

Virulentnost fitopatogene gljive *Ophiostoma novo-ulmi*

Ćaleta, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:312526>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Bruno Čaleta

Virulentnost fitopatogene gljive *Ophiostoma novo-ulmi*

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Zorana Katanić

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku
Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Virulentnost fitopatogene gljive *Ophiostoma novo-ulmi*

Bruno Čaleta

Rad je izrađen u: Laboratorij za molekularnu ekologiju, Odjel za biologiju
Mentor: Dr. sc. Zorana Katanić, doc.

Kratki sažetak završnog rada: Fitopatogena gljiva *Ophiostoma novo-ulmi* uzročnik je druge pandemije izrazito destruktivne holandske bolesti brijesta. Vrsta *O. novo-ulmi* dijeli se na dvije podvrste: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, između kojih postoji parcijalna reproduktivna barijera zbog čega je moguća njihova hibridizacija u prirodi. U ovom radu analizirani su izolati gljive *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske. Za determinaciju podvrsta i njihovih hibrida primijenjena je PCR-RFLP analiza gena *cu* i *coll*. Kako bi se istražilo postoje li razlike u virulentnosti izolata različitih podvrsta i hibrida primijenjena je metoda inokulacije izolata na plod jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') te je virulentnost procijenjena na temelju promjera nekrotične lezije nastale nakon 14 i 28 dana. Utvrđene su statistički značajne razlike u veličini promjera nekrotičnih lezija, osobito 28 dana nakon inokulacije, što ukazuje na postojanje značajnih razlika u virulentnosti pojedinih izolata gljive *O. novo-ulmi*. Međutim, virulentnost testiranih izolata nije se mogla dovesti u korelaciju s rezultatima molekularne identifikacije patogena. Ovo istraživanje predstavlja doprinos karakterizaciji uzročnika holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj, a po prvi puta je opisano postojanje razlika u virulentnosti izolata *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske.

Broj stranica: 22

Broj slika: 3

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 34

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Holandska bolest brijesta, hibridizacija, *Ophiostoma novo-ulmi*, PCR- RFLP, virulentnost

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Bachelor thesis****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**Virulence of phytopathogenic fungus *Ophiostoma novo-ulmi***

Bruno Čaleta

Thesis performed at: Molecular Ecology Laboratory, Department of Biology**Supervisor:** Zorana Katanić, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: Phytopathogenic fungus *Ophiostoma novo-ulmi* is a casual agent of the second, extremely destructive, pandemic of Dutch elm disease. Species *O. novo-ulmi* is divided into two subspecies: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. With only partial reproductive barrier between them, hybridization takes place in nature. In this study *O. novo-ulmi* isolates from Croatia were analyzed. Determination of subspecies and their hybrids was based on PCR-RFLP analysis of genes *cu* and *coll*. Virulence of isolates determined as different subspecies and hybrids was investigated by inoculation of isolates on apple fruit (*Malus x domestica* 'Golden delicious') and evaluated based on diameter size of necrotic lesion observed after 14 i 28 days. Statistically significant differences in diameter size of necrotic lesions were identified, especially after 28 days post inoculation. Those results indicate significant differences in virulence of individual *O. novo-ulmi* isolates. However, virulence of tested isolates was not in correlation with the results of molecular identification of the pathogen. This research represents contribution to characterization of casual agent of Dutch elm disease in Croatia. For the first time, the existence of differences in virulence of *O. novo-ulmi* isolates found in Croatia was indicated.

Number of pages: 22**Number of figures:** 3**Number of tables:** 5**Number of references:** 34**Original in:** Croatian**Key words:** Dutch elm disease, hybridization, *Ophiostoma novo-ulmi*, PCR-RFLP, virulence**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Promjene u strukturi populacija uzročnika holandske bolesti brijesta.....	3
1.2. Cilj rada.....	5
2. Materijali i metode.....	6
2.1. Uzorci gljive <i>O. novo-ulmi</i>	6
2.2. Molekularna analiza fitopatogene gljive <i>O. novo-ulmi</i>	6
2.2.1. Izolacija ukupne DNA.....	6
2.2.2. Amplifikacija gena <i>cu</i> i <i>coll</i> lančanom reakcijom polimerazom (PCR)...	7
2.2.3. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP).....	9
2.3. Test virulentnosti izolata gljive <i>O. novo-ulmi</i> inokulacijom ploda jabuke (<i>Malus x domestica</i> 'Golden delicious').....	9
3. Rezultati.....	12
3.1. Identifikacija podvrsta i hibrida gljive <i>O. novo-ulmi</i>	12
3.2. Procjena virulentnosti izolata gljive <i>O. novo-ulmi</i>	13
4. Rasprava.....	16
5. Zaključak.....	19
6. Literatura.....	20

1. Uvod

Invazivne vrste jednom kada su unesene u novo stanište mogu narušiti postojeće ekološke sustave i utjecati na smanjenje bioraznolikosti (Williamson 1999). Jedan od primjera izrazito negativnog utjecaja invazivnih vrsta je holandska bolest brijesta uzrokovana invazivnim fitopatogenim gljivama *Ophiostoma ulmi* i *O. novo-ulmi*. Holandska bolest brijesta obuhvaća gljivični patogen, insektoidni vektor te populacije brijestova, a smatra se jednom od najvećih ekoloških katastrofa 20. stoljeća (Heybroek 1993) uzrokujući propadanje milijardi stabala brijestova (*Ulmus* spp.) na više kontinenata. Epidemije biljnih bolesti, kao što je holandska bolest brijesta, često su inicirane ljudskom aktivnošću te u takvim slučajevima obično postoji ograničena otpornost populacije domaćina i velika agresivnost patogena, što rezultira ubrzanom izbijanjem bolesti (Brasier i Buck 2001).

U 20. stoljeću zabilježene su dvije izrazito destruktivne pandemije holandske bolesti brijesta koje su uzrokovala dva različita gljivična patogena koja pripadaju koljenu Ascomycota i rodu *Ophiostoma*. Prvu pandemiju uzrokovala je gljiva *O. ulmi*. Prva pandemija započela je u sjevernoj Francuskoj oko 1910. godine (Brasier i Kirk 2010), nakon čega se bolest ubrzano širila istočno kroz Europu i jugozapadnu Aziju. U Ujedinjenom Kraljevstvu i Sjevernoj Americi pojavila se oko 1927. godine, a u središnjoj Aziji u tridesetim godinama 20. stoljeća kao rezultat izvoza zaraženih trupaca brijestovoga drveta (Brasier i Buck 2001). Četrdesetih godina 20. stoljeća bilježi se pad broja zaraženih brijestova, nakon što je uništeno 10 – 40 % ukupne populacije europskih brijestova (Brasier i Buck 2001), dok na američkom kontinentu ovakav pad nije zabilježen. Mitchell i Brasier (1994) ovaj pad objašnjavaju širenjem mikovirusa unutar populacija vrste *O. ulmi*.

