av de analyserte baitene og de samme artene som ved første utlegg ble påvist; *P. gonapodyides* (s), *P. riparia* (s) og *P. plurivora* (m), samt ett isolat av *P. taxon Pgchlamydo* (m) som dannet klamydosporer i agar (se tabell 4.3.1.).

Dersom en ser på sammensetningen av *Phytophthora*-artene ved de forskjellige baitingperiodene, ser en av tabell 4.1.1. at *P. gonapodyides*, dominerte i 1. baitingperiode hvor 76 % (n = 13) av isolatene med påvisning av *Phytophthora* var *P. gonapodyides*. *P. taxon Pgchlamydo*, *P. riparia* og *P. plurivora* representerte 8 % hver av påvisningene. Den jevneste fordelingen mellom artene var i utleggsperiode 2, hvor *P. gonapodyides* ble påvist ved 38 % (n = 16) av isolatene med påvisning av *Phytophthora*, *P. plurivora* representerte 31 %, sekvenserte *P. taxon Pgchlamydo* utgjorde 6 %, mens 25 % var *P. taxon Pgchlamydo* isolater som ikke dannet klamydosporer i agar (se tabell 4.3.1). I 3. baitingperiode var 56 % (n = 9) av påvisningene *P. gonapodyides*. *P. riparia* og *P. plurivora* representerte 11 % hver, mens *P. taxon Pgchlamydo* representerte 11 % med ett isolat som dannet klamydosporer i agar og ett 11 % som ikke dannet klamydosporer i agar (se tabell 4.3.1).

I Brusdalsvannet, uttakstedene 10 til 14, ble det ikke påvist *Phytophthora* i en elv som kom inn i Brusdalsvatnet (Uttaksted 12. Brusdalsvatnet, innløp), mens det ble påvist *P. gonapodyides* (s) og *P. plurivora* (m) i selve Brusdalsvatnet og i elva som gikk ut av vannet ble det påvist *P. gonapodyides* (s).

Samlet sett for alle tre utleggsperiodene i Ålesund, ble det påvist *Phytophthora* ved 17 av 20 uttaksteder, det vil si 85 % av uttakstedene. Uttakstedene uten påvisning var 9. Olsvika, 12. Brusdalsvatnet innløp og 19. Ekornås.

Tabell 4.1.2. Ulsteinvik. *Phytophthora*-art og isolatnummer med uthevet skrift er de isolatene som ble bekreftet både ved morfologiske kjennetegn og ITS-sekvensering, mens de uten uthevet skrift ble bestemt kun ved hjelp av morfologiske kriterier. Resultatene som ikke er av interesse for oppgaven er oppført i parentes.

Uttaksted	Koordinater	Utlegg periode/ dato	Artsbestemte <i>Phytophthora</i> isolater	Materiale/ merknad	Isolat nr./ bestemt ved
1. Sauneselva	62.33744°N – 5.87525°Ø	24-31.08.2013	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 313</b>
2. Sauneselva, utløp	62.34397°N – 5.86938°Ø	24-31.08.2013	<i>P. gonapodyides</i>	Baiting	250 313
3. Vikelva	62.34431°N – 5.86669°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
4. Vikelva	62.34307°N – 5.85327°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
5. Skeide, elv	62.35247°N – 5.82749°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
6. Raudeelva	62.35733°N – 5.82261°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	

I Usteinvik ble det kun påvist *Phytophthora* ved to av uttakstedene, og begge var fra Sauneselva. I de 3 andre elvene Vikelva, elva på Skeide og Raudeelva ble det ikke påvist *Phytophthora*.

Tabell 4.1.3. Fosnavåg. *Phytophthora*-art og isolatnummer med uthevet skrift er de isolatene som ble bekreftet både ved morfologiske kjennetegn og ITS-sekvensering, mens de uten uthevet skrift ble bestemt kun ved hjelp av morfologiske kriterier.

Uttaksted	Koordinater	Utlegg periode/ dato	Artsbestemte <i>Phytophthora</i> isolater	Materiale/ merknad	Isolat nr.
7. Myklebust vatnet	62.33229°N – 5.64274°Ø	24-31.08.2013	<b><i>P. gonapodyides</i></b>	Baiting	<b>250 317</b>
8. Myklebust vatnet	62.33184°N – 5.64513°Ø	24-31.08.2013	<i>P. gonapodyides</i>	Baiting	250 313

I Fosnavåg (Tabell 4.1.3.) var Myklebustvatnet den eneste plassen hvor det var mulig å legge ut bait. Det ble lagt ut to bait i nærheten av hverandre i Myklebustvatnet, hvor det var mulig å komme til fritt vann.



Tabell 4.1.4. Ørsta. *Phytophthora*-art og isolatnummer med uthevet skrift er de isolatene som ble bekreftet både ved morfologiske kjennetegn og ITS-sekvensering, mens de uten uthevet skrift ble bestemt kun ved hjelp av morfologiske kriterier. Resultatene som ikke er av interesse for oppgaven er oppført i parentes.

Uttaksted	Koordinater	Utlegg periode/ dato	Artsbestemte <i>Phytophthora</i> isolater	Materiale/ merknad	Isolat nr.
9. Hovdevatnet	62.33184°N – 6.64513°Ø	24-31.08.2013	<b>(<i>Phytopythium</i>)</b> ( <i>Pyhtium</i> )	Baiting	<b>250 315**</b> ++
10. Hovdeelva	62.19104°N – 6.08627°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
11. Rystefeltet, øverst	62.18321°N – 6.0970°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
12. Rystefeltet, nederst	62.18471°N – 6.10273°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
13. Storelva	62.19189°N – 6.12565°Ø	24-31.08.2013	-	Bait lå tørt	
14. Storelva	62.19089°N – 6.13122°Ø	24-31.08.2013	-	Bait lå tørt	
15. Follestadelva ved Daleveien	62.19780°N – 6.14642°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
16. Follestadelva ved Daleteigane,	62.20832°N – 6.16834°Ø	24-31.08.2013	Ikke påvist	Baiting	
17. Storelva ved Dalevegen	62.18369°N – 6.16071°Ø	24-31.08.2013	<b><i>Phytophthora. sp.</i></b> <b>Ørsta</b> <i>P. gonapodyides</i>	Baiting Baiting	<b>250 316</b> 250 313

++ Isolatet ble vurdert til å være *Pythium* før gruppering etter morfologi startet

– Betyr at prøvene med blader av *Rhododendron* (baitet) ble borte i løpet av de dagene de lå ute i vann og ingen analyse ble foretatt

I Ørsta (Tabell 4.1.4.) ble det lagt ut 9 bait, og 3 av disse ble lagt i Storelva, hvorav 2 bait ble liggende tørt på grunn av stor variasjon i vannstanden i elva. Ved det siste uttakstedet, nr 17. Storelva ved Dalevegen, ble det påvist 2 arter av *Phytophthora*, *Phytophthora. sp. Ørsta* (s) og *P. gonapodyides* (m).

Det ble ikke påvist *Phytophthora* fra av uttakstedene ved Rystefeltet i Ørsta (Uttaksted 11 og 12).

Ingen av bladene i kontrollene som ble baitet i vann fra springen eller i kokt vann fikk vasstrukne flekker.

I denne undersøkelsen ble det tilsammen påvist *P. gonapodyides* i 16 sekvenserte isolater, fra 14 uttaksteder og 10 uavhengige vannsystemer. Fra alle vannsystemene med påvisning av *P. gonapodyides* ble påvisningene bekreftet med sekvensering. Bortsett fra ved uttaksted nr. 17. Storelva ved Dalevegen, her ble isolatet kun morfologisk bestemt til *P. gonapodyides*.

De morfologisk like isolatene dannet en gruppe og ett isolat fra gruppen ble valgt ut til ITS-sekvensering for å representere denne gruppen. Fra 7 av gruppene ble det i tillegg valgt ut ett

ekstra isolat for å kontrollere om de morfologiske vurderingene var riktige (se tabell 4.1.5). Av resultatene fra ITS-sekvenseringen ser en at alle de 7 ekstra isolatene som ble sekvensert (høyre side av tabell 4.1.5.) ga det samme resultatet som det første utvalgte isolatet i gruppen (venstre side av tabell 4.1.5).

Tabell 4.1.5. Kryssjekk av morfologiske vurderinger. De isolatene som ble valgt ut for å representere isolatene i den morfologisk like gruppen til venstre. Fra 7 av gruppene ble ett ekstra isolat sendt inn, og resultatet fra disse kryssjekkene står til høyre. *P.* er forkortelse for *Phytophthora*. De isolatene som som ble sekvensert og artsbesemt til ikke å være *Phytophthora*, ble satt i parentes.

