

Rje – prikrita grožnja za lesnate rastline v Sloveniji?

Barbara Piškur

Oddelek za varstvo gozdov, Gozdarski inštitut Slovenije

Ena izmed največjih skupin glivnih patogenov rastlin, ki povzročajo velike ekonomske škode, so rje (Pucciniales). Poznamo več kot 7000 vrst rij, ki imajo enega najbolj kompleksnih življenjskih ciklov v kraljestvu gliv ter so genetsko izredno raznolika skupina. Z razširjanjem na nova območja lahko nastanejo novi medvrstni hibridi, ali pa rje preskočijo na nove gostiteljske rastline, ki nanje niso odporne. Raziskave rij postajajo v svetu prioriteta predvsem zaradi ekonomskih vplivov, ki jih te glive imajo na svetovno gozdarstvo, kmetijstvo in druge panoge. Na seznamih Direktive Sveta št. 2000/29/ES in Evropske in mediteranske organizacije za varstvo rastlin (EPPO) je trenutno 16 vrst rij, ki predstavljajo potencialno nevarnost za lesnate rastline v Evropi, zavedati pa se moramo, da s prenosom rij v nova okolja tvegamo nastanek novih hibridov in / ali novih epifitocij. Poznavanje in uporaba najnovejših diagnostičnih metod sta ključni za pravilno taksonomsko umestitev ter za natančno diagnozo potencialno invazivnih in novih rij, kar predstavlja osnovo za uveljavljanje karantenskih ukrepov.

Ključne besede: diagnostika, karantenski organizmi, *Melampsora*, rje, taksonomija

Rusts – hidden threat to woody plants in Slovenia?

Rusts (Puccinales) represent one of the largest groups of plant pathogenic fungi and are one of the most economically important pathogens of many native and cultivated plants. Rusts have a complex life cycle and are genetically extremely diverse, currently more than 7000 rust species are known. With spread of rusts into new areas hybrids can evolve or newcomers can jump and infect new plant hosts. Rust research is becoming a priority because of the economic impacts of rusts on world forestry, agronomy and other plant related markets. At the moment, Directive 2000/29/EC and European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) list 16 species of rusts, which represent potential threat to woody plants in Europe. But we also need to be aware that with transmission of rusts into new environments, there is a risk of new hybrids and / or new epidemics. Knowledge and implementation of new diagnostic methods are essential for correct taxonomic emplacement and for reliable pathogen identification and subsequently for quarantine enforcement.

Keywords: diagnostics, quarantine organisms, *Melampsora*, rusts, taxonomy

1. Uvod

Rje (Pucciniales) so obligatni biotrofi in predstavljajo največjo skupino glivnih patogenov rastlin, ki povzročajo ekonomske izgube tako pri gojenih kot tudi samoniklih rastlinah. Poznamo več kot 7000 vrst rij, ki imajo enega najbolj kompleksnih življenjskih ciklov v kraljestvu gliv, saj lahko obsega do pet različnih vrst trosov (Cummins in Hiratsuka, 2003; Kirk et al., 2008). Rje so genetsko izredno raznolika glivna skupina, ki izraža različne stopnje virulentnosti tako na med- kot tudi na znotrajvrstnem nivoju. Variabilnost je verjetno posledica spolnega razmnoževanja rij ter zmožnosti prenosa trosov na daljše razdalje (Hamelin et al., 1995; Hamelin, 1996; Feau et al., 2006). Zaradi koevolucije rij in njihovih gostiteljev ter večkratne evolucije nekaterih morfoloških karakteristik taksonomija na osnovi morfologije ne odseva realnega filogenetskega odnosa znotraj skupine. Morfološki znaki večkrat ne omogočajo prepoznave do vrstnega nivoja, temveč le do skupine podobnih, a reprodukcijsko izoliranih osebkov, ki tvorijo vrstni kompleks (Wingfield et al., 2004; Aime, 2006; Voegelé et al., 2009). Implementacija molekularnih podatkov skupaj z morfološkimi znaki je zato ključnega pomena za razrešitev filogenetskih relacij znotraj skupine rij. Zanesljiva identifikacija povzročitelja bolezní je namreč kritičen korak pri napovedovanju potencialnega vpliva ter tveganja in za določitev ustreznih ukrepov za omejitev bolezní oziroma njenega ekonomskega učinka. Pravilna taksonomska umestitev je še posebej relevantna za potencialno invazivne in nove vrste, saj uveljavljanje karantenskih ukrepov temelji ravno na natančni diagnozi (Desprez-Loustau et al., 2007). S številnimi aktivnostmi, kot je globalna trgovina, razširjamo glive na nova območja in omogočamo stike s samoniklimi sorodnimi vrstami, kar pa lahko vodi do medvrstnih hibridizacij in posledično novih patogenih oblik.