Sedamdesetih godina 20. stoljeća bilježi se novo izbijanje holandske bolesti brijesta u Velikoj Britaniji i okolnim dijelovima Europe koje je uzrokovano do tada nepoznatom vrstom *O. novo-ulmi* (Brasier i Buck 2001), uzročnikom druge pandemije holandske bolesti brijesta. Međutim, kasnijim istraživanjima, utvrđeno je kako je druga pandemija započela ranije – četrdesetih godina 20. stoljeća, na dvije geografski izolirane lokacije: moldovsko-ukrajinska regija u istočnoj Europi te južni dio Velikih jezera u Sjevernoj Americi (Brasier 1990, 1996). Izvorno je *O. novo-ulmi* razdijeljena na dvije rase: euroazijska (EAN) i sjevernoamerička (NAN) rasa koje su zbog mnoštva morfoloških, bihevioralnih i molekularnih razlika 2001. godine opisane kao zasebne podvrste. Tako je euroazijska rasa preimenovana u *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, dok je sjevernoamerička rasa

preimenovana u *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *americana* (Brasier i Kirk 2001). Smatra se da je trenutna pandemija holandske bolesti brijesta uzrokovana gotovo isključivo vrstom *O. novo-ulmi* (Brasier i Buck 2001).

Važan skok u razvoju pandemije dogodio se šezdesetih godina 20. stoljeća, nakon što je podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana* pristigla iz Kanade u Veliku Britaniju putem zaraženih trupaca odakle se ubrzo proširila na okolne zemlje zapadne Europe, zbog čega je došlo do preklapanja areala dvije podvrste ovoga patogena u nekoliko dijelova Europe. Tako je danas u Sjevernoj Americi prisutna samo podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, u jugozapadnoj i središnjoj Aziji prisutna samo podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, a na europskom kontinentu prisutne su obje podvrste (Brasier i Kirk 2001). Na područjima gdje se areali dviju podvrsta *O. novo-ulmi* preklapaju dolazi do njihove hibridizacije i širenja hibrida u prirodnim populacijama (Brasier i Kirk 2010).

Prijenos holandske bolesti brijesta najčešće se odvija pomoću potkornjaka (red Coleoptera, porodica Scolytidae). Smatra se da su na području Europe najznačajnije vektorske vrste *Scolytus scolytus* i *S. multistriatus* (Santini i Faccoli 2014). Potkornjaci unutar kore bolesnih stabala brijesta izrađuju različite tipove hodnika unutar kojih postoji mogućnost prijenosa spora patogena na rane razvojne stadije jedinki potkornjaka te oni već u stadiju kukuljice postaju vektori bolesti. Mlade jedinice izlaze iz legla te odlaze hraniti se na zdravim stablima brijesta kako bi dovršili vlastito dozrijevanje i pri tome mogu prenositi zarazu (Webber 2004). Nakon toga patogen se širi kroz vaskularni sustav brijesta (ksilem) te dolazi do razvoja bolesti. Osim putem vektora, bolest se može prenositi od zaraženih do zdravih stabala brijesta i putem anastomoza korijena (Ghelardini i Santini 2009).

Razvoj bolesti ovisi o starosti i vrsti brijesta, kao i o vrsti i svojstvima patogena i okolišnim faktorima. Prvi vanjski simptomi su žućenje, sušenje i otpadanje mladih listova, a zatim se simptomi bolesti šire na cijelu krošnju i zahvaćaju ostatak listova. Kronični oblik bolesti manifestira se odumiranjem stabla, što može biti dugotrajan proces, zbog širenja patogena kroz ksilem, pri čemu se na poprečnom prerezu grana pojavljuje tamno obojenje ksilema u obliku isprekidanog ili cjelovitog prstena (Glavaš 1999).

1.1. Promjene u strukturi populacija uzročnika holandske bolesti brijesta

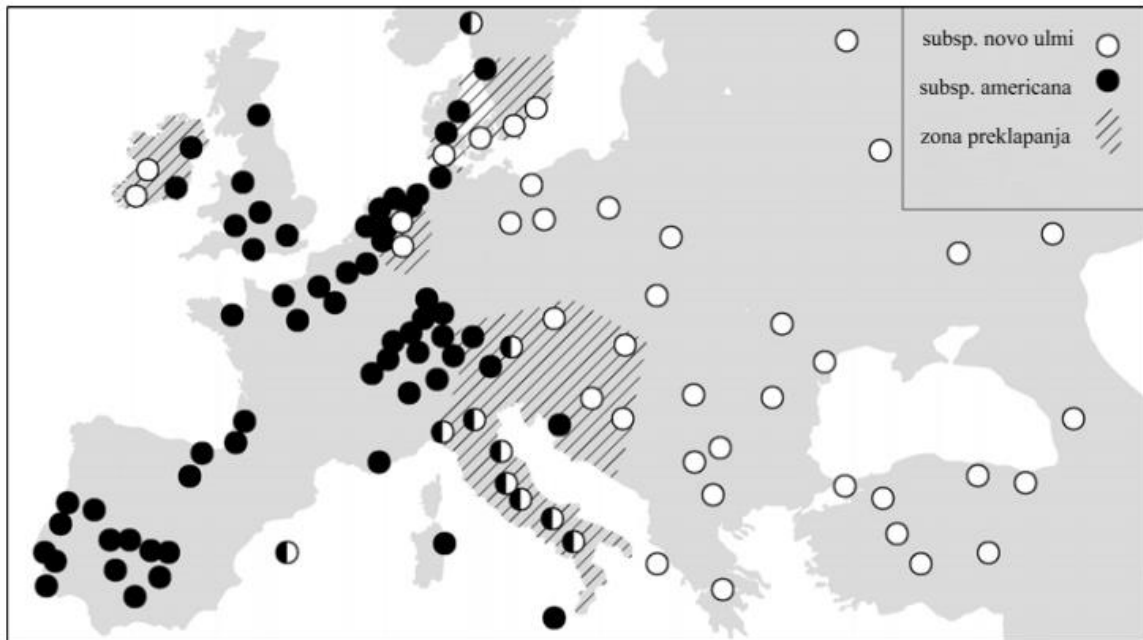
Vrste *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* razlikuju se u velikom broju bihevioralnih i genetičkih svojstava, kao što su optimum temperature rasta, morfologija kolonija, produkcija toksina cerato-ulmina, te stupanj patogenosti prema brijestovima (Brasier 1991). Bihevioralne razlike očituju se u različitim ekološkim strategijama, a druga bitna razlika je u stupnju agresivnosti, pri čemu je *O. ulmi* manje agresivan patogen (Brasier i Buck 2001). Kada *O. novo-ulmi* migrira na lokaciju na kojoj je *O. ulmi* već prisutna, tada populacija *O. novo-ulmi*, budući da je bolje prilagođena, ubrzano zamjenjuje populaciju *O. ulmi*, čije populacije opadaju za oko 10 % ukupne populacije po godini (Brasier i Buck 2001). Zbog toga je vrsta *O. ulmi* vjerojatno u potpunosti nestala s područja poznatog areala, među kojima je i područje Europe, a *O. novo-ulmi* smatra se jednim uzročnikom holandske bolesti brijesta (Brasier i Kirk 2010).

Dvije podvrste *O. novo-ulmi* razlikuju se u mnogim morfološkim, bihevioralnim i molekularnim karakteristikama (Tablica 1). Smatra se kako su izolati ssp. *americana* virulentniji prema brijestu u odnosu na izolate podvrste ssp. *novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001; Konrad i sur. 2002). Važno je napomenuti kako unatoč širokom spektru razlika između dvije podvrste, one nisu potpuno reproduktivno odvojene. *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* pokazuje parcijalnu reproduktivnu barijeru prema *O. novo-ulmi* ssp. *americana* – kada je jedinka podvrste *americana* donor gamete, a jedinka podvrste *novo-ulmi* akceptor, seksualna reprodukcija reducirana je za 90 %, ali to nije slučaj kod obrnutog križanja (Brasier 1979).