Isolat som ble bestemt å representere gruppen		Kryssjekk, fra 7 grupper hvor ett ekstra isolat ble sendt inn	
Isolat nr.	ITS sekvensert resultat	Isolat nr.	ITS sekvensert resultat
250 290	( <i>Phytopythium</i> )	250 296	( <i>Phytopythium</i> )
250 294	( <i>Phytopytium</i> )	250 295	( <i>Phytopytium</i> )
250 300	<i>P. gonapodyides</i>	250 310	<i>P. gonapodyides</i>
250 301	<i>P. gonapodyides</i>	250 303	<i>P. gonapodyides</i>
250 302	<i>P. gonapodyides</i>	250 307	<i>P. gonapodyides</i>
250 308	( <i>Phytopythium</i> )	250 288	( <i>Phytopythium</i> )
250 313	<i>P. gonapodyides</i>	250 317	<i>P. gonapodyides</i>

## 4.2. PATOGENITETSTEST

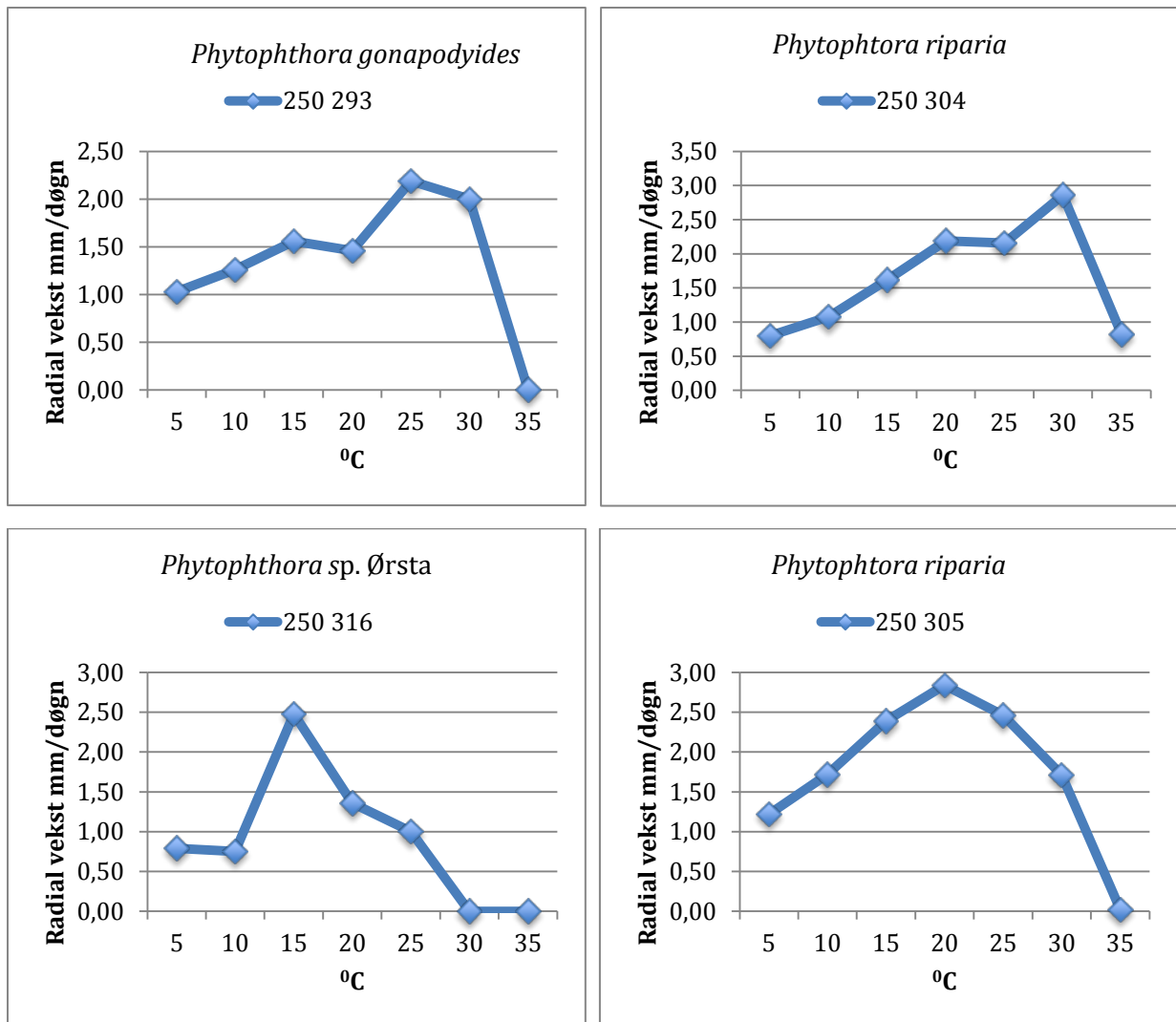
Ved første forsøk, hvor bladene ble dyppet ca. 5 sekunder i 70 % etanol før de ble tørket av og inokulert, ble alle bladene brune, også kontrollene som ikke var inokulert. Resultatene fra denne undersøkelsen kunne derfor ikke brukes.

Ved andre forsøk, hvor bladene ikke ble forhåndsbehandlet, ble forsøket startet den 25. april 2014 og resultatet fra denne undersøkelsen foreligger ikke ennå, pr. 14. mai 2014.

## 4.3. MORFOLOGISKE UNDERSØKELSER

### 4.3.1. Veksthastigheter

De radiale veksthastighetene for isolatene *P. gonapodyides* (Isolatnr. 250 293), *P. riparia* (Isolatnr. 250 304 og 250 305) og *Phytophthora*. sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316) som ble undersøkt på PDA ved temperaturer fra 5°C til 35°C, med trinn på 5°C (Figur 4.3.1.).



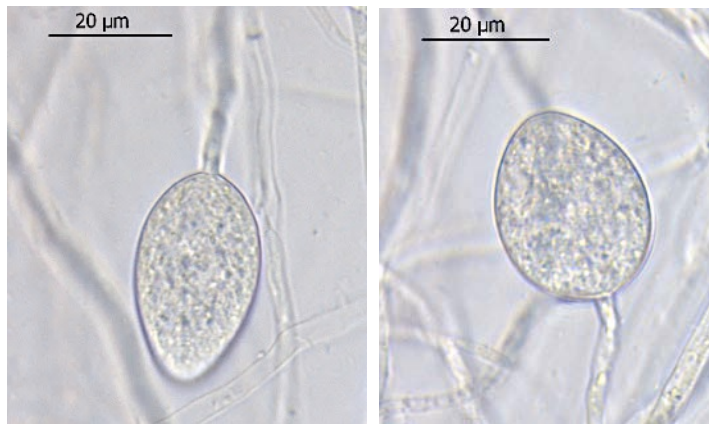
Figur 4.3.1. Radial veksthastighet i millimeter pr. døgn, for *Phytophthora gonapodyides* (Isolatnr. 250 293), *P. riparia* (Isolatnr. 250 304 og 250 305) og *Phytophthora* sp. Ørsta (250 316). Isolatene vokste i 9 cm Petriskåler på PDA, inkubert i mørke ved temperaturer som angitt i figuren. For ordens skyld er begge isolatene av *P. riparia* satt under hverandre i figuren.

Av tabell 4.2.1 ser en at *P. riparia* isolatnr. 250 304 ble påvist ved baiting ved uttaksted 16. Litlevatnet, utløp i juni og at dette isolatet hadde optimumstempeatur på omlag 30°C (Figur 4.3.1.). Det andre isolatet av *P. riparia*, isolatnr. 250 305, ble påvist ved samme uttaksted i august og hadde optimumstemperatur omlag 20°C. Isolatnr. 250 293, *P. gonapodyides* hadde en optimumstemperatur på omlag 25°C og isolatnr. 250 316 av *Phytophthora* sp. Ørsta hadde lavest optimumstemperatur av disse isolatene på omlag 15°C.

#### 4.3.2. Ukjønna strukturer i vann

*P. cambivora* (Isolatnr. 250 312) dannet sporangier både i autoklavert og filtrert vann fra Andedammen ved NMBU med biter av V8-agar. Isolatene var inkubert ved 13°C i mørke.

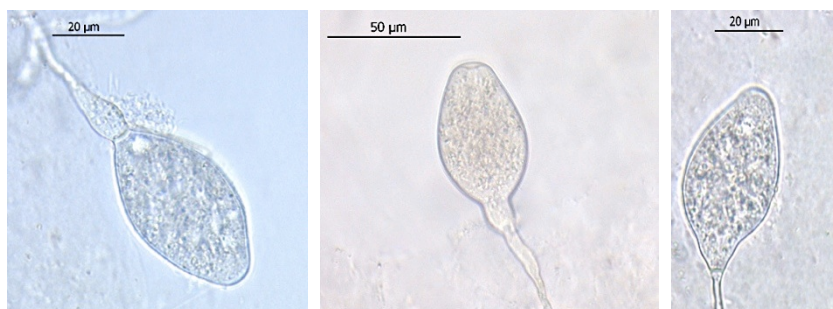
Sporangiene varierte i form mellom ovoide og ellipsoide, og de var ikke papillate. Størrelsen var  $33.29 \times 15.35 \mu\text{m}$  ( $n = 20$ ) og varierte fra  $24.43 \times 18.00 \mu\text{m}$  til  $41.14 \times 31.00 \mu\text{m}$ .



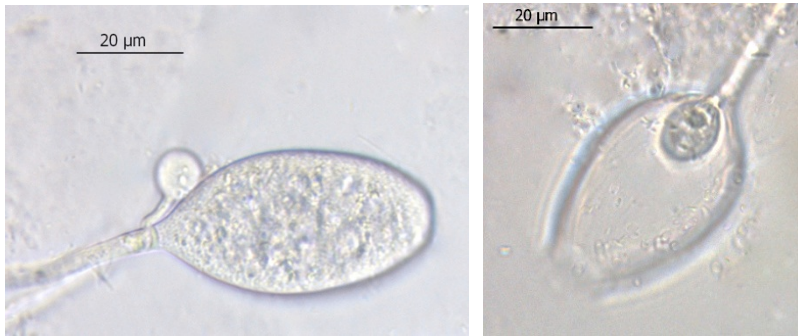
4.3.2. Sporangier fra *Phytophthora cambivora* dannet i V8 agar oversvømt med autoklavert eller filtrert vann fra Andedammen ved NMBU. Isolatene var inkubert ved  $13^\circ\text{C}$  i mørke.

*P. riparia* (Isolatnr. 250 304): Det ble kun dannet hyfer i vann, ingen andre strukturer ble observert.