Uspešna okužba z rjo vodi do izrazitih sprememb v metabolizmu gostitelja. Količina klorofila in nivo fotosinteze se obdržita na mestih okužbe, v okoliškem tkivu pa se znižata, kar vodi do prezgodnjega staranja in kloroze. Po okužbi se sproži premeščanje ogljikovih hidratov v rastlini in na mestu okužbe se začne kopičiti škrob. Okužbe z rjami lahko spremenijo tudi gensko ekspresijo pri rastlinskih organih, ki so od mesta okužbe bolj oddaljeni (Wirsel et al., 2001; Voegelé et al., 2009).

Na seznamih Direktive Sveta št. 2000/29/ES in Evropske in mediteranske organizacije za varstvo rastlin (EPPO) je trenutno 16 vrst rij, ki predstavljajo potencialno nevarnost za lesnate rastline v Evropi: *Chrysomyxa arctostaphyli* Dietel, ne-evropske vrste *Cronartium* Fr., *Endocronartium harknessii* (J.P. Moore) Y. Hirats., ne-evropske vrste *Gymnosporangium* R. Hedw. ex DC., *Melampsora farlowii* (Arthur) Davis in *Melampsora medusae* Thüm.. Rje, ki jih najdemo na karantenskih seznamih, so morfološko večkrat izredno podobne že razširjenim rjam, kar lahko privede do prikritega vnosa in posledično do razširjanja karantenskih rij.

Znanje o rjah v Sloveniji je pomanjkljivo, ni primerjalne zbirke rij niti podatkov o njihovi prisotnosti oziroma razširjenosti. Večina znanja o rjah na območju Slovenije izvira izpred 2. svetovne vojne in je omejeno na glivne popise (Maček, 1974). Najobsežnejše delo o rjah, razširjenosti in njihovih gostiteljih v Sloveniji predstavlja delo iz 19. stoletja (Voss, 1889-1892). Kasneje so bile raziskave, ki so vključevale rje, redke. Nekaj podatkov sta objavila Janežič (Janežič, 1953, 1955, 1957, 1970) in Maček (Maček, 1965, 1968, 1969). Novejši podatki o rjah so zapisani v posameznih poročilih javne gozdarske službe (Jurc, 1995;

Jurc, 2007a, 2007b) oziroma so bili zbrani v okviru ljubiteljskega zanimanja (Jurc in Weber, 2001).

Zaradi neraziskanosti rij v Sloveniji in kompleksnosti rij smo z letom 2014 pričeli z dvoletno raziskavo rij v Sloveniji. Osredotočili smo se na rje iz rodu *Melampsoridium* Kleb., ki kužijo jelše in breze, in rje iz rodu *Melampsora* Castagne, ki kužijo vrbe in topole. Z raziskavo smo želeli dobiti vpogled v vrstno pestrost obeh rodov v Sloveniji ter pridobiti diagnostične izkušnje za delo s to skupino gliv. V prispevku so predstavljeni preliminarni rezultati vzorčenj iz leta 2014, ki se nanašajo na gostiteljske rastline iz rodu *Salix* L. in *Populus* L..

