Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Simpozij zaštita šuma-stabilnost šumskih ekosistema: Dan šuma

Beus, Vladimir; urednik

2024-09

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/794

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

DOI: 10.5644/PI2024.211.23
Originalni naučni članak

Molekularne analize prisustva vrsta *Ophiostoma* na brijestu u Bosni i Hercegovini

Tarik Treštić
Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu
E-mail: t.trestic@sfsa.unsa.ba

Aldin Vranić
Grad Essen, Grün und Gruga

Kenan Zahirović
JP Šumsko privredno društvo Ze-do kantona d. o. o., Zavidovići

Apstrakt: U okviru istraživanja analizirano je prisustvo uzročnika holandske bolesti brijesta (*Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi ssp. novo-ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi ssp. americana* te njihovih hibrida) molekularnim analizama u Bosni i Hercegovini. Molekularnim analizama je utvrđeno da je ukupno četiri od sedam izolata dobijenih s brijesta pripadalo gljivama iz roda *Ophistoma* sp. Utvrđeno je da je područje Bosne i Hercegovine "zona hibridnosti", te su svi analizirani izolati bili hibridi između podvrsta *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *americana*. Ovo je prvo istraživanje ovoga tipa na području Bosne i Hercegovine.

Ključne riječi: *Ulmus* sp., *Ophiostoma* sp., PCR, hibridizacija

Uvod

Holandska bolest brijesta jedna je od ekonomski najštetnijih bolesti šumskog drveća na svijetu. Uzrokuju je gljive askomicete iz roda *Ophiostoma*. Bolest je otkrivena 1918. godine u zapadnoj Evropi, ali pošto prva istraživanja potiču iz Nizozemske, gdje je gljiva otkrivena 1919. godine, dobila je ime koje je općeprihvaćeno. U evropskim uslovima, vektori prenošenja ove bolesti na velike razdaljine su brijestovi potkornjaci iz roda *Scolytus*, dok u Sjevernoj Americi bolest primarno prenosi *Hylurgopinus rufipes*. Širenje bolesti može se ostvariti i žilnim kontaktom, ukoliko se zaraženo nalazi u blizini zdravog stabla.

Historijski gledano, dogodile su se dvije pandemije holandske bolesti brijesta: prva, koju je uzrokovala vrsta *O. ulmi*, i tekuća pandemija ove bolesti, koju uzrokuje *O. novo-ulmi* (podvrsta *novo-ulmi* i podvrsta *americana*) (Brasier, 1979). Treća vrsta *O. himal-ulmi* predstavlja endemsku vrstu

zapadnog dijela Himalaja gdje se smatra endofitom na autohtonim brijestovima (Brasier i Mehrotra, 1995).

Prva pandemija holandske bolesti brijesta uzrokovana s *O. ulmi* započela je u sjeverozapadnoj Evropi oko 1910. Nakon toga, bolest se brzo proširila na istok Evrope i jugozapadne Azije. U početku, širenje *O. ulmi* rezutiralo je intenzivnom epidemijom u Evropi. Tokom 1940-ih godina prva pandemija bolesti je naglo prestala nakon gubitka 10–40% stabala brijesta u većini evropskih zemalja (Peace, 1960, prema Brasier i Buck, 2001).

Drugu pandemiju holandske bolesti brijesta uzrokovala je *O. novo-ulmi* (podvrsta *novo-ulmi i* podvrsta *americana*). Pandemija je počela 1940-ih godina s dva različita lokaliteta: moldavsko-ukrajinski region na istoku Evrope (podvrsta *novo-ulmi*) i južni dio Velikih jezera u Sjevernoj Americi (podvrsta *americana*) (Brasier, 1990; 1996). Podvrsta *novo-ulmi* migrirala je zapadno širom Evrope, dopirući do Nizozemske sredinom 1970-ih i istočno do jugozapadne Azije. Podvrsta *americana* proširila se širom Sjeverne Amerike dopirući do istočne i zapadne obale do 1970-ih i 1980-ih godina. Introdukcija podvrste *americana* iz Kanade u Veliku Britaniju ostvarila se uvozom zaraženih trupaca brijesta tokom 1960-ih godina. Brzo se proširila Nizozemskom, Francuskom, Španijom i mnogim drugim zemljama zapadne Evrope (Brassier i Buck, 2001). Pandemije ove bolesti značajno su uticale na smanjenje populacije, pa skoro i nestanak brijesta u šumama širom svijeta.