Tablica 1. Razlike između *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana* (preuzeto i prilagođeno prema Brasier i Kirk 2001).

Karakteristika	ssp. <i>novo-ulmi</i>	ssp. <i>americana</i>
Duljina vrata peritecija	Veća	Manja
Morfologija kolonije na hranjivoj podlozi	Nepravilno fibrozno-prugasta	Pravilno fibrozno-prugasta
Stopa radijalnog rasta (mm dan ⁻¹) na hranjivoj podlozi	3,1-4,4	3,2-4,8
Patogenost (% defolijacije) na <i>Ulmus procera</i>	(40-)60-100 %	80-100 %
Patogenost (% defolijacije) na <i>U. X 'Commelin'</i>	(20-)40-90 %	60-100 %
Produkcija biomase u tekućem mediju	Veća	Manja
Produkcija cerato-ulmina u tekućem mediju	Manja	Veća
Veličina mitohondrijske DNA	65-71 kb	48-60 kb

U mnogim dijelovima Europe areali dviju podvrsta *O. novo-ulmi* se preklapaju (Slika 1) te je pojava hibrida do sada dokazana na području Španjolske, Italije, Grčke, Estonije, Češke, Austrije i Hrvatske (Kirisits i Konrad 2004; Santini i sur. 2005; Solla i sur. 2008; Katanić 2014; Tziros i sur. 2017; Stančin 2018).



Slika 1. Areali podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana* u Europi prikazani na temelju više od 2500 prikupljenih uzoraka (preuzeto i prilagođeno prema Brasier i Buck 2001).

Identifikacija podvrsta *O. novo-ulmi* i njihovih hibrida moguća je primjenom različitih metoda kao što su test plodnosti na temelju njihove parcijalne reproduktivne barijere (Brasier 1979), analiza izozima (Jeng i sur. 1991), nasumična amplifikacija polimorfne DNA (engleski: *Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*) (Hoegger i sur. 1996; Solla i sur. 2008; Brasier i Kirk 2010) te polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engleski: *Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*) gena *cu* i *coll* (Konrad i sur. 2002; Dvořák i sur. 2007; Tziros i sur. 2017). Gen *cu* kodira hidrofobni protein *cerato-ulmin* (Pipe i sur. 1997), dok gen *coll* kodira protein povezan s filamentoznim rastom gljive (tip kolonije) (Pereira i sur. 2000). Elektroforetski restrikcijski obrasci gena *cu* dobiveni cijepanjem restrikcijskim enzimom *HphI*, kao i elektroforetski restrikcijski obrasci gena *coll* dobiveni cijepanjem restrikcijskim enzimom *BfaI* (*FspBI*) specifični su za podvrstu *O. novo-ulmi*, stoga ova metoda omogućava jednostavnu identifikaciju podvrsta i hibrida (Konrad i sur. 2002).

Hibridi podvrsta *O. novo-ulmi* su fertilni i nisu manje agresivni prema brijestu (Brasier i Kirk 2010), a osim toga moguća je hibridizacija između hibrida i originalnih podvrsta. Zbog nastalog širokog spektra mogućnosti rekombinacije, moguće je da će prirodna selekcija favorizirati određeni set genotipova koji će se smatrati novom podvrstom, stoga se može zaključiti kako patogen holandske bolesti brijesta prolazi kroz novu fazu evolucijskog razvoja u Europi (Brasier i Buck 2001).

1.2. Cilj rada

Glavni cilj ovog istraživanja bio je usporediti virulentnost različitih izolata fitopatogene gljive *O. novo-ulmi*. U dosadašnjim istraživanjima holandske bolesti brijesta na području Hrvatske prikupljen je veći broj izolata *O. novo-ulmi* (Katanić 2014). Dio izolata prethodno je molekularno karakteriziran primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* te je dokazana prisutnost *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i ssp. *americana*, kao i hibridnih izolata (Stančin 2018), dok za dio izolata još uvijek nije utvrđeno kojoj podvrsti pripadaju. Također, do sada nije istraženo postoji li razlika u virulentnosti izolata *O. novo-ulmi* koji zaražavaju brijest na području Hrvatske. Obzirom na to postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

- 1) Molekularno karakterizirati izolate gljive *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske za koje nije poznato kojoj podvrsti pripadaju
- 2) Testirati virulentnost odabranih izolata različitih podvrsta gljive *O. novo-ulmi* te njihovih hibrida

2. Materijali i metode

2.1. Uzorci gljive *O. novo-ulmi*

U ovom istraživanju korišteni su uzorci gljive *O. novo-ulmi* izolirani iz grančica nizinskog (*U. minor* Mill.) i gorskoga brijesta (*U. glabra* Huds.) te brijesta veza (*U. laevis* Pall.) sakupljenih na tri lokaliteta na području Republike Hrvatske: Nova Kapela, Jastrebarsko i Kalnik (Katanić 2014). Izolacija gljive je rađena prema Brasier (1981) bez primjene antibiotika, a identifikacija izolata temeljila se na analizi rasta i morfologije kulture (Brasier 1981; Brasier i Webber 1987). Izolati su čuvani u 22%-tnoj otopini glicerola na -20°C (Katanić, 2014). U ovom radu molekularno je karakteriziran 21 izolat od čega 8 uzoraka izoliranih iz zaraženih grančica brijesta veza prikupljenih na lokalitetima Nova Kapela i Jastrebarsko i 13 uzoraka izoliranih iz zaraženih grančica gorskoga brijesta prikupljenih na lokalitetu Kalnik. Za testiranje virulentnosti nasumično je odabrano 12 izolata različitih podvrsta gljive *O. novo-ulmi* i njihovih hibrida koji su izolirani iz sve tri vrste brijesta prirodno rasprostranjene na području Hrvatske.

2.2. Molekularna analiza fitopatogene gljive *O. novo-ulmi*

2.2.1. Izolacija ukupne DNA

Kruta MEA podloga priređena je prema uputama proizvođača (35,6 g praškaste podloge pomiješano je s 1000 mL destilirane vode, smjesa je zagrijana do vrenja, sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta pri 120°C) i zatim razlivena u sterilne plastične Petrijeve zdjelice promjera 90 mm, nakon čega podloga potpunim hlađenjem prelazi u kruto stanje. Na krutu MEA podlogu postavljen je porozni celofan na koji je nasaden komad krute MEA podloge koji sadrži micelij. Izlijevanje podloga i precjeppljivanje izolata rađeno je u laminaru sa sterilnim priborom. Tako pripremljen uzorak inkubiran je najmanje sedam dana na sobnoj temperaturi u mraku. Prorasli micelij gljive sastrugan je nožićem s celofana te korišten za izolaciju DNA.