2. Material in metode

V letu 2014 smo vzorčili liste vrb (*Salix* spp.) in topolov (*Populus* spp.) na osmih lokacijah v Sloveniji, med drugim v izven gozdnih nasadih hitrorastočih drevesnih in grmovnih vrst ter v visokogorju. Vzorčenje je bilo izvedeno od junija do septembra 2014. Vzorcili smo liste, ki so imeli prisotne okužbe z rjami. Vzorci so bili herbarizirani in deponirani v Mikoteko in herbarij Gozdarskega inštituta Slovenije. Iz herbariziranih vzorcev smo s pomočjo stereomikroskopa izrezali en uredinij, iz katerega smo izolirali genomsko DNA s komercialnim kitom Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Nemčija) po protokolu proizvajalca. Za vpogled v vrstno sestavo rij smo izbrali regijo ITS rDNA, ki smo jo pomnoževali z začetnima oligonukleotidoma ITS1F in ITS4B (Gardes in Bruns, 1993). Reakcijska mešanica PCR (25 µl) je vsebovala vodo, prosto nukleaz (7 µl), 10x pufer PCR (5 µl), 50 mM MgCl₂ (0,75 µl), 5 mM mešanico dNTP-jev (1 µl), začetna oligonukleotida s koncentracijo 25 µM (po 0,5 µl), 2 U/µl polimerazo MangoTaq (Bioline, Nemčija) in 10 µl ekstrahirane genomske DNA, redčene 1:10. Reakcijo PCR smo izvajali na aparatu Mastercycler Nexus (Eppendorf) po protokolu »touchdown« PCR z 10 »touchdown« cikli (od 60 °C do 50 °C) in 25 cikli pri optimalni temperaturi naleganja začetnih oligonukleotidov. Produkte PCR smo očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR (Promega). Obe verigi produkta PCR smo sekvencirali v ločenih reakcijah z začetnima oligonukleotidoma, ki smo ju uporabili tudi za PCR. Sekvenciranje je izvedlo podjetje GATC Biotech (Nemčija). Dobljena nukleotidna zaporedja smo ročno pregledali s programom SeqTrace (Stucky, 2012). Zaporedja smo poravnali s spletno različico programa MAFFT z algoritmom E-INS-i (Kato et al., 2005). Na podlagi pridobljenih poravnjav smo z metodo največjega verjetja ("maximum likelihood", ML) s programom RAxML (Stamatakis, 2006; Stamatakis et al., 2008) izračunali ML-filogenetska drevesa, statistične podpore posameznih cepitev v drevesih pa smo izračunali z neparametričnim testom samovzorčenja (»bootstrap«) s 1000 ponovitvami. V filogenetske analize smo vključili zaporedja iz raziskav, ki so jih opravili Bubner et al. (2014) ter Vialle et al. (2011).

3. Rezultati in razprava

Rje iz rodu *Melampsora* so v svetu prepoznane kot najhujši problem topolov, vrb pa tudi drugih drevesnih vrst (Ramsted, 1998; Vialle et al., 2011). Vrbe in topoli so gostitelji več kot polovice vrst iz rodu *Melampsora*, haplontski gostitelji pa so večinoma iglavci. Taksonomija rodu *Melampsora* je zaradi pomanjkanja morfoloških razlik težavna, število vrst znotraj rodu je ocenjeno med 80 in 100. Običajno so vrste iz omenjenega rodu rij makrociklične, saj oblikujejo pet različnih vrst trosov, in sicer bazidiospore, spermacije, eciospore, urediniospore in teliospore (povzeto po Pei et al., 2005).

Najbolj razširjena in hkrati tudi izredno kompleksna vrbova rja je *Melampsora larici-epitea* Kleb.. V Evropi je doslej prepoznanih šest različnih posebnih oblik omenjene vrste (Pei, 2005). Preliminarni rezultati vrstnega vpogleda v rod *Melampsora* na vrbah v Sloveniji so na osnovi izvedenih vzorčenj pokazali nižjo variabilnost od pričakovane. Naši rezultati so v skladu z nedavno raziskavo v Nemčiji (Bubner et al., 2014), kjer je bil v 84 odstotkih analiziranih vzorcev (listi vrb, okuženi z rjami) določen vrstni kompleks *M. larici-epitea*. Tudi slovenski vzorci rij na vrbah, ki smo jih vzorčili tudi v visokogorju na pritlikavih vrbah, so se na osnovi regije ITS rDNA uvrstili v kompleks *M. larici-epitea*, z izjemo enega vzorca, ki se ujema z vrsto *M. larici-caprearum* Kleb. in enega vzorca, ki se ujema z vrsto *M. ribesii-purpureae* Kleb..