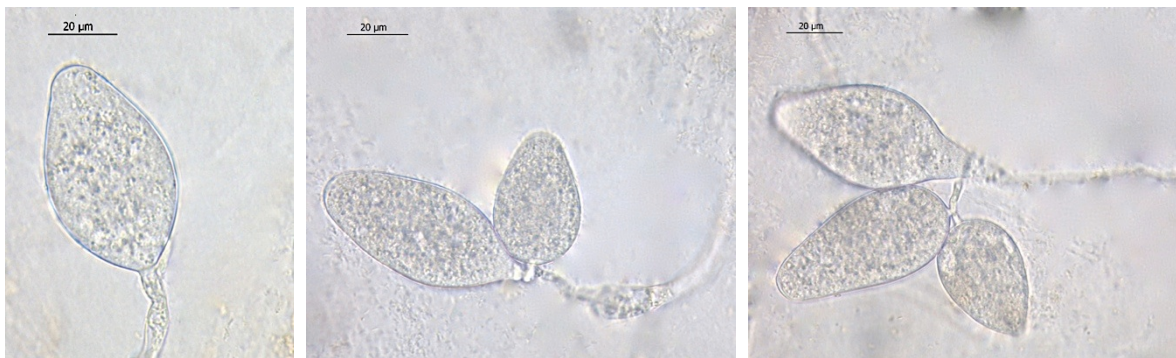
*Phytophthora*. sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316): Den eneste metoden (se tabell 3.5.1.) som ga sporangier (Figur 4.3.3) og oppsvulming i hyfene var isolatene som ble tilsatt filtrert vann fra Andedammen og satt mørkt på kjølerom ved  $13^\circ\text{C}$ . Det ble dannet rikelig med sporangier ved endringer i temperaturene. Sporangiene hadde forskjellig form, og de var ovoide til ellipsoide og semipapillate. Gjennomvekst (proliferasjon), eller dannelse av nye sporangier fra de gamle, tomme, sporangiene, var enten ekstern eller intern. Ved intern gjennomvekst ble det nye sporangiet dannet nedi det gamle på en kort sporangiofor (Figur 4.3.4.) Sporangiene opptrådte enten enkeltvis eller 2 til 4 sammen, i et sympodium. Sporangioforene var korte, noe som gjorde at sporangiene satt tett sammen (Figur 4.3.5.). Ved skylling med vann falt sporangiene ikke av sporangioforene. Figur 4.3.7. viser cyster i sporangiene og cyster som frigjøres fra et sporangium. Det ble også observert zoosporer, men disse lyktes det imidlertid ikke å ta bilde av.



Figur 4.3.3. Sporangier fra *Phytophthora* sp. Ørsta.



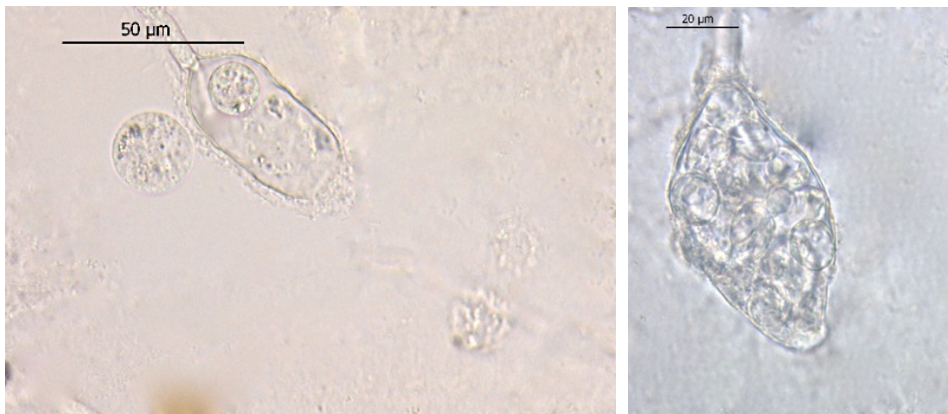
Figur 4.3.4. Ekstern gjennomvekst til venstre og intern gjennomvekst til høyre hos *Phytophthora* sp. Ørsta. Åpningen i sporangiet var 9.3 µm.



Figur 4.3.5. Sporangiene i *Phytophthora* sp. Ørsta, opptrådte enkeltvis (til venstre) eller i sympodium. I sympodium med to sporangier i midten og tre sporangier til høyre. Det ble observert sympodium med opp til 4 sporangier sammen.

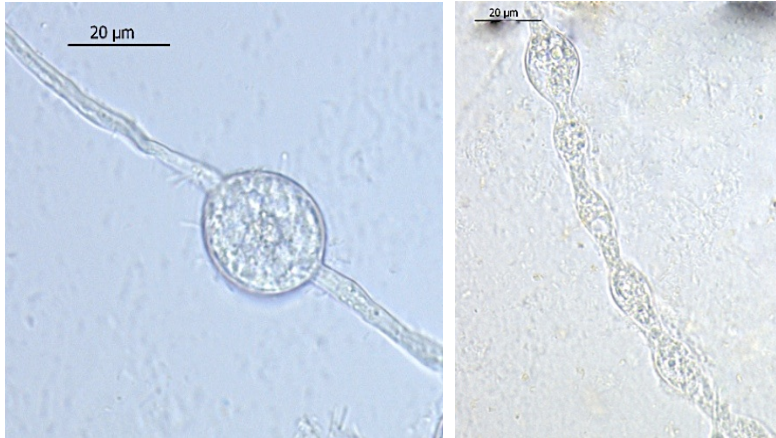


Figur 4.3.6. Peanøttform på sporangiene hos *Phytophthora* sp. Ørsta. Disse ble observert men var ikke vanlig.

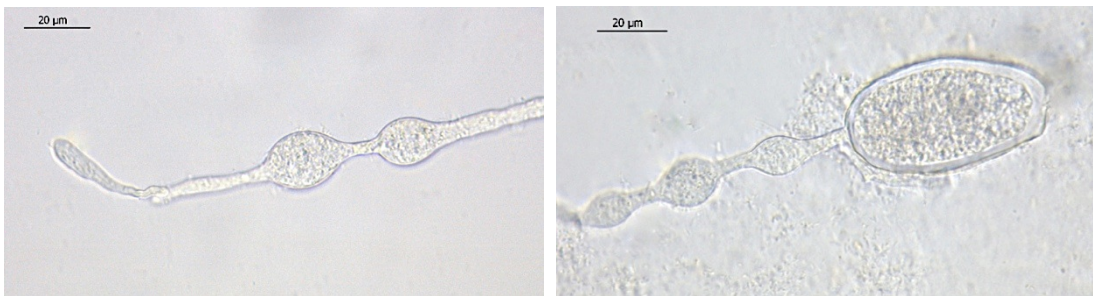


Figur 4.3.7. Sporangium hos *Phytophthora* sp. Ørsta, med cyster av zoosporer. En cyste er ennå inni sporangiet, en har nettopp kommet ut, som er lett å se ved siden av sporangiet, samt to stykker som en kan skimte foran sporangiet ned mot høyre hjørne av bildet. Til høyre ser en cyster i et sporangium.

Det ble observert oppsvulminger i hyfene, disse var enten enkeltvis eller i kjeder, se figurene 4.3.8. og 4.3.9.

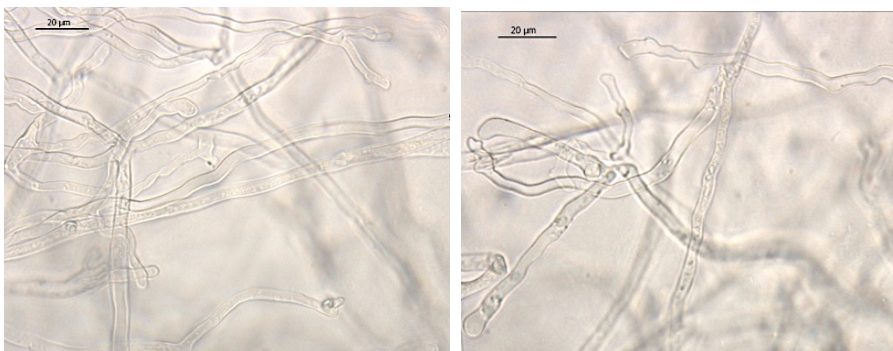


Figur 4.3.8. Det ble observert oppsvulminger i hyfene hos *Phytophthora* sp. Ørsta. Disse var enten enkeltvis som til venstre eller i kjeder, til høyre.



Figur 4.3.9. *Phytophthora* sp. Ørsta dannet oppsvulminger i hyfene. Til høyre er det et sporangium i enden av hyfen.

Hyfene var glatte, av og til knudrete og gjennomsnittlig bredde på hyfene var  $5.1 \mu\text{m}$  ( $n = 20$ ), se figur 4.3.10.



Figur 4.3.10. Hyfene hos *Phytophthora* sp. Ørsta var som regel glatte, men kunne noen ganger være knudrete.

#### 4.3.3. Ukjønna strukturer i agar

*Phytophthora* taxon Pgchlamydo (Isolatnr. 250 286): Dette isolatet ble isolert fra uttaksted 1. Byparken vest, avløp, og dannet klamydosporer i gulrotagar. Det gjorde også det andre isolatet fra samme uttaksted som var morfologisk bestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo*. De andre isolatene som var morfologisk bestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo*, dannet ikke klamydosporer i gulrotagar, se tabell 4.3.1.



Figur 4.3.11. *Phytophthora* taxon Pgchlamydo (Isolatnr. 250 286) dannet rikelig med klamydosporer i gulrotagar. Isolatet var inkubert i mørke, ved 23°C, og dannet klamydosporer etter 4 dager.

Tabell 4.3.1. Isolater av *Phytophthora* taxon Pgchlamydo hvorav et ble sekvensert (isolatnummer er oppgitt i parentes) og 7 isolater ble morfologisk bestemt til å være *P. taxon Pgchlamydo*. Isolatene ble inkubert i mørke ved 23°C i 2 uker.

Uttaksteder i Ålesund	Antall isolater fra uttakstedet/isolat-nummer	Isolater som dannet klamydosporer i gulrotagar
<b>1. Byparken vest, avløp</b>	1 (Isolatnr. 250 286) 1	1 1
<b>2. Byparken kunstig dam</b>	1	0
<b>5. Gåseiddammen</b>	1	0
<b>7. Gåseidvatnet</b>	3	0
<b>15. Litlevatnet</b>	1	0

#### 4.3.4. Kjønna strukturer i vann

Det ble ikke observert kjønna strukturer (oogonier, oosporer eller antheridier) i noen av isolatene som ble lagt i vann, dette er vist i tabell 3.5.1.