Ukupna DNA izolirana je iz svježeg tkiva pomoću tržišnoga paketa *OmniPrep for Fungi* (*G-Bioscience*) prateći priloženi protokol. Odvagano je 10-20 mg micelija u mikroepruvetu i usitnjeno lizom stanica pomoću *Tissuelyser II* (*Quiagen*), na način da je u mikroepruvetu s micelijem dodan pufer za lizu stanica (*GenomicLysisBufer*) i metalna kuglica te su uzorci usitnjavani frekvencijom od 30 Hz u trajanju od ukupno 4 minute. Nakon toga dodano je 5 µl proteinaze K te su uzorci inkubirani 60 minuta na 60 °C uz povremeno miješanje. Potom

su uzorci ohlađeni na sobnoj temperaturi te je u njih dodano 200 µl kloroforma. Uzorci su promiješani rukom te su centrifugirani 10 minuta na 14 000 xg. Supernatant pažljivo je odvojen nakon centrifugiranja u nove mikroeprovete te je u njega dodano 50 µl otopine za odvajanje komponenti (*DNA Stripping Solution*). Mikroeprovete su promiješane okretanjem te su uzorci inkubirani na 60°C u trajanju od 10 minuta. Potom je dodano 100 µl otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*), a mikroeprovete su promiješanje okretanjem, nakon čega se pojavio bijeli talog. Ukoliko bijelog taloga nije bilo, u mikroeprovete je dodavano po 50 µl otopine za precipitaciju, sve dok se talog nije pojavio. Nakon pojave taloga uzorci su centrifugirani 5 minuta na 14 000 xg, a supernatant je odvojen u novu mikroeprovetu u kojoj se genomska DNA precipitirala dodatkom 500 µl izopropanola. Mikroeprovete promiješane su okretanjem 10 puta te su centrifugirane 5 minuta na 14 000 xg. Nakon centrifugiranja, supernatant je bačen, a u mikroeprovetu dodano je 700 µl 70%-tnog etanola kako bi se isprao talog. Uzorci su centrifugirani 1 minutu na 14 000 xg. Potom je etanol uklonjen, a mikroeprovete okrenute su naopako na čisti ubrus kako bi se precipitat DNA osušio, pazeći pri tome da se ne osuši u potpunosti budući da će u tom slučaju precipitat biti teško rehidriran. Nakon sušenja na zraku, talog je otopljen u 30 µl sterilne deionizirane vode, a uzorci su pohranjeni na 4°C na kraće vrijeme, te na -20°C na duže vrijeme.

Masena koncentracija ukupne DNA određena je mjerenjem apsorbancije 1 µl uzorka pri 260 nm nanospektrofotometrom (*Implen*), a kao slijepa proba korištena je sterilna deionizirana voda. Čistoća uzorka određena je omjerom apsorbancije pri 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) koji ukazuje na kontaminaciju u vidu zaostalih proteina, pri čemu je okvir prihvatljive vrijednosti omjera između 1,8 i 2,0.

2.2.2. Amplifikacija gena *cu* i *coll* lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Geni *cu* i *coll* amplificirani su lančanom reakcijom polimerazom (*Polymerase chain reaction*, PCR) kako je opisano u prethodnim radovima (Konrad i sur. 2002; Pipe i sur. 1997), za što je korišten *EmeraldAmp MAX PCR* (Takara) koji sadrži optimiziranu količinu PCR pufera, polimeraze i dNTP smjese, te početnice koje je sintetizirala tvrtka *Thermo Fisher Scientific*, čije se nukleotidne sekvence nalaze u Tablici 2. Reakcijska smjesa za amplifikaciju oba gena sadržavala je po jednom uzorku 25 µl *EmeraldAmp MAX PCR*, 22 µl sterilne deionizirane vode te po 1 µl uzvodne i nizvodne početnice i 1 µl uzorka DNA koncentracije 20 µg/µl, pri čemu je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 50 µl. Kao negativna kontrola korišten je 1 µl sterilne deionizirane vode. Uvjeti PCR reakcija navedeni

su u Tablici 3. PCR produkti analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu koji je pripremljen otapanjem agaroze u 0,5 x TBE pufera (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3) i u koji je dodana boja SYBR Safe DNA Gel Stain (*Thermo Fisher Scientific*). U jažice je nanošeno 5 µl PCR produkta, a za određivanje duljine DNA odsječaka kao standard korišten je 50 pb DNA Ladder (Takara). Elektroforeza se odvijala u 0,5 x TBE u trajanju od 30 min pod naponom od 100 V. Za vizualizaciju PCR produkata korišten je UV-transiluminator (UVITEC) i kamera (Kodak EDAS 290 System).

Tablica 2. Nukleotidne sekvence početnica za amplifikaciju gene *cu* i *coll* (Pipe i sur. 1997; Konrad i sur. 2002).

Gen	Početnica	Nukleotidna sekvencija 5'-3'	Autori
<i>cu</i>	<i>Cu1</i>	GGGCAGCTTACCAGAGTGAAC	Pipe i sur., 1997
	<i>Cu2</i>	GCGTTATGATGTAGCGGTGGC	Pipe i sur., 1997
<i>coll</i>	<i>Coll-F</i>	GCAGTTGTTGAACATGTATG	Konrad i sur., 2002
	<i>Coll-R</i>	TGCTTGACGTAGATCTCG	Konrad i sur., 2002

Tablica 3. Uvjeti amplifikacije gena *cu* i *coll* lančanom reakcijom polimerazom.

Gen	Reakcijski koraci	Vrijeme	Temperatura (°C)	
<i>cu</i>	1 ciklus	Početna denaturacija	4 min	94
	30 ciklusa	Denaturacija	15 s	94
		Sparivanje početnica	1 min	68
		Produljivanje lanaca	2 min	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanaca	5 min	72
<i>coll</i>	1 ciklus	Početna denaturacija	4 min	94
	30 ciklusa	Denaturacija	15 s	94
		Sparivanje početnica	1 min	59
		Produljivanje lanaca	2 min	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanaca	5 min	72

2.2.3. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP)

Transverzija u sekvenci gena *cu* kojom se razlikuju dvije podvrste nalazi se unutar restrikcijskog mjesta enzima *HphI* (Konrad i sur. 2002), pri čemu ova endonukleaza cijepa gen *cu* podvrste *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* dvaput, a podvrste ssp. *americana* jednom. Posljedično, 3 elektroforetske vrpce bit će detektirane u izolatima ssp. *novo-ulmi*, a dvije elektroforetske vrpce bit će detektirane u izolatima ssp. *americana*. Za restrikcijski enzim *BfaI* (*FspBI*) unutar sekvence gena *coll* podvrste ssp. *novo-ulmi* postoji jedno restrikcijsko mjesto, a dva restrikcijska mjesta unutar sekvence gena *coll* podvrste ssp. *americana* (Konrad i sur. 2002), zbog čega se mogu detektirati 2 elektroforetske vrpce u izolatima ssp. *novo-ulmi* i 3 elektroforetske vrpce u izolatima ssp. *americana*. Ukoliko se restrikcijski elektroforetski obrasci u usporednoj analizi pojedinačnih izolata nisu poklapali ukazujući na različite podvrste, takvi izolati u ovom radu smatrani su hibridima (Pipe i sur. 1997; Konrad i sur., 2002).

Reakcijska smjesa za cijepanje gena *cu* sadržavala je 9 µl sterilne deionizirane vode, 1 µl 10x pufera (*Buffer B*), 0,5 µl *HphI* restrikcijskog enzima (*Thermo Fisher Scientific*) i 5 µl PCR produkta. Sukladno tome, reakcijska smjesa za cijepanje gena *coll* sadržavala je po uzorku 9 µl sterilne deionizirane vode, 1 µl 10x pufera (*Buffer Tango*), 0,5 µl *BfaI* restrikcijskog enzima (*Thermo Fisher Scientific*) i 5 µl PCR produkta, pri čemu je ukupan volumen reakcijske smjese iznosio 15,5 µl. Reakcijska smjesa inkubirana je 120 min na 37°C, a restrikcijski fragmenti analizirani su u 2%-tnom agaroznom gelu koji je pripremljen otapanjem agaroze u 0,5 x TBE puferu. Za vizualizaciju korištena je boja *SYBR Safe DNA Gel Stain* (*Thermo Fisher Scientific*). U jažice je stavljano 10 µl uzorka pomiješanog s 2 µl 6x koncentriranog obojenog pufera *Blue/Orange* (*Promega*), a za određivanje duljine DNA odsječaka kao standard korišten je 50 pb *DNA Ladder* (*Takara*). Za elektroforezu korišten je 0,5 x TBE pufer, a elektroforeza se odvijala tokom 90 minuta pod naponom od 100 V. Za vizualizaciju restrikcijskih obrazaca korišten je UV-transiluminator (*UVITEC*) i kamera (*Kodak EDAS 290 System*).