Vzorci rij na topolih v Sloveniji so bili nabrani v nasadih v Ižakovcih in Murski šumi ter na obrežju Gradiškega jezera. Za vrstno določitev na osnovi izbranega genetskega označevalca smo uporabili filogenetski koncept, ki ga je vzpostavila Vialle s sod. (2013). Vsi slovenski vzorci, ki so bili vključeni v analize, so se uvrstili v vrsto *Melampsora larici-populina* Kleb., ki je ena izmed najbolj pogostih topolovih rij v svetu in se je iz evrazijskega prostora razširila v Avstralijo in Južno ter Severno Ameriko. Rod *Populus* je v primerjavi z rodом *Salix* manj raznolik, zato je pestrost rij, ki jih lahko najdemo na topolih pričakovano manjša v primerjavi z rjami, ki okužujejo vrbe. Na topolih je opisanih 13 vrst in dva hibrida iz rodu *Melampsora*, vendar taksonomija še ni razjasnjena (Pei in Shang, 2005; Vialle et al., 2011). V Evropi je zabeleženih osem vrst rij, ki okužujejo topole: *M. larici-populina*, *M. allii-populina* Kleb., *M. medusae*, *M. pinitorqua* Rostr., *M. larici-tremulae* Kleb., *M. rostrupii* Wagner, *M. magnusiana* Wagner in *M. pulcherrima* Maire. Vrsti *M. occidentalis* Jacks. in *M. medusae* sta samonikli v Severni Ameriki, vendar so slednjo našli tudi v Evropi in je na seznamu karantenskih bolezni (Pei in Shang, 2005). Vrsta *M. medusae* kuži topole in nekatere iglavce – v Kanadi so njeni najpomembnejši haplontski gostitelji *Larix* spp., *Pseudotsuga* spp. in *Pinus* spp. Populacije rje *M. medusae*, ki so že prisotne v evropskem prostoru, niso močno agresivne in se slabo razširjajo. Vendar obstaja visoko tveganje za vnos nove in agresivne oblike omenjene vrste rij, ki bi lahko povzročila velike škode. Rja *M. medusae* je edina poznana topolova rja, ki se lahko razširja brez vmesnega (haplontskega) gostitelja (EPPO).

Rje iz rodu *Melampsora* povzročajo prezgodnjo defoliacijo in odmiranje poganjkov, zmanjšajo debelinski prirastek, povečajo dovzetnost gostitelja za druge škodljive organizme in abiotske dejavnike, ter lahko povzročijo propad svojega gostitelja (Newcombe et al., 1994; Yin et al., 2004; Dawson et al., 2005). Pri močnih okužbah z rjami so lahko donosi zunajgozdnih nasadov zmanjšani za več kot 40 odstotkov (Lieseback in Zaspel, 2005). Dawson et al. (2005) so spremljali skupen donos suhe biomase pri nasadih vrb, ki so bili tretirani s fungicidi in pri netretiranih nasadih. Z rjami neokuženi nasadi so imeli za skoraj 80 odstotkov večji donos v primerjavi z nasadi, ki niso bili tretirani s fungicidi. Okužbe z rjami zato predstavljajo eno izmed največjih omejitev za vzpostavitev in vzdrževanje zunajgozdnih nasadov (povzeto po Pei et al., 2005). Za prisotnost rij smo v avgustu 2014 pregledali testni nasad hitrorastočih dreves vrbe v Velenju, ki ga sestavljajo drevesa dveh klonov: Tordis in Inger (Čebul et al., 2012). Ob pregledu smo ugotovili, da so drevesa klona Inger močno okužena z rjami, opazna je bila defoliacija. Pri klonih Tordis okužb z rjami nismo opazili, drevesa so bila v primerjavi s kloni Inger vitalnejša in ni bilo znakov prezgodnje defoliacije. Nasad je bil zasnovan leta 2009, leta 2011 so Čebul et al. (2012) določili skupni donos lesne biomase, ki je bil za klon Inger

manjši kot za klon Tordis. Iz rezultatov naše raziskave lahko posredno sklepamo na vpliv okužb z rjami na manjšo donosnost v nasadu v Velenju. Iz opažanj iz literature (npr. Pei, 2005; Toome et al., 2010) lahko povzamemo, da so okužbe z rjami pomemben dejavnik pri zdravstvenem stanju nasadov, ki lahko privede do manjše donosnosti. V Velenju smo določili rjo *M. larici-epitea* f. sp. *larici-epitea typica*, ki je tudi najpogosteje določena vrsta na vrbah v naši raziskavi. Zanimivo je, da klon Inger tržijo kot odpornega na rje (<http://www.lignoplant.com>). Naša opažanja in poročanja iz npr. Danske (Eide et al., 2012) in Romunije (Botu et al., 2013) pa kažejo, da je klon Inger dovzeten za okužbe z rjami iz rodu *Melampsora*. V testnem nasadu v Velenju klon Tordis ni imel vidnih znakov okužb z rjami, v Romuniji pa je okuženost z rjami pri tem klonu celo dvakrat večja kot pri klonu Inger (Botu et al., 2013). Sklepamo lahko, da na dovzetnost klonov za okužbe z rjami vplivajo ekološke razmere in / ali populacije rij, ki so prisotne na območju nasadov.