Širenjem patogena preklopili su se geografski areali rasprostranjenja vrsta, odnosno podvrsta, što je imalo za posljedicu nastanak zona pojave hibrida podvrsta (Tabela 1). Interakcija između *O. ulmi* na njenom području rasprostranjenja i *O. novo-ulmi* koja je introdukovana na njena područja, uzrokovala je rapidno slabljenje i nestanak *O. ulmi* na velikom dijelu njenog areala i zamjene s *O. novo-ulmi* (Brasier, 1986a; 2000; Brasier i Buck, 2001).

Kako se, za razliku od *O. ulmi* i *O. novo-ulmi*, podvrste *O. novo-ulmi* slobodno hibridiziraju u prirodi, bilo je očekujuće da će doći do pojave njihovih hibrida. Preliminarne studije na dvije lokacije – Limburg u Nizozemskoj i Orvieto u Italiji – to su i potvrdile, jer su njihovi hibridi zamijenili prvobitno prisutne "čiste" podvrste. U budućnosti, postoji velika vjerovatnoća da će se ovi hibridi međusobno križati s drugim hibridima, koji će se dalje križati s preživjelim primjercima "čistih" podvrsta (Brasier i Buck, 2001).

Tabela 1. Distribucija podvrsta *O. novo-ulmi* u Evropi u 1990. godini
Table 1. Distribution of subspecies of O. novo-ulmi *in Europe in 1990*

Podvrsta / *subspecies*	Država / *Country*
O. novo-ulmi ssp. *americana*	Portugal, Španija, Francuska, zapadna Njemačka, Nizozemska, Danska
O. novo-ulmi ssp. *novo-ulmi*	Rusija, Turska, Grčka, Rumunija, Bugarska, Srbija, Mađarska, Poljska, Slovačka
Zona preklapanja areala i potencijalno zona hibridnosti	Italija, Njemačka, Nizozemska, Irska, Norveška, Švedska, Slovenija, Austrija

Vrste *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* međusobno se razlikuju po izgledu kolonija koje rastu na vještačkoj podlozi, brzini rasta micelije i njenoj optimalnoj temperaturi, dužini vrata peritecija, patogenosti, proizvodnji toksina ceratoulmina, izgledu DNA u mitohondrijama i nukleusu, fertilnoj/genetičkoj barijeri i drugim karakteristikama. Kako vrste, tako i podvrste se međusobno razlikuju po nekim od karakteristika kao što su: dimenzije peritecija, oblik kolonija, brzina rasta micelije i patogenosti (Brasier, 1991; Brasier i Kirk, 2010). U prosjeku, podvrsta *novo-ulmi* je veće patogenosti od podvrste *americana*, ali obje podvrste su veoma agresivni patogeni evropskih i sjevernoameričkih brijestova (Brasier, 1991). Ipak, za diferencijaciju među različitim uzročnicima holandske bolesti brijesta prema navedenim kriterijima potrebno je izdvojiti mnogo vremena.

Zahvaljujući napretku tehnika molekularne biologije, razvijen je veliki broj DNK markera za detekciju genskih polimorfizama koji omogućavaju determinaciju vrsta i/ili sojeva (Hintz et al., 1989). Razvoj PCR pristupa kasnih 1980-ih godina potaknulo je analiziranje populacione strukture patogena holandske bolesti brijesta. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) predstavlja jednu od tehnika na bazi PCR koja je korištena za utvrđivanje patotipova *O. ulmi* i podvrsta *O. novo-ulmi*. Ova tehnika je korištena kako bi se dokazalo prisustvo *O. ulmi* i dvije podvrste *O. novo-ulmi* u Švicarskoj (Hoegger et al., 1996).

