

Joško KALITERNA<sup>1</sup>, Tihomir MILIČEVIĆ<sup>1</sup>, Đani BENČIĆ<sup>1</sup>, Aleksandar MEŠIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
jkaliterna@agr.hr

## SUŠENJE MASLINE UZROKOVANO GLJIVOM *Verticillium dahliae* Kleb. U ISTRI

### SAŽETAK

Maslina je važna kultivirana biljka u Hrvatskoj i u svijetu. Podložna je manjem broju bolesti, a među najvažnijima su mikoze. Verticiliozno venuće u svijetu je jedna o najvažnijih bolesti masline, no do sada u Hrvatskoj nije dokazana. Simptomi sušenja u jednom privatnom masliniku u Istri nalikovali su simptomima koje izazivaju različite mikoze provodnog staničja masline te su uzeti uzorci simptomatskih maslina za analizu. Iz svih uzoraka izolirana je gljiva koje je prema morfološkim karakteristikama i temeljem analize molekularnog markera ITS identificirana kao *Verticillium dahliae* Kleb.. To je njezin prvi nalaz na maslini u Istri. Zaključeno je da je radi prevencije širenja toga patogena u Hrvatskoj te radi utvrđivanja jasnije slike etiologije bolesti koje uključuju simptome sušenja izboja ili čitavih stabala masline, potrebno provesti dodatna istraživanja i monitoring matičnih stabala te tla u rasadnicima masline na zahvaćenom području Hrvatske.

**Cljučne riječi:** Stablo masline, venuće, *Verticillium dahliae*, Istra

### UVOD

Maslina (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) važna je kulturna biljka u Hrvatskoj. Uzgaja se na više od 19.000 ha, a već godinama površine pod maslinama sve su veće (Statistički ljetopis RH, 2015). Maslina je biljka poznata po otpornosti na sušu, a podložna je relativno malom broju ozbiljnih bolesti (Phillips i sur., 2005). Najčešće su istraživane dalmatinska bolest masline, antraknoza ploda masline, rak masline, paunovo oko i verticiliozno venuće masline. To su najvažnije bolesti koje uzrokuju ekonomske štete u uzgoju masline u svijetu (Urbez-Torres i sur., 2013). Verticiliozno venuće masline jedina je od navedenih bolesti koja do sada u Hrvatskoj nije znanstveno dokazana na maslini iako su uočena stabla sa simptomima te bolesti (Cvjetković, 2010). Uzročnik verticilioznoga venuća masline fitopatogena je gljiva *Verticillium dahliae* koja, ako je prisutna u tlu, maslinu inficira putem korijena, a potom se širi u nadzemne dijelove biljke gdje dovodi do začepjenja i nekroze provodnih snopova te posljedično do sušenja pojedinih ogranaka ili čitave biljke. Razlikuju se dva patotipa *V. dahliae* na maslini. Jedan izaziva brzo i potpuno otpadanje zelenih asimptomatskih listova (defolijaciju) i venuće na zahvaćenom dijelu biljke ili na cijeloj biljci, a drugi uzrokuje naglo sušenje (apopleksiju) ili postupno sušenje pojedinih grana ili čitavih mladih biljaka, no

bez otpadanja listova (Moral i sur. 2010). Simptomi verticilioznoga venuća mogu se djelomično preklapati s drugim bolestima drva masline poput sušenja grana i izboja masline uzrokovanih gljivama iz porodice Botryosphaeriaceae (*Diplodia seriata*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Botryosphaeria dothidea*), gljivama *Phoma incompta*, *Fomitiporia mediterranea*, *Nectria radicecola*, *Eutypa lata*, *Armillaria melea*, i dr. (Urbez-Torres i sur., 2013; Cvjetković, 2010; Moral i sur., 2010). U Hrvatskoj su posljednjih godina kao uzročnici sušenja masline utvrđeni *P. incompta* i *D. seriata* (Ivić i sur., 2010, Kaliterna i sur., 2012).

## MATERIJALI I METODE

U travnju 2015., u okolici Vodnjana u Istri, običen je manji maslinik zbog pojave sušenja mladih maslina, kultivara Buza i Istarska bjelica. Od pedeset stabala osam je pokazivalo simptome sušenja (slika 1.).



**Slika 1.** Verticiliozno venuće  
(snimio T. Miličević)

Listovi su im bili svinuti prema naličju, svijetlosmeđe boje te pričvršćeni za grane. Uzorci grana svake od simptomatskih biljaka doneseni su u laboratorij gdje je u poprečnim presjecima grana i izboja utvrđena nekroza drva u vidu smeđih nekrotičnih zona. Fragmenti simptomatskoga drva, uzeti s granice zdravog i simptomatskoga tkiva, kao i odsječci grančica kojima je prethodno uklonjena kora, površinski su 15 sekundi sterilizirani pomoću 3 postotne otopine natrijeva hipoklorita. Potom su isprani sterilnom destiliranom vodom, osušeni na filtrirnom papiru u struji zraka u sterilnoj komori te aseptički postavljeni na hranjivu podlogu krumpirov dekstrozni agar s dodatkom antibiotika streptomicina (50 µg/mL) (PDA-Strep) pa inkubirani pri 25 °C u tami. Iz svih uzoraka drva i grančica masline konzistentno je izolirana jedna gljiva bijelog micelija. Metodom monohifalne izolacije, gljiva je dobivena u čistoj kulturi na hranjivoj podlozi PDA, a bila je predstavljena

s po jednim izolatom iz svakog od osam uzoraka masline. Da bi se analizirale morfološke karakteristike izolata, inkubirani su u opisanim uvjetima.

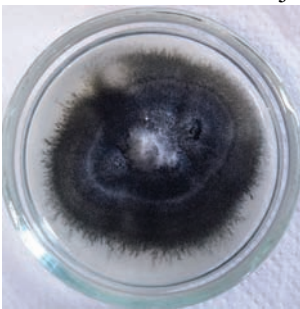
Radi molekularne identifikacije izolata, odabran je reprezentativni izolat MTH4, kojem je izolirana ukupna genomska DNA korištenjem protokola na bazi organskih otapala prema Santos i sur. (2009), a potom je radi njegove analize metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnožen molekularni marker ITS (eng. Internal Transcribed Spacer) korištenjem para početnica

ITS5/ITS4 kako je opisano u Kaliterna (2013). Da bi se utvrdila taksonomska pripadnost izolata MTH4, dobiveni PCR produkt sekvenciran je, a sekvenca je, korištenjem metode BLAST (eng. Basic Logical Alignment Search Tool), uspoređena s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata gljiva iz međunarodne baze podataka GenBank.

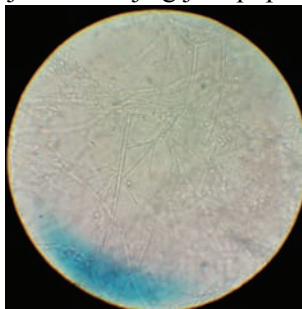
Radi utvrđivanja patogenosti izolata gljive na maslini i zadovoljenja Kochovih postulata, provedeni su testovi patogenosti umjetnim infekcijama zdravih dvogodišnjih maslina sorte Oblica. Korištene su po tri biljke za svaki testirani izolat i kontrolu, a umjetne infekcije provedene su tako da je biljkama običnom vodom pažljivo isprano korijenje da bi se uklonio supstrat, a potom im je korijen sat vremena namakan u suspenziji konidija (koncentracija  $10^5$  konidija/mL u sterilnoj destiliranoj vodi), odnosno u sterilnoj destiliranoj vodi u slučaju kontrolnih biljaka. Suspenzije konidija izolata pripravljene su neposredno prije pokusa, a dobivene su od deset dana starih kolonija izolata gljive kultivirane na PDA kako je opisano, pri čemu je korišten hemocitometar za poštimanje željene koncentracije konidija. Nakon umjetne infekcije, testne biljke zasađene su u prikladne lončanice u supstrat prethodno steriliziran autoklaviranjem te su prema slučajnom rasporedu postavljene u plastenik u kojima su pripremljeni ovi uvjeti:  $24 \pm 2$  °C, relativna vlažnost zraka oko 70 %, trajanje dnevnog svjetla 15 sati, a biljke su zalijevane dva puta tjedno. Biljke su promatrane od četvrtog tjedna nakon umjetne infekcije, a nakon pojave simptoma sušenja na testnim biljkama, odnosno u isto vrijeme i iz kontrolnih testnih biljaka, uzimani su uzorci drva iz kojih je pokušana već opisana reizolacija uzročnika.

## REZULTATI I RASPRAVA

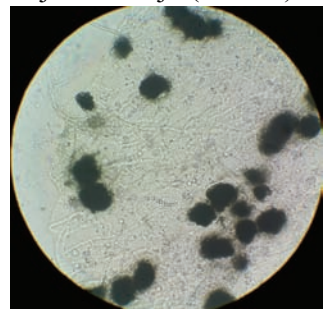
Inkubacija kolonija čistih izolata gljiva rezultirala je u svim slučajevima sporo rastućom kolonijom koja je rasla brzinom od 1,9 milimetara na dan, a nakon nekoliko dana inkubacije bijela kolonija gljive poprimala je crnu boju (slika 2.).



**Slika 2.** Kolonija *V. dahliae* na PDA (snimio J. Kaliterna)



**Slika 3.** Konidiofori i konidije *V. dahliae* (snimio J. Kaliterna)



**Slika 4.** Mikrosklerociji *V. dahliae*

Mikroskopska analiza pokazala je da su hife, unatoč crnom obojenju kolonije, zapravo prozirne, septirane, i s konidioforima verticilatnog rasporeda fialida (slika 3.). Na vrhovima fialida formirale su se konidije, a bile su prozirne,

jednostanične, ovoidnog do elipsoidnog oblika, dimenzija  $4,8 \pm 0,7 \mu\text{m} \times 2,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$  (na uzorku od 100 konidija). Crno obojenje kolonije bilo je posljedica mnoštva mikrosklerocija tamnosmeđe boje koje su bile uklopljene u hranjivu podlogu (slika 4.). Pojedinačni mikrosklerociji bili su okrugli, izduženi ili nepravilnog oblika, veličine 22 do  $117 \mu\text{m}$ , a kada su formirali veće nakupine, dosežali su do  $404 \mu\text{m}$ . Na temelju morfoloških karakteristika gljiva je identificirana kao *Verticillium dahliae* Kleb. (Inderbitzin i sur., 2011).

Analiza molekularnog markera ITS, u sklopu molekularne identifikacije izolata MTH4, rezultirala je PCR produktom veličine 524 parova baza koji je temeljem BLAST analize pokazao 99,8 % homologije s istom takvom sekvencom izolata PD322 (GenBank pristupni broj HQ206718), (Inderbitzin et al. 2011), referentnog za vrstu *V. dahliae*, odnosno 100 % homologije u slučaju drugog takvog referentnog izolata SDV1025 (GenBank pristupni broj KC834733), (Yu et al. 2016). Stoga su navedeni rezultati molekularne analize potvrdili raniji zaključak o morfološkoj identifikaciji tj. da izolati gljiva pripadaju vrsti *V. dahliae*. Sekvenca molekularnog markera ITS izolata MTH4 pohranjena je u međunarodnu bazu podataka GenBank pod pristupnim brojem KX061497, a izolati gljiva pohranjeni su u mikološkoj zbirci Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Testovi patogenosti potvrdili su virulentnost testiranih izolata gljive *V. dahliae* na maslini jer su testirane biljke (osim kontrolnih) nakon četiri do pet tjedana pokazale znakove kloroze listova, a sušenje, slično onome na uzorkovanim biljkama, od šestoga tjedna. Također, iz svih testiranih biljaka, osim kontrolnih, uspješno su reizolirane gljive koje po svojim morfološkim karakteristikama odgovaraju izolatima MTH1 do MTH8, čime su zadovoljeni Kochovi postulati. Taj nalaz prvi je znanstveni dokaz sušenja masline u Istri uzrokovan gljivom *V. dahliae*. Budući da simptomi nisu uključivali otpadanje sasušenih listova, vjerojatno je to bila apopleksija mladih maslina uzrokovana manje agresivnim patotipom koji ne izaziva defolijaciju. Tu pretpostavku trebalo bi u budućnosti testirati molekularnim metodama uporabom specifičnih početnica za PCR, temeljem čega se mogu razlikovati ta dva patotipa *V. dahliae* (Triki i sur., 2011). Također, budući da je prilikom uzorkovanja na lokalitetu u Istri uočeno da približno 15 % maslina u susjednim maslinicima također pokazuje simptome sušenja, možda je zastupljenost *V. dahliae* u Istri veća nego se trenutno može pretpostaviti, što bi trebalo dodatno istražiti. Dodatno istraživanje još je potrebnije i zbog činjenice da u ovom istraživanju nije izoliran niti jedan izolat gljive *D. Seriata*, koja je do sada u Hrvatskoj i Istri držana primarnim uzročnikom opaženih simptoma na maslini (Kaliterna i sur., 2012). Stoga bi u skoroj budućnosti trebalo provesti dodatna istraživanja etiologije opaženih pojava sušenja i uvesti monitoring matičnih stabala te tla u rasadnicima u zahvaćenom području Hrvatske da bi se izbjeglo daljnje širenje bolesti.

## SUMMARY

**WILT OF OLIVE TREES IN ISTRIA CAUSED BY *Verticillium dahliae* Kleb.**

Olive is an important cultivated plant in Croatia and in the world. It is subject to a small number of diseases, and the most important are mycoses. *Verticillium* wilt is one of the most important diseases of olive, but so far in Croatia it has not been scientifically proven. Symptoms of wilt, observed in a private olive orchard in Istria, resembled the symptoms of various vascular mycoses of olive, therefore the affected trees were sampled for analysis. A fungus was isolated from all the samples and was identified as *Verticillium dahliae* Kleb following its morphological characterization and analysis of molecular marker ITS. This finding was the first scientific proof of *V. dahliae* on olive in Istria. It was concluded that in order to prevent the spread of this pathogen in Croatia and to establish a clearer picture of the etiology of diseases involving symptoms of wilting shoots or whole olive trees, it is necessary to carry out further research and monitoring of planting material and soil in olive nurseries in the affected area of the country.

**Keywords:** olive tree, wilting, *Verticillium dahliae*, Croatia

## LITERATURA

**Cvjetković, B.** (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Čakovec, Zrinski d.d.

**Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., Subbara, K. V.** (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. PLoS ONE 6(12): e28341. Internet publikacija. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>

**Ivić, D., Ivanović, A., Miličević, T., Cvjetković, B.** (2010). Shoot necrosis of olive caused by *Phoma incompta*, a new disease of olive in Croatia. Phytopathologia Mediterranea 49 (3), 414-416.

**Kaliterna, J., Miličević, T., Ivić, D., Benčić, Đ., Mešić, A.** (2012). First Report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. Plant disease 96 (2), 290-290.

**Kaliterna, J.** (2013). Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Disertacija. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

**Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., Michailides, T.** (2010). Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. Phytopathology 100, 1340-1351.

**Phillips, A. J. L., Rumbos, I. C., Alves, A., Correia, A.** (2005). Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. Mycopathologia 159, 433-439.

**Santos, J. M., Phillips, A. J. L.** (2009). Resolving the complex of *Phomopsis* species and their *Diaporthe* teleomorphs on *Foeniculum vulgare*. Fungal Diversity 34, 111-125.

**Statistički ljetopis 2015.** Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske.

**Triki, M. A., Krid, S., Hsairi, H., Hammemi, I., Ioos, R., Gdoura, R., Rhouma, A.** (2011). Occurrence of *Verticillium dahliae* defoliating pathotypes on olive trees in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 267-272.

**Urbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., Gubler, W. D.** (2013). Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease* 97, 231-244.

**Yu, J. M., Cafarov, I. H., Babadoost, M.** (2016). Morphology, molecular identity, and pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* associated with internally discolored horseradish roots. *Plant disease* 100 (4), 749-757.

**Znanstveni rad**