4. Sklepi

Na osnovi izbranih genetskih podatkov lahko rje iz rodu *Melampsora* identificiramo do nivoja vrst oziroma potrdimo ali zavržemo sum o prisotnosti karantenskih vrst rij. Preliminarni rezultati vrstnega vpogleda v rod *Melampsora* v Sloveniji so na osnovi izvedenih vzorčenj pokazali nižjo variabilnost od pričakovane, tako na vrbah (*Salix* spp.) kot na topolih (*Populus* spp.). Na vzorcih nabranih v letu 2014 nismo dokazali prisotnosti tujerodnih oziroma karantenskih rij.

5. Zahvala

Prispevek je nastal v okviru podoktorskega projekta Z4-5518 in programske skupine P4-0107. Za pomoč pri nabiranju vzorcev rij se zahvaljujem prof. dr. Dušanu Jurcu, dr. Nikici Ogrisu, dr. Tinetu Hauptmanu, dr. Gregorju Božiču in Tini Jemec. Za filogenetsko viharjenje se zahvaljujem dr. Sigisfredu Garnici in dr. Kai Riessu iz Univerze v Tübingenu, Nemčija.

6. Literatura

- Aime M.C. 2006. Towards resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*, 47: 112-122.
- Botu I., Botu M., Preda S., Achim G., Lazar A., Alecu A. 2013. Comparative evaluation of Romanian and introduced *Salix* cultivars for short rotation coppice. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*, 4: 35-42.
- Bubner B., Wunder S., Zaspel I., Zander M., Gloger J., Fehrenz S., Ulrichs C. 2014. *Melampsora* rust species on biomass willows in central and north-eastern Germany. *Fungal Biology*, 118: 910-923.
- Council Directive 2000/29/EC. 2000. 2000/29/EC. EU, Official Journal of the European Communities L169: 1-112 .
- Cummins G.B., Hiratsuka Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. St. Paul, APS Press: 225 str.
- Čebul T., Krajnc N., Piškur M. 2012. Lesna biomasa iz zunajgozdnih nasadov hitrorastočih vrst. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 97: 19-29.
- Dawson M.W., McCracken A.R., Carlisle D. 2005. Short-rotation coppice willow mixtures and yield. V: *Rust diseases of willow and poplar*. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 195-208.
- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Buee M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Sache I., Rizzo D.M. 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 472-80.

- Eide T., Gertz F., Hjort-Gregersen K., Jacobsen B.H., Jørgensen U., Ugilt Larsen S.U., Lemming C., Madsen T.U., Pedersen J., Siri Pugesgaard S., Schelde K., Søndergaard S., Vistedsen T.H. 2012. Evalueringsrapport Pil. AgroTech: 107 str.
- European and Mediteranean Plant Protection Organization (EPPO). 2016. <http://www.eppo.org> (12.2.2016)
- Feau N., Bourassa M., Joly D.L., Hamelin R.C., Andrieux A., Barres B., Frey P. 2006. Intercontinental genetic structure of the poplar rust *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. *Phytopathology*, 96, 6: S34-S35.
- Frey P., Gerard P., Feau N., Husson C., Pinon J. 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). CABI Publishing: 63-72.
- Gardes M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 2: 113-118.
- Hamelin R.C., Beaulieu J., Plourde A. 1995. Genetic diversity in populations of *Cronartium ribicola* in plantations and natural stands of *Pinus strobus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 8: 1214-1221.
- Hamelin R.C. 1996. Genetic diversity between and within cankers of the white pine blister rust. *Phytopathology*, 86, 8: 875-879.
- Janežič F. 1953. Drugi prispevek k poznavanju mikološke flore Slovenije. *Biološki Vestnik*, 2: 59-65.
- Janežič F. 1955. Prispevek k poznavanju mikoflore Slovenije. III. *Biološki Vestnik*, 4: 3-6.
- Janežič F. 1957. Indeks rastlinskih bolezní v Sloveniji. Zbornik fakultete za agronomijo, gozdarstvo in veterino, 3: 39-86.
- Janežič F. 1970. Dodatek k indeksu rastlinskih bolezní v Sloveniji. Zbornik Biotehniške fakultete, 17: 77-87.
- Jurc D., Weber R.W.S. 2001. *Puccinia distincta* and *Puccinia lagenophorae*, two rust fungi of Asteraceae recently introduced into Slovenia. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin: 146-154 str.
- Jurc D. 2007a. Bori - *Pinus* spp.: bolezní poganjkov, vej in debla: *Gremeniella abietina*, *Cronartium flaccidum*, *Melampsora pinitorqua*. *Gozdarski Vestnik*, 65: 145-160.
- Jurc D. 2007b. Bori - *Pinus* spp.: bolezní iglic: *Coleosporium tussilaginis*, *Thyriopsis halepensis*, *Meloderma desmazieri*. *Gozdarski Vestnik*, 65: 393-408.
- Jurc M. 1995. Mehurjevka iglic rdečega bora (*Coleosporium* sp.) Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije in Gozdarski oddelek Biotehniške fakultete: 2 str.
- Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33, 2: 511-518.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford, International Mycological Institute: 771 str.
- Liesebach M., Zaspel I. 2005. Genetic diversity of *Melampsora* willow rusts in Germany. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 73-89.
- Maček J. 1965. Pomen acidijev v razvojnem krogu *Tranzschelia pruni spinosae* (Pers.) Diet v Sloveniji. *Biološki Vestnik*, 13: 31-33.
- Maček J. 1968. Rje na gojenih in samoniklih rastlinah v Sloveniji, Poročilo za Sklad Borisa Kidriča za leto 1967. Ljubljana: 11 str.
- Maček J. 1969. Rđa geranijuma (*Puccinia pelargonii-zonalis* Doidge) nova bolest u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, 105: 269-276.
- Maček J. 1974. Zgodovinski oris raziskovanja mikromicetov v Sloveniji do druge svetovne vojne. *Biološki Vestnik*, 22: 115-121.
- Newcombe G., Chastagner G.A., Schuette W., Stanton B.J. 1994. Mortality among hybrid poplar clones in a stool bed following leaf rust caused by *Melampsora-medusae* f sp *deltoidae*. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, 9: 1984-1987.
- Pei M.H. 2005. A brief review of *Melampsora* rusts on *Salix*. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 11-28.