Prema istraživanjima Brasier i Buck (2001) vidljivo je da područje gdje dolazi do preklapanja areala podvrsta, odnosno potencijalno područje pojave hibrida podvrsta, zahvata i Bosnu i Hercegovinu. Istraživanja koja se tiču uzročnika holandske bolesti brijesta u prošlosti nisu provođena na području Bosne i Hercegovine. Upravo nedostatak bilo kakvih informacija o uzročnicima holandske bolesti brijesta, kao i činjenica da Bosna i Hercegovina predstavlja područje na kojem je moguća pojava *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* x

ssp. *americana* hibrida bili su glavni motivi ovog istraživanja. Stoga, cilj istraživanja bio je molekularnom analizom prikupljenih uzoraka na dijelu Bosne i Hercegovine (centralna Bosna) utvrditi populacionu strukturu *Ophiostoma novo-ulmi*, što predstavlja prvo istraživanje takve vrste na području Bosne i Hercegovine.

Materijal i metode istraživanja

Materijal sa stabala brijesta, potreban za istraživanje, prikupljen je u dva navrata na području centralne Bosne. Uzorci su prikupljeni sa stabala koja su pokazivala znake umanjene vitalnosti i simptome koji podsjećaju na holandsku bolest brijesta (stabla u procesu sušenja ili sušenje pojedinih grana na vitalnim stablima). Stabla su imala prsne prečnike 12–21 cm. Uzorci su isijecani u zoni prelaza bolesnog u zdravo biljno tkivo i sadržavali su koru i dio debla.

Prvi uzorci prikupljeni su na lokalitetu Zvijezda, u okolini Vareša 11. 5. 2016. godine, a drugi na obroncima Vranice, u blizini Busovače 20. 7. 2016. godine. Na lokalitetu u okolini Vareša, biljni materijal potreban za istraživanje prikupljen je s pet simptomatičnih stabala u odjeljenjima 21, 22 i 26, koji pripadaju GJ "Gornja Misoča" i GJ "Gornja Stavnja", ŠGP "Gornjebosansko". Na drugom lokalitetu u blizini Busovače, objekti istraživanja bila su odjeljenja 169 i 170 koji pripadaju GJ "Busovača", ŠGP "Lašvansko". Prikupljeno je devet uzoraka sa simptomatičnih stabala. Osnovne karakteristike odjela prikazane su u tabeli 2.

Tabela 2. Osnovne karakteristike lokaliteta istraživanja
Table 2. The main characteristics of research sites

Odjeljenje / *Department*	Gospodarska jedinica / *Management unit*	Lokaliteti / *Sites*	Nadmorska visina / *Altitude* (m)	Ekspozicija / *Exposure*	Površina / *Area* (ha)
21	"Gornja Misoča"	Zvijezda	1120–1320	J–I / *S–E*	71,51
22	"Gornja Misoča"	Zvijezda	1100–1320	J–I, I / *S–E, E*	71,73
26	"Gornja Stavnja"	Zvijezda	900–1060	J, J–I, Z / *S, S–E, W*	41,20
169	"Busovača"	Busovača	500–700	S / *N*	41,50
170	"Busovača"	Busovača	500–700	S / *N*	85,50

Izolacija patogena vršena je na MEA (*malt extract agar*) hranjivoj podlozi koja je pripremljena po standardnoj recepturi proizvođača. Isijecani su komadići biljnog materijala na prelazu bolesnog u zdravo tkivo, pažljivo sterilisani

u alkoholu i na plamenu, a potom stavljeni na MEA podlogu. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (20–22°C) i pojave micelija vršeno je presijavanje u novu Petrijevu podlogu te su tako dobijene čiste kulture patogena.

Identifikacija kultura uzgojenih na sobnoj temperaturi vršena je na bazi prosječne brzine rasta i izgleda kolonija na MEA podlozi. Kulture su inkubirane sedam dana u tami, a potom 10 dana na difuznom svjetlu. Morfološki izgled kultura poređen je s dostupnim literaturnim podacima (Liberato et al., 2006).

Za ekstrakciju DNK iz micelija s hranjive podloge korišten je protokol Tel-Zur et al. (1999). Za amplifikaciju ciljanog segmenta DNK korištene su tubice s pripremljenim reagensima, proizvod ReadyToGo PCR beads firme Amersham, Bioscience.

Reagensi su pripremljeni u formi bijele kuglice u količinama koje obezbjeđuju da se u tubicama dopunjenim do 25 µl nalazi:

– 1,5 jedinica Taq DNK polimeraze,
– 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 pri temperaturi ambijenta),
– 50 mM KCl,
– 1,5 mM $MgCl_2$,
– 200 µM dNTP i
– 200 µM stabilizatora.