2.3. Test virulentnosti izolata gljive *O. novo-ulmi* inokulacijom ploda jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious')

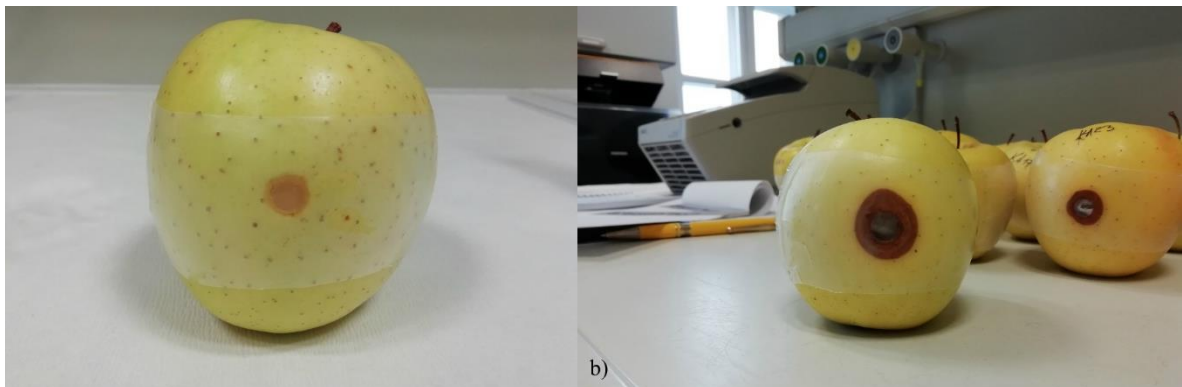
Za test virulentnosti odabrani su nasumično po tri uzorka gljive *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* (NK21, KA17, J34), tri uzorka ssp. *americana* (NK11, KA23, J19), tri uzorka ssp. *novo-*

ulmi x ssp. *americana* hibrida (NK22, KA9, J8) i tri uzorka ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* hibrida (NK23, NK17, KA3), koji su identificirani u prethodnom radu (Stančin 2018) (Tablica 4.), a dio uzoraka identificiran je u prvome dijelu ovoga rada. Oznaka ssp. *novo-ulmi* x ssp. *americana* znači da *cu* gen pokazuje elektroforetski obrazac karakterističan za ssp. *novo-ulmi*, a *coll* gen pokazuje elektroforetski obrazac karakterističan za ssp. *americana*, te se zbog toga podvrsta smatra hibridom. Nasuprot tome, oznaka ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* znači da *cu* gen pokazuje elektroforetski obrazac karakterističan za ssp. *americana*, a *coll* gen pokazuje elektroforetski obrazac karakterističan za ssp. *novo-ulmi*, te se takav izolat smatra hibridom.

Tablica 4. Rezultati identifikacije podvrsta i hibrida za izolate gljive *O. novo-ulmi* koji zaražavaju nizinski brijest na području Hrvatske primjenom RFLP-PCR analizom *cu* i *coll* gena (preuzeto iz Stančin 2018).

Lokalitet	Oznaka izolata	Podvrsta	
		<i>cu</i>	<i>coll</i>
Nova Kapela	NK8	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	NK11	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	NK14	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	NK18	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	NK 21	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	NK 22	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	NK23	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	NK24	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
Jastrebarsko	J6	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J8	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J12	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J16	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J20	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J21	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J23	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J26	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J27	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J29	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J30	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
J34	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	

Odabrani izolati nasađeni su na krutu MEA podlogu u sterilnoj Petrijevoj zdjelici i ostavljeni da rastu najmanje sedam dana prije inokulacije. Inokulacija plodova jabuke 'Golden delicious' i test virulentnosti rađeni su prema Fulbright (1984) te Plourde i Bernier (2014), pri čemu su jabuke kupljene u lokalnoj trgovini te su držane 3 do 4 dana u laboratoriju na sobnoj temperaturi (22 – 24°C). Prije inokulacije, jabuke su vizualno analizirane, te su oštećene jabuke odstranjene, a ostatak jabuka pažljivo je opran blagim sapunom i površinski dezinficiran 70%-tnim etanolom. Tkivo jabuke uklonjeno je cilindričnim metalnim bušačem promjera 10 mm do dubine od 10 mm, nakon čega je komad krute MEA podloge s micelijem odgovarajućeg promjera od 10 mm ubačen u prethodno napravljenu udubinu u plodu jabuke, pazeći pri tome da micelij bude okrenut prema unutrašnjosti. Kao kontrola korišten je plod jabuke inokuliran krutom MEA podlogom bez micelija. Preko mjesta inokulacije stavljen je komad transparentne trake proizvođača *Parafilm M*, kako bi se spriječila kontaminacija i isušivanje. Cijeli proces inokulacije rađen je u laminaru kako bi se izbjegla kontaminacija. Nakon inokulacije, jabuke su nasumično raspoređene u kartonske kutije, koje su zatvorene i držane su u mraku na sobnoj temperaturi (22 – 24°C).



Slika 2. Prikaz inokuliranih plodova jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') – a) prikaz negativne kontrole; b) prikaz nekrotične lezije nastale 28 dana nakon inokulacije izolatima gljive *O. novo-ulmi*.

Virulentnost izolata *O. novo-ulmi* evaluirana je mjerenjem promjera nekrotičnih lezija (Slika 2.) 14. i 28. dan nakon inokulacije. Podaci su statistički analizirani korištenjem *Graph Pad Prism 5* (*Graph Pad Software Inc.*) i *Statistica 13* (*TIBCO Software Inc.*). Normalna distribucija podataka u testu virulentnosti obrađena je koristeći Shapiro-Wilk test, a budući da dio podataka nije bio normalno distribuiran korišten je Kruskal-Wallis i *post hoc* test.

3. Rezultati

3.1. Identifikacija podvrsta i hibrida gljive *O. novo-ulmi*

Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnoženi su odsječci gena *cu* i *coll* za ukupno 21 izolat gljive *O. novo-ulmi* koji su cijepani restrikcijom enzimima *HphI* i *BfaI*. Usporednom analizom dobivenih elektroforetski obrazaca 8 izolata determinirano je kao podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, dva izolata s lokaliteta Jastrebarsko (J5, J11) i 5 izolata s lokaliteta Kalnik (KA8, KA11, KA12, KA14, KA17 i KA19). Ukupno 3 izolata determinirano je kao podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, 2 izolata s lokaliteta Jastrebarsko (J14 i J19) te 1 izolat s lokaliteta Kalnik (KA23). Ukupno 10 uzoraka nije pokazivalo jednoznačne rezultate te su oni determinirani kao hibridi, a utvrđeni su na sva tri lokaliteta. Identificirano je 8 uzoraka (NK6, J24, J25, KA5, KA9, KA10, KA18 i KA21) koji su pokazivali elektroforetski obrazac gena *cu* karakterističan za ssp. *novo-ulmi* te elektroforetski obrazac gena *coll* karakterističan za ssp. *americana* (*O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* x ssp. *americana* hibrid). Dva uzorka (NK17 i KA3) pokazivala su elektroforetski obrazac gena *cu* karakterističan za ssp. *americana* te elektroforetski obrazac gena *coll* karakterističan za ssp. *novo-ulmi* (*O. novo-ulmi* ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* hibrid). Rezultati PCR-RFLP analize prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati identifikacije podvrsta i hibrida RFLP-PCR analizom *cu* i *coll* gena.

