

# Karakterizacija gljive *Ophiostoma novo-ulmi* izolirane iz uzoraka nizinskog brijesta s područja Hrvatske

---

Stančin, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:181:764513>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



**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

Paula Stančin

**Karakterizacija gljive *Ophiostoma novo-ulmi* izolirane iz  
uzoraka nizinskog brijesta s područja Hrvatske**

Završni rad

Osijek, 2018.

**Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Biologija

**Karakterizacija gljive *Ophiostoma novo-ulmi* izolirane iz uzoraka nizinskog brijesta s područja  
Hrvatske**

Paula Stančin

**Rad je izrađen u:** Laboratorij za molekularnu ekologiju, Odjel za biologiju

**Mentor:** Dr. sc. Zorana Katanić, doc.

**Komentor:** Dr. sc. Ljiljana Krstin, doc.

**Kratki sažetak završnog rada:** Gljiva *Ophiostoma novo-ulmi* uzročnik je druge pandemije holandske bolesti brijesta, traheomikoze koja dovodi do sušenja i propadanja brijesta diljem Europe, Sjeverne Amerike i centralne Azije. Vrsta *O. novo-ulmi* dijeli se na dvije podvrste, *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, koje se mogu hibridizirati. U ovom radu su primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* karakterizirani izolati gljive *O. novo-ulmi* koji zaražavaju nizinski brijest na području Hrvatske (lokaliteti Nova Kapela, Đurđevac i Jastrebarsko). Dokazano je da su u Hrvatskoj prisutne obje podvrste, iako je podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* znatno učestalija u odnosu na podvrstu *O. novo-ulmi* subsp. *americana* na istraženim lokalitetima. Nadalje, na svim lokalitetima je dokazana prisutnost hibridnih izolata. Ovo istraživanje po prvi puta pruža detaljniji uvid u strukturu uzročnika holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj.

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**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**

**Bachelor thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific Area:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

**Characterisation of fungus *Ophiostoma novo-ulmi* isolated from field elm samples in Croatia**

Paula Stančin

**Thesis performed at:** Molecular Ecology Laboratory, Department of Biology

**Supervisor:** Zorana Katanić, PhD, Asst. Prof.

**Cosupervisor:** Ljiljana Krstin, PhD, Asst. Prof.

**Short abstract:** Fungus *Ophiostoma novo-ulmi* is a causal agent of the second pandemic of Dutch elm disease, vascular wilt disease responsible for the death of elm trees across Europe, North America and central Asia. Species *O. novo-ulmi* is separated into two distinct subspecies, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, which can hybridize. In this work, PCR-RFLP analysis of *cu* and *coll* genes was used for characterisation of *O. novo-ulmi* isolates which infect *Ulmus minor* in Croatia (sites Nova Kapela, Đurđevac and Jastrebarsko). It was proven that in Croatia both subspecies are present, although *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* is far more frequent in comparison with *O. novo-ulmi* subsp. *americana* at investigated sites. Moreover, presence of hybrid isolates is proven at all sites. This research provides first detail insight into the structure of causal agent of Dutch elm disease in Croatia.

**Original in:** Croatian

**Key words:** Dutch elm disease, hybridization, *Ophiostoma novo-ulmi*, PCR-RFLP

**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. Svojstva nizinskog brijesta .....	1
1.2. Holandska bolest brijesta .....	2
1.3. Vrsta <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> .....	4
1.4. Holandska bolest brijesta u Hrvatskoj .....	5
1.5. Cilj rada.....	6
2. MATERIJALI I METODE .....	7
2.1. Uzorci brijesta.....	7
2.2. Uzgoj gljive <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> na krutoj MEA podlozi.....	7
2.3. Izolacija ukupne DNA .....	8
2.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA .....	8
2.5. Umnožavanje gena <i>cu</i> i <i>coll</i> lančanom reakcijom polimerazom .....	9
2.6. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata .....	10
3. REZULTATI.....	12
3.1. Identifikacija podvrsta gljive <i>O. novo-ulmi</i> i njihovih hibrida .....	12
4. RASPRAVA .....	17
5. ZAKLJUČCI.....	20
6. LITERATURA.....	21

## 1. UVOD

Holandska bolest brijesta jedinstvena je bolest koja uzrokuje sušenje i propadanje brijesta diljem Europe, Sjeverne Amerike i centralne Azije. Uzročnici bolesti su fitopatogene gljive mješinarke iz roda *Ophiostoma*. Prvu pandemiju ove bolesti, koja je započela početkom 20. stoljeća, uzrokovala je vrsta *O. ulmi*. Druga pandemija započela je sredinom 20. stoljeća i još uvijek traje, a uzrokovana je vrstom *O. novo-ulmi*. Vrsta *O. novo-ulmi* dijeli se na dvije podvrste, subsp. *novo-ulmi* i subsp. *americana* između kojih postoji samo djelomična reproduktivna barijera te je prisutnost hibrida ovih podvrsta dokazana na područjima gdje se njihovi areali preklapaju (Brasier i Buck 2001, Brasier i Kirk 2010). U Hrvatskoj je sušenje brijesta zbog širenja holandske bolesti započelo dvadesetih godina prošlog stoljeća (Škorić 1943, Spaić 1955). Osamdesetih godina prošlog stoljeća u Hrvatskoj su bile prisutne i vrsta *O. ulmi* i obje podvrste *O. novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001). Nedavna istraživanja ukazuju da je danas vrsta *O. novo-ulmi* jedini uzročnik holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj (Katanić 2014), ali zastupljenost podvrsta u novije vrijeme nije detaljno istražena.

### 1.1. Svojstva nizinskog brijesta

Nizinski ili poljski brijest (*Ulmus minor* Mill.) je listopadno drvo koje može narasti do visine oko 30 m. Odlikuje se stožastom krošnjom s ravnim, položenim vrhom (Zebeć i sur. 2014). Ima pretežno uzdužno, duboko ispucanu koru, crvenkastomrke boje (Šilić 1973). Listovi su jednostavni, obrnuto jajasti, šiljastog vrha i dvostruko napiljenog ruba te imaju naizmjeničan raspored. Gornji dio lista je tamnozeleno boje i glatko sjajnog izgleda, dok su donji listovi svijetlo zeleni i imaju dlačice u pazušcima žila (Idžojtić 2009). Cvjetovi su dvospolni i anemofilni, skupljeni su u cvatove, a ocvijeće nalikuju čaški. Po 15 – 35 cvjetova zajedno u čupercima se razvijaju iz cvjetnih pupova na prošlogodišnjim izbojcima. Cvjeta u ožujku i travnju prije listanja. Plod je jednosjemeni okriljeni oraščić (perutka ili samara). Oraščić je plosnat i smeđe boje, smješten ekscentrično u gornjem dijelu perutke te urez na vrhu krilca dopire do njega. Krilce je kožasto i bijelosmeđe boje. Plodovi dozrijevaju u travnju i svibnju te brzo otpadaju, anemohorni i hidrohorni su (Idžojtić 2013). Osim generativnog način razmnožavanja, nizinski brijest se može razmnožavati i vegetativno. Nizinski brijest je prirodno rasprostranjen na području Europe, osim u Norveškoj, Švedskoj, Finskoj i sjevernom dijelu Rusije, te u jugozapadnoj Aziji i sjevernoj Africi (Idžojtić 2009,