Najčešće korištene količine prajmera, vode i ekstrakta DNK u mikrotubicama za PCR za *Ophiostoma* spp. su:

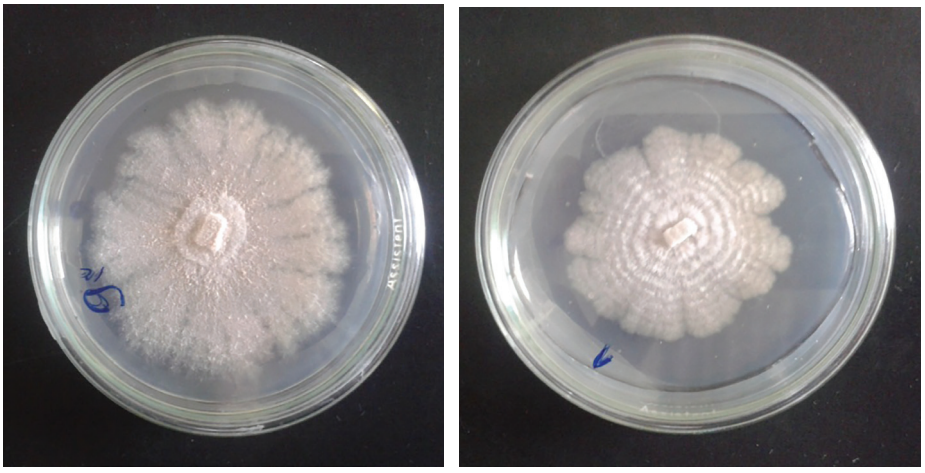
– 1 µl prajmer 1 /OPA2 (TGCCGAGCTG); OPA4 (AATCGGGCTG); OPA8 (GTGACGTAGG); OPB17 (AGGGAACGAG); OPK16 (GAGCGTCGAA); OPK19 (CACAGGCGGA); OPK20 (GTGTCGCGAG) za ITS region/,
– 8 µl ekstrakta DNK i
– 16 µl destilovane vode.

Za postupak amplifikacije korišten je termociklusar Eppendorf Mastercycler Personal. Program amplifikacije ITS regiona vrsta *Ophiostoma* spp. sastojao se od sljedećih ciklusa: 1 ciklus u trajanju 04′00″ pri temperaturi 94°C (denaturacija); 2 ciklusa od kojih se svaki sastojao od tri potciklusa: 0′30″ pri 94°C (denaturacija), potom 1′00″ pri 37°C (hibridizacija) i 2′00″ pri 72°C (elongacija), zatim 40 ciklusa, od kojih se svaki sastojao od tri potciklusa: 0′30″ pri 94°C (denaturacija), potom 1′00″ pri 37°C (hibridizacija) i 2′00″ pri 72°C (elongacija) i, najzad, završnog ciklusa u trajanju 8′00″ pri temperaturi 72°C (elongacija).

Provjera uspješnosti amplifikacije vršena je elektroforetskim razdvajanjem molekula DNK na agaroznom gelu koncentracije 1,5% u koji je dodano 0,4 µg/ml etidij-bromida (Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, Amersham Biosciences). Provjera uspješnosti amplifikacije molekula DNK izvršena je na agaroznom gelu pomoću uređaja za elektroforezu koji se sastoji od jedinice za napajanje električnom energijom (Consort E865) i jedinice za horizontalnu elektroforezu (Roth, Horizontal Electrophoresis Unit N562.1) pri naponu od 80 V u trajanju od 1 h i 30 min. Za utvrđivanje udaljenosti odsječaka na gelu korišteni su markeri 100 bp (Carl Roth GmbH) i marker 1kb (New England Biolabs).