Lokalitet	Oznaka izolata	Podvrsta	
		<i>cu</i>	<i>coll</i>
Nova Kapela	NK6	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	NK17	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
Jastrebarsko	J5	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J11	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	J14	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J19	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J24	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	J25	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	Kalnik	KA3	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
KA5		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
KA8		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA9		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
KA10		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
KA11		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA12		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA14		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA17		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA18		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
KA19		<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
KA21	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	
KA23	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	

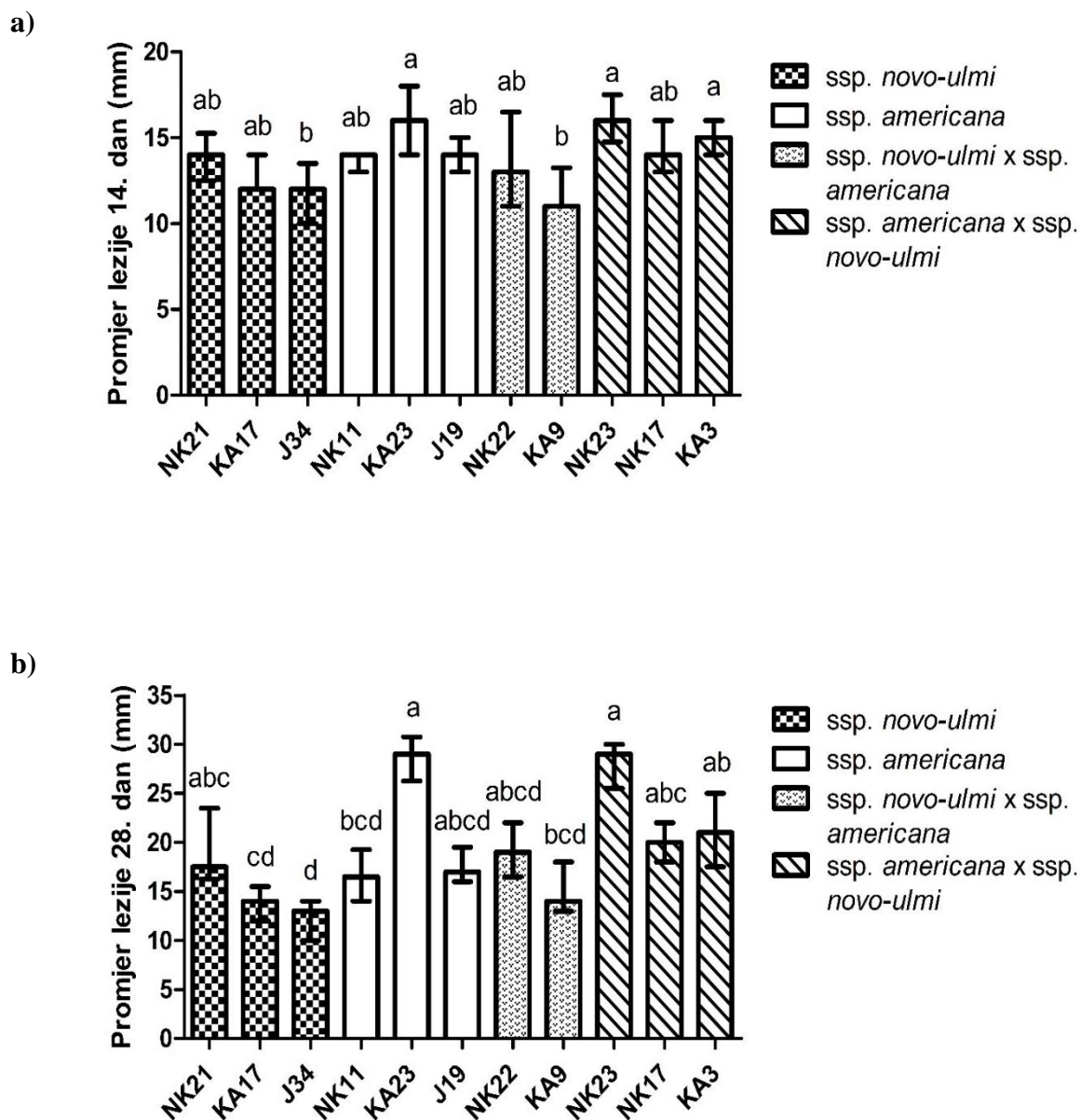
3.2. Procjena virulentnosti izolata gljive *O. novo-ulmi*

Virulentnost odabranih izolata *O. novo-ulmi* (navedenih u poglavlju 2.3.) procijenjena je metodom inokulacije izolata na plod jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') (Plourde i Bernier 2014) i mjerenjem promjera nekrotične lezije nakon 14 i 28 dana (Slika 3.). Rezultati za uzorak J8 (ssp. *novo-ulmi* x ssp. *americana*) nisu uvršteni u analizu jer zbog kontaminacije nije bilo moguće pouzdano izmjeriti promjer lezije.

Svi testirani izolati *O. novo-ulmi* uzrokovali su pojavu koncentričnih smeđih nekrotičnih lezija oko mjesta inokulacije na plodu jabuke (Slika 2.b). Na negativnim kontrolama, u

skladu s očekivanjem, nije primijećena pojava nekrotičnih lezija (Slika 2.a). Srednja vrijednost promjera nekrotične lezije 14 dana od inokulacije izolatima ssp. *novo-ulmi* iznosila je 13,08 mm, a vrijednost je varirala između 10 mm i 20 mm, dok je za izolate ssp. *americana* srednja vrijednost promjera nekrotične lezije iznosila 14,42 mm, s rasponom između 10 mm i 20 mm. Nakon 28 dana od inokulacije srednja vrijednost promjera nekrotične lezije uzrokovana izolatima ssp. *novo-ulmi* iznosila 15,63 mm, s varijacijama vrijednosti od 10 mm do 31 mm, dok je srednja vrijednost promjera nekrotične lezije izazvane izolatima ssp. *americana* iznosila je 21,03 mm, s varijacijama vrijednosti od 14 mm do 33 mm.

Statistička analiza promjera nekrotične lezije na plodu jabuke pokazala je statistički značajne razlike u veličini promjera nekrotične lezije između pojedinih izolata, što ukazuje na postojanje razlika u virulentnosti. Veće razlike utvrđene su 28. dan od inokulacije u odnosu na 14. dan. Najveću procijenjenu virulentnost imali su izolati KA23 (*O. novo ulmi* ssp. *americana*) i NK23 (ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* hibrid) koji su uzrokovali statistički značajno veći promjer lezija 14 dana nakon inokulacije u usporedbi s izolatima J34 (*O. novo ulmi* ssp. *novo-ulmi*) i KA9 (ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* hibrid) te statistički značajno veći promjer lezija 28 dana nakon inokulacije u usporedbi s izolatima KA17 (*O. novo ulmi* ssp. *novo-ulmi*), J34 (*O. novo ulmi* ssp. *novo-ulmi*), NK11 (*O. novo ulmi* ssp. *americana*) i KA9 (ssp. *americana* x ssp. *novo-ulmi* hibrid).