- Pei M.H., Bayon C., Ruiz C. 2005. Phylogenetic position of *Melampsora* in rust fungi inferred from ribosomal DNA sequences. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 1-9.
- Pei M.H., Shang Y.Z. 2005. A brief summary of *Melampsora* species on *Populus*. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallington, CABI Publishing: 51-62.
- Pinon J., Frey P. 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. V: Rust diseases of willow and poplar. Pei M.H., McCracken A.R. (eds.). Wallingford, CAB International: 139-154.
- Ramsted M. 1998. Diversity of the *Melampsora* rust on willows - consequences for SRF planting strategies. V: Proceedings of the First IUFRO Rusts of Forest Trees Working Party Conference, Saariselkä, Finland, 2.-7. Aug, 1998. Jalkanen R., Crane P.E., Walla J.A., Aalto T. (eds.). Saariselkä, Finland, Finish Forest research Institute: 123-130.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-90.
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57: 758-71.
- Stucky B.J. 2012. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, 23: 90-93.
- Toome M., Heinsoo K., Holm B., Luik A. 2010. The influence of canopy density on willow leaf rust (*Melampsora epitea*) severity in willow short rotation coppice. *Biomass & Bioenergy*, 34, 8: 1201-1206.
- Vialle A., Frey P., Hambleton S., Bernier L., Hamelin R.C. 2011. Poplar rust systematics and refinement of *Melampsora* species delineation. *Fungal Diversity*, 50, 1: 227-248.
- Vialle A., Feau N., Frey P., Bernier L., Hamelin R.C. 2013. Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 3: 628-644.
- Voegele R.T., Hahn M., Mendgen K. 2009. The Uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology. V: The Mycota, 5. Plant relationships. Deising H.B. (ed.). Berlin, Springer: 69-98
- Voss W. 1889-1892. *Mycologia Carniolica*. Ein Betrag zur Pilzkunde des Alpenlandes. Berlin, Friedländer: 302 str.
- Wingfield B.D., Ericson L., Szaro T., Burdon J.J. 2004. Phylogenetic patterns in the Uredinales. *Australasian Plant Pathology*, 33: 327-335.
- Wirsel S.G.R., Voegele R.T., Mendgen K.W. 2001. Differential regulation of gene expression in the obligate biotrophic interaction of *Uromyces fabae* with its host *Vicia faba*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 11: 1319-1326.
- Yin T.M., DiFazio S.P., Gunter L.E., Jawdy S.S., Boerjan W., Tuskan G.A. 2004. Genetic and physical mapping of *Melampsora* rust resistance genes in *Populus* and characterization of linkage disequilibrium and flanking genomic sequence. *New Phytologist*, 164, 1: 95-105.