#### 4.3.5 Kjønna strukturer i agar

*P. cambivora* (Isolatnr. 250 312): Ved bruk av krysningstype *Phytophthora cryptogea* A<sub>2</sub> ble det dannet kjønna strukturer, oogonier, i gulrotagaren hos *P. cambivora* (Isolatnr. 250 312), se figur 4.3.12., men ikke ved bruk av krysningstype A<sub>1</sub>. Antheridiene omsluttet oogoniene, altså en amphigyn omslutning. Oogoniene var gjennomsnittlig 31.2 μm (n = 20), og varierte fra 24.9 til 36.8

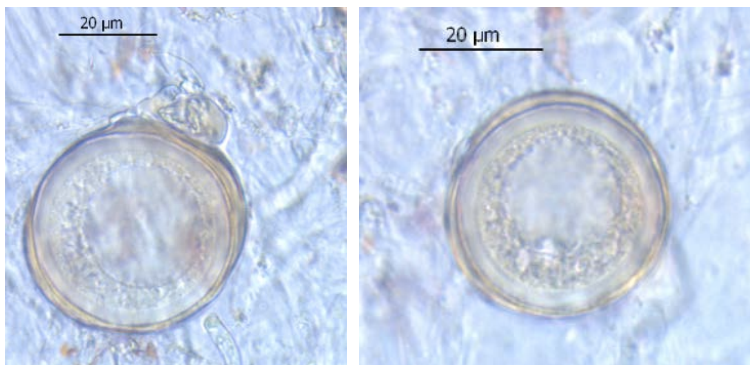
$\mu\text{m}$ . Det var kun glatte oogonier som ble målt. De var glatte eller knudrete, plerotiske og oosporene i oogoniene var gjennomsnittlig  $28.8 \mu\text{m}$  ( $n = 20$ ) og varierte fra  $23.0$  til  $34.07 \mu\text{m}$ . Oosporeveggene var gjennomsnittlig  $2.7 \mu\text{m}$  ( $n = 20$ ) og varierte fra  $1.6$  til  $3.9 \mu\text{m}$ . Antheridiene var gjennomsnittlig  $16.3 \times 18.4 \mu\text{m}$  ( $n = 12$ ) og varierte fra  $18.5 \times 27.1 \mu\text{m}$  til  $12.7 \times 13.3 \mu\text{m}$ .



Figur 4.3.12. Oogoniene hos *Phytophthora cambivora* hadde amphigyne antheridier. De var enten knudrete (til venstre) eller glatte (til høyre).

*P. riparia* (Isolatnr. 250 304): Det ble ikke dannet kjønna strukturer i agar, verken ved bruk av *P. cryptogea* krysningstype  $A_1$  eller  $A_2$  i gulrotagar eller alene på gulrotagar.

*Phytophthora*. sp. Ørsta (Isolatnr. 250 316): Det ble dannet oogonier ved tilstedeværelse av både *P. cryptogea* krysningstype  $A_1$  og  $A_2$  på gulrotagar, og på gulrotagar alene. Oogoniene var i størrelseordenen  $33.8$  til  $45.4 \mu\text{m}$  ( $n = 16$ ), gjennomsnittlig  $40.8 \mu\text{m}$ . Oosporene fylte i hovedsak oogoniene helt (plerotisk), men i noen tilfeller var de ikke helt plerotiske, i størrelse varierte oosporene fra  $33.2 \mu\text{m}$  til  $41.7$  ( $n = 16$ ), gjennomsnittlig  $37.4 \mu\text{m}$ . Oosporenes vegg var  $2.2$  til  $4.0 \mu\text{m}$  tykk ( $n = 16$ ), gjennomsnittlig  $3.1 \mu\text{m}$ .



Figur 4.3.13. Oogonier hos *Phytophthora* sp. Ørsta var pigmenterte, oosporene fylte oogoniene (plerotisk) hos de fleste oogoniene, antheridiene var paragyne.



Antheridiene omsluttet ikke oogoniene helt (paragyne), og det var 1 til 4 antheridier pr. oogonium. Oogoniene ble kun dannet i bitene av gulrot i agaren. I noen tilfeller gikk stilken til oogoniet rundt antheridiet.

*P. plurivora*, isolatnr. 250 287, 250 289, 250 311, samt de isolatene som ble morfologisk bestemte til å være *P. plurivora* dannet alle oogonier i V8-agar. Den gjennomsnittlige størrelsen på oogoniene var  $27.4 \pm 1.9 \mu\text{m}$  (n = 20).

Tabell 4.3.2 Oversikt over morfologiske trekk for *Phytophthora*. sp. Ørsta sammenlignet med *P. ramorum* og *P. lateralis*.

	<b><i>Phytophthora</i>. sp. Ørsta Isolatnr. 250 316</b>	<b><i>P. ramorum</i> Werres, De Cock &amp; Man in 't Veld 2001</b>	<b><i>P. lateralis</i> Tucker &amp; Milbrath 1942</b>
<b>Temperaturer</b>	Minimum < 5°C Optimum omtrent 15°C Maksimum mellom 25-30°C	Minimum 2°C Optimum 20°C (17-30°C ble registrert) Maksimum 27°C (25-37°C ble registrert)	Minimum 3°C Optimum 20°C Maksimum <26°C **
Radial vekst i millimeter/døgn ved 20°C	1.4 mm/d	2.8 mm/d	$2.2 \pm 0.37 - 4.4 \pm 0.22$ mm/d *
<b>Sporangier</b>			
Form	Ovoide, ellipsoide eller semi-papillate med avrundet base, eller base med tapp	Ellipsoide, spindelformet, eller forlenget ovoide med utydelig papilla, avrundet ved basis, av og til med tappet base.	Ovate, obovate, obpyriform, forlenget, ikke-papillate+ Normal, forlenget, forvridd * ikke-papillate, ovate, obovate, obpyriform, forlenget eller forvridd**
Sympodial	Enkel eller sympodial, opp til 4 sporangier sammen	Enkel eller sympodial	Sympodial+
Lengde $\mu\text{m}$	37.2 - 68.9 $\mu\text{m}$ (n = 20), gjennomsnittlig 52.1 $\mu\text{m}$	40 - 80 $\mu\text{m}$ , gjennomsnittlig 52 $\mu\text{m}$	26 - 60 $\mu\text{m}$ , gjennomsnittlig 36 $\mu\text{m}$ + $49.0 \pm 1.5 - 86.1 \pm 3.60 \mu\text{m}^*$
Bredde	17.7 - 36.8 $\mu\text{m}$ (n = 20), gjennomsnittlig 29.8 $\mu\text{m}$	20 - 32 $\mu\text{m}$ , gjennomsnittlig 24 $\mu\text{m}$	12 - 20 $\mu\text{m}$ , gjennomsnittlig 15 $\mu\text{m}$ + $24.9 \pm 1.09 - 31.5 \pm 1.83 \mu\text{m}^*$
Lengde/bredde forhold	Gjennomsnittlig 1.8	Gjennomsnittlig 2.16	Flere varianter; 2.5, 3.0, 2.4 *
Gjennomvekst	Ekstern og intern med korte sporangioforer		Ekstern eller intern inne i den gamle sporangien+
Caducouse	Ser ut til å være persistente	Caducouse	Persistente, men noen isolater kan ha en liten andel caducouse sporangier++
<b>Oogonier</b>	Glatte, sfæriske, terminale 33.8 - 45.4 $\mu\text{m}$ (n = 16), gjennomsnittlig 40.8 $\mu\text{m}$	Glatt, nesten sfæriske, terminale også laterale 24 - 40 $\mu\text{m}$ , vanligst 29-33 $\mu\text{m}$	Ikke observert+ Glatt, subglobulære, fargeløse 28 - 31.2 - 38 $\mu\text{m}$ , sjelden***

	<i>Phytophthora</i> sp. Ørsta Isolatnr. 250 316	<i>P. ramorum</i> Werres, De Cock & Man in 't Veld 2001	<i>P. lateralis</i> Tucker & Milbrath 1942
<b>Oosporer</b>	33.2 – 41.7 µm (n = 16), gjennomsnittlig 37.4 µm	20 - 36 µm, vanligst 27 - 31 µm	Ikke rapportert+
Plerotisme	De fleste plerotisk, noen ikke helt plerotisk	Plerotisk	
Tykkelse oosporevegg	Veggykkelse 2.2 – 4.0 µm (n = 16), gjennomsnittlig 3.1 µm		
<b>Antheridier</b>	Paragyne	Amphigyne	Paragyne**
<b>Homotallisme/ Heterotallisme</b>	Ser ut til å være homotallisk	Heterotallisk	Homotallisk** Produserer ikke kjønnne strukturer med kryssningstyper slik som homotalliske arter gjør***
<b>Hyfer</b> Form	Oppsvulminger i hyfene Mycelet oftest glatt men kunne være knudrete		Danner oppsvulminger i hyfene+++ Mycelet vanligvis glatt men kan være knudrete+
Bredde	Gjennomsnitt 5.1 µm, varierte mellom 4.4 – 6.5 µm på gulrotagar	Opp til 8 µm	
<b>Klamydosporer</b>	Ikke observert i V8, PDA eller gulrotagar	29 - 91 µm, vanligst 46 - 60 µm	Terminal plassering eller lateral plassering, 20-77 µm, gjennomsnittlig 40 µm + 32.7 ± 1.06 – 47.5 ± 0.05 µm*
<b>Clade</b>		Clade 8 (Kroon et al. 2012)	Clade 8 (Kroon et al. 2012)
<b>Kilder</b>		(Werres et al. 2001)	+ (Tucker & Milbrath 1942) ++(Hansen et al. 1999) +++(Gallegly & Hong 2009) *(Brasier et al. 2012) **(Erwin & Ribeiro 1996) ***(Brasier et al. 2010)

## 5. Diskusjon

Hypotesen i oppgaven var å undersøke om *Phytophthora* er utbredt i vann og vannveier på Sunnmøre. Fra denne undersøkelsen kan en klart slå fast at *Phytophthora* er utbredt i vann og vannveier på Sunnmøre. I Ålesund kommune ble det påvist *Phytophthora* ved 85 % (n = 20) av uttakstedene, noe som tyder på at disse organismene har godt potensiale for å spre seg og overleve i området. Siden det ved de andre byene Ulsteinvik, Fosnavåg og tettstedet Ørsta bare ble utført en utleggsperiode med et begrenset antall bait, er det ikke et tilstrekkelig grunnlag til å dra gode konklusjoner, men en kan slå fast at det også finnes *Phytophthora* i vann og vannveier der. Når *Phytophthora* har etablert seg i vann og vannveier kan dette føre til at planter i vannkanten smittes og føre til videre spredning av *Phytophthora*. Ferdsl og annen aktivitet i infiserte områder kan spre

*Phytophthora* med både vann og jord. Også dyr kan dra smitta jord med seg. Spesielt ille er det dersom infisert vann blir brukt til vanning i planteskoler.