2013). U Hrvatskoj je rasprostranjen u kontinentalnom i mediteranskom području. U kontinentalnoj Hrvatskoj nizinski brijest se najčešće javlja u šumama hrasta lužnjaka, kitnjaka i običnog graba te južnije u zajednici hrasta medunca i crnog jasena. U mediteranskom području raste u zajednici s hrastom meduncem te u čistim sastojinama, a uz veće rijeke jadranskog sliva kao što su Cetina, Krka i Neretva, raste u zajednicama bijele topole (Zebeć i sur. 2010).

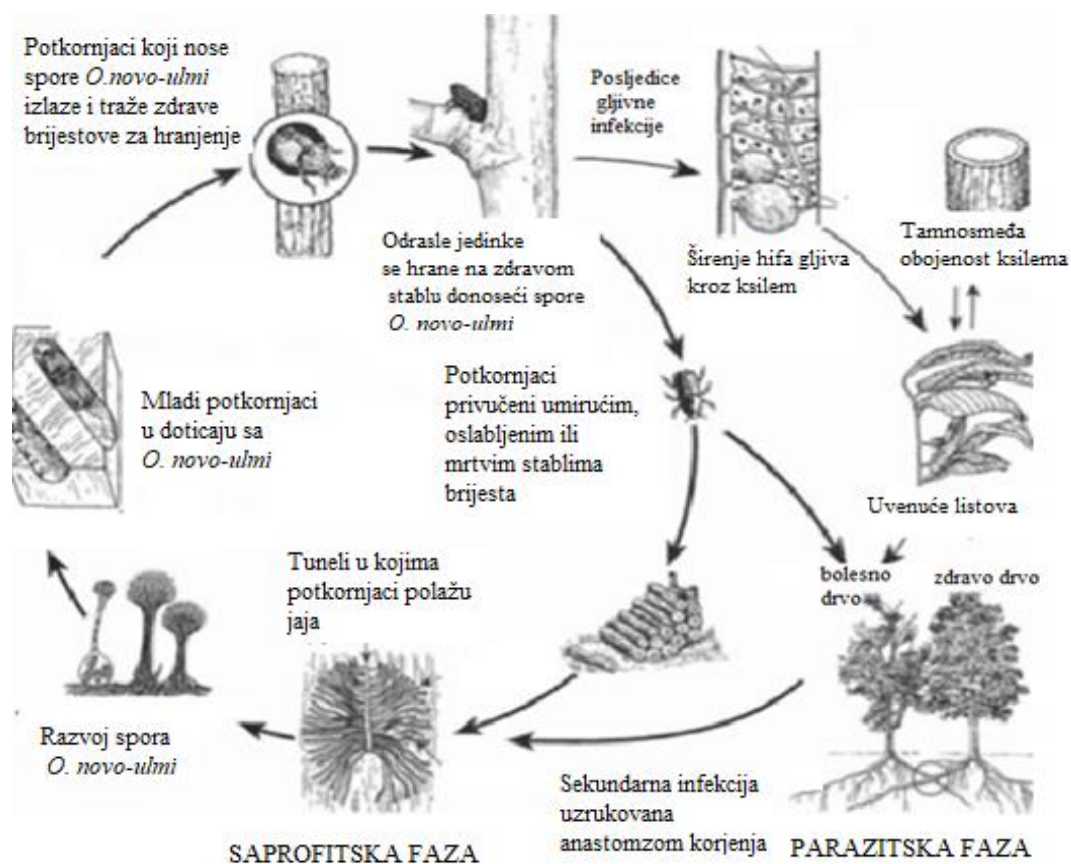
## 1.2. Holandska bolest brijesta

Holandska bolest brijesta je traheomikoza koju uzrokuju tri srodne fitopatogene gljive mješinarke iz roda *Ophiostoma*: *O. ulmi* (Buism.) Nannf., *O. novo-ulmi* Brasier i *O. himal-ulmi* Brasier & Mehrotra. Do sada su zabilježene dvije pandemije ove bolesti. Prva pandemija, koju je uzrokovala vrsta *O. ulmi*, započela je početkom 20. stoljeća u sjeverozapadnoj Europi te se naglo proširila ostatkom Europe, sjeverne Amerike i centralne Azije. Druga pandemija započela je sredinom 20. stoljeća i još uvijek je u tijeku, a uzorkovana je vrstom *O. novo-ulmi* (Brasier i Buck 2001). Vrsta *O. novo-ulmi* znatno je virulentnija u usporedbi s vrstom *O. ulmi* i zastupljena je s dvije podvrste: *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* subsp. *americana* (Brasier 1991, Brasier i Kirk 2001). Vrsta *O. himal-ulmi* je endemična na području Himalaja te je slabo virulentna prema vrstama brijesta koje se tamo prirodno rastu (Brasier i Mehrotra 1995). Pretpostavka je da i vrste *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* potječu s područja Azije jer su europske i američke vrste brijesta puno osjetljivije na ove patogene za razliku od azijskih vrsta brijesta, ali to još uvijek nije sa sigurnošću potvrđeno (Brasier 1991).

Uzročnici holandske bolesti brijesta mogu se razvijati kao jednostanični ili višestanični oblici. Razmnožavanje ovih vrsta može biti spolno ili nesporno. Spolno razmnožavanje odvija se pomoću askospora. Nesporno razmnožavanje odvija se preko konidija, a jednostanični oblici mogu se razmnožavati pupanjem (Stipes i Campana 1981).

Za širenje holandske bolesti brijesta (Slika 1) zaslužni su potkornjaci (red *Coleoptera*, porodica *Scolytidae*). Najznačajnije vektorske vrste u Europi su *Scolytus scolytus* i *S. multistriatus* (Webber 2004). Oni buše hodnike u kori bolesnih brijestova i tamo polažu jaja. Ličinke potkornjaka se hrane floemom i okomito buše nove tunele te se tamo zakukulje. U hodnicima koje su potkornjaci izbušili odvija se saprofitska faza gljive kada ona raste nitasto i stvara brojne spore. Spore gljive se lijepe za mlade kukce koji se odlaze hraniti na mlada i zdrava stabla pa ih tako prenose. Gljiva se tada kroz ksilem širi i uzrokuje pojavu bolesti.