Rezultati istraživanja

Poslije izolacije iz prikupljenih uzoraka, dobijeno je ukupno 7 izolata. Izvršena je identifikacija izolata uzgojenih na sobnoj temperaturi na bazi opisa kolonija (Slika 1. i 2). Na osnovu opisa kolonija dobijena su dva različita tipa kolonija. Prvi dobijeni tip kolonija ustanovljen je kod 2 izolata (91 i 92) i karakterističan je za *Ophiostoma novo-ulmi* vrstu, podvrstu *novo-ulmi* (Slika 1). Drugi tip kolonija koji je dobijen kod preostalih izolata (6, 7, 11, 12 i 14) nije karakterističan ni za *O. ulmi* ni za *O. novo-ulmi* i moguće je da se radi o hibridima (Slika 2).



Slika 1. i 2. Kultura *Ophiostoma novo-ulmi s* lokaliteta kod Busovače (lijevo); kultura potencijalnog hibrida *Ophiostoma novo-ulmi* (desno)

Figure 1. and 2. Culture of Ophiostoma novo-ulmi *from the location near Busovača (left); Culture of potential hybrid of* Ophiostoma novo-ulmi *(right)*

Izmjerena je brzina rasta kultura izolata 91 koji ima koloniju karakterističnu za podvrstu *novo-ulmi*. Brzina rasta izolata dobijena je na osnovu premjerenih prečnika pomoću formule:

$$(D2–D1)/2*(T2–T1), \text{ gdje je;}$$

D1 – zbir prečnika kulture drugog dana nakon zasijavanja,
D2 – zbir prečnika kulture sedmog dana nakon zasijavanja,
T1 – vrijeme prvog mjerenja, 2. dan i
T2 – vrijeme drugog mjerenja, 7. dan.

Na osnovu navedene formule izračunata je prosječna brzina rasta kulture koja iznosi 4 mm/dan.

U tabeli 3. su prikazani rezultati RAPD analize izolata.

Tabela 3. RAPD analiza izolata
Table 3. RAPD analysis of isolates

Lokalitet / *Site*	Izolat / *Isolate*	Vrsta prajmera i dužina odsječka (bp) / *Primer and fragment size (bp)*										*Ophiostoma* spp.
		OPA2	OPA4	OPA8	OPK19	OPK20	OPB17	OPK16	OPK16	OPK16	OPK16	
		1000	1900	800	1400	1750	1750	550	410	840	930	
Zvijezda	6	x	x	x	x	x	x	○	○	○	x	Nije / *Negative*
Zvijezda	7	○	●	○	●	●	○	●	●	○	○	*O. novo-ulmi* H
Zvijezda	11	x	x	x	x	x	x	○	○	○	x	Nije / *Negative*
Zvijezda	12	x	x	x	x	x	x	○	○	○	x	Nije / *Negative*
Zvijezda	14	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	*O. novo-ulmi* H
Busovača	91	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	*O. novo-ulmi* H
Busovača	92	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○	*O. novo-ulmi* H

x – nije testirano / *not tested*
○ – nema odsječka / *no band*
● – ima odsječak / *have band*
H – hibrid / *hybrid*

Diskusija

Ovo je prvo istraživanje *Ophiostoma* sp. vrsta na brijestu u Bosni i Hercegovini, čime je potvrđeno prisustvo hibrida između dvije podvrste *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *americana*. Naime, za četiri od ukupno sedam analiziranih uzoraka potvrđeno je da se radi o navedenim hibridima, dok tri izolata nisu pripadala vrstama iz roda *Ophiostoma*.

Za izolate 6, 11 i 12 molekularnim analizama je utvrđeno da ne pripadaju vrstama i podvrstama roda *Ophiostoma*, jer prilikom testiranja prajmerom OPK16 nisu sadržavali karakteristične odsječke za *Ophiostoma* vrste (550, 410 i 840 bp) (43% uzoraka), dok je za 4 uzorka (57% uzoraka) utvrđeno da se radi o *Ophiostoma* vrstama.

Izolat 7 ima karakteristične odsječke s prajmerima OPA4 (1900 bp), OPK19 (1400 bp), OPK20 (1750 bp), OPK16 (550 bp), koji odgovaraju odsječcima koje su dobili Brasier i Kirk (2010), te odsječak s prajmerom OPK16 (410 bp) koji odgovara rezultatima istraživanja koje je dobio Solla i drugi (2008). Utvrđeno je da je izolat *O. novo-ulmi* hibrid, jer po položaju odsječaka koje su dobili Brasier i Kirk (2010) ponajbliže odgovora izolatu H723.