Slika 3. Promjer nekrotične lezije na plodu jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') a) 14 dana nakon inokulacije izolata *O. novo-ulmi* i b) 28 dana nakon inokulacije izolata *O. novo-ulmi*.

4. Rasprava

U ovome radu analizirani su izolati gljive *O. novo-ulmi* primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* (Konrad i sur. 2002) kako bi se detaljnije istražila prisutnost pojedinih podvrsta i njihovih hibrida na području Republike Hrvatske, a za odabrane izolate procijenjena je virulentnost metodom inokulacije izolata na plod jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') prema Plourde i Bernier (2014).

Holandska bolest brijesta je u Hrvatskoj prvi puta zabilježena dvadesetih godina 20. st., a uzrokovala ju je vrsta *O. ulmi* (Brasier i Buck 2001; Zebec i sur. 2010), dok se vrsta *O. novo-ulmi* pojavila na području Hrvatske osamdesetih godina 20. st. (Brasier i Kirk 2001). U narednim godinama vrsta *O. novo-ulmi* u potpunosti je zamijenila vrstu *O. ulmi* i postala glavni uzročnik holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj (Katanić 2014), jednako kao i u drugim dijelovima Europe (Kirisits i Konrad 2004; Santini i sur. 2005; Dvořák i sur. 2007; Solla i sur. 2008; Tziros i sur. 2017; Jürisoo i sur. 2019). Molekularna karakterizacija izolata *O. novo-ulmi* koji zaražavaju nizinski brijest na području Hrvatske ukazala je da su na području Hrvatske prisutne obje podvrste gljive *O. novo-ulmi* (Stančin 2018), što je potvrđeno i ovim radom u kojem su molekularno karakterizirani izolati *O. novo-ulmi* koji zaražavaju gorski brijest i brijest vez. Veći broj izolata analiziranih u ovom radu je primjenom PCR-RFLP gena *cu* i *coll* determiniran kao podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, nego kao ssp. *americana*, a takva zastupljenost podvrsta u skladu je s prethodnim istraživanjima na području Hrvatske (Brasier i Kirk 2001; Stančin 2018).

U prethodnim radovima pokazano je kako su se areali dviju podvrsta u mnogim dijelovima Europe počeli preklapati. Uslijed toga, dvije podvrste *O. novo-ulmi* došle u izravan kontakt, a budući da nisu u potpunosti reproduktivno odvojene, moguća je pojavnost hibrida između te dvije podvrste. Do sad je potvrđena pojava i širenje hibrida u većem broju europskih zemalja (Konrad i sur. 2002; Kirisits i Konrad 2004; Santini i sur. 2005, Dvořák i sur. 2007; Solla i sur. 2008, Brasier i Kirk 2010, Tziros i sur. 2017, Jürisoo i sur., 2019). U radu Stančin (2018) pokazano je da se areali dviju podvrsta *O. novo-ulmi* preklapaju i na području Hrvatske, a značajan udio analiziranih izolata činili su hibridi. Rezultati ovog istraživanja također su ukazali na veliku zastupljenost hibrida u populacijama *O. novo-ulmi* u Hrvatskoj te potvrđuju da područje Hrvatska predstavlja potencijalnu zonu hibridizacije podvrsta.

Primjena PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* smatra se jednostavnom i pouzdanom metodom determinacije podvrsta i njihovih hibrida te je do sada korištena u većem broju istraživanja

uzročnika holandske bolesti brijesta (Pipe i sur. 1997; Konrad i sur. 2002; Tziros i sur. 2017; Jürisoo i sur. 2019). Međutim, važno je naglasiti da se geni *cu* i *colI* nalaze na istom kromosomu te kada PCR-RFLP analize oba gena ukazuju na istu podvrstu, to ne mora značiti da taj izolat nije hibrid jer je moguće da je do rekombinacije došlo na nekome drugom mjestu u genomu. Stoga ova metoda ne garantira točnost identifikacije podvrsta koje pokazuju jednoznačne elektroforetske obrasce (Konrad i sur. 2002). Sukladno tome, broj hibridnih izolata mogao bi biti veći od utvrđenog primjenom samo ove metode (Konrad i sur. 2002). Pretpostavlja se da bi se u budućnosti udio hibridnih izolata s različitim udjelom DNA jedne i druge roditeljske vrste mogao povećati kao rezultat gotovo neogranične mogućnosti hibridizacije, te bi takvi izolati mogli postati dominantni u Europi (Brasier i Kirk 2010). Na to ukazuju i rezultati ovog rada, budući da su hibridi činili gotovo polovicu od ukupnog broja analiziranih izolata. Stoga je potrebno primijeniti drugačije metode u istraživanjima gljive *O. novo-ulmi* kako bi se dobila jasnija slika o genetičkoj raznolikosti ovog patogena u prirodnim populacijama.

Budući da su pojavnost hibrida i njihova sve veća učestalost dokazani (Pipe i sur. 1997; Konrad i sur. 2002; Kirisits i Konrad 2004; Santini i sur. 2005; Dvořák i sur. 2007; Solla i sur. 2008; Katanić 2014; Tziros i sur. 2017; Stančin 2018; Jürisoo i sur. 2019), dolazi do potrebe za istraživanjem i razumijevanjem fenotipskih svojstava različitih genotipova *O. novo-ulmi*, a osobito njihove virulentnosti. U istraživanju virulencije gljive *Cryphonectria parasitica*, uzročnika raka kore kestena, uspješno su korišteni plodovi jabuke *Malus x domestica* 'Golden delicious' (Fulbright 1984), a prema Plourde i Bernier (2014) navedena metoda pokazala se kao pogodna za brzo i jednostavno testiranje virulentnosti gljive *O. novo-ulmi*. Test virulencije koristeći plodove 'Golden delicious' jabuka može biti zamjena sadnicama brijesta i odraslim stablima brijesta u testiranju virulencije *O. novo-ulmi*. Prednosti ovakvog testa su dostupnost materijala za testiranje kroz cijelu godinu, brzina testa, jednostavnost, laka kontrola okolišnih uvjeta, kao i isključivanje faktora stresa. Inokulacijom *O. novo-ulmi* na plodove jabuke dolazi do nastanka nekrotičnih lezija puno brže nego što dolazi do simptoma prilikom testiranja virulencije na stablima brijesta (Plourde i Bernier 2014). Rezultati primijene metoda inokulacije izolata na plod jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') (Plourde i Bernier 2014) dobiveni u ovom radu pokazali su postojanje varijabilnosti u procijenjenoj virulentnosti između testiranih izolata. Smatra se da je podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana* virulentnija u odnosu na ssp. *novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001; Konrad i sur. 2002). Jedan od testiranih izolata (KA23) koji je na temelju veličine

nekrotične lezije procjenjen kao visoko virulentan zaista je pripadao podvrsti ssp. *amaricana*, no dobiveni rezultati ne ukazuju da su sveukupno izolati determinirani primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* kao ssp. *americana* virulentnije od onih koji su determinirani kao ssp. *novo-ulmi*. Međutim, pri tumačenju rezultata testa virulentnost potrebno je uzeti u obzir prethodno opisana ograničenja PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* kao metode za determinaciju podvrsta (Konrad i sur. 2002). Virulentnost hibridnih izolata također je bila vrlo varijabilna što ukazuje da bi genetički različiti hibridni izolati mogli pokazivati velike razlike u virulentnosti prema brijestu te je svojstvo virulentnosti *O. novo-ulmi* potrebno dalje istraživati (Bernier 2016). Et-Touil i sur. (1999) pokazali su kako je moguće da pojedini izolati *O. novo-ulmi* sadrže alele koji određuju nisku virulenciju pridobivene iz *O. ulmi*, što također može utjecati na rezultat testa virulencije.