Patogen se može širiti od zaraženih do zdravih jedinki i pomoću anastomoza korijenja (Stipes i Campana 1981, Kirisits 2013).



Slika 1. Širenje holandske bolesti brijesta uzrokovane vrstom *O. novo-ulmi* pomoću vektora potkornjaka (*Scolytus* spp.) (prilagođeno prema Kirisits 2013)

Razvoj i tijek bolesti ovise o starosti brijesta, vrsti brijesta, vrsti i svojstvima patogena, mjestu zaraze, vegetacijskom razdoblju te čimbenicima okoliša (temperatura, vlažnost, vrsta tla) (Webber 2004, Ghelardini i Santini 2009). Prvi vanjski simptomi bolesti su žućenje i uvenuće listova, a zatim dolazi do sušenja i opadanja listova. Ponekad suhi listovi mogu ostati duže na granama, a moguće je da se listovi brzo posuše, ali ne požute te se na granama uočavaju suhi i tamnozeleni listovi. Kod akutnog oblika bolesti prvo se pojavljuje sušenje mladih listovima, a zatim se simptomi proširuju na cijelu krošnju. Ovakav oblik bolesti najčešći je u mladim stabala te u slučaju zaraze ranije tijekom vegetacijske sezone. Kronični oblik bolesti karakterizira polako odumiranje stabla koje može trajati godinama i obično se javlja u starijih stabala. Karakteristični unutrašnji simptom je tamno obojenje ksilema koje



se uočava na poprečnom prerezu zaražene grane u obliku isprekidanog ili cjelovitog prstena (Stipes i Campanula 1981, Glavaš 1999, Kirisits, 2013).

### 1.3. Vrsta *Ophiostoma novo-ulmi*

Vrsta *O. novo-ulmi* uzročnik je druge pandemije holandske bolesti brijesta. Kada je započelo širenje ove vrste, ona je opisivana kao agresivniji soj vrste *O. ulmi*, a kao nova vrsta formalno je opisana tek 1991. godine (Brasier 1991). Vrsta *O. novo-ulmi* je politipična i širila se u formi dviju podvrsta, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, koje su formalno opisane 2001. godine, a do tada su označavane kao EAN (euroazijska) i NAN (sjeverno-američka) forma vrste *O. novo-ulmi*. Podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* prvi puta se pojavila oko 1940. godine na području Crnog mora u Ukrajini, odakle se proširila na zapadnu Europu do 1970.-ih godina. Za podvrstu *O. novo-ulmi* subsp. *americana* vjeruje se da se pojavila na području Velikih jezera u Sjevernoj Americi oko 1940. godine i proširila cijelom Amerikom i Kanadom. U Veliku Britaniju je stigla kasne 1960. godine na zaraženim brijestovima iz Ontaria i zatim se proširila na ostale dijelove Europe 1970.-ih i 80.-ih godina (Brasier i Buck 2001, Brasier i Kirk 2010).

Iako pripadaju istom rodu, vrsta *O. novo-ulmi* i vrsta *O. ulmi* razlikuju se u brojnim fiziološkim, biološkim i molekularnim svojstvima (Brasier 1991, Brasier i Kirk 2010). Vrsta *O. novo-ulmi* znatno je virulentniji patogen te je do danas gotovo u potpunosti potisnula i zamijenila manje virulentnu vrstu *O. ulmi* na svim područjima gdje je bolest prisutna (Brasier i Buck 2001, Tziros i sur. 2017). Jedan od najjednostavnijih način identifikacije vrsta je na temelju razlike u temperaturnom optimumu. Optimalna temperatura rasta vrste *O. novo-ulmi* je 20-22 °C, dok je optimalna temperatura rasta vrste *O. ulmi* 30 °C. Osim toga, morfologija kulture izolata *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* uzgajanih na dnevnom svjetlu i 20 °C značajno se razlikuje. Vrstu *O. ulmi* karakterizira glatka, voštana konzistencija micelija, a dnevne zone rasta su slabo vidljive, dok izolati vrste *O. novo-ulmi* razvijaju zračni micelij s dobro uočljivim dnevnim zonama rasta (Brasier 1981, 1991).

Dvije podvrste gljive *O. novo-ulmi* razlikuju se prema dimenzijama i obliku peritecija (Brasier i Buck 2001). Također, pokazuju određenu malu razliku u morfologiji kulture (Brasier 1981, Brasier i Buck 2001), ali na temelju toga nije moguća pouzdana determinacija podvrsta. Obje podvrste vrlo su virulentne, iako se podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana* smatra nešto virulentnijom u odnosu *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. Između podvrsta gljive

*O. novo-ulmi* postoji slaba reproduktivna barijera te se one mogu hibridizirati, a nastali hibridi su fertilni i pokazuju visok stupanj virulentnosti prema brijestu (Brasier i Kirk 2010). Pojava i širenje hibrida utvrđena je na brojnim područjima gdje se areali dviju podvrsta preklapaju (Hoegger i sur. 1996, Konrad i sur. 2002, Dvořák i sur. 2007, Brasier i Kirk 2010, Tziros i sur. 2017).

Za identifikaciju podvrsta i hibrida do sada su korišteni testovi fertiliteta, analiza izoenzima, nasumična amplifikacija polimorfne DNA (engleski: Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD) te polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engleski: Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) gena *cu* i *coll* (Brasier 1981, Hoegger i sur. 1996, Konrad 2002, Dvořák i sur. 2007, Brasier i Kirk 2010, Tziros i sur. 2017). Gen *cu* kodira hidrofobin cerato-ulmin, protein male molekularne mase od oko 8000 Da. Vrsta *O. novo-ulmi* luči znatno veće količine cerato-ulmina u odnosu na vrstu *O. ulmi* te se dugo smatralo da je to glavni toksin koji utječe na venuće zaraženih brijestova. Daljnja istraživanja dovela su u pitanje takvu pretpostavku te je predloženo da bi funkcija cerato-ulmina mogla biti u rasprostriranju spora (Pipe i sur. 1997). Gen *coll* kodira jedinstveni protein od 826 aminokiselina koji sadrži RNA vezujuće domene i povezan je s filamentoznim rastom gljive *O. novo-ulmi* (Pereira i sur. 2000). Elektroforetski restrikcijski obrasci gena *cu* i *coll* specifični su za svaku podvrstu gljive *O. novo-ulmi*, što omogućava njihovu jednostavnu identifikaciju (Konrad i sur 2002).