Izolat 14 ima karakteristične odsječke s prajmerima OPK19 (1400 bp), OPK16 (550 bp), koji odgovaraju odsječcima koje su dobili Brasier i Kirk (2010) i za koje je utvrđeno da je *O. novo-ulmi* hibrid. Po položaju odsječaka koje su dobili Brasier i Kirk (2010) ponajbliže odgovora izolatu H765.

Izolat 91 ima karakteristične odsječke s prajmerima OPK20 (1750 bp), OPK17 (1750 bp), koji odgovaraju odsječcima koje su dobili Brasier i Kirk (2010), a koji odgovara izolatu H729, za koji je utvrđeno da je *O. novo-ulmi* hibrid.

Izolat 92 ima karakteristične odsječke s prajmerima OPA4 (1900 bp), OPK17 (1750 bp), koji odgovaraju odsječcima koje su dobili Brasier i Kirk (2010), a koji odgovara izolatu H747 za koji je utvrđeno da je *O. novo-ulmi* hibrid (Tabela 2).

Iako kod nekih uzoraka nisu uočeni neki odsječci koji su uočeni kod rezultata koje su proveli Brasier i Kirk (2010), ovi uzorci su hibridi, jer su i njihovi uzorci bili kombinacija pozitivnih i negativnih očitanja. Jedan od argumenata na osnovu kojeg možemo tvrditi da se radi o hibridima je i fenotipski izgled kultura na hranjivoj podlozi, koje odgovaraju izgledu kultura za hibride koje su ustanovili ranije navedeni autori.

Potvrda da se radi o hibridu (Slika 2) je i istraživanje koje su objavili Kirisits i Konrad (2004), gdje je izolat L/16 imao iste morfološke karakteristike kao i izolati koji su okarakterisani kao potencijalni hibridi. U kontrolisanim laboratorijskim uslovima ovaj izolat je karakterističan po koncentričnom načinu rasta, izraženom zonacijom i obilnom proizvodnjom micelija. Prema Kirisits i Konrad (2004) ovo ukazuje na mogućnost da su ovakve kulture hibridi između *O. ulmi* i *O. novo-ulmi*. Kako bismo dodatno potvrdili da je riječ o navedenoj podvrsti, izmjerena je brzina rasta kultura izolata 91 koji ima koloniju karakterističnu za podvrstu *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*. Brzina

rasta izolata izmjerena je po metodi koja je prethodno opisana (Brasier, 1981). Utvrđena brzina rasta kulture odgovara intervalu brzine rasta za datu podvrstu koji je naveden u literaturi (Brasier 1981; 1986b).

Prema Brasier i Kirk (2001), u Nizozemskoj je 1980. godine prikupljen 171 uzorak sa stabala zaraženim gljivama roda *Ophiostoma*. Molekularnim analizama je utvrđeno da 16 izolata (9%) pripada vrsti *O. ulmi*, 14 izolata nije se moglo izdiferencirati, dok je 139 izolata pripadalo vrsti i podvrsti *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* je utvrđena na 14 izolata. Međutim, dva izolata su imali dimorfizam vrste *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, a tip plodonošenja od vrste *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. Utvrđeno je da su to prvi nalazi hibrida između ove dvije podvrste.

RAPD analizom je utvrđeno da je na istim uzorcima 70–80% izolata sadržavalo DNK od obje vrste, što nas dovodi do zaključka da se radilo o hibridima (Brasier i Kirk, 2010). Prema istom modelu provedena su istraživanja i na području Bosne i Hercegovine. Potvrda hibridizacije ovih dviju podvrsta u prirodi u Evropi su i istraživanja brojnih autora: Brasier i Buck (2001), Konrad et al. (2002), Brasier et al. (2004) Kirisits i Konrad (2004); Dvořák et al. (2007), Solla et al. (2008), te Brasier i Kirk (2010). Posmatrajući takva istraživanja može se utvrditi da je upravo područje Bosne i Hercegovine "zona hibridnosti". Isti autori navode da hibridi sadrže fenotipske karakteristike obje podvrste, koji su istog stepena agresivnosti prema brijestu i polako zamjenjuju "čiste" podvrste ovog patogena.