De øverste uttakstedene i Sauneselva i Ulsteinvik og Storelva i Ørsta burde, ideelt sett, vært plassert ovenfor all bebyggelse i elva, slik at en så om vannet var uten *Phytophthora* smitte før det kom inn i bebygd område eller om *Phytophthora* var tilstede. En ville da hatt grunnlag for å vurdere om den påviste smitten kunne være spredt med menneskelig aktivitet.

Fra Uttaksted 11, Brusdalsvatnet, nordsiden mot øst, ble det sekvensert 3 isolater, disse var morfologisk forskjellige på PDA og V8-agar. Resultatet fra sekvenseringen viste likevel at alle tre var *P. gonapodyides*. Disse morfologiske forskjellene kan tyde på at isolatene har forskjellig opphav eller at arten har vært etablert lenge i området og gitt opphav til variasjon i genmaterialet gjennom mutasjoner. *P. gonapodyides* ble ikke funnet i Norge før i 2007 (Herrero et al. 2011), men denne arten er svært utbredd i alle undersøkte vassdrag både på Sørvest- og Østlandet, også i naturområder, så det er rimelig å anta at denne arten ikke er introdusert nylig (Talgø et al. 2012a; Talgø et al. 2012b; Talgø 2013).

I elva som bringer vann inn i Brusdalsvatnet ble det ikke påvist *Phytophthora*. Fra 4 bait i selve Brusdalsvatnet ble det påvist 8 isolater av *P. gonapodyides* og ett isolat av *P. plurivora*. Dette kan tyde på at menneskelig aktivitet rundt vannet har bragt med seg smitte av *Phytophthora* til vannet. Siden isolatene var morfologisk forskjellige kan dette tyde på at isolatene ikke har felles opphav, men det er også kjent at det kan være vanskelig å påvise *Phytophthora* i elver der vannet strømmer raskt (V. Talgø, Bioforsk, pers. comm.).

De to isolatene av *P. riparia* som ble påvist, hadde forskjellige optimumstemperaturer for radial vekst. Isolatnr. 250 304 hadde høyest optimumstemperatur, omlag 30°C og isolat nr. 250 305 hadde optimumstemperatur på omlag 20°C. I kommentarene fra M. B. Brurberg i forbindelse med artsbestemmelsen, står det at isolatnr. 250 304 ikke hadde full DNA-sekvens, men den hadde opp til 99 % sekvenslikhet med *P. riparia*. I kommentarene til isolatnr. 250 305 står det at DNA-sekvensene ikke var fullstendige og at likheten med isolatnr. 250 304 ikke kunne fastslås med sikkerhet. *P. riparia* har temperaturoptimum på omlag 30°C (Hansen et al. 2012) og dette styrker teorien om at isolatnr. 250 304 er *P. riparia*. Morfologisk er *P. riparia* og *P. gonapodyides* like, men de har forskjellige DNA sekvenser og har forskjellige temperaturoptimum. *P. gonapodyides* har temperaturoptimum ved 25°C (Erwin & Ribeiro 1996). Isolatnr. 250 305 som ikke hadde fullstendige DNA-sekvenser og med et temperaturoptimum på omlag 25°C kan derfor være *P. gonapodyides*, men det må ytterligere undersøkelser til for å fastslå dette. En ser også at isolatnr.

250 304 er det eneste av de undersøkte isolatene som vokser ved 35°C. Isolatet av *P. gonapodyides* (Isolatnr. 250 293) hadde optimumstemperatur på omlag 25°C, noe som sammenfaller med annen litteratur (Erwin & Ribeiro 1996).

*P. gonapodyides* (Cooke et al. 2000), *P. riparia* (Hansen et al. 2012) og *P. taxon Pgchlamydo* (Brasier et al. 1993; Brasier et al. 2003; Cooke et al. 2000) tilhører alle Clade 6. Både *P. gonapodyides* (Brasier & Hansen 1992) og *P. riparia* (Hansen et al. 2012) er sterile, mens *P. taxon Pgchlamydo* dannet kjønna strukturer ved krysningstype A<sub>2</sub> fra *P. drechsleri* (Brasier et al. 1993; Brasier et al. 2003). Dette er arter som ofte blir påvist i vann og elver ved baiting (Brasier et al. 1993; Huai et al. 2013; Reeser et al. 2010). Artene i Clade 6 ligner på hverandre morfologisk og for sikker påvisning må en bruke DNA baserte analyser i tillegg. Denne gruppen omfatter *Phytophthora*-arter som antas å ha et utbredt saprofyttisk levesett. De blir assosiert med infeksjoner på røtter og blir ofte isolert fra rhizosfæren, men noen arter som *P. pinifolia* (Duràn et al. 2008) og *P. gemini* (Man in 't Welt 2011), har blitt isolert fra nåler og blader, men har ikke-caducouse sporangier og spres derfor ikke i luft. En del arter har ikke blitt påvist som patogener og det antas at disse har med nedbryting av dødt organisk materiale å gjøre. Under favoriserende forhold kan arter som *P. taxon Pgchlamydo* og *P. gonapodyides* opptre som trepatogener (Brasier et al. 1993). *P. gonapodyides* blir ofte påvist ved baiting i vann (Brasier et al. 1993; Reeser et al. 2010) men blir relativt sjelden påvist som plantepatogen i forhold til hvor ofte den blir funnet. Det blir derfor antatt at denne arten er mindre aggressiv, men opptrer som aggressiv ved favoriserende forhold. Det er oppgitt at *P. gonapodyides* kan forårsake stor skade på fine røtter i kastanje og noen isolater har moderat mulighet til å angripe suberinisert bark fra disse artene, samt bøk. *P. gonapodyides* har vært isolert fra bøk både i Sør-Tyskland og Storbritannia. I Tyskland og Sveits er den isolert fra lind (*Tilia* sp.), lønn og bjørk (Jung et al. 2007). I Norge er den isolert fra barlind og gråor (Herrero et al. 2011). I "Phytophthora diseases worldwide" (Erwin & Ribeiro 1996), er det oppgitt at *P. gonapodyides* har vertplanter i 13 slekter og 11 plantefamilier. En kjenner for lite til artens opptreden som plantepatogen i våte miljøer hvor den oftest blir isolert fra og flere undersøkelser må til for å klarlegge dette (Hüberli et al. 2013; Reeser et al. 2010).

Det ble sekvensert et isolat fra en bøkestammemateriale som ble bestemt å være *P. gonapodyides*. I avløpet ved hovedporten, nedenfor bøka ble det isolert *P. gonapodyides* ved baiting. Disse to isolatene hadde like DNA sekvenser og kan derfor ha samme opphav. Også i den kunstige dammen 100 % sekvenslikhet som de to isolatene fra Byparken. Det er ukjent om byparken i Ålesund og damanlegget på Aksla har felles tilknytning via avløp eller drenering, men en mye brukt tursti gjennom Aksla ender i byparken i Ålesund og går rett forbi bøka og ned til avløpet ved hovedporten. Smitten kan dermed ha spredd seg med infisert jord på fottøy.

*P. plurivora* antas å ha sin opprinnelse i Europa og diversiteten blir beskrevet som moderat, men er ikke geografisk spesifisert. Genflyten innen Europa ble vurdert som stor og genflyten til USA var enveis, fra Europa til USA. *P. plurivora* er nå etablert i USA og andre deler av verden (Schoebel et al. 2014). *Plurivora* er avledet fra *pluri-* som betyr mange og *-vora* som betyr føde og henviser til de mange vertplantene til *P. plurivora* (Erwin & Ribeiro 1996). Den har blitt isolert fra 45 arter av trær i Europa og USA. I Norge er den tidligere blitt isolert fra bøk, spisslønn (Talgø et al. 2009), *Rhododendron* sp., leddved (*Lonicera* sp.) og syress (Chamaecyparis lawsoniana) (Talgø et al. 2010) og fra baiting i vann både i Bergen, Bryne og Stavanger (Talgø et al. 2012a). I "Fremmede arter i Norge – med norsk Svarteliste 2012" er *P. plurivora* en av to *Phytophthora*-arter som er nevnt, begge vurdert til "Svært Høy risiko". Den andre *Phytophthora*-arten er karanteneskadegjøreren *P. ramorum* (Gederaas et al. 2012; Lovdata 2014).