#### **1.4. Holandska bolest brijesta u Hrvatskoj**

U Hrvatskoj su prirodno rasprostranjene tri vrste brijesta: nizinski brijest (*U. minor*), gorski brijest (*U. glabra* Huds.) i brijest vez (*U. laevis* Pall.). Pojava holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj zabilježena je 1929. godine na području Slavonije (Škorić 1943, Spaić 1955). Širenje ove bolesti u Hrvatskoj smatra se najznačajnijim uzročnikom sušenja brijesta u Hrvatskim šumama, a osobito je utjecala na nizinski i gorski brijest (Zebec i sur. 2010, 2014, 2015, Katanić 2014). Brasier i Kirk (2001) analizirali su uzorake s područja Hrvatske te pokazali da su osamdesetih godina prošlog stoljeća u Hrvatskoj bile prisutne obje podvrste *O. novo-ulmi*, pri čemu je podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* bila učestalija, te je tada još uvijek je bila prisutna i vrsta *O. ulmi*. Novija istraživanja ukazala su na veliku učestalost holandske bolesti u Hrvatskoj te pokazala da je virulentniji patogen, vrsta *O. novo-ulmi*, do danas potpuno zamijenio manje virulentnog uzročnika, vrstu *O. ulmi* (Katanić 2014). Noviji

podaci o zastupljenost podvrsta gljive *O. novo-ulmi* i pojavi hibrida u Hrvatskoj nisu dostupni.

### **1.5. Cilj rada**

Dugi niz godina holandska bolest brijesta uzrokuje propadanje nizinskog brijesta u Hrvatskoj. Bolest je danas uzrokovana samo gljivom *O. novo-ulmi* (Katanić 2014). Dostupni podaci ukazuju da bi u Hrvatskoj mogle biti prisutne obje podvrste gljive *O. novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001), ali njihova zastupljenosti te pojava hibrida nije detaljnije istražena. Obzirom na to postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Analizirati izolate gljive *O. novo-ulmi* koji zaražavaju nizinski brijest u Hrvatskoj i utvrditi kojoj podvrsti pripadaju
2. Utvrditi jesu li u Hrvatskoj prisutni hibridi *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* x *O. novo-ulmi* ssp. *americana*

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Uzorci brijesta

U ovom istraživanju analizirani su izolati gljive *O. novo-ulmi* koji su u prethodnom istraživanju (Katanić 2014) izolirani iz uzoraka grančica nizinskog brijesta prikupljenih na tri lokaliteta na području Hrvatske: Nova Kapela, Đurđevac i Jastrebarsko. Izolacija gljive je rađena na krutoj MEA podlozi (Malt Extract Agar, Biolife) prema Brasier (1981), bez dodatka antibiotika u podlogu. Nakon prorastanja i sporulacije izolata na MEA podlozi, izrezani su mali komadići podloge s micelijem i stavljeni u mikroeprevetu sa sterilnom 22%-tnom otopinom glicerola te pohranjeni na -20 °C (Katanić 2014).

### 2.2. Uzgoj gljive *Ophiostoma novo-ulmi* na krutoj MEA podlozi

Izolati gljive *O. novo-ulmi* uzgajani su na istoj podlozi koja je korištena i za izolaciju gljive iz uzoraka grančica brijesta. Kruta MEA podloga je pripravljena 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 121°C i zatim razlivena u sterilne plastične Petrijeve zdjelice. Tako pripravljena podloga potpunim hlađenjem prelazi u kruto stanje. Slijedećeg dana na pripravljene podloge nasaden je komadić podloge s micelijem koji je čuvan u glicerolu na -20 °C (Katanić 2014). Petrijeve zdjelice s nasadenim izolatima držane su u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon nekoliko dana micelij gljive je prorastao na podlozi. Svježja kultura je održavana precijepljivanjem svaka tri tjedna.

U svrhu izolacije DNA komadić podloge s micelijem precijepljen je na novu krutu MEA podlogu koja je prethodno prekrivena sterilnim celofanom. Nakon 7 do 10 dana prorasli micelij je sastrugan nožićem s celofana, prebačen u sterilnu mikroeprevetu od 1,5 ml i odmah korišten za izolaciju DNA.

Razlijevanje podloge i precijepljivanje izolata rađeno je u laminaru sa sterilnim priborom kako bi se izbjegla zagađenja.

### **2.3. Izolacija ukupne DNA**

Ukupna DNA izolirana je pomoću tržišnog paketa OmniPrep for Fungi (G-Bioscience). Oko 10- 20 mg micelija odvagano je u mikroepruvetu i usitnjeno pomoću mikrotučka uz dodatak tekućeg dušika. Usitnjenom tkivu dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera za lizu (Genomic Lysis Bufer) i 5  $\mu\text{L}$  proteinaze K. Uzorci su stavljeni na inkubaciju 60 minuta na 60°C uz povremeno miješanje. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi dodano je 200  $\mu\text{L}$  kloroforma, a zatim su uzorci promućkani rukom te su centrifugirani 10 minuta pri 14000xg. Nakon centrifugiranja pažljivo je odvojen supernatant i stavljen u nove mikroepruvete. Dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine za odvajanje komponenti (DNA Stripping Solution), promiješano okretanjem mikroepruvete te inkubirano 10 minuta pri 60 °C. Nakon toga dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine za precipitaciju (Precipitation Solution) nakon čega se trebao pojaviti bijeli talog. Ukoliko se talog nije stvorio, dodavano je po 50  $\mu\text{L}$  otopine za precipitaciju (Precipitation Solution) sve do pojave taloga. Nakon pojave bijelog taloga uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 14 000xg. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroepruvetu, dodano je 500 $\mu\text{L}$  izopropanola, par puta promiješano okretanjem te centrifugirano 5 min na 14 000xg. Nakon centrifugiranja supernatant je bačen, a u mikroepruvetu je dodano 700  $\mu\text{L}$  70%-tnog etanola kako bi se isprao talog DNA. Nakon centrifugiranja 1 minutu na 14 000xg, supernatant je ponovno bačen, a talog je osušen na zraku. Nakon sušenja talog je otopljen u 30  $\mu\text{L}$  sterilne deionizirane vode. Uzorci DNA čuvani su na 4 °C kraće vrijeme, a za duže čuvanje pohranjeni su na -20 °C.