Ovo istraživanje predstavlja značajan doprinos karakterizaciji uzročnika holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju strukture populacija ovog patogena, za koju je pokazano da je vrlo kompleksna obzirom da obuhvaća obje podvrste *O. novo-ulmi* te veliku zastupljenost hibridnih izolata. Osim toga, po prvi puta je opisano postojanje razlika u virulentnost izolata *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske, a dobiveni rezultati ukazuju na varijabilnost ovog svojstva između genetički različitih izolata gljive *O. novo-ulmi*.

5. Zaključak

U ovome radu primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* potvrđena je prisutnost obje podvrste gljive *O. novo-ulmi* – ssp. *novo-ulmi* i ssp. *americana*, na području Hrvatske. Dobiveni rezultati determinacije patogena ukazali su na veću učestalost *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* u usporedbi s *O. novo-ulmi* ssp. *americana* te veliku učestalost hibridnih izolata na istraženim lokalitetima.

Test virulentnosti inokulacijom ploda jabuke (*Malus x domestica* 'Golden delicious') izolatima *O. novo-ulmi* pokazao se kao dobar alternativan pristup u istraživanju virulentnosti ove fitopatogene gljive. Utvrđena je varijabilnost u svojstvu virulentnosti izolata gljive *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske, međutim virulentnost različitih testiranih izolata nije se mogla dovesti u korelaciju s rezultatima molekularne identifikacije patogena.

6. Literatura

- Bernier, L. (2016) Genome-wide analysis of parasitic fitness traits in a non-model tree pathogen. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38: 153–163.
- Brasier, C. M. (1979) Dual origin of recent Dutch elm disease outbreaks in Europe. *Nature* 281: 78–80.
- Brasier, C. M. (1981) Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. U: Stipes, R.J., Campana, R. J. (ur.) Compendium of elm diseases. American Phytopathological Society Str. 76-79.
- Brasier, C. M. (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115: 151–161.
- Brasier, C. M., Buck, K. W. (2001) Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Dutch elm disease). *Biological Invasions* 3: 223–233.
- Brasier, C. M. (1996) New Horizons in Dutch Elm Disease Control. Report on Forest Research, Available from Her Majesty's Stationery Office, London. 20–28.
- Brasier, C. M. (1990) China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathology* 39: 5–16.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A. (2001) Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies: their perithecial size differences and geographical distributions. *Mycological Research* 105: 547–554.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A. (2010) Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathology* 59: 186–199.
- Brasier, C. M., Webber, J. F. (1987) Positive correlations between in vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology* 36: 462-466
- Dvořák, M., Tomšovský, M., Jankovský, L., (2007) Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 43: 142–145.
- Et-Touil, A., Brasier, C. M., Bernier, L. (1999) Localization of a pathogenicity gene in *Ophiostoma novo-ulmi* and evidence that it may be introgressed from *O. ulmi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 6–15.

- Fulbright, D. (1984) Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 74: 722–4.
- Ghelardini, L., Santini, A. (2009) Avoidance by early flushing: A new perspective on Dutch elm disease research. *IForest* 2: 143–153.
- Glavaš, M. (1999) Gljivične bolesti šumskoga drveća. Sveučilište u Zagrebu.
- Heybroek, H. M. (1993) Why Bother About the Elm? U: Sticklen, M. B., Sherald, J. L. (ur.) *Dutch Elm Disease Research*, Springer-Verlag New York str. 1–8.
- Hoegger, P. J., Binz, T., Heiniger, U. (1996) Detection of genetic variation between *Ophiostoma ulmi* and the NAN and EAN races of *O. novo-ulmi* in Switzerland using RAPD markers. *Forest Pathology* 26: 57–68.
- Jeng, R. S., Duchesne, L. C., Sabourin, M., Hubbes M. (1991) Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Mycological Research* 95: 537–542.
- Jürisoo, L., Adamson, K., Padari, A., Drenkhan, R. (2019) Health of elms and Dutch elm disease in Estonia. *European Journal of Plant Pathology*, 154:823–841.
- Katanić, Z. (2014) Identifikacija i molekularna karakterizacija fitoplazme brijesta ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ u Hrvatskoj. Doktorski rad. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Kirisits, T., Konrad, H. (2004) Dutch elm disease in Austria. *Investigacion agraria. Sistemas y recursos forestales* 13: 81–92.
- Konrad, H., Kirisits, T., Riegler, M., Halmschlager, E., Stauffer, C. (2002) Genetic evidence for natural hybridization between the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. *Plant Pathology* 51: 78-84.
- Zebec, M., Idžojtić, M., Poljak, I. (2010) Varijabilnost nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill. *sensu latissimo*) na području Hrvatske Podravine prema morfološkim svojstvima listova. *Šumarski list* 164: 569–580.
- Mitchell, A. G., Brasier, C. M. (1994) Contrasting structure of European and North American populations of *Ophiostoma ulmi*. *Mycological Research* 98: 576–582.

- Pereira, V., Royer, J. C., Hintz, W. E., Field, D., Bowden, C., Kokurewicz, K., Hubbes, M., Horgen, P. A. (2000) A gene associated with filamentous growth in *Ophiostoma novo-ulmi* has RNA-binding motifs and is similar to a yeast gene involved in mRNA splicing. *Current Genetics* 37: 94–103.
- Pipe, N. D., Buck, K. W., Brasier, C. M. (1997) Comparison of the cerato-ulmin (cu) gene sequences of the Himalayan Dutch elm disease fungus *Ophiostoma himal-ulmi* with those of *O. ulmi* and *O. novo-ulmi* suggests that the cu gene of *O. novo-ulmi* is unlikely to have been acquired recently from *O. himal-ulmi*. *Mycological Research* 101: 415–421.
- Plourde, K., Bernier, L. (2014) A rapid virulence assay for the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi* by inoculation of apple (*Malus × domestica* 'Golden Delicious') fruits *Plant Pathology* 63: 1078–1085.
- Santini, A., Montagni, A., Vendramin, G. G., Capretti, P. (2005) Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. *Journal of Phytopathology* 153: 73–79.
- Santini, A., Faccoli, M. (2014) Dutch elm disease and elm bark beetles: A century of association. *IForest*, 8: 126–134.
- Solla, A., Dacasa, M. C., Nasmith, C., Hubbes, M., Gil, L. (2008) Analysis of Spanish populations of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* using phenotypic characteristics and RAPD markers. *Plant Pathology* 57: 33–44.
- Stančin, P. (2018) Karakterizacija gljive *Ophiostoma novo-ulmi* izolirane iz uzoraka nizinskog brijesta s područja Hrvatske. Završni rad. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. Odjel za biologiju. Osijek.
- Tziros, G. T., Nakopoulou, Z. G., Perlerou, C., Diamandis, S. (2017) „Current status of the Dutch elm disease pathogen populations affecting *Ulmus minor* in Greece“, *Forest Pathology*, 47(2): 1–10.
- Webber, J. F. (2004) Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease Components of Dutch elm disease Early work on DED. *Investigacion agraria. Sistemas y recursos forestales* 13: 197–205.
- Williamson, M. (1999) Invasions, *Ecography*, 22(1): 5–12.