

Eutypella parasitica R.W. Davidson & R.C. Lorenz SEDAM GODINA NAKON PRVOG NALAZA U HRVATSKOJ

Eutypella parasitica R.W. Davidson & R.C. Lorenz SEVEN YEARS AFTER THE FIRST FINDINGS IN CROATIA

Sanja NOVAK AGBABA¹, Nevenka ČELEPIROVIĆ¹, Monika KARIJA VLAHOVIĆ³, Boris LOVIĆ¹

Sažetak

Gljiva *Eutypella parasitica* uzročnik je bolesti raka kore javora. Ta bolest umanjuje ekonomsku i estetsku vrijednost javora. Na zaraženim dijelovima stabala dolazi do truljenja drva, što oslabljuje statiku stabla i predstavlja opasnost od loma.

U Europi je bolest raka kore javora prvi puta registrirana u Sloveniji 2005. godine. Od 2005. do 2008. godine bila je na EPPO Alert listi zbog opasnosti od širenja zaraze.

U Hrvatskoj je bolest rak kore javora registrirana prvi puta 2007. godine na *A. campestre* u blizini granice sa Slovenijom. Od 2011. godine u Hrvatskoj se provodi program Poseban nadzor gljive *E. parasitica*.

Cilj ovoga rada je utvrditi stanje zaraze rakom kore javora sedam godina nakon prvog nalaza, rasprostranjenost bolesti i intenzitet zaraze u Hrvatskoj. Drugi cilj je potvrditi vrstu gljive fitopatološkom i molekularnom analizom te pohraniti njihove DNA sekvence ITS2 regije u GenBank (NCBI).

U razdoblju od 2011. do 2014. godine pregledane su šumske sastojine u kojima su zastupljena stabla javora na području 8 županija i 17 lokaliteta. Od ukupno pregledanih 2209 stabala, svega 2 stabla (*A. pseudoplatanus* i *A. campestre*) u blizini mjesta Hum na Sutli uz slovensku granicu bila su zaražena rakom kore, što iznosi 0,09 % zaraženih stabala. Zaraza rakom kore javora je vrlo malog intenziteta i bolest se nije proširila na druge lokalitete. Na uzorcima rakastih tvorevina laboratorijskim analizama, fitopatološkom analizom i DNA analizom dijagnostičkim početnicama, potvrđena je prisutnost gljive *E. parasitica*. Fragmneti DNA su sekvencirani te je napravljena usporedba u genskoj bazi podataka (GenBank, NCBI) gdje je potvrđeno da se radi o 100 % istovjetnosti s *E. parasitica*. ITS2 regija gljive *E. parasitica* utvrđena na gorskom javoru i na klenu, sekvencirana je i pohranjena u gensku banku (GenBank, NCBI) pod pristupnim brojevima KP868619 i KP868620.

E. parasitica je prvi puta utvrđena u Hrvatskoj na klenu (*A. campestre*) 2007. Godine 2013. prvi puta je utvrđena u Hrvatskoj na gorskom javoru (*A. pseudoplatanus*), a 2014. godine potvrđena je na klenu (*A. campestre*). Vrsta gljive *E. parasitica* potvrđena je fitopatološkom i molekularnom DNA detekcijom. Zaraza rakom kore javora nije se proširila zadnjih sedam godina u Hrvatskoj.

KLJUČNE RIJEČI: *Eutypella parasitica*, rak kore javora, *Acer pseudoplatanus*, *Acer campestre*, molekularna dijagnostika, ITS2 regije

¹ Dr. sc. Sanja Novak (sanjan@sumins.hr), Dr. sc. Nevenka Čelepirović (nevenkac@sumins.hr), Mr. sc. Boris Lović (borisl@sumins.hr), Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska

² Dr. sc. Monika Karija Vlahović (monika.karija.vlahovic@mef.hr), DNA laboratorij Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