### **2.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA**

Masena koncentracija ukupne DNA određena je mjerenje apsorbancije uzorka pri 260 nm pomoću nanospektrofotometra (Implen). Koncentracija je mjerena u 1  $\mu\text{L}$  uzorka, 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 zaostale proteine u uzorku. Vrijednost omjera  $A_{260}/A_{280}$  čiste DNA iznosi 1,8 – 2.

## 2.5. Umnožavanje gena *cu* i *coll* lančanom reakcijom polimerazom

Za umnožavanje gena *cu* i *coll* lančanom reakcijom polimerazom (engleski: Polymerase Chain Reaction, PCR) korišten je EmeraldAmp MAX PCR (Takara) i početnice koje je sintetizirala tvrtka Thermo Fisher Scientific. Nukleotidne sekvence korištenih početnica su navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Nukleotidne sekvence početnica za umnožavanje gena *cu* i *coll*.

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

Reakcijska smjesa za oba gena sadržavala je 10 µL 2 x EmeraldAmp MAX PCR Master Mix koji sadrži optimiziranu količinu PCR pufera, polimeraze i dNTP smjese, 0,2 µM uzvodne i nizvodne početnice te 10 ng DNA. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 µL. Kao negativna kontrola korištena je sterilna deionizirana voda. Uvjeti PCR reakcija navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti za umnožavanje 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 lanca	2 min	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanca	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 lanca	2 min	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanca	5 min	72

Produkti lančane reakcije polimerazom analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3). Kako bi se PCR produkti mogli vidjeti nakon elektroforeze, u gel je dodana boja SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). U jažice je stavljano 5 µl PCR uzorka. Za određivanje duljine DNA odsječka kao standard korišten je 50 pb DNA Ladder (Takara). Elektroforeza se odvijala u kadici Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad) u 0,5 x TBE puferu pri naponu od 100V u trajanju od 1h. Za vizualizaciju PCR produkta korišten je UV-transiluminator (UVITEC) i kamera (Kodak EDAS 290 System).

## 2.6. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata

Umnoženi odsječak gena *cu* cijepan je pomoću restrikcijskog enzima *HphI* (Thermo Fisher Scientific), a umnoženi odsječak gena *colI* cijepan je pomoću restrikcijskog enzima *BfaI* (*FspBI*) (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Restrikcijska mjesta koja prepoznaju korišteni enzimi prikazana su u Tablici 3.

Tablica 3. Restrikcijska mjesta enzima *HphI* i *BfaI*(*FspBI*).

Restrikcijski enzim	Mjesto cijepanja
<b><i>HphI</i></b>	5'... G G T G A (N) 8 ↓ ... 3' 3'... C C A C T (N) 7 ↑ ... 5'
<b><i>BfaI</i> (<i>FspBI</i>)</b>	5'... C ↓ T A G ... 3' 3'... G A T ↑ C ... 5'

Reakcijska smjesa je sadržavala 10 µL PCR produkta, 18 µL sterilne vode, 2 µL 10x Buffer B za *HphI* odnosno 2 µL 10x Buffer Tango za *BfaI* (*FspBI*) i 1 µL odgovarajućeg restrikcijskog enzima. Reakcijska smjesa je inkubirana 120 minuta na 37 °C. Restrikcijski fragmenti analizirani su u 2%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3), a za vizualizaciju je korištena boja SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). U jažice je stavljano 10 µl uzorka pomiješanog s 2 µL 6x koncentriranog obojenog pufera za nanošenje uzoraka Blue/Orange (Promega). Za određivanje duljine DNA odsječka kao standard korišten je 50 pb DNA Ladder (Takara). Elektroforeza se odvijala u 0,5 x TBE puferu pri naponu od 100V

u trajanju od 1h 30 minuta. Za vizualizaciju elektroforetskih restrikcijskih obrazaca korišten je UV-transiluminator (UVITEC) i kamera (Kodak EDAS 290 System).

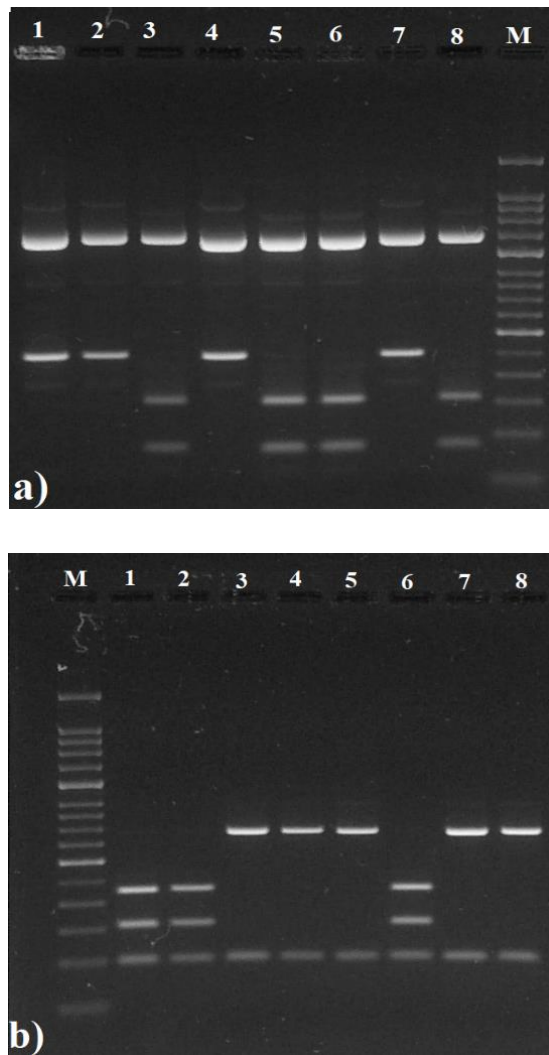
Identifikacija podvrsta gljive *O. novo-ulmi* i njihovih hibrida zasnivala se na usporednoj analizi restrikcijskih elektroforetskih obrazaca gena *cu* i *coll* koji su specifični za podvrstu (Konrad i sur. 2002). U sekvenci umnoženog odsječka gena *cu* kod podvrste *O. novo-ulmi subsp. novo-ulmi* postoje dva restrikcijska mjesta zbog čega se elektroforetski restrikcijski obrazac sastoji od tri elektroforetske vrpce, dok kod podvrste *O. novo-ulmi subsp. americana* postoji jedno restrikcijsko mjesto zbog čega se elektroforetski restrikcijski obrazac sastoji od dvije elektroforetske vrpce. Suprotno od toga, u sekvenci umnoženog odsječka gena *coll* kod podvrste *O. novo-ulmi subsp. novo-ulmi* postoji jedno restrikcijsko mjesto zbog čega se elektroforetski restrikcijski obrazac sastoji od dvije elektroforetske vrpce, a kod podvrste *O. novo-ulmi subsp. americana* postoje dva restrikcijska mjesta zbog čega se elektroforetski restrikcijski obrazac sastoji od tri elektroforetske vrpce. Izolati za koje je usporedna RFLP analiza gena *cu* i *coll* ukazivala na različite podvrste, smatrani su hibridnim izolatima.