*P. plurivora* kan kun skilles fra den nære slektningen *P. citricola* ved fylogeniske metoder, selv om vekstratene er noe forskjellige er de morfologisk like. Vekstraten til *P. plurivora* på V8 agar var oppgitt til 8.0 til 8.4 mm pr. døgn ved 20°C, mens *P. citricola* hadde en vekstrate på 6.9 til 7.0 mm pr. døgn. (Jung & Burgess 2009). I denne oppgaven ble ikke vekstraten til *P. plurivora*-isolatene undersøkt. Den gjennomsnittlige størrelse på oogoniene hos *P. plurivora* ble oppgitt til  $28.5 \pm 3.3$  µm og varierte fra 15-37.5 µm (Jung & Burgess 2009). I denne undersøkelsen var gjennomsnittlig størrelse på oogoniene 27.4 (n = 20) og varierte fra 25.5 µm til 29.3 µm. De gjennomsnittlige målingene i denne undersøkelsen lå litt under Jung & Burgess sine målinger, men variasjonene i størrelse lå innenfor det Jung & Burgess rapporterte i 2009. I kommentarene til M. B. Brurberg i forbindelse med artsbestemmelsen av isolatene som inngår i denne undersøkelsen, ble det informert om at DNA sekvensene var meget gode og de hadde opptil 100 % sekvenslikhet med eksisterende DNA sekvenser i databasen, i tillegg dannet både de sekvenserte og morfologisk bestemte isolatene like oogonier i V8-agar. Antagelsen om at de morfologisk bestemte isolatene er *P. plurivora* eller en annen art fra *P. citricola*-komplekset er derfor styrket.

*P. riparia* ble første gang påvist i elvebreddeområdene i Alaska og Oregon (Reeser et al. 2010) og beskrevet av Hansen (Hansen et al. 2012). Selv om *P. riparia* ble isolert flere ganger i Reezers undersøkelse av elvene i Oregon og Alaska (Reeser et al. 2010), er det er ikke påvist at *P. riparia* er plantepatogen (Hansen et al. 2012), men *P. riparia* er en relativ ny art og dermed også lite undersøkt. Det ble ikke funne rapporter om påvisning av *P. riparia* i Norge, så det antas at den ikke er påvist her før, men *P. riparia* har nylig blitt beskrevet og det kan være at isolater som tidligere ble bestemt til å *P. gonapodyides* er *P. riparia*.

*Phytophthora* taxon Pgchlamydo er også en art som er morfologisk lik *P. gonapodyides* (Brasier et al. 2003; Reeser et al. 2010). Den danner store, sfæriske, tynnveggede klamydosporer i gulrotagar, særlig ved høye temperaturer og sfæriske oppsvulminger i hyfene (Brasier et al. 1993), noe *P. gonapodyides* ikke gjør (Erwin & Ribeiro 1996). *P.* taxon Pgchlamydo ble opprinnelig beskrevet i Storbritannia i 1982 i røtter av *Prunus*, og har også blitt isolert fra røtter av Douglasgran (*Pseudotsuga menziesii*) og fra stammemateriale av edelgran (*Abies* sp.) (Brasier et al. 1993; Brasier et al. 2003). *P.* taxon Pgchlamydo har blitt påvist i flere verdensdeler etter dette, den er også påvist i Norge (Talgø et al. 2010).

Ved morfologisk utvelgelse av isolater før innsending til sekvensering ble isolatene sammenlignet på V8 og PDA. I etterkant av sekvenseringen ble derfor isolatene inokulert på gulrotagar for å fremme dannelsen av klamydosporer. Det var kun ett isolat (m) som dannet klamydosporer i gulrotagar i tillegg til det sekvenserte isolatet (Isolatnr. 250 286), begge isolatene var fra Byparken i Ålesund. En kan derfor anta at de isolatene som ikke dannet klamydosporer er en annen *Phytophthora*-art. Det ble ikke utført ytterligere undersøkelser for å finne ut hvilken *Phytophthora*-art disse isolatene tilhørte.

*P. cambivora* er mest kjent for å forårsake "Ink disease" i kastanje i Storbritannia og USA (Vannini et al. 2012), men er også en alvorlig skadegjører på frukttrær (Julis et al. 1978; Wicks 1988) og har ellers verplanter i 30 slekter fordelt på 19 familier. På kastanje vises symptomene langt nede stammen, hvor eksudatet som kommer ut av stammen og røttene kan farge jorden blåsvart. I frukttrær (eple, kirsebær, plomme, aprikos og fersken) er symptomene uklare, men ved langt fremtreden sykdom får treet små blader som kan være klorotiske og hengene, treet slutter å vokse fra terminale skudd og/eller dør om våren uten forutgående symptomer (Erwin & Ribeiro 1996). I Norge har *P. cambivora* vært påvist flere ganger, i bøk i Larvik og Bergen (Talgø et al. 2009; Telfer 2013), i nobelgran (*Abies procera*) og fjelledelgran (*A. lasiocarpa*) (Talgø et al. 2006; Talgø et al. 2009). *P. cambivora* kan forveksles med *P. cinnamomi* ved morfologisk bestemmelse, men *P. cambivora* produserer sjelden klamydosporer og har koralloide hyfer, ofte med irregulær form, men oppsvulminger i hyfene forekommer sjelden. *P. cinnamomi* danner lyst pigmenterte, tynnveggede oppsvulminger i hyfene, samt klamydosporer. *P. cinnamomi* har blitt påvist i potteplanter i veksthus og planteskoler i Norge (Herrero et al. 2011).

I denne oppgaven ble *P. cambivora* (Isolatnr. 250 312) påvist i stammemateriale fra blodbøk i Brusdalshagen i Ålesund. Blodbøka hadde typiske symptom på *Phytophthora*-angrep, med blødende sår på stammen, også langt nede på stammen, men jorden var ikke misfarget av eksudat.

Det ble også tatt en jordprøve under et av de laveste blødende sårene, men det lyktes ikke å isolere *Phytophthora* fra jordprøven.

Dette isolatet *P. cambivora* dannet oogonier i gulrotagar med krysningstype A<sub>2</sub> av *Phytophthora cryptogea*, men ikke med krysningstype A<sub>1</sub>, eller i gulrotagar uten bruk av krysningstyper. Dette tyder på at isolatet er heterotallisk, av krysningstype A<sub>1</sub>. Oogoniene som ble målt i denne undersøkelsen var varierte fra 24.9 til 36.8 µm. Størrelsene på oogoniene oppgitt i Q-bank (Q-bank 2014) er (17.02) 30.26 til 52.48 (53.35) µm. En ser at målingene i denne undersøkelsen ligger i nedre del av spekteret. I denne oppgaven var gjennomsnittlig størrelse på antheridiene 16.3 × 18.4 µm (n = 12). Størrelsene for antheridier som er oppgitt i Q-banken var (10.19) 16.3 til 49.2 (63.2) µm. Også her ser en at målingene i denne undersøkelsen ligger i nedre del av spekteret, men innenfor de verdiene som er oppgitt.

*Phytophthora*. sp. Ørsta har mange likhetstrekk med *P. ramorum* og *P. lateralis*, men har lavere optimumstemperatur (omlag 15°C) og lavere radial vekstrate ved 20°C, tynnere hyfer og har ikke samme evne til å danne klamydosporer i flere agartyper. *Phytophthora*. sp. Ørsta har også lavere lengde/breddeforhold på sporangiene enn de to andre. Det ser også ut til at oogoniene er større hos *Phytophthora*. sp. Ørsta enn hos *P. ramorum* og *P. lateralis*. *Phytophthora*. sp. Ørsta har paragyne antheridier som *P. lateralis* (Erwin & Ribeiro 1996), men produserer oogonier kun i selve gulrotbitene i agaren, som *P. ramorum* (Werres et al. 2001). *P. ramorum* er heterotallisk, mens *P. lateralis* er homotallisk, men det er vanskelig å få *P. lateralis* til å danne oogonier i agar, selv ikke med andre arter som krysningstyper, men danner rikelig med klamydosporer (Érsek & Ribeiro 2010; Tucker & Milbrath 1942). Hos *Phytophthora*. sp. Ørsta ble det ikke observert klamydosporer, men rikelig med oogonier ble produsert i gulrotagar podet med isolatet av *Phytophthora*. sp. Ørsta og i gulrotagar ved poding med både krysningstype A<sub>1</sub> og krysningstype A<sub>2</sub> fra *P. cryptogea*. Arten ble derfor vurdert til å være homotallisk.

*P. lateralis* er *P. ramorum*s nærmeste slektning (Werres et al. 2001) og videre undersøkelser må til for å bestemme slektskapet mellom *Phytophthora*. sp. Ørsta og *P. lateralis* og *P. ramorum*. Siden *Phytophthora*. sp. Ørsta ble funnet ved baiting og ikke ved isolering fra infisert plantemateriale vet en ikke noe om hvilken vertplanter den eventuelt kan angripe. Siden arten ikke har vært beskrevet før, er dette mest sannsynlig ikke en vanlig art av *Phytophthora*.

På et tidspunkt var en nødt til å velge ut isolater som skulle sekvenseres. En enkel morfologiske undersøkelse som var grunnlaget for utvelgelsen, er ikke nok for å kunne hevde at artene bestemt ved morfologi er sikre påvisninger. Bare molekylære metoder gir sikre nok svar til å hevde funnene

og det er således kun de sekvenserte artene som er sikre påvisninger. Isolatene er oppbevart hos Bioforsk, Ås og kan eventuelt sekvenseres senere.

Funnene som ble gjort i denne kartleggingen skal inngå i videre publisering av *Phytophthora*-situasjonen i Norge. Spesielt skal det legges vekt på beskrivelse av den nye arten, *Phytophthora* sp. Ørsta. Baiting vil igjen bli utført på funnstedet og det skal undersøkes nøye med tanke på potensielle vertplanter.