Zaključci

Na osnovu provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Istraživanjem je obuhvaćeno 7 stabala brijesta na 3 lokaliteta, na kojima je utvrđivano prisustvo *Ophiostoma* vrsta.
- 57% stabala u uzorku je bilo zaraženo *Ophiostoma* vrstama.
- Kod četiri analizirana uzorka potvrđeni su hibridi između dvije podvrste *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *Americana*, čime je utvrđeno da područje Bosne i Hercegovine pripada "zoni hibridnosti".
- Potrebna su obuhvatnija istraživanja u narednom periodu kako bi se ustanovio areal ovog patogena na širem području Bosne i Hercegovine.

Literatura

Brasier, C. M. (1979): Dual origin of recent Dutch elm disease outbreaks in Europe, Nature, 281, 78-79.

Brasier, C. M. (1981): Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*, u: Stipes, R. J., Campana, R. J. (ur.) Compendium of Elm Diseases, St. Paul, USA, APS Press, 76-79.

Brasier, C. M. (1986a): The population biology of Dutch elm disease: its principal features and some implications for other host-pathogen systems, u: Ingram, D. S., Williams, P. H. (ur.) Advances in Plant Pathology, Academic Press 5, London, New York, 55-118.

Brasier, C. M. (1986b): Comparison of pathogenicity and cultural characteristics in the EAN and NAN aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*, Transactions of the British Mycological Society, 87 (1), 1-13.

Brasier, C. M., Webber, J. F. (1987): Positive correlations between *in vitro* growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*, Plant Pathol., 36, 462-466.

Brasier, C. M. (1990): China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal, Plant Pathology, 39, 5-16.

Brasier, C. M. (1991): *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of the current Dutch elm disease pandemics, Mycopathologia, 115, 151-161.

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. doi: 10.1016/S0 953-7562(09)80887-3.

Brasier, C. M. (1996): New horizons in Dutch elm disease control, u: Report on Forest Research, Her Majesty's Stationery Office, London, 20-28.

Brasier, C. M. (2000): Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens, u: Dunne, C. P. (ur.) The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA, 61-72.

Brasier, C. M., Buck, K. W. (2001): Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Duch elm disease), Biological inovations, 3, 223-233.

Brasier, C. M., Buck, K. W., Paoletti, M., Crawford, L., Kirk, S. A. (2004): Molecular analysis of evolutionary changes in populations of *Ophiostma novo-ulmi*, Invest Agrar: Sist Recur For, 13 (1), 93-103.

Brasier, C. M., Kirk, S. A. (2010): Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with high level of pathogenic fitness, Plant Pathology, 59, 186-199.

Dvoŕák, M., Tomšovský, M., Jankovský, L., Novontný, D. (2007): Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic, Plant Protect. Sci., 43, 142-145.

Hintz, W. E., Anderson, J. B., Horgen, P. A. (1989): Relatedness of three species of *Agaricus* inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA, Genome, 32, 173-178.

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. doi:10.1111/j.1439-0329.1996.tb00710.x.

Kirisits, T., Konrad, H. (2004): Dutch elm disease in Austria, Forest Systems, 13 (1), 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.

Liberato, J. R., Scott C. R., Dick, M. A., Inglis, C. (2006): Dutch elm disease (*Ophiostoma*), PaDIL, Updated on 7/19/2016. http://www.padil.gov.au.

Peace, T. (1960): The status and development of elm disease in Britain, Forestry Commission Bulletin, 33, 1-44.

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.

Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D., Mizrahi, Y. (1999): Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (*Cactaceae*), Plant Molecular Biology Reporter, 17, 249-254.

Posebna izdanja ANUBiH CCXI, OPMN 29, 391-402

Molecular analysis of the presence of species *Ophiostoma* on the elm in Bosnia and Herzegovina

Summary: Within this study, the presence of pathogens of Dutch elm disease (*Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, and their hybrids) was analysed molecularly in Bosnia and Herzegovina. Molecular analyses showed that a total of 4 of the 7 isolates from Elm belonged to fungi of the genus *Ophistoma* sp. It was found that the area of Bosnia and Herzegovina is a "zone of hybridity," and all four of the analysed isolates were hybrids between subspecies *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. This is the first study of this pathogen in Bosnia and Herzegovina.