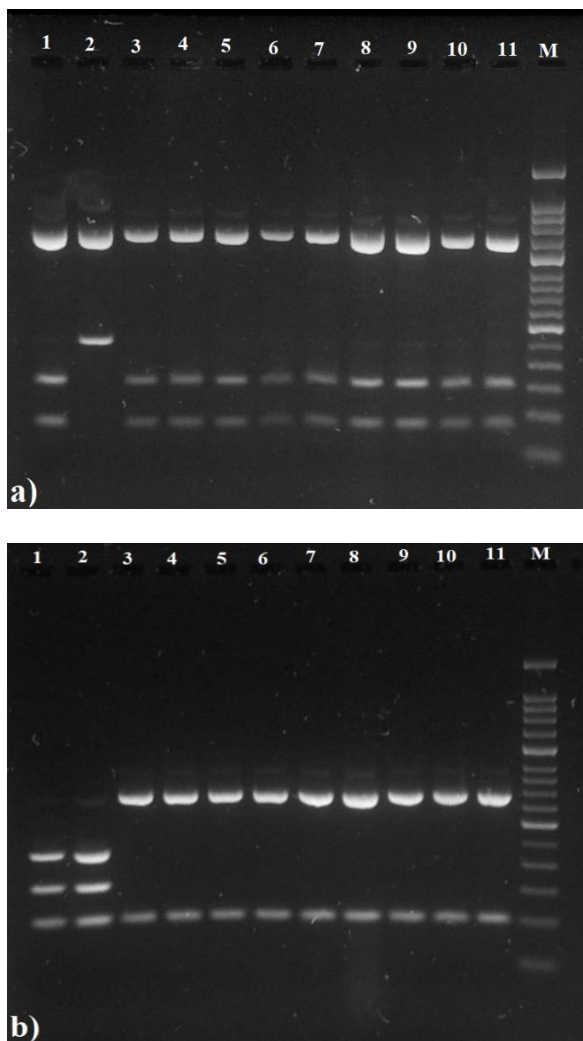
### 3. REZULTATI

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

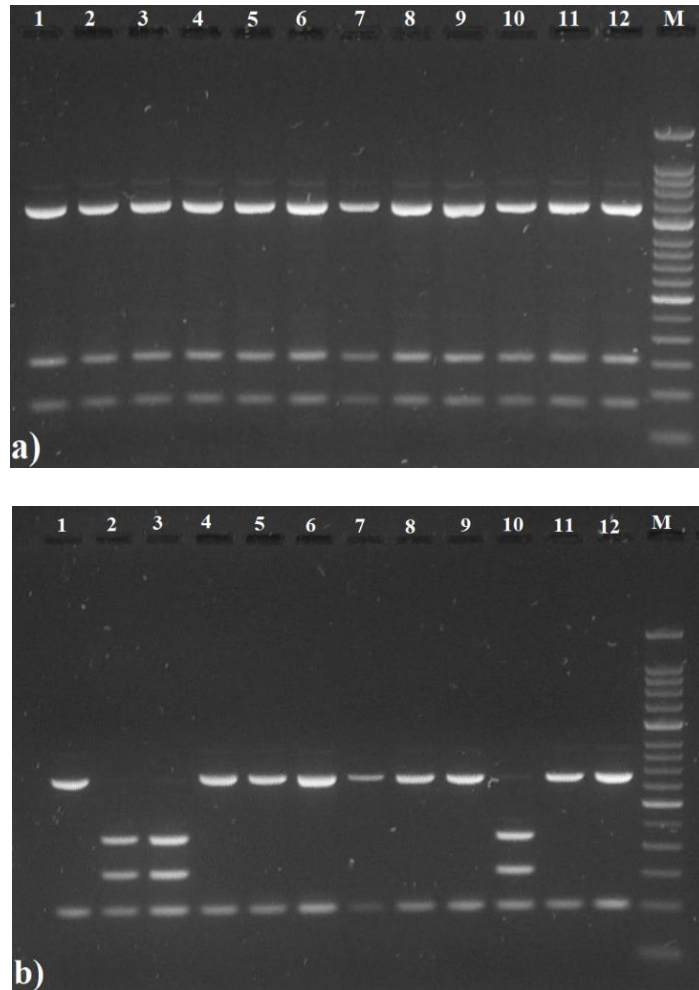
Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) pomoću para početnica *cu1* i *cu2* te para početnica *coll-F* i *coll-R* umnoženi su odsječci gena *cu* i *coll* očekivanje veličine za sve analizirane uzorke gljive *O. novo-ulmi* s područja Hrvatske koji su cijepani restriksijskim enzimima *HphI* i *BfaI* (*FspBI*). Dobiveni restriksijski elektroforetski obrasci (Slike 2, 3, 4) usporedo su analizirani, a rezultati RFLP analize prikazani su u Tablici 4. Restriksijski elektroforetski obrasci oba analizirana gena za 3 izolata s lokaliteta Nove Kapela, 9 izolata s lokaliteta Đurđevac i 9 izolata s lokaliteta Jastrebarsko odgovarali su podvrsti *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi*, dok su za 2 izolata s lokaliteta Nova Kapela i 1 izolat s lokaliteta Đurđevac odgovarali podvrsti *O. novo-ulmi ssp. americana*. Za ukupno 7 izolata RFLP analiza nije dala jednoznačni rezultat te su zbog toga smatrani hibridnim izolatima. Dva izolata s lokaliteta Nova Kapela imala su restriksijski elektroforetski obrazac gena *cu* koji je odgovarao podvrsti *O. novo-ulmi ssp. americana* i restriksijski elektroforetski obrazac gena *coll* koji je odgovarao podvrsti *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi*. Suprotno od toga, 1 izolat s lokaliteta Nova Kapela, 1 izolat s lokaliteta Đurđevac te 3 izolata s lokaliteta Jastrebarsko imali su restriksijski elektroforetski obrazac gena *cu* koji je odgovarao podvrsti *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* i restriksijski elektroforetski obrazac gena *coll* koji je odgovarao podvrsti *O. novo-ulmi ssp. americana*. Zastupljenost podvrsta gljive *O. novo-ulmi* i njihovih hibrida na istraženim lokalitetima na području Hrvatske utvrđena na temelju rezultata PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* prikazana je u Tablici 5.