UVOD INTRODUCTION

Gljiva *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz uzročnik je bolesti rak kore javora. Rak kore javora porijeklom je iz Sjeverne Amerike, gdje dolazi na različitim vrstama javora *Acer saccharum*, *A. rubrum*, *A. saccharum* subsp. *nigrum*, *A. pensilvanicum*, *A. negundo*, *A. platanoides*, *A. pseudoplatanus*, (European Plant Protection Organisation, EPPO 2006). U Europi je bolest rak kore javora prvi puta registrirana u Sloveniji 2005. godine na području Ljubljane (Jurc et al. 2006). Do kraja siječnja 2006. intenzivnim pregledom detektirano je 76 zaraženih javora (*A. pseudoplatanus*, *A. platanoides*, *A. campestre*), provedene su mjere eradikacije i sva zaražena stabla su oborena i spaljena (EPPO Reporting service 2006/143). U Austriji je registrirana u prosincu 2006. godine na rubu šume na području Lilienfeld (Cech 2007) na gorskom javoru *A. pseudoplatanus*. Rizik širenja bolesti raka kore prema Ogris et al. (2006.) u Europi je znatan na području prirodnog rasprostranjenja javora. Najugroženija su područja Balkana, Apenina, Francuske, Centralne i Istočne Europe i Kavkaza. Hrvatska spada u područje visokog rizika širenja bolesti rak kore javora. *E. parasitica* stavljena je 2005. godine na EPPO Alert listu po preporuci NPPPO (National Plant Protection Organisation) Slovenija. Godine 2008. skinuta je s EPPO Alert liste (EPPO RS 2008/028) iz razloga što se bolest sporo širi, a širenje bolesti ne može se zaustaviti. Iskorjenjivanje nije moguće, a štete su male. U većini slučajeva postotak zaraze javora rakom u šumi i urbanim sredinama iznosi 2 – 10 % (Moorman 2012).

U Hrvatskoj je bolest rak kore javora prvi puta utvrđena 2007. godine u blizini granice sa Slovenijom u mjestu Prišlin (Ogris et al. 2008) na 13 stabala klena (*A. campestre*). Prilikom tog prvog nalaza zaraze gljivom *E. parasitica* u Hrvatskoj gljiva je detektirana PCR metodom dijagnostičkim početnicama (Ogris et al. 2008).

U Hrvatskoj se od 2011. godine provodi program Poseban nadzor gljive *E. parasitica*. Program nadzora provodi šumarska inspekcija i Hrvatski šumarski institut koji financira Ministarstvo poljoprivrede (Liović 2012). Cilj nadzora je utvrditi status gljive u Hrvatskoj, pratiti pojavu i širenje bolesti te poduzeti odgovarajuće mjere zaštite kako bi se bolest iskorijenila.

E. parasitica prema znanstvenoj klasifikaciji pripada odjelu *Ascomycota*, razredu *Sordariomycetes*, redu *Xylariales*, porodici *Diatrypaceae*, rodu *Eutypella* (www.indexfungorum.org/Names).

Gljiva *E. parasitica*, uzročnik raka kore javora stvara veliki kalus oko središta rakaste tvorevine koji podsjeća na kobrinu glavu (Hudler 1984). Tipični rak ima ravan ili utonulo središte s mrtvom korom okružen debelim kalusom (EPPO RS 2008/028). Na površini kore nalaze se crna reproduktivna

tijela gljive, a kad se odstrani kora s rubova raka može se vidjeti tkivo gljive (Hudler 1984). Micelij je lepezastog oblika, bijele do krem boje (Ogris et al. 2008). Rak je mjesto truleži drva, a bolesno stablo se često prelomi pod djelovanjem jakog vjetra (Hudler 1984). Plodna tijela gljive, strome s peritecijima, formiraju se u središnjem dijelu rakaste tvorevine 5 – 8 godina nakon infekcije (Cech 2007). U vrijeme vegetacije oko središta raka raste kalus 1,5 do 2,0 cm godišnje, a u vrijeme mirovanja vegetacije gljiva *E. parasitica* razara tkivo drva (Koetter i Grabowski 2015). Periteciji otpuštaju askospore jedino kada se natope vodom za kišnog vremena (Landache 1971). Askospore se šire vjetrom i kišom maksimalno do udaljenosti 25 m i visine 4 m (Johnson i Kuntz 1979). Gljiva *E. parasitica* proizvodi i konidije, ali one ne kliju i ne predstavljaju izvor infekcije (Glawe 1983 u Cech 2007, Moorman 2012).

Bolest rak kore umanjuje estetsku i ekonomsku vrijednost javora. Zaražena stabla su osjetljiva i često ih dodatno naseljuju gljive truležnice koje oslabljuju statiku stabla, što predstavlja opasnost od lomova (EPPO RS 2008/028).

Identifikacija *E. parasitica* provodi se klasičnom fitopatološkom metodom zapažanja vidljivih simptoma i analizom morfoloških karakteristika gljive na drvetu i u kulturi na hranjivoj podlozi.

Brza metoda detekcije uključuje analizu DNA primjenom dijagnostičkih početnica PCR metodom (Polimeraze Chain Reaction – Lančana reakcija polimeraze). Piškur et al. (2007) su napravili dijagnostičke početnice za gljivu *E. parasitica*, pretraživajući unutrašnje transkribirano područje (Internal Trancibed Spacer region, ITS) ribosomske DNA uzoraka *E. parasitica* nađenih na različitim lokacijama i domaćinima u Sloveniji i usporedbom njihovih sekvenci s *Eutypella* spp. pohranjenim u GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

Cilj ovoga rada je utvrditi stanje zaraze rakom kore javora sedam godina nakon prvog nalaza, rasprostranjenosti bolesti i intenzitet zaraze u Hrvatskoj. Drugi cilj je potvrditi vrstu gljive fitopatološkom analizom i DNA analizom dijagnostičkim početnicama te pohraniti njihove DNA sekvence ITS2 regije u GenBank (NCBI).