## 6. Litteraturliste

- Adams, G. C., Catal, M., Trummer, L., Hansen, E., Reeser, P. & Worrall, J. J. (2008). *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* found in Alaska beneath thinleaf alders *Online. Plant Health Progress*.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S.-Y., Geiser, D. M. & Kang, S. (2007). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 266-277.
- Brasier, C. M. (1967). *Physiology of reproduction in Phytophthora*: University of Hull, UK.
- Brasier, C. M. (1969). The effect of light and temperature on reproduction in vitro of two tropical species of *Phytophthora*. *Transactions of the British Mycological Society*, 52: 105-113.
- Brasier, C. M. & Hansen, E. M. (1992). Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part II: Phylogeny, speciation, and population structure *Phytopathology*, 30: 153-170.
- Brasier, C. M., Hamm, P. B. & Hansen, E. (1993). Cultural characters, protein-patterns and unusual mating behaviour of *Phytophthora gonapodyides* isolates from Britain and North-America. *Mycological Research*, 97: 1287-1298.
- Brasier, C. M., Rose, J., Kirk, S. A. & Webber, J. F. (2002, 17.-18. December). *Pathogenicity of Phytophthora ramorum isolates from North America and Europe to bark of European Fagaceae, American Quercus rubra and other forest trees*. Sudden oak death, a science symposium - the state of our knowledge, USDA Forest Service and University of California, Berkeley, California, USA, s. 15-18.
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. & Hansen, E. M. (2003). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* - *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycologia Research*, 107: 277-290.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D. E. L., Jung, T. & Man in 't Welt, W. A. (2004). *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alni* trees. *Mycol. Res.*, 108: 1172-1184.
- Brasier, C. M., Beales, P. A., Kirk, S. A., Denman, S. & Rose, J. (2005). *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesion on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research*, 109: 853-859.
- Brasier, C. M., Jung, T. & Osvald, W. (2006). *Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees*. UK: Forest Research, Farnham, Surrey, UK. 182 s.



- Brasier, C. M., Vettraino, A. M., Chang, T. T. & Vannini, A. (2010). *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth *Chamaecyparis* forest in Taiwan. *Plant Pathology*, 59: 595-603.
- Brasier, C. M., Franceschini, S., Vettraino, A. M., Hansen, E., Green, S., Robin, C., Webber, J. & Vannini, A. (2012). Four phenotypically and phylogenitically distinct lineages in *Phytophthora lateralis*. *Fungal Biology*, 116: 1232-1249.
- Broadbent, P. & Baker, K. F. (1974). Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25: 121-137.
- Cahill, D. M., Bennett, I. J. & McComb, J. A. (1993). Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology*, 42: 865-872.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kindom Chromista, origin and systematics. *Progress in Phycological Research*, 4: 309-344.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 17-32.
- Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J. & van der Wal, D. (1981). Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 65-68.
- Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, I. f. b. (2011). *Biologiske fagtermer fra A til Å*. <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/>: Universitetet i Oslo, Norge.
- Dick, M. W. (2001). *Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic. 670 s.
- Dowley, L. J. & O'Sullivan, E. (1985). Monitoring metalaxyl resistance in populations of *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 28: 531-534.
- Dowley, L. J. (1997). The potato and late blight in Ireland. *Cormac O Grada (ed.), Famine 150 commemorative lecture series*: 49-65.
- Duràn, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. (2008). *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology*, 57: 715-727.
- Eikemo, H., Klemsdal, S. S., Riisberg, I., Bonats, P., Stensvand, A. & Tronsmo, A. M. (2004). Genetic variation between *Phytophthora cactorum* isolates differing in their ability to cause crown rot in strawberry. *Mycological Research*, 108: 318-324.
- Érsek, T. & Ribeiro, O. K. (2010). An annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45: 251-266.
- Érsek, T., English, J. T. & Schoelz, J. E. (1995). Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology*, 85: 1343-1347.
- Érsek, T. & Nagy, Z. A. (2008). Species hybrids in the genus *Phytophthora* with emphasis on the alder pathogen *Phytophthora alni*: a review. *Journal of Plant Pathology*, 122: 31-39.
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA: APS. 562 s.
- Fichtner, E. J., Lynch, S. C. & Rizzo, D. M. (2009). Survival, Dispersal, and Potential Soil-Mediated Suppression of *Phytophthora ramorum* in a California Redwood-Tanoak Forest. *Ecology and Epidemiology* 99: 608-619.

- Gallegly, M. E. & Hong, C. (2009). *Phytophthora* species by morphology and DNA fingerprints. *Journal of Phytopathology*, 157: 520.
- Gederaas, L., Moen, T. L., Skjelseth, S. & Larsen, L.-K. r. (2012). *Fremmede arter i Norge – med norsk svarteliste* Artsdatabanken. Trondheim, Norge.
- Gibbs, J. N., Lipscombe, M. A. & Peace, A. J. (1999). The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *European Journal of Forest Pathology*, 29: 39-50.
- Ginetti, B., Ragazzi, A. & Moricca, S. (2014). First report of *Phytophthora* Taxon Walnut in Lombardy, North Italy. *Plant Disease*, 98: 424.
- GISD. (2014). *Global Invasive Species Database*. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. <http://www.issg.org/database/>.
- Goss, E. M., Carbone, I. & Grunwald, N. J. (2009). Ancient isolation and independent evolution of the three clonal lineages of the exotic sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology*, 18: 1161-1174.
- Hagen, D., Endrestøl, A., Hanssen, O., Often, A., Skarpaas, E., Staverløkk, A. & Ødegaard, E. (2012). Fremmede arter kartlegging og overvåking av spredningsvegen «import av planteprodukter». *NINA Rapport*. <http://www.nina.no>: Norsk institutt for naturforskning. 76 s.
- Hansen, E. (2007). Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal environment research*, 13: 33-41.
- Hansen, E., Reeser, P. W. & Sutton, W. (2012). *Phytophthora boralis* and *Phytophthora riparia*, new species in *Phytophthora* ITS Clade 6. *Mycologia*, 104: 1133-1142.
- Hansen, E. M., Streito, C. & Delatour, C. (1999). First confirmation of *Phytophthora lateralis* in Europe. *Plant Disease*, 83: 587.
- Hantula, J., Lilja, A., Nuorteva, H., Parikka, P. & Werres, S. (2000). Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron and silver birch. *Mycological Research*, 104: 1062-1068.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F. & van der Vossen, E. A. G. (2008). Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, 51: 47-57.
- Hermansen, A., Hannukkala, A., Hafskjold, R. N. & Brurberg, M. B. (2000). Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant pathology* 49: 11-22.
- Herrero, M. L. & Sletten, A. Riskoanalyse (PRA) for *Phytophthora ramorum*. *Planteforsk plantevernet*.
- Herrero, M. L., Talgø, V., Brurberg, M. B. & Toppe, B. (2011, 21-22 November in 2011). *Phytophthora* species in woody plants in Norway Cost Action FP0801. Programme and abstracts. P 31, Hungary.
- Huai, W.-x., Tian, G., Hansen, E. M., Zhao, W.-x., Goheen, E. M., Grünwald, N. J. & Cheng, C. (2013). Identification of *Phytophthora* species baited and isolated from forest soil and streams in northwestern Yunnan province, China. *Forest Pathology*, 43: 87-103.
- Huang, H., Jeffers, S. N., Layne, D. R. & Schnabel, G. (2004). AFLP analysis of *Phytophthora cactorum* isolates from strawberry and other hosts; Implications for identifying the primary source of inoculum. *Plant Disease*, 88: 714-720.
- Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble managing invasive species pathways in an era of globalisation. *Journal of Applied Ecology*, 46: 10-18.

- Hüberli, D., Hardy, G. E. S. J., White, D., Williams, N. & Burgess, T. I. (2013). Fishing for *Phytophthora* from Western Australia's waterways: a distribution and diversity survey. *Australasian Plant Pathology*, 42: 251-260.
- Ioos, R., Andrieux, A., Marçais, B. & Frey, P. (2006). Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 511-529.
- Judelson, H. S. & Blanco, F. A. (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 47-58.
- Julis, A. J., Clayton, C. N. & Sutton, T. B. (1978). Detection and distribution of *Phytophthora cactorum* and *P. cambivora* on apple rootstocks. *Plant Disease Reporter*, 62: 516-520.
- Jung, T. & Blaschke, M. (2003). *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197-208.
- Jung, T., Hudler, G. W., Jensen-Tracy, S. L., Griffiths, H. M., Fleishmann, F. & Osvald, W. (2005). Involvement of *Phytophthora* spp. in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist*, 19: 159-166.
- Jung, T., Vannini, A. & Brasier, C. M. (2007). *Phytophthoras in forests and natural ecosystems*. Agriculture, U. S. D. o. California, US: United States Department of Agriculture. 3-24 s.
- Jung, T. (2008). Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climate extremes. *Forest Pathology*, 39: 73-94.
- Jung, T. & Burgess, T. I. (2009). Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp nov. *Persoonia*, 22: 95-110.
- Jung, T. (2011). Investigation of the causal agents of the decline and dieback of mature beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in Pildammsparken in Malmö. *Phytophthora research and consultancy expert report 81* s.
- Klotz, L. J., Wong, P. P. & DeWolfe, T. A. (1959). Survey of irrigation water for the presence of *Phytophthora* spp. pathogenic to citrus. *Plant Disease Reporter*, 43: 238-249.
- Kroon, L. P. N. M. (2010). *The genus Phytophthora: phylogeny, speciation and host specificity*. PhD dissertation. Wageningen, NL: Thesis Wageningen University. 184 s.
- Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M. & Govers, F. (2012). The Genus *Phytophthora* Anno 2012. *Phytopathology Review*, 102: 348-364.
- Lovdata. (2014). [lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2003-03-17-341](http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2003-03-17-341).
- Malajczuk, N., Nesbitt, H. J. & Glenn, A. R. (1977). A light and electron microscope study of the interaction of soil bacteria with *Phytophthora cinnamomi* rands. *Canadian Journal of Microbiology*, 23: 1518-1525.
- Man in 't Welt, W. A., Veenbaas-Rijks, W. J., Ilieva, E., de Cock, A. W. A. M., Bonants, P. J. M. & Pieters, R. (1998). Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology*, 88: 922-929.
- Man in 't Welt, W. A. (2011). *Phytophthora gemini* sp. nov., a new species isolated from the halophilic plant *Zostera marina* in the Netherlands. *Fungal Biology*, 115: 724-732.
- Martin, F. (2013). Molecular identification of *Phytophthora*. I: Lamour, K. H. (red.) *Phytophthora a Gobar Perspective*. Knoxville, USA: CAB
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. & Nakanishi, N. (1977). Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, 67: 425-428.