Slika 2. Restriksijski elektroforetski obrazaci izolata *O. novo-ulmi* s lokaliteta Nova Kapela dobiveni cijepanjem umnoženog odsječka gena *cu* pomoću enzima *HphI* (a) i cijepanjem umnoženog odsječka gena *coll* pomoću enzima *BfaI* (*FspBI*) (b): 1 – NK8, 2 – NK11, 3 – NK14, 4 – NK18, 5 – NK21, 6 – NK22, 7 – NK23, 8 – NK24, M-50 bp (DNA Ladder).



Slika 3. Restriksijski elektroforetski obrazaci izolata *O. novo-ulmi* s lokaliteta Đurđevac dobiveni cijepanjem umnoženog odsječka gena *cu* pomoću enzima HphI (a) i cijepanjem umnoženog odsječka gena *coll* pomoću enzima BfaI (FspBI) (b): 1 – KP1, 2 – KP2, 3 – KP5, 4 – KP26, 5 – KP27, 6 – KP29, 7 – KP31, 8 – KP32, 9 – KP34, 10 – KP35, 11 – KP36, M – 50 bp DNA Ladder.



Slika 4. Restriksijski elektroforetski obrazaci izolata *O. novo-ulmi* s lokaliteta Jastrebarsko dobiveni cijepanjem umnoženog odsječka gena *cu* pomoću enzima *HphI* (a) i cijepanjem umnoženog odsječka gena *coll* pomoću enzima *BfaI* (*FspBI*) (b), 1 – J6, 2 – J8, 3 – J12, 4 – J16, 5 – J20, 6 – J21, 7 – J23, 8 – 26, 9 – J27, 10 – J29, 11 – J30, 12 – J34, M – 50 bp DNA Ladder.

Tablica 4. Rezultati PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll*.

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>
Đurđevac	KP1	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	KP2	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>
	KP5	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP26	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP27	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP29	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP31	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP32	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP34	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	KP35	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
Jastrebarsko	KP36	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>
	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>	

Tablica 5. Zastupljenost podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana* i njihovih hibrida na istraženim lokalitetima na području Hrvatske određena PCR-RFLP analizom gena *cu* i *coll*.

Lokalitet	Broj izolata podvrste <i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i>	Broj izolata podvrste <i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>americana</i>	Broj hibridnih izolata
Nova Kapela	3	2	3
Đurđevac	9	1	1
Jastrebarsko	9	/	3
Ukupno	21	3	7

## 4. RASPRAVA

U ovom istraživanju su primjenom molekularnih metoda karakterizirani izolati gljive *O. novo-ulmi* te je dokazana prisutnost obje podvrste, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, kao i njihovih hibrida na području Hrvatske.

U Hrvatskim šumama zabilježeno je veliko propadanje stabala nizinskog brijesta uzrokovano širenjem holandske bolesti (Spaić 1955, Glavaš 1999, Zebec 2010, 2014). Bolest je u Hrvatskoj prvi put zabilježena 1929. godine na području Slavonije za vrijeme prve pandemije koju je uzrokovala vrsta *O. ulmi* (Spaić 1955, Glavaš 1999, Brasier i Buck 2001). Vrsta *O. novo-ulmi* je 1980.-ih godina bila prisutna na području Hrvatske (Brasier i Kirk 2001), a danas se ova vrsta smatra jedinim uzročnikom bolesti u Hrvatskoj (Katanić 2014). Slično je zabilježeno i u drugim Europskim zemljama gdje je također vrsta *O. novo-ulmi*, koja je virulentniji patogen, potisnula i zamijenila manje virulentnu vrstu *O. ulmi* (Hoegger i sur. 1996, Kirisits i Konrad, 2004, Santini i sur. 2005, Dvořák i sur. 2007; Solla i sur. 2008, Tziros i sur. 2017). U radu Katanić (2014) utvrđena je velika učestalost holandske bolesti brijesta na lokalitetima Nova Kapela, Đurđevac i Jastrebarsko. Većina stabala nizinskog brijesta na ovim lokalitetima bila je zaražena, a kao uzročnik determinirana je vrsta *O. novo-ulmi*. Daljna karakterizacija izolata gljive *O. novo-ulmi* prikupljenih u istraživanju Katanić (2014) provedena je u ovom radu primjenom PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll*. U novije vrijeme nije bilo istraživanja holandske bolesti brijesta na području Hrvatske. Jedinu dostupni podaci o zastupljenosti podvrsta gljive *O. novo-ulmi* na području Hrvatske stari su gotovo 40 godina, a ukazuju na veća učestalost podvrste *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je to i dalje tako. U ovom istraživanju je dokazno da iako su obje podvrste prisutne u Hrvatskoj, podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* je znatno učestalija u odnosu na podvrstu *O. novo-ulmi* subsp. *americana*. U ovom istraživanju ukupno je analiziran 31 izolata, a prema rezultatima PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* je 21 izolat determiniran kao podvrsta subsp. *novo-ulmi*, dok su samo 3 izolata determinirana kao podvrsta subsp. *americana*. Podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* pronađena je na svim istraženim lokalitetima, dok podvrsta subsp. *americana* nije dokazana na lokalitetu Jastrebarsko.

Dvije podvrste gljive *O. novo-ulmi* imale su različit centar širenja na području Europe. Podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* širila se od istoka prema zapadu, a obrnuti smjer širenja, od zapada prema istoku, imala je podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *americana*. Kako su

se ove dvije vrste širile, tako su dolazile u međusobni kontakt. Danas se smatra da se areali dviju podvrsta u velikoj mjeri preklapaju i pretpostavlja se da bi na svim tim područjima moglo dolaziti do njihove hibridizacije. Prisutnost hibrida do sada je utvrđena u brojnim Europskim zemljama, kao što su Austrija (Konrad i sur. 2002), Italija (Santini i sur. 2005), Češka (Dvořák i sur. 2007), Španjolska (Solla i sur. 2008), Nizozemska (Brasier i Kirk 2010) i Grčka (Tziros i sur. 2017), gdje je zabilježena pojava obje podvrste. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je i područje Hrvatske potencijalna zona hibridizacije dviju podvrsta. Za 7 izolata elektroforetski restriksijski obrazac gena *cu* odgovarao je jednoj vrsti, a elektroforetski restriksijski obrazac gena *coll* odgovarao je drugoj vrsti te su ovi izolati smatrani hibridnim izolatima. Iako na temelju rezultata ovog istraživanja nije moguće utvrditi jesu li pronađeni hibridi nastali na istraženim lokalitetima, obzirom na prisutnost obje podvrste može se pretpostaviti da na području Hrvatske dolazi do hibridizacije podvrsta.