MATERIJALI I METODE MATERIALS AND METHODS

Područje rada – Research area

Programom posebnog nadzora *E. parasitica* u razdoblju od 2011. do 2014. godine pregledane su šumske sastojine (Slika 1.) u kojima su zastupljena stabla javora na području graničnih županija sa Republikom Slovenijom te nekoliko županija u unutrašnjosti Hrvatske. Pregledi su obavljani na području 8 županija i 17 lokaliteta (Tablica 1.).

Tablica 1. Mjesta pregleda: županije KZ – Krapinsko zagorska, ZG – Zagrebačka, KA – Karlovačka, PG – Primorsko goranska, I – Istarska, SM – Sisačko moslavačka, BB – Bjelovarsko bilogorska, OB – Osječko baranjska, broj pregledanih stabala, broj uzetih uzoraka, broj pozitivnih nalaza od 2011.–2014. godine

Table 1 Locations of inspection: counties KZ – Krapina-Zagorje County, ZG – Zagreb County, KA – Karlovac County, PG – Požega-Slavonia County, I – Istria County, SM – Sisak-Moslavina County, BB – Bjelovar-Bilogora County, OB – Osijek-Baranja County, number of examined trees, the number of samples, the number of positive rate of 2011–2014 years

Županija County	Mjesto pregleda/Zemljopisne koordinate Locality/ geographic coordinates	2011. god. year		2012. god. year		2013. god. year		2014. god. year	
		Broj pregledanih stabala (ukupno: 2209 stabala) Number of examined trees (total: 2209 trees)							
		566 stabala-trees		458 stabala-trees		425 stabala-trees		760 stabala-trees	
		Mjesto pregle-da Locality	Stabla zaražena rakom kore Infected trees	Mjesto pregleda Locality	Stabla zaražena rakom kore Infected trees	Mjesto pregleda Locality	Stabla zaražena rakom kore Infected trees	Mjesto pregleda Locality	Stabla zaražena rakom kore Infected trees
KZ	Trakošćan	+	0	+	0	+	0	+	0
	46°15'29"N 15°56'49"E								
	Desinić 46°8'24"N 15°39'36"E	+	0	+	0	+	0	+	0
	Hum na Sutli 46°12'50"N 15°40'30"E	+	0	+	0	+	1	+	1
	Kumrovec 46°04'35"N 15°40'49"E	+	0	+	0	+	0	+	0
	Zalug 46°12'04"N 15°39'04"E	–	–	+	0	+	0	+	0
	Mali Tabor 46°12'48"N 15°40'31"E	–	–	+	0	+	0	+	0
ZG	Brezno Gora 46°10'52"N 15°39'07"E	–	–	+	0	+	0	+	0
	Samobor 45°48'N 15°43'E	+	0	+	0	+	0	+	0
KA	Gornja Vas 45°46'22"N 15°28'07"E	+	0	+	0	+	0	+	0
	Sošice 45°45'0"N 15°22'58"E	+	0	+	0	+	0	+	0
PG	Ribnik 45°34'39"N 15°21'04"E	+	0	+	0	+	0	+	0
	Netretić 45°30'2"N 15°24'8"E	+	0	–	–	–	–	–	–
	Brod Moravice 45°27'36"N 14°58'12"E	+	0	–	–	–	–	–	–
I	Buzet 45°24'36"N 13°58'12"E	–	–	–	–	+	0	+	0
SM	Kutina 45°28'48"N 16°46'48"E	+	0	+	0	–	–	+	0
BB	Bjelovar 45°54'36"N 16°50'24"E	+	0	–	0	–	–	–	–
OB	Našice 45°30'0"N 18°6'0"E	+	0	+	0	+	0	+	0
8	17	13	0	13	0	13	1	14	1

Terenski rad – Field work

U šumskim sastojinama obavljani su vizualni pregledi stabala javora *Acer* spp. u potrazi za simptomima raka kore. Stabla na kojima su uočeni simptomi zaraze su oborena i uzeti su uzorci dijelova debla s rakastom tvorevinom za laboratorijsku fitopatološku i molekularnu analizu. Zabilježene su koordinate stabala sa simptomima zaraze. Izmjeren je prsni promjer stabala, određena je njihova starost, izmjerena je visina na kojoj se rakasta tvorevina nalazi. Izmjerena je širina i visina rakaste tvorevine na stablu.