- Mattilsynet. (2014). *Publikasjoner. Godkjente nederlandske planteskoler sesongen 2013-2014. Godkjente tyske planteskoler sesongen 2013-2014.* [http://www.mattilsynet.no/planter\\_og\\_dyrking/planteskadegjorere/soppsjukdommer/ramorum\\_greinvisning\\_phytophthora\\_ramorum/import\\_av\\_vertplanter\\_for\\_phytophthora\\_ramorum\\_fra\\_nederland\\_og\\_tyskland.7517](http://www.mattilsynet.no/planter_og_dyrking/planteskadegjorere/soppsjukdommer/ramorum_greinvisning_phytophthora_ramorum/import_av_vertplanter_for_phytophthora_ramorum_fra_nederland_og_tyskland.7517).
- May, K. J., Drenth, A. & Irwin, J. A. G. (2003). Intraspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. *Australasian Plant Pathology*, 32: 353-359.
- Moralejo, E., Perez-Sierra, A. M., Alvarez, L. A., Belbahri, L., Lefort, F. & Descals, E. (2009). Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*, 58: 100-110.
- NBCI. (2014). *Genbank*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>.
- Nechwatal, J., Bakonyi, J., Cacciola, S. O., Cooke, D. E. L., Jung, T., Nagy, Z. A., Vannini, A., Vettraino, A. M. & Brasier, C. M. (2012). The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon Salixsoil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathology*, 62: 355-369.
- Newton, A. C., Duncan, J. M., Augustin, N. H., Guy, D. C. & Cooke, D. E. L. (2010). Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant Pathology*, 59 (3): 472-479.
- Pennisi, E. (2010). Armed and dangerous. *Science*, 327: 804-805.
- Q-bank. (2014). <http://www.q-bank.eu/Fungi/Biolomics.aspx?Table=Phytophthora+species+ONLINE&genlist=t&fields=E1610&fields=E1611>.
- Reeser, P. W., Sutton, W., Hansen, E. M., Remigi, P. & Adams, G. C. (2010). *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103: 22-35.
- Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. & Koike, S. T. (2002). *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*, 86: 205-215.
- Saude, C., Hurtado-Gonzales, O. P., Lamour, K. H. & Hausbeck, M. K. (2008). Occurrence and characterization of a *Phytophthora* sp pathogenic to asparagus (*Asparagus officinalis*) in Michigan. *Phytopathology*, 98: 1075-1083.
- Schoebel, C. N., Stewart, J., Gruenwald, N. J., Rigling, D. & Prospero, S. (2014). Population history and pathways of spread of the plant pathogen *Phytophthora plurivora*. *Plos One*, 9 (1): 1.
- Scibetta, S., Schenaa, L., Chimentob, A., Cacciola, S. O. & Cooke, D. E. L. (2012). A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 356-368.
- Scott, P., Burgess, T. & Hardy, G. (2013). Globalization and *Phytophthora*. I: Lamour, K. (red.) *Phytophthora A Global Perspective*, s. 226-232. Wallingford, UK: CABI.
- Shearer, B. L., Crane, C. E. & Cochrane, A. (2004). Quantification of the susceptibility of the native flora of the South-West Botanical Province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, 52: 435-443.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. & Hall, G. S. (1990). Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycol. Papers*, 162: 1-28.
- Strømeng, G. M., Brurberg, M. B., Herrero, M. L., Couanon, W., A., S., Børja, I. & Talgø, V. (2012). *Phytophthora alni* forårsaker sjukdom på or (*Alnus* spp.) i Norge. *Bioforsk Tema* (12): 8.
- Szabó, I., Nagy, Z., Bakonyi, J. & Érsek, T. (2000). First Report of *Phytophthora* Root and Collar Rot of Alder in Hungary. *Plant Disease*, 84: 1251.

- Szabó, I., Lakatos, F. & Sipos, G. (2013). Occurrence of soilborne *Phytophthora* species in declining broadleaf forests in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 159-168.
- Talgø, V., Herrero, M., Toppe, B., Klemsdal, S. & Stensvand, A. (2006). First report of root rot and stem canker caused by *Phytophthora cambivora* on noble fir (*Abies procera*) for bough production in Norway. *Plant Disease*, 90: 682-682.
- Talgø, V., Herrero, M., Toppe, B., Brurberg, M. B., Thurston, R., Slørstad, T. & Stensvand, A. (2009). *Phytophthora plurivora* – ny skadegjerar på tre i Noreg. *Bioforsk Fokus*, 5: 246-247.
- Talgø, V., Herrero, M., Brurberg, M. B. & Stensvand, A. (2010). *Phytophthora* alvorleg trugsmål mot buskar og tre i grøntanlegg og naturområde. *Bioforsk Tema*, 5 (20): 8.
- Talgø, V. (2012). Upublisert manuskript.
- Talgø, V., Herrero, M. L., Brurberg, M. B. & Stensvand, A. (2012a). Sluttrapport i prosjektet Grøntanleggshygiene 2011. *Bioforsk rapport*, 7 (34): 14.
- Talgø, V., Telfer, K., Herrero, M. & Brurberg, M. B. b. (2012b). Registrering av *Phytophthora* i anleggsområdet til E18 ved Larvik. *Bioforsk Rapport*, 7 (120): 12.
- Talgø, V. (2013). Sluttrapport for prosjektet "*Phytophthora* trugar norsk bøk (*Fagus sylvatica*)", 978-82-17-01060-9. Ås, Norge: Bioforsk Plantehelse. 10 s.
- Telfer, K. H. (2013). A survey of *Phytophthora* in a beech forest in Norway. Ås, Norway: UMB.
- Thines, M. (2007). Characterisation and phylogeny of repeated elements giving rise to exceptional length of ITS2 in several downy mildew genera (Peronosporaceae). *Fungal Genetics and Biology*, 44: 199-207.
- Thines, M. (2013). Taxonomy and phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. I: Lamour, K. (red.) *Phytophthora A Global Perspective*, s. 11-18. Wallingford, UK: CABI.
- Tucker, C. M. & Milbrath, J. A. (1942). Root rot of *Chamaecyparis* caused by a species of *Phytophthora*. *Mycologia*, 34: 94-103.
- Vannini, A., Breccia, M., Bruni, N., Tomassini, A. & Vettraino, A. M. (2012). Behaviour and survival of *Phytophthora cambivora* inoculum in soil-like substrate under different water regimes. *Forest Pathology*, 42: 362-370.
- Waterhouse, G. M. (1963). *Key to the species Phytophthora de Bary*, b. 92. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute. 22 s.
- Werres, S., Marwitz, R., Man in 't Welt, W. A., de Cock, A. W. A. M., Bonants, P. J. M., de Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E. & Baayden, R. P. (2001). *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*, 105: 1155-1165.
- Wicks, T. J. (1988). Effects of solarization on the control of *Phytophthora cambivora* in almond and cherry. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28: 539-545.
- Zentmyer, G. A., Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. & Tsao, P. H. (1983). *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. The World of *Phytophthora*. University of Wisconsin, USA: APS. 1-7 s.

# Vedlegg 1

## Agar oppskrifter og fremgangsmåter

### P<sub>5</sub>ARP (PARP)

*Destillert vann	900 ml
*Corn meal agar, Difco™	17 g
Destillert vann	100 ml
Pimaricin	5 mg
Ampicilin	250 mg
**Rifampicin	10 mg
Dimethylsulfoxide	1 ml
Pentachloronitrobenzen	50 mg

\*Autoklaveres sammen i 20 minutter ved 121°C.

\*\* løses i Dimethylsulfoxide.

Ingrediensene løses i 100 ml destillert vann og blandes med den autoklaverte blandingen når den er kjølt ned til 50°C. Helles deretter i 9 cm Petriskåler.

### P<sub>5</sub>ARPH (PARP)

*Destillert vann	900 ml
*Corn meal agar, Difco™	17 g
Destillert vann	100 ml
Pimaricin	5 mg
Ampicilin	250 mg
**Rifampicin	10 mg
Dimethylsulfoxide	1 ml
Pentachloronitrobenzen	50 mg
Hymexazol	20 mg

\*Autoklaveres sammen i 20 minutter ved 121°C.

\*\* løses i Dimethylsulfoxide.

Ingrediensene løses i 100 ml destillert vann og blandes med den autoklaverte blandingen når den er kjølt ned til 50°C. Helles deretter i 9 cm Petriskåler.

### V8® Juice Agar

Destillert vann	1416.0 ml
V8® Juice*	354.0 ml
CaCO <sub>3</sub>	3.5 g
Agar, Difco™	26.5 g

\*Produsert i USA for Oluf Lorentsen AS, Vestby, Norge [www.oluf.no](http://www.oluf.no)

Blandingen varmes og røres slik at CaCO<sub>3</sub> løses opp. Helles deretter i 9 cm Petriskåler.

### Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA)

Renset vann	1000 ml
Difco™ Potato Dextrose Agar	39 g

Autoklaveres sammen i 15 min ved 121°C og avkjøles til 45-50°C.

Helles deretter i 9 cm Petriskåler.

### Gulrotagar

Revet gulrot uten skall	20 g
Agar, Difco™	22 g
Renset vann	1000 ml

Autoklaveres sammen i 15 min ved 121°C og avkjøles til 45-50°C. Helles deretter i 9 cm Petriskåler.

## Vedlegg 2



Oversiktskart over uttakssteder i Ålesund kommune. De blå, runde prikkene angir uttakstedene.





Ålesund. Uttakssted 1-4. De blå, runde prikkene angir uttakstedene.



Oversiktskart over uttakssteder i Ulsteinvik. De blå runde prikkene angir uttakstedene.



Oversiktskart over uttakstedene i Fosnavåg. De blå runde prikkene angir uttakstene.



Oversiktskart over uttakssteder i Ørsta. De blå runde prikkene angir uttaksstedene.



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)