U istraženim populacijama gljive *O. novo-ulmi* na području Europe utvrđena je različita zastupljenost hibrida, od samo nekoliko izolata do značajnog udjela hibrida u populaciji od 70-80% (Brasier i Kirk 2010). Od ukupnog broja analiziranih uzoraka u ovom radu, 22,5% je bilo hibridnih izolata, što predstavlja značajan udio. Razlikovanje vrsta *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* relativno je jednostavno, a zbog snažne reproduktivne barijere rijetko dolazi do njihove hibridizacije u prirodi (Brasier 1981, Brasier i Buck 2001). Za razliku od toga, podvrste gljive *O. novo-ulmi* nije moguće pouzdano razlikovati na temelju morfologije, a slaba reproduktivna barijera i česta hibridizacija u prirodi znatno otežavaju determinaciju podvrsta (Brasier i Buck 2001). Obzirom na to, metodologija istraživanja može značajno utjecati na rezultat, a primjena molekularnih metoda pokazala se kao najpouzdaniji način determinacije podvrsta i identifikacije hibrida (Konrad i sur. 2002, Brasier i Kirk 2010). U ovom radu odabrana je primjena PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* koja se pokazala vrlo uspješnom u prethodnim istraživanjima (Konrad i sur. 2002, Dvořák i sur. 2007, Tziros i sur. 2017). U sekvenci gena *cu* i *coll* utvrđene su mutacije u restriksijskim mjestima koje prepoznaju restriksijski enzimi *HphI* i *BfaI*, što čini PCR-RFLP analizu ovih gena brzom i pouzdanom metodom determinacije podvrsta (Konrad i sur. 2002). Međutim, i ova metoda ima određena nedostatke jer se geni *cu* i *coll* nalaze na istom kromosomu, na kromosomu IV. Stoga, kada PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* ukazuje na različite podvrste, to je direktan dokaz postojanja rekombinacije, ali kada PCR-RFLP analize gena *cu* i *coll* ukazuje na istu podvrstu, to ne isključuje da do rekombinacije nije došlo na nekom drugom mjestu u genomu (Konrad i sur. 2002). Obzirom na to, postoji mogućnost da je broj hibridnih izolata na

području Hrvatske znatno veći od broja koji je utvrđen u ovom istraživanju. Pojedini znanstvenici pretpostavljaju da bi u budućnosti „čiste“ podvrste mogle u potpunosti nestati i biti zamijenjene hibridima s različitim udjelom DNA jedne i druge vrste u njihovom genomu (Brasier i Kirk 2010).

Holandska bolest brijesta već više od sto godina ima vrlo negativan utjecaj na populacije europskih i američkih vrsta brijesta i usprkos brojnim istraživanja epidemiologija bolesti i svojstva uzročnika još uvijek nisu dovoljno istraženi. Provedeno istraživanje predstavlja značajan doprinos razumijevanju populacijske strukture uzročnika holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj, koja bi mogla biti podložna brzim promjenama uslijed hibridizacije i nastajanja novih genotipova gljive *O. novo-ulmi*. Daljnja istraživanja trebalo bi usmjeriti prema razvoju novih, pouzdanijih metoda determinacije podvrsta i hibrida i njihove karakterizacije kako bi se mogla bolje razumjeti populacijska dinamika uzročnika holandske bolesti brijesta.



## 5. ZAKLJUČCI

- Na području Hrvatske prisutne su obje podvrste gljive *O. novo-ulmi*: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* ssp. *americana*.
- Učestalost zaraze nizinskog brijesta podvrstom *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* na lokalitetima Nova Kapela i Đurđevac značajno je veća u usporedbi s podvrstom *O. novo-ulmi* ssp. *americana*; prisutnost podvrste *O. novo-ulmi* ssp. *americana* nije utvrđena na lokalitetu Jastrebarsko.
- Obzirom na prisutnost obje podvrste gljive *O. novo-ulmi*, područje Hrvatske predstavlja potencijalnu zonu hibridizacije podvrsta, a hibridni izolati prisutni su na sva tri istražena lokaliteta.

## 6. LITERATURA

- 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., Kirk, S.A. (2001) Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105: 547-55.
- 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., Mehrotra, M.D. (1995) *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycological Research* 99: 205-215.
- Dvořák, M., Tomšovský, M., Jankovský, L., Novotný, D. (2007) Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 43: 142-145.
- Ghelardini, L., Santini, A. (2009) Avoidance by early flushing: a new perspective on Dutch elm disease research. *Biogeosciences and Forestry* 2: 143-153.
- Glavaš, M. (1999) Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- 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. *European Journal of Forest Pathology* 26: 57-68.
- Idžojtić, M. (2009). *Dendrologija-List*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Idžojtić, M. (2013). *Dendrologija-Cvijet, češer, plod, sjeme*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

- Katanić, Z. (2014) Identifikacija i molekularna karakterizacija fitoplazme brijesta ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ u Hrvatskoj. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti.
- Kirisits, T. (2013) Dutch elm disease and other *Ophiostoma* diseases U: Gonthier, P., Nicolotti, G. (ur.) Infectious forest diseases, CAB International, UK, str. 256-282.
- Kirisits, T., Konrad H (2004) Dutch elm disease in Austria. *Forest Systems* 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 90.
- 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-ulm*. *Mycological Research* 101: 415–421
- Santini, A., Montaghi, A., Vendramin, G.G., Capretti, P. (2005) Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. *Journal of Phytopathology* 153:73–79
- 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.
- Spaić, I. (1955) Problematika zaštite šuma u NR Hrvatskoj. *Šumarski list* 11-12: 440-46
- Stipes, R.J., Campana, R.J. (1981) Compendium of elm diseases. American Phytopathological Society
- Šilić, Č. (1973) Atlas drveća i grmlja. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo
- Škorić, V. (1943) Holandska bolest briestova. *Šumarski list* 67, 65–73.

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 Pathol 47: n/a, e12323.

Webber, J.F. (2004) Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 13: 197-205.

Zebec, M., Idžojtić, M., Poljak, I. (2014) Morphological variability of the field elm (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo) in continental Croatia. Šumarski list 138, 563–572.

Zebec, M., Idžojtić, M., Poljak, I., Mihaldinec, I. (2010) Varijabilnost nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo) na području Hrvatske podravine prema morfološkim svojstvima listova. Šumarski list 134: 569-579

Zebec, M., Idžojtić, M., Poljak, I., Modrić, I. (2015.) Population variability of wych elm (*Ulmus glabra* Huds.) in the mountainous region of Croatia according to the leaf morphology. Šumarski list 139, 429–439.