Laboratorijski rad – Laboratory work

Fitopatološka analiza i detekcija – *Phytopathological analysis and detection*

Uzorci dijelova debla, trupčići s rakastom tvorevinom okularno su pregledani. Analizirani su simptomi raka, pre-

gledna je kora na prisutnost plodnih tijela, odstranjen je dio kore u potrazi za micelijem gljive. Uzorci kore zajedno s plodnim tijelima gljive su mikroskopski analizirani. Izmjerena je dimenzija askospora i određene su veličine: minimum, maksimum i srednja vrijednost. Korištena je zoom stereo lupa Olympus SZX7 i svjetlosni mikroskop Olympus BX53.

Trupčić sa simptomima zaraze gljivom prerezan je okomitim rezom na kojemu je bio vidljiv prijelaz zaraženog u zdravo drvo. Trupčić je držan u radnom zatvorenom predprostoru laboratorija u promjenjivim klimatskim uvjetima ovisnim o vanjskim vremenskim uvjetima. Prosječna temperatura kretala se oko 15 °C, a vlažnost zraka oko 85 %.

Komadići drva s trupčića na prijelazu nekrotiziranog u zdravo tkivo veličine 5x5mm su izrezani sterilnim skalpelom i inokulirani na hranjivu podlogu PDA (Potato dextrosa agar) u petrijeve zdjelice i ostavljeni na sobnoj temperaturi



Slika 1. Šumska sastojina bukve s lazarkinjom i primjesom stabala javora (Foto Liović B.)

Figure 1 Forest stand of beech and sweet woodruff with a hint of maple trees (Photo Liović B.)

23°C u prirodnim uvjetima izmjene dana i noći, kako bi se razvio micelij gljive. Dobivena kultura gljive morfološki je analizirana i uzeti su uzorci micelija sa PDA podloge za molekularnu detekciju.

Molekularna detekcija – *Molecular detection*

DNA izolacija – *DNA isolation*

DNA je izolirana iz 0,1 g piljevine zaraženog drveta prema protokolu kompleta QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany) te iz micelija sastruganim s površine agara CTAB metodom (Doyle JJ i Doyle JL 1987) koristeći 2 %

cetil trimetil ammonium bromid (CTAB) pufer uz dodatak 1 % (wt/vol) polivinilpirolidina (PVPP). DNA je resuspendirana u 50 µl ultračiste vode. Kvaliteta i kvantiteta DNA je provjerena elektroforezom u 1x TBE puferu, pH 8,0 na 0,8 % agaroznom gelu obojanom s bojom GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, Inc. Rockland, USA). Kao DNA marker korišten je Lambda DNA/Hind III Fragment (Invitrogen, Germany).

PCR umnažanje i sekvenciranje – *PCR amplification and sequencing*

PCR reakcija umnažanja DNA ITS početnicama je sadržavala 1x PCR pufer, 0,8 µg/µl BSA (Bovine Serum Albumin, Amersham Pharmacia Biotech, USA), 0,5 µM ITS 3 i ITS 4 (White et al. 1990), 1 u TaKaRa Taq Hot Start (Takara, Japan) i 0,5 µl izolirane DNA u razrjeđenju 1:100. Parametri amplifikacijskog ciklusa su bili sljedeći: početna denaturacija 5 min, 94 °C i 30 ciklusa: 1 min 95 °C, 1 s 56 °C i 1 min 72 °C te završni ciklus od 10 min, 72 °C. PCR reakcija umnažanja DNA dijagnostičkim početnicama je sadržavala 1x PCR pufer, 0,8 µg/µl BSA 0,5 uM početnica EpF i EpR (Piškur et al. 2007), 1 u TaKaRa Taq Hot Start (Takara, Japan) i 0,5 µl izolirane DNA u razrjeđenju 1:100. Parametri amplifikacijskog ciklusa su bili sljedeći: početna denaturacija 85 s, 94 °C i 35 ciklusa: 35 s, 95 °C; 55 s 60 °C i 1 min 72 °C te završni ciklus od 10 min, 72 °C. Sve PCR reakcije provedene su s negativnom kontrolom koja je sadržavala ultračistu vodu umjesto DNA. Umnažanje DNA fragmenta provedeno je u ukupnom volumenu od 10 µl u uređaju PTC-100 (MJ Research, USA). PCR produkti provjereni su elektroforezom na 1,8 % agaroznom gelu obojanom GelStar Nucleic Acid Gel Stain, (Lonza Rockland, Inc. Rockland, USA) u 1x TBE pufer pH 8,0 i DNA markerom TrackIt 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Germany) i UV svjetlom. Umnožena DNA je pročišćena iz agaroznog gela korištenjem kompleta PureLink Quick gel Extraction kit (Invitrogen, Germany). Automatsko sekvencioniranje je izvedeno pomoću kompleta BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) na instrumentu 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Analiza sekvenci provedena je usporedbom sekvenci DNA prisutnih u GenBank (NCBI, Bethesda, MD, USA) koristeći program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tablica 2. Lokaliteti i koordinate uzorkovanih stabala s pozitivnim nalazom na zarazu *E. parasitica* 2013. i 2014. godine

Table 2 Locations and coordinates sampled trees with positive findings on infection *E. parasitica* 2013 and 2014

Godina nalaza <i>Year</i>	Vrsta javora <i>Acer species</i>	Lokalitet <i>Locality</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Uzorak trupčica <i>Sample from trunk</i>
2013	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Šumarija Krapina, G. j. Pregrada-Klanjec, odjel 2e (Općina Hum na Sutli) <i>Forest office Krapina, M.unit Pregrada- Klanjec, department 2e (Community Hum on Sutla)</i>	N 46°13'01,124" E 15°42'46,610"	1 stablo – uzorak trupčić debla sa simptomima zaraze <i>1 tree – part of the trunk with disease symptoms</i>
2014	<i>Acer campestre</i> L.	Lupinjak (općina Hum na Sutli) – privatna šuma <i>Lupinjak (Community Hum on Sutla) – private forest</i>	N 46°12'52,715" E 15°43'58,750"	1 stablo – uzorak trupčić debla sa simptomima zaraze <i>1 tree- part of the trunk with disease symptoms</i>

REZULTATI I DISKUSIJA RESULTS AND DISCUSSION

Pregledi šumskih sastojina sa prisutnošću stabala javora obavljani su na 2011., 2012. i 2013. godine na 13 lokacija, a 2014. na 14 lokacija (Tablica 1). Godine 2011. i 2012. nije pronađeno niti jedno stablo javora zaraženo rakom kore. Godine 2013. pronađeno je u blizini mjesta Hum na Sutli uz Slovensku granicu (Šumarija Krapina, Gospodarska je-

dinica Pregrada-Klanjec, odjel 2e) jedno zaraženo stablo gorskog javora (*A. pseudoplatanus*). Stablo se nalazilo u mješovitoj sastojini bukve, kitnjaka, graba, cera, kestena i javora. Godine 2014. u mjestu Lupinjak u blizini Huma na Sutli uz slovensku granicu u privatnoj šumi pronađeno je jedno zaraženo stablo poljskog javora (*A. campestre*). Oba zaražena stabla imala su stari rak. Ukupno je pregledano 2209 stabala javora (*Acer* spp.).



Slika 2. i 3. Dio debla *Acer pseudoplatanus* sa simptomima raka i poprečni presjek kroz rakastu tvorevinu (Foto Liović B.)

Figure 2 and 3 Part of the trunk of *Acer pseudoplatanus* with disease symptoms and cross section through the center of canker (Photo Liović B.)

Slika 4. i 5. Dio debla *Acer campestre* sa simptomima raka i poprečni presjek kroz rakastu tvorevinu (Foto Liović B.)

Figure 4 and 5 Part of the trunk of *Acer campestre* with disease symptoms and cross section through the center of canker (Photo Liović B.)



Slika 6. Rak kore poljskog javora, strome s peritecijima na kori i lepezastim micelijem ispod kore (Foto Novak Agbaba S.)

Figure 6 Eutypella canker on maple, stroma with perithecia on bark surface, mycelial fans under the bark (Photo Novak Agbaba S.)



Slika 7. Micelij gljive na prijelazu bolesnog u zdravo tkivo drva (Foto Novak Agbaba S.)

Figure 7 Whitish mycelium formed between healthy and diseased tissue (Photo Novak Agbaba S.)

U Tablici 2. prikazani su lokaliteti i koordinate na kojima su nađena stabla javora zaraženih rakom kore. Stablo gorskog javora (*A. pseudoplatanus*) starosti 69 godina, prsnog promjera 49 cm imao je rakastu tvorevinu na visini 5 m. Rakasta tvorevina bila je široka 46 cm a visoka 50 cm. Na poprečnom presjeku stabla kroz centar raka vidljivo je da je jedna trećina presjeka zahvaćena procesom truleži koja

se širi od središte raka (Slike 2. i 3.). Stablo poljskog javora (*A. campestre*) starosti 37 godina, prsnog promjera 35 cm imao je rakastu tvorevinu na visini 3,5 m. Rakasta tvorevina bila je široka 37 cm i visoka 44 cm. Na poprečnom presjeku stabla kroz središte raka vidljivo je da su dvije trećina presjeka zahvaćene procesom truleži koja se širi od središta raka (Slike 3. i 4.). Prema Moorman (2012) mlađa stabla su osjetljivija na zarazu gljivom *E. parasitica*. Prema poprečnom presjeku vidljivo je da je na starijem stablu *A. pseudoplatanus* gljiva sporije prodirala u tkivo drva, dok je na mlađem stablu *A. campestre* gljiva brže prodirala u tkivo drva. Procijenjena starost raka, uzimajući u obzir veličinu rakaste tvorevine i brzinu rasta raka (1,5 do 2 cm godišnje prema Koetter i Grabowski, 2015), na stablu *A. pseudoplatanus* iznosi oko 27 godina i na stablu *A. campestre* oko 23 godine.

Na oba stabla ulazno mjesto infekcije je odlomljena trula grana oko koje se širi zaraza u okolno tkivo, što se vidi na poprečnom presjeku. Gljiva je razvila micelij ispod kore, prorasla je i razorila stanice bjelike i kambija i širi se u srčiku. Ispod kore pronađen je karakteristični bijelokremasti lepezasti micelij (Slika 6.).

Makro i mikro analizom kore u središnjem dijelu raka utvrđena su plodna tijela, strome s crnim peritecijima te slobodni crni periteciji. U peritecijima su bili vidljivi askusi s askosporama. Veličina izmjerenih 30 askospora iznosila je 6,15-11,13 (7,93) μm x 2,18-3,85 (2,86) μm , što odgovara izmjerama Ogris et al. (2008). Na prerezu trupčića s rakastom tvorevinom na prijelazu bolesnog u zdravo tkivo razvio se bijeli gusti micelij gljive *E. parasitica* tri mjeseca nakon držanja u uvjetima opisanim u metodama (Slika 7.).

Izolacijom gljive iz komadića drva s prijelaza bolesnog u zdravo tkivo na PDA hranjivoj podlozi u petrijevim zdje-



Slika 8. Kultura gljive *E. parasitica* na PDA, uzorak za molekularnu detekciju (Foto Novak Agbaba S.)

Figure 8 *E. parasitica* culture on PDA, sample for molecular detection (Photo Novak Agbaba S.)

licama dobivena je kultura gljive gustog bijelog micelija istovjetna miceliju koji se razvio na prerezanom trupčiću (Slika 8.).

Na temelju morfoloških karakteristika koje su utvrđene laboratorijskim ispitivanjima, a odgovaraju opisima Ogris et al. (2008) i Cech (2007), utvrđena je vrsta *E. parasitica*. Da bi se sa sigurnošću moglo potvrditi nalaz gljive *E. parasitica* uzorci zaraženog drveta i kulture gljive prosljeđeni su na molekularnu analizu i detekciju.

Molekularnom analizom PCR metodom i dijagnostičkim početnicama provedena je analiza zaraženog tkiva drveta dva uzorka uzeta s gorskog javora i kljena, kao i kulture gljiva koje su nastale iz ta dva uzorka drveta. Sva četiri uzorka DNA umnožena s dijagnostičkim početnicama dali su pozitivan rezultat. Umnoženi su fragmenti DNA istovjetne veličine (Slika 9.), što odgovara veličini fragmenta DNA od 341 pb umnoženim s istim početnicama navedenim u članku Piškur et al. (2007). Fragmenti DNA su sekvencirani te je napravljena usporedba u genskoj bazi podataka (GenBank, NCBI), gdje je potvrđeno da se radi o 100 % istovjetnosti s *E. parasitica*.

ITS 2 regija *E. parasitica* iz dva uzoraka zaraženog stabla umnožena je s ITS3 i ITS4 početnicama i sekvencirana. Sekvence DNA su prijavljene u gensku banku (GenBank, NCBI) pod pristupnim brojevima KP868619 i KP868620. Uspoređivanje ITS2 regije ovih dviju DNA sa sekvencama pohranjenim u genskoj banci pokazalo je 99-100 % istovjetnosti sa sekvencama ITS2 regija gljiva *E. parasitica* iz Slovenije koje su pohranili Piškur et al. (2007) i Jurc et al. (2006). Pohranjene slovenske sekvence izolirane su iz *E. parasitica* s tri različita domaćina: *A. platanoides* (AM295773), *A. pseudoplatanus* (AM295770, AM295776 DQ11896) i *A. campestre* (AM295774, AM295772).

Fitopatološka i DNA analiza potvrdile su zarazu na samo dva stabla javora od ukupno pregledanih 2209. Javorova stabla u šumskim sastojinama u Hrvatskoj dolaze pojedinačno ili u manjim grupama. Takva struktura šumskih sastojina usporava pojavu širenja zaraze rakom kore javora. Osim toga na širenje zaraze bitno utječe i biologija gljive. Plodna tijela formiraju se 5 do 8 godina nakon početne infekcije, periteciji otpuštaju askospore samo u izravnom kontaktu s vodom (Lachance 1971). Osim toga, askospore se šire maksimalno 25 m u dužinu i 4 m u visinu (Johnson i Kuntz 1979 u Cech 2007).

E. parasitica utvrđena je u Hrvatskoj 2007. godine samo na stablima vrste *A. campestre* (Ogris et al. 2008.). Pregledom stabala javora 2013. gljiva *E. parasitica* prvi puta je utvrđena u Hrvatskoj na stablu *A. pseudoplatanus*.

Rezultati istraživanja upućuju da se zaraza od prvog mjesta nalaza ne širi na druga područja. S obzirom da je zaraza teško vidljiva prvih godina raka (EPPO RS 2008/028), zbog



Slika 9. PCR fragmenti nastali amplifikacijom dijagnostičkim početnicama EpF i EpR DNA *E. parasitice* izolirane iz različitih izvora. 1-DNA marker, 2-DNA iz zaraženog drveta *Acer pseudoplatanus* L, 3-DNA iz kulture gljive razvijene iz zaraženog drveta *Acer pseudoplatanus* L, 4-DNA iz zaraženog drveta *Acer campestre* L., 5-DNA iz kulture gljive razvijene iz zaraženog drveta iz *Acer campestre* L. 6-Negativna kontrola sadrži ultračist vodu (Foto Čelepirović N.)

Figure 9 The PCR products were originated from amplification of *E. parasitica* isolated DNA from different sources and amplified with diagnostic primers EpF and EpR. 1-DNA marker, 2-DNA from the infected wood *Acer pseudoplatanus* L, 3-DNA from cultured fungi from infected wood *Acer pseudoplatanus* L, 4-DNA from the infected wood *Acer campestre* L., 5-DNA from cultured fungi from infected wood *Acer campestre* L. 6- The negative control containing ultrapure water (Photo Čelepirović N.)

sigurnosti i očuvanja trenutnog stanja pod kontrolom nastavlja se provođenje programa Posebni nadzor raka kore javora.

ZAKLJUČAK CONCLUSION

Utvrđeno je da je zaraza gljivom *E. parasitica* u Hrvatskoj od 17 mjesta pregleda na 8 županija nađena samo u 1 županiji, Krapinsko-zagorskoj, na dva lokaliteta u općini Hum na Sutli u blizini slovenske granice. Nakon prvog nalaza 2007. godine, a za vrijeme 4 godišnjeg pregleda šumskih sastojina s javorom, nađeno je 2013. i 2014. godine po jedno zaraženo stablo (*A. pseudoplatanus* i *A. campestre*). Pregledom stabala javora 2013. gljiva *E. parasitica* prvi puta je utvrđena u Hrvatskoj na stablu gorskog javora (*A. pseudoplatanus*).

Od ukupnog broja pregledanih stabala 2209 kom., u tom razdoblju nađena su dva zaražena stabla, što iznosi 0,09 %.

Razlog slabog intenziteta zaraze je mala zastupljenost javora u šumskim sastojinama, stabilimičan raspored i raspored stabala u malim grupama. Formiranje plodnih tijela peritecija je spor proces (potrebno je 5 do 8 godina od početka infekcije), za otpuštanje askospora iz plodnih tijela potreban je izravan kontakt s vodom tj. kišom, a širenje askospora je na kratku udaljenost, do 25 m. Gljiva *E. parasitica* detektirana je klasičnom morfološkom fitopatološkom metodom i modernom molekularnom metodom. Molekularna detekcija potvrdila je vrstu gljive *E. parasitica*. Dvije sekvence ITS2 regije gljive *E. parasitica* prisutne na zaraženim stablima pohranjene su u gensku banku (GenBank, NCBI) pod pristupnim brojevima KP868619 i KP868620.

ZAHVALE ACKNOWLEDGEMENTS

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Hrvatskih šuma i šumarskoj inspekciji koji su sudjelovali pri terenskim radovima, kao i Ministarstvu poljoprivrede koje financira Program Posebni nadzor *Eutypella parasitica*.

LITERATURA REFERENCES

- Cech, T., 2007: Erstnachweis von *Eutypella parasitica* in Österreich. Forstschutz Aktuell 40: 10 – 13., <http://www.waldwissen.net/waldwirtschaft/schaden/piltze-nematoden/bfw>
- Database of fungal names, <http://indexfungorum.org/names/Names.asp.strGenus=Eutypella>
- Doyle, J.J., J.L., Doyle, 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem Bull*, 19:11-15.
- EPPO, 2006: Alert list, EPPO RS 2005/176, 2006/143. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/ETPLPA.htm
- EPPO, 2006: Reporting service no. 07-2006, Num. Article 2006/143. Current situation of *Eutypella parasitica* in Slovenia. <https://archives.eppo.int/EPPORreporting/2006/Rse-0607.pdf>
- EPPO, 2008: Reporting service 2008/028 <http://www.eppo.int/Eutypella/parasitica.doc>
- Hudler, G. W., 1984: Disease of Maple in Eastern North America. Cornell Cooperative Extension Publication. Cornell Tree Pest Leaflet A-13, <http://maple.dnr.cornell.edu/pubs/diseases/bark.htm>
- Johnson, D. W., J.E., Kuntz, 1979: *Eutypella* canker of maple: Ascospore discharge and dissemination. *Phytopathology* 69: 130-135.
- Jurc, D., N., Ogris, B., Slippers, J., Stenlid, 2006: First report of *Eutypella* canker of *Acer pseudoplatanus* in Europe. *New Disease Reports*, <http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2005-99.asp>
- Koetter, R., M., Grabowski, 2015: *Eutypella* Canker. University of Minnesota. <http://www.extension.umn.edu>
- Lachance, D., 1971: Discharge and germination of *Eutypella parasitica* ascospores. *Canadian Journal of Botany* 49(7): 1111-1118.
- Liović, B., 2012: Rak javorove kore (*Eutypella parasitica* Davidson & Lorenz) u Hrvatskoj. *Radovi* 44(2): 153-157.
- Moorman, G.W., 2012: *Eutypella* canker on maple. Plant disease fact sheet. Penn State Extension, Penn State University College of Agricultural Sciences. <http://extension.psu.edu/plant-disease-factsheets/all-fact-sheets/eutypella-canker-on-maple>.
- Ogris N., D., Jurc, M., Jurc, 2006: Spread risk of *Eutypella* canker of maple in Europe. *EPPO Bulletin* 36, 475-485.
- Ogris N., D., Diminic, B., Piškur, H., Kraigher, 2008: First report of *Eutypella parasitica* causing cankers on field maple (*Acer campestre*) in Croatia, *New Disease Reports* 16, 39. *Plant pathology* 57 (4): 785-785.
- Piškur B, N., Ogris, D., Jurc, 2007: Species-specific primers for *Eutypella parasitica*, the causal agent of *Eutypella* canker of maple, *Plant Disease* 91, 1579-1584.
- Program posebnog nadzora *Eutypella parasitica* Davidson & Lorenz rak kore javora, 2011., 2012., 2013., 2014., Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb
- White, T. J., T., Bruns, S., Lee, J. W., Taylor, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., 315–322. New York, N.Y

Summary

Fungus *Eutypella parasitica* is cause of bark canker on on maple trees. The disease reduces the economic and aesthetic value of maple. In Europe, the *Eutypella* canker was first recorded in Slovenia in 2005. From 2005 to 2008 the disease was listed on the EPPO Alert List because of the danger of contagion. In Croatia, *Eutypella* canker was recorded for the first time in 2007 on *A. campestre* near the border with Slovenia. The program Special monitoring of fungus *E. parasitica* was carried out since 2011 in Croatia. The aim of this study was to determine the status of infection on maples seven years after it was recorded for the first time, spread of the disease and infection intensity in Croatia. The second objective was to confirm the type of fungus using phytopathological and molecular analysis and store the DNA sequence of ITS2 region in GenBank (NCBI). The forest stands that represent maple trees in the area of 8 counties and 17 localities were examined in the period from 2011 to 2014. From a total of 2209 examined trees, only 2 trees of *A. pseudoplatanus*, and *A. campestre*, in the vicinity of settlement Hum na Sutli on the Slovenian border, were infected by the fungus, representing

only 0.09 % of infected trees. *Eutypella* canker was found with very low intensity and the disease has not spread to other sites. The samples of cankerous formations were submitted to laboratory analysis, morphological analysis, and DNA analysis to confirm the presence of fungi *E. parasitica*. Fragments of DNA were sequenced and compared with gene in databases GenBank (NCBI), where it was confirmed that it was a 100 % identity with the *E. parasitica*. ITS2 region fungus *E. parasitica* established as sycamore and chubs was sequenced and deposited in gene bank (GenBank, NCBI) under accession numbers KP868619 and KP868620. Fungus *E. parasitica* was recorded for the first time in Croatia on *A. pseudoplatanus* in 2013, and its presence was confirmed on *A. campestre* in 2014. Type fungus *E. parasitica* was confirmed by morphological and molecular DNA detection. Bark canker on maples has not been significantly expanded during the last seven years in Croatia.

KEY WORDS: *Eutypella parasitica*, *Eutypella canker*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer campestre*, molecular diagnostic, ITS2 region