

Prisutnost virusa Cryphonectria hypovirus 1 u kalusima kestena

Karin, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:258196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Valentina Karin

**Prisutnost virusa *Cryphonectria hypovirus 1* u kalusima
kesteni**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica koja mi je puno pomogla korisnim savjetima i što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Marinu Ježiću na strpljenju i velikoj pomoći u istraživačkom dijelu diplomskog rada.

Zahvaljujem se svom bratu Luki i sestri Darinki na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.

Posebno se zahvaljujem svojoj sestri Moniki koja mi je bila velika potpora i koja je sa mnom proživjela sve dobre i loše trenutke tijekom cijelog studija.

Zahvaljujem se i dečku Stipanu koji je cijelo vrijeme bio uz mene bez obzira na udaljenost.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, ocu Borisu i majci Antoniji, te im se neizmjereno zahvaljujem na nesebičnosti i izuzetnoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija. Bez njih ne bih bila ono što jesam danas. Hvala im na tome!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

PRISUTNOST VIRUSA *Cryphonectria hypovirus 1* U KALUSIMA KESTENA

Valentina Karin
Roosveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1) je dvolančani (ds)RNA virus bez kapside koji inficira fitopatogenu gljivu *Cryphonectria parasitica*, uzročnika raka kore pitomoga kestena *Castanea sativa*. Ovaj virus smanjuje virulenciju i reproduktivni kapacitet gljive i jako je važan u biološkoj kontroli raka kestenove kore. Ukoliko se hipovirulentna gljiva zaražena CHV1 virusom unese u aktivni rak uzrokovan virulentnim sojem gljive *C. parasitica*, prestaje širenje raka te se formira kalus. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti prevalenciju virusa CHV1 u kalusima kestena. Istraživanje je provedeno na 24 kalusa s područja Ozlja i Markuševca. Uočena je jako velika zastupljenost virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* u kalusima kestena. Čak 29,16% kalusa u svom tkivu imalo je samo virulentne sojeve gljive, 45,84% imalo je kombinaciju virulentnih i hipovirulentnih sojeva gljive, dok ih je tek 25% imalo samo hipovirulentne sojeve gljive. Pretpostavlja se da se to moglo dogoditi zbog spontanog gubitka virusa iz hipovirulentnih sojeva gljive ili zbog gubitka cijele hipovirulentne gljive na čije se mjesto naselila nova virulentna gljiva koja bi ponovo mogla izazvati infekciju na kalusima. Da bi se ustanovio razlog gubitka hipovirulencije, potrebno je pratiti promjene u kalusu kroz određeni vremenski period.

(41 stranica, 18 slika, 4 tablice, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Cryphonectria parasitica*, rak kestenove kore, kalus, hipovirus

Voditelj: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Neposredni voditelj: dr. sc. Marin Ježić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zamjena: doc. dr. sc. Silvija Černi

Rad prihvaćen: 26.11.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

PRESENCE OF *Cryphonectria hypovirus 1* IN CHESTNUT CALLI

Valentina Karin
Roosveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1) is a double-stranded (ds)RNA virus without a capsid that infects phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight. This virus reduces virulence and reproductive capacities of the fungus and thus is very important in biological control of the chestnut blight. If a hypovirulent fungus carrying CHV1 is introduced into an active canker caused by virulent *C. parasitica* strain, canker expansion ceases and callus is formed. The aim of this research was to evaluate the prevalence of CHV1 in chestnut calli. A total of 24 calli from Ozalj and Markuševac were included in the research. Observed presence of virulent fungal strains in chestnut calli was high. As many as 29.16% of calli had only virulent fungal strains in their tissue, 45.84% of calli had the combination of virulent and hypovirulent fungal strains, and only 25% of calli had solely hypovirulent fungal strains in their tissue. It is assumed that this could have happened because of the spontaneous loss of virus from hypovirulent fungal strains or due to the loss of whole hypovirulent fungal strain and colonization of the callus by a new, virulent strain which could reinitiate the infection. In order to ascertain the reason for the loss of hypovirulence, it is necessary to monitor changes in the callus over a longer period of time.

(41 pages, 18 figures, 4 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, chestnut blight, callus, hypovirus

Supervisor: Dr. Mirna Ćurković Perica, Prof.

Assistant supervisor: Dr. Marin Ježić

Reviewers: Dr. Mirna Ćurković Perica, Prof.

Dr. Dunja Leljak-Levanić, Assoc. Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Thesis accepted: 26.11.2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak kestenove kore	1
1.2. Pitomi kesten (<i>Castanea sativa</i> Miller)	2
1.2.1. Povijest pitomog kestena i njegova rasprostranjenost u Europi	2
1.2.2. Biološke karakteristike	3
1.2.3. Gospodarska i ekonomska važnost	4
1.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> Murril Barr	5
1.3.1. Životni ciklus	5
1.3.2. Simptomi raka kestenove kore	7
1.4. <i>Cryphonectria hypovirus</i> 1 – uzročnik hipovirulencije	9
1.4.1. Karakteristike hipovirusa i njegov utjecaj na gljivu <i>C. parasitica</i>	9
1.4.2. Načini prijenosa hipovirusne dsRNA	11
1.4.3. Poteškoće prilikom prijenosa hipovirusa	13
1.5. Biološka kontrola raka kestenove kore	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Uzorkovanje izolata gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	17
3.2. Uzgoj kultura izolata gljive <i>C. parasitica</i>	18
3.3. Određivanje morfologije izolata gljive <i>C. parasitica</i>	18
3.4. Izolacija hipovirusne dsRNA, RT-PCR i elektroforeza	19
3.5. Test vegetativne kompatibilnosti i određivanje VC tipova izolata gljive <i>C. parasitica</i>	20
4. REZULTATI	22
4.1. Prisutnost virusa u izolatima gljive <i>C. parasitica</i> u slučaju intermedijarne boje micelija	22
4.2. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive <i>C. parasitica</i> na području Ozlja i Markuševca	24
4.3. Zastupljenost virusa CHV1 u kalusima kestena	25
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA	35
ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

1.1. Rak kestenove kore

Početkom 20. stoljeća u Sjevernoj Americi pojavila se bolest, rak kestenove kore, koja je ugrozila opstanak šuma kestena. Tu bolest uzrokuje patogena gljiva *Cryphonectria parasitica* koja je nenamjerno unesena iz Azije u Sjevernu Ameriku (Anagnostakis 1987). Rak kestenove kore ne predstavlja veliki problem u Aziji jer su azijski kesteni, prvenstveno *Castanea mollissima* i *Castanea crenata*, razvili rezistenciju na bolest zahvaljujući dugoj koevoluciji s gljivom *C. parasitica*, dok američki i europski kesteni nikad prije nisu bili u kontaktu s tim patogenom što je rezultiralo pojavom tako agresivne bolesti (Anagnostakis 1982, Bryner i sur. 2014). Rak kestenove kore prvi put je uočen na američkom kestenu 1904. godine u Bronx zoološkom vrtu u New Yorku (Merkel 1905). Bolest se širila prirodnim arealom američkog kestena (*Castanea dentata*) koji se proteže od Maine do Alabame i zapadno do rijeke Mississippi uništavajući tako stotine milijuna stabala kestena (Anagnostakis 1982). Rak kestenove kore prvi put se pojavio na europskom pitomom kestenu (*Castanea sativa*) 1938. godine blizu Genove u Italiji te se ubrzo nakon toga proširio na područje čitave Europe (Robin i Heiniger 2001). Bolest je zahvatila i šume kestena na području Hrvatske. Prvi put uočena je 1955. godine u blizini Opatije gdje se najvjerojatnije proširila sa sjevera, iz Slovenije (Krstin i sur. 2008).

Nekoliko desetljeća nakon što se gljiva *C. parasitica* proširila Europom, primijećen je prirodni oporavak europskog pitomog kestena. Uočeni su rakovi koji su postali inaktivni, prestali su se širiti i na njihovom mjestu formirali su se kalusi (Heiniger i Rigling 1994). Iz kalusa su izolirani sojevi gljive *C. parasitica* zaraženi virusom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1). CHV1 je dvolančani (ds) RNA virus bez kapside koji se nalazi u citoplazmi gljive *C. parasitica*. Član je roda *Hypovirus* (Bryner i sur. 2013). Taj virus odgovoran je za oporavak pitomog kestena jer inficira gljivu *C. parasitica* i reducira njen patogeni potencijal. Smanjenje patogenog potencijala gljive naziva se hipovirulencija. Dakle, virus ne uništava gljivu, već smanjuje njenu virulentnost. Također je smanjena i sposobnost sporulacije, rast gljive te pigmentacija zbog čega su hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* u kulturi bijele boje (Milgroom i Cortesi 2004, Bryner i sur. 2013). Hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* stvaraju površinske rakove koji nisu letalni i zahvaćaju samo vanjski dio kore, dok virulentni

sojevi uništavaju kambijsko tkivo ispod kore te tako uništavaju i stabla kestena (Bissegger i sur. 1997, Bryner i sur. 2014). CHV1 se od jedne do druge gljive prenosi anastomozom hifa gljive *C. parasitica* što rezultira konverzijom gljive koja je primila virus u hipovirulentni fenotip. Zbog toga se taj način prijenosa hipovirulencije koristi kao strategija za biološku kontrolu raka kestenove kore (Nuss 1992, Bissegger i sur. 1997). Međutim, širenje virusa je ograničeno ili onemogućeno između sojeva gljive koji pripadaju različitom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC). Sustav vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* kontroliran je s najmanje šest *vic* lokusa. Između sojeva gljive *C. parasitica* koji sadrže identične alele na svim *vic* lokusima omogućeno je širenje virusa, dok je između sojeva koji sadrže jedan ili više različitih *vic* lokusa širenje virusa ograničeno ili najčešće onemogućeno (Cortesi i Milgroom 1998, Choi i sur. 2012). Mogućnost prirodnog širenja virusa između VC tipova se smanjuje ukoliko se broj heteroalelnih lokusa povećava (Liu i Milgroom 1996) što negativno utječe na biološku kontrolu raka kestenove kore.

1.2. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Miller)

1.2.1. Povijest pitomog kestena i njegova rasprostranjenost u Europi

Europski pitomi kesten (*Castanea sativa*) pripada porodici *Fagaceae* (bukve) i član je roda *Castanea*. Na masivu Coiron u Francuskoj nađeni su listovi i jedan fosil kestena star oko 8,5 milijuna godina koji nalikuje na europski pitomi kesten. U Europi su postojale dvije svojte kestena: *C. sativa* i *C. latifolia*. Samo je *C. sativa* preživjela zadnje ledeno doba i sada je ona jedina autohtona vrsta kestena u srednjoj Europi i na Mediteranu (Bounous i Marinoni 2005, Kosňovská 2013). Palinološki podaci za sjeveroistočnu Grčku, jugoistočnu Bugarsku i nekoliko regija u Anatoliji, čija je starost procijenjena na 3700 godina, čvrst su dokaz kultivacije kestena (Zeist i Bottema 1991). Za vrijeme Rimskog Carstva, stabla kestena su zbog izrazite hranjive vrijednosti kultivirana i sađena i izvan svoje prirodne zone gdje nisu bili najbolji uvjeti za njihov rast. Tada je počelo širenje šuma pitomog kestena pod direktnim antropogenim utjecajem (Zohary i Hopf 1988). Autohtone ili kultivirane šume kestena širile su se od Kavkaza preko Turske, Grčke, Hrvatske i Slovenije do Italije, Francuske, Španjolske, Portugala, Njemačke i južne Engleske. Europski pitomi kesten raste u svim mediteranskim zemljama jer tamo ima povoljne klimatske uvjete za svoj rast i razvoj. Jestivi plodovi te dobra kvaliteta debela čine kesten jednom od najvažnijih šumskih vrsta. Kesten je bio glavni izvor

hrane, posebice za ljudsku populaciju u ruralnim područjima te vrijedan resurs za mnoga planinska područja Mediterana (Bounous i Marinoni 2005).

1.2.2. Biološke karakteristike

Pitomi kesten (*C. sativa*) je listopadno drvo visine od 20 do 30 m koje ima bujnu i veliku krošnju, može dosegnuti promjer od 3 m i starost veću od 500 godina. Mladi kesten ima glatku koru, maslinastosmeđe boje sa svijetlim lenticelama, koja kasnije postaje sivosmeđa i duboko uzdužno ispucana. Korijenski sustav je snažan, s izraženom glavnom žilom. Listovi su naizmjenično raspoređeni, dugi, ušiljenog vrha, pilastog ruba, kožaste teksture i nalaze se na kratkim peteljka. Dugi su 12-20 cm i široki 3-6 cm, na licu su goli, a naličje im je dlakavo (Tomić 2010).

Pitomi kesten je jednodomna biljka. Muški cvjetovi se obično nalaze u grupama po tri ili čak i više. Skupljeni su u uspravne 10-30 cm duge prividne klasove s dlakavim vretenom (Slika 1a). Ženski cvjetovi nalaze se pri bazi muških cvatova. Sakupljeni su u grupice od 3 do 7 u zajednički omotač (kupolu) (Slika 1b) (Tomić 2010). Plod pitomog kestena je smeđi orašić s kožnatom lupinom. U početku razvoja zaštićen je zelenim omotačem iz kojeg se kasnije razvija bodljikava kupola. Kupola se za vrijeme sazrijevanja ploda raspada u dva, tri ili četiri režnja, a u njoj su 1-3 jestiva ploda (Slika 2). Dozrijevaju početkom listopada, a jedno stablo može godišnje roditi i do 200 kg plodova.



Slika 1. Cvjetovi pitomog kestena (*Castanea sativa*): a) muški, b) ženski
(www.aphotoflora.com, www.floralimages.co.uk)

Staništa pitomog kestena su srednje duboka, umjereno vlažna i kisela tla (pH 4-5). Kesten ne podnosi dobro ekstremne izmjene temperatura i dobro uspijeva na područjima tople i blage klime s dovoljno vlage u zraku. Kod nas najčešće raste u kontinentalnoj Hrvatskoj i najbolje uspijeva do 900 m n. v.



Slika 2. Plod pitomog kestena *Castanea sativa*
(www.naturescene.co.uk)

1.2.3. Gospodarska i ekonomska važnost

Kesten je jedna od najznačajnijih i najkorisnijih šumskih vrsta jer su svi njegovi dijelovi iskoristivi. Ima neprocjenjivo povijesno i kulturno nasljeđe te važnu gospodarsku i ekonomsku ulogu. Još od Srednjeg vijeka, plodovi pitomog kestena *C. sativa* korišteni su kao osnovna hrana koja se sušila i skladištila za cijelu godinu u mnogim ruralnim područjima Europe. Plodovi kestena su značajni u prehrani jer sadrže visoki udio škroba (oko 43%), a mali udio ulja (oko 3%). Osim toga, bogati su taninima i dobar su izvor vlakana, esencijalnih masnih kiselina, mnogih vitamina i minerala kao što su kalcij, fosfor i magnezij (Borges i sur. 2008). Budući da su plodovi kestena bogat izvor antioksidansa, mogući su i djelotvorni učinci na zdravlje. Oni mogu spriječiti ili usporiti oksidativnu štetu u tijelu smanjujući na taj način rizik od nastanka raka, pomažući suzbijanju razvoja tumora, štiteći srce i krvne žile, itd. (Blomhoff i sur. 2006). Kesten je cijenjen i kao izuzetno kvalitetno drvo, a njegov list koristi se u farmaceutskoj industriji. Zbog svoje velike trajnosti i lake obrade, deblo kestena koristi se kao građevno (izrada različitih drvenih konstrukcija) i stolarsko drvo (izrada namještaja). U pčelarstvu se upotrebljava kao medonosna biljka jer sadrži velike količine nektara.

Međutim, pojavom raka kestenove kore, kojeg uzrokuje patogena gljiva *C. parasitica*, šume kestena pretrpjele su veliku štetu. Uništeno je stotine milijuna stabala, a kvaliteta pitomog kestena i njegovog ploda je opala, kao i interes za njihovom upotrebom i proizvodnjom.

1.3. *Cryphonectria parasitica* Murril Barr

Cryphonectria parasitica Murril Barr je nitasta, askomicetna, fitopatogena gljiva koja pripada razredu *Sordariomycetes*, redu *Diaporthales*, porodici *Cryphonectriaceae* (Rossman i sur. 2007). Uzročnik je raka kestenove kore koji oštećuje stabla kestena te uzrokuje njihovo propadanje i sušenje. Gljiva je vrlo agresivna i može zaraziti stabla bez obzira na njihovu vitalnost i dob (Novak-Agbaba i sur. 2000). Osim što je patogen na kestenima (*Castanea* spp.), zaražava i stabla drugih rodova i vrsta, naročito vrste roda *Quercus* (OEPP/EPPO 2005).

1.3.1. Životni ciklus

Gljiva *C. parasitica* razmnožava se nesporno i spolno (Slika 3). Nesporno se razmnožava konidijama ili dijelovima micelija, dok se spolno razmnožava askosporama (Marra i Milgroom 2001). Odabir načina razmnožavanja ovisi o okolišnim čimbenicima kao što su dostupnost nutrijenata, temperatura i svjetlo. Askospore i konidiospore (konidije) prenose se vjetrom, kišom, pticama, ali i ljudskom nepažnjom. Značajan broj kukaca provodi dio svog životnog ciklusa na rakovima kestena pa su i oni važni kao vektori u prijenosu bolesti (Russin i sur. 1984). I spolne i nespodne spore ulaze kroz otvorene rane na kori kestena koje su napravili kukci, te kliju zaražavajući i uništavajući zdravi vaskularni kambij kestena.

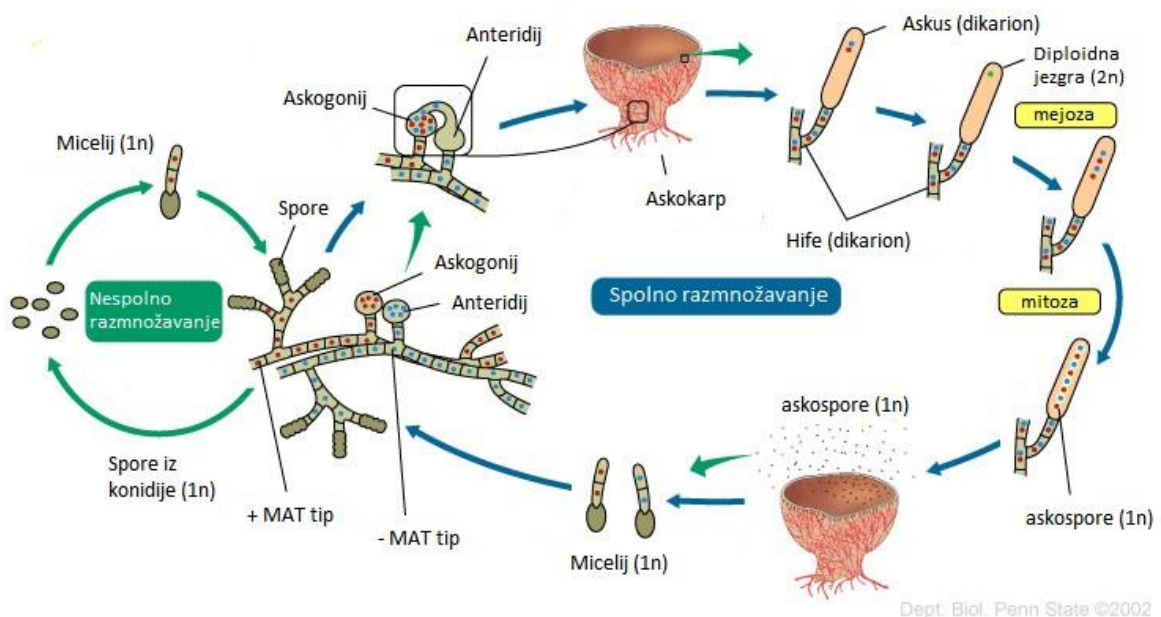
Nesporno razmnožavanje

C. parasitica nesporno se razmnožava pomoću konidiospora, nespornih spora koje nastaju mitozom i koje su genetički identične kao i micelij. To su male, jednostanične spore koje se razvijaju u konidioforima, specijaliziranim hifama koje ih nose. Budući da su konidije genetički identične kao i micelij, ne pridonose raznolikosti populacije gljive *C. parasitica*.

Spolno razmnožavanje

Prilikom spolnog razmnožavanja dolazi do razvitka askogonija i anteridija. Askogonij predstavlja žensku rasplodnu strukturu i on nakon plazmogamije prihvata jezgru iz anteridija. Plazmogamijom nastaje jedna stanica s dvije haploidne jezgre (dikarionska stanica), iz koje se razvija askogeni micelij. Nakon nekog vremena događa se kariogamija, jezgre se spajaju pri čemu nastaje jedna diploidna jezgra. Od jedne diploidne jezgre nastane 8 haploidnih jezgara (mejozom diploidne jezgre nastanu četiri koje se kasnije podijele mitozom) te se formiraju askospore, spolne spore koje se nalaze u askusu. Iz askospora se razvije haploidni micelij te spolni ciklus kreće iznova (Slika 3).

U gljive *C. parasitica* spolno razmnožavanje kontrolira se pomoću dialelnog *MAT* lokusa na kojem mogu biti aleli *MAT1-1* ili *MAT1-2*. Taj lokus kontrolira proces oplodnje, određene korake sparivanja i *MAT* – specifične ferohormone i receptore (Kües i Casselton 1992, Marra i Milgroom 2001). Sparivanje je moguće samo između jedinki koje imaju suprotne *MAT* alele (idiomorfe), *MAT-1* ili *MAT-2*. *Cryphonectria parasitica* je heterotalična (dvodomna) gljiva u koje se često događa samooplodnja u prirodi. Međutim, u laboratorijskim uvjetima rijetko dolazi do samooplodnje zbog spolne nekompatibilnosti gameta. Pretpostavlja se da je do ovog proturječja moglo doći zbog diparentalnog inbreeding-a, sparivanja blisko srodnih gljiva u prirodi (Marra i Milgroom 2001, Montenegro i sur. 2008).



Slika 3. Životni ciklus gljiva iz koljena Ascomycota
(Preuređena slika, online.science.psu.edu)

1.3.2. Simptomi raka kestenove kore

Gljiva *C. parasitica* zaražava zdravo kambijsko tkivo kestena. Spore gljive prodiru ispod kore kroz otvorene rane na površini, kliju i dopiru do unutrašnjosti gdje tvore svijetlosmeđi micelij koji se može vidjeti ukoliko se odstrani vanjski dio kore. Micelij može preživjeti više od 10 mjeseci u suhoj kori (Hepting 1974). Širenje raka uzrokuje oštećenje kambija zbog čega se narušava prohodnost provodnih elemenata. U namjeri da se zaštiti od napada patogena i da zatvori napadnuto mjesto, stablo kestena odgovara pojačanom diobom stanica. Budući da se ne uspijeva zaštititi, dolazi do sušenja, nekroze i odumiranja distalnih dijelova stabla kestena. Zaraza ne zahvaća korijen stabla zbog čega izdanci mogu nicati iznova (Heiniger i Rigling 1994). Simptomi su vidljivi na granama i lišću koje se suši. Plodovi kestena ne podliježu zarazi pa infekcija ne utječe na klijanje i rast sjemenke, dok se gljiva povezuje samo s bodljikavom ljuskom kestena (Jaynes i DePalma 1984).

Simptomi bolesti na kori kestena su varijabilni, a raspon boje kore kreće se od svijetlosmeđe, žućkastosmeđe ili narančaste do crvenosmeđe (OEPP/EPPO 2005). Mogu se zapaziti tri oblika raka: aktivni rak, kalusirajući rak i površinske nekroze (Halambek 1991). Virulentan soj gljive *C. parasitica* uzrokuje aktivni rak (Slika 4). Prepoznaje se po uzdužno raspucaloj kori, otvorenim ranama, tamnožutom lepezastom miceliju ispod kore i nastalim izbojcima ispod mjesta infekcije. Na tom području vidljiva su i brojna žutosmeđa plodna tijela gljive *C. parasitica* (Slika 4) (Novak-Agbaba i sur. 2000).



Slika 4. Aktivni rak kestenove kore s plodnim tijelima gljive *C. parasitica*
(www.cabi.org)

Dok u aktivnom raku zaraza brzo prodire do kambija, u površinskim nekrozama infekcija vrlo sporo napreduje i ne prodire do kambijskog tkiva. U površinskoj nekrozi kora je hrapava, a deblo na mjestu zaraze zadebljano (Slika 5). Uzročnik ovakvih nekroza je hipovirulentni soj gljive *C. parasitica* koji, za razliku od virulentnog soja, nije agresivan (Novak-Agbaba i sur. 2000). Ukoliko se virulentni soj gljive zarazi hipovirusom, dolazi do oporavka bolesnog stabla zatvaranjem rak rane, odnosno nastanka kalusa. Kalusirajući rak prepoznaje se po formiranom kalusnom staničju oko rak rane (Slika 6).



Slika 5. Površinska nekroza kore kestena
(www.wsl.ch)



Slika 6. Kalusirajući rak kesteneve kore
(Bryner i sur. 2014)

Hipovirulentni sojevi gljive zanimljivi su jer, za razliku od virulentnih sojeva, ne uništavaju stabla kestena. Za to je zaslužan virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) koji zaražava gljivu *C. parasitica* i smanjuje njen patogeni potencijal.

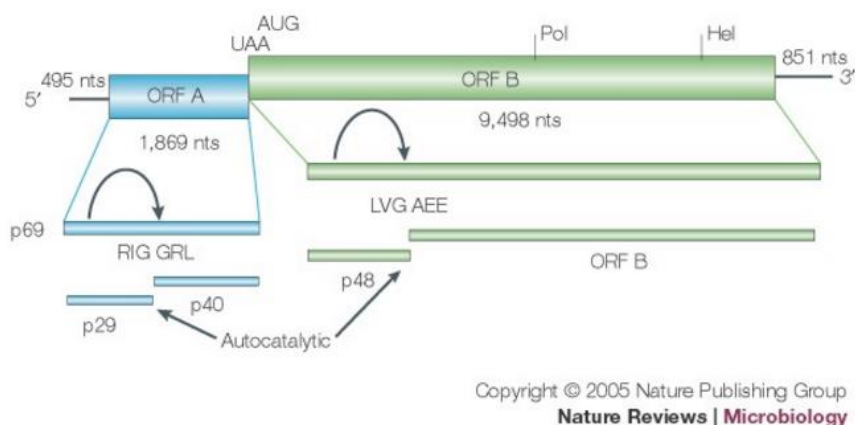
1.4. *Cryphonectria hypovirus 1* – uzročnik hipovirulencije

1.4.1. Karakteristike hipovirusa i njegov utjecaj na gljivu *C. parasitica*

Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1) pripada porodici *Hypoviridae*, rodu *Hypovirus*. Identificirano je pet različitih podtipova hipovirusa CHV1, a to su: španjolski CHV1-E, dva francuska CHV1-F1 i CHV1-F2, talijanski CHV1-I i njemački CHV1-D (Allemann i sur. 1999). CHV1 je virus bez kapside koji kao genom ima dvolančanu (ds)RNA veličine 12 712 pb (Bryner i sur. 2013, Feau i sur. 2014), nema strukturnih proteina i ne stvara virione, zrele infektivne virusne čestice. Pozitivni, kodirajući lanac CHV1 je poliadeniliran (ima poliA rep na 3' kraju) i sadrži dva kontinuirana otvorena okvira čitanja (ORF A i ORF B) koja kodiraju poliproteine koji se proteolitički cijepaju (Slika 7) (Choi i sur. 1991). Proksimalna kodirajuća domena 5', ORF A, kodira za dva polipeptida, p29 i p40, koja nastaju autoproteolitičkim cijepanjem poliproteina p69. Kod ekspresije ORF B također je uključeno autoproteolitičko cijepanje prilikom kojeg nastaje p48, polipeptid koji se odcjepljuje od N-terminalnog dijela kodiranog poliproteina (Slika 7). ORF A i ORF B odvojeni su 5'-UAAUG-3' sekvencom. UAA dio pentanukleotida predstavlja stop kodon ORF A regije, dok AUG dio predstavlja start kodon ORF B regije (Nuss 2005). Domene otvorenih okvira čitanja, ORF A i ORF B, dijele homologiju sekvence s biljnim jednolančanim (ss)RNA virusima iz roda *Potyvirus* (Koonin i sur. 1991), a poliadenilirani lanac je infektivan što odgovara strategiji replikacije ssRNA virusa (Dawe i Nuss 2001). Virus se nalazi unutar membranskih vezikula (promjera 50-80 nm) u citoplazmi gljive *C. parasitica*. CHV1 potiče proliferaciju vezikula u kojima se osim dsRNA virusa nalazi i RNA-ovisna RNA polimeraza (RdRp). Poznato je da je replikacija pozitivnog lanca RNA virusa usko povezana s unutarstaničnim membranama. Virus za svoju replikaciju koristi *trans*-Golgijevu mrežicu (TGN), a proteaza p29 ponaša se kao integralni membranski protein u vezikulama (Jacob-Wilk i sur. 2006).

U sojevima gljive *C. parasitica* zaraženih CHV1 hipovirusom, reducirana je virulencija, spolna i nesporna sporulacija te je smanjena proizvodnja pigmenta zbog čega su gljive u kulturi bijele, a ne žute boje (Milgroom i Cortesi 2004, Bryner i sur. 2013). Međutim,

virus ima malo ili nimalo utjecaja na rast gljive u kulturi. Vidljivi simptomi povezani su sa smanjenim nakupljanjem mRNA i proteina domaćina. Okarakterizirana su četiri gena domaćina koja kodiraju za takve mRNA, a to su dva gena koja kodiraju spolni feromon gljive (*Vir1* i *Vir2*), gen koji kodira izvanstaničnu lakazu (*Lac1*) i gen koji kodira hidrofofin (*Crp*) koji se nalazi u staničnoj stijenci gljive. Virus nema velikog utjecaja na ekspresiju ostalih proteina gljive. Pretpostavlja se da virus koordinirano smanjuje ekspresiju ova četiri gena i da su oni najvjerojatnije povezani u regulatornoj kaskadi (Kazmierczak i sur. 1996). Virusni elementi prisutni u hipovirulentnim sojevima gljive *C. parasitica* djeluju na brojne procese u gljivi, uključujući i interakcije domaćin – patogen, selektivno modulirajući ekspresiju specifičnih gena i regulatorne putove u gljivi (Nuss 1992).



Slika 7. Shematski prikaz genetičke organizacije i osnovne strategije ekspresije hipovirusa CHV1 (Nuss 2005)

Postoje genetičke varijacije u virulenciji CHV1 hipovirusa i varijacije u otpornosti gljive *C. parasitica*. U virusa se kao primjer mogu navesti CHV1/EP713 i CHV1/Euro7. CHV1/EP713 uzrokuje jaču redukciju fitnesa gljive *C. parasitica* i puno ozbiljnije simptome (jaču redukciju sporulacije i sporiji rast raka na stablima) od CHV1/Euro7 (Chen i Nuss 1999, Peever i sur. 2000). Jako virulentni sojevi virusa su rijetki, a pretpostavlja se da se to događa zbog jake supresije sporulacije i rasta gljive pri čemu se smanjuje mogućnost prijenosa virusa i njegov opstanak u populacijama gljive *C. parasitica* (Milgroom i Cortesi 2004, Sotirovski i sur. 2011). Varijacija u odgovoru gljive *C. parasitica* na infekciju hipovirusom CHV1 zabilježena je u nekoliko istraživanja. Hipovirulentni sojevi gljive iz Europe i Sjeverne Amerike pokazali su različite razine hipovirulencije u testu patogenosti koje se kreću od nevirulentnih do onih sa skoro normalnom virulencijom koji izazivaju bolest na stablima

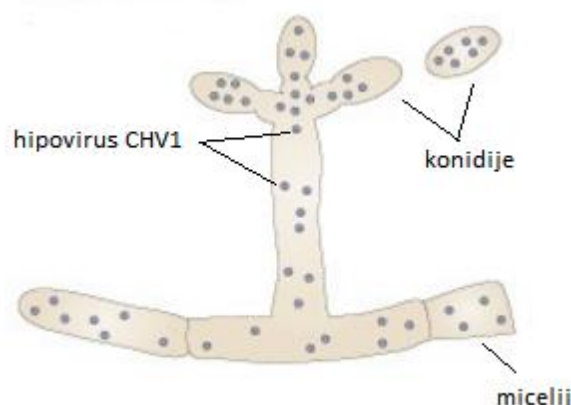
kestena (Fulbright i sur. 1983, Elliston 1985a). Kod odgovora gljive na infekciju virusom, osim genotipa virusa, jako je važan i genotip gljive.

1.4.2. Načini prijenosa hipovirusne dsRNA

Za razliku od biljnih i animalnih virusa koji imaju i unutarstaničnu i izvanstaničnu fazu, virusi koji napadaju gljive imaju samo unutarstaničnu fazu u svom replikacijskom ciklusu (Wickner 2001). Zbog toga je njihov prijenos ograničen na unutarstanične mehanizme kao što su razmjena citoplazme tijekom anastomoze (fuzije) hifa gljiva - horizontalni prijenos, ili prijenos nespolnim sporama - vertikalni prijenos (Choi i sur. 2012). Nije zabilježen vertikalni prijenos virusa spolnim sporama (Liu i Milgroom 1996).

Vertikalni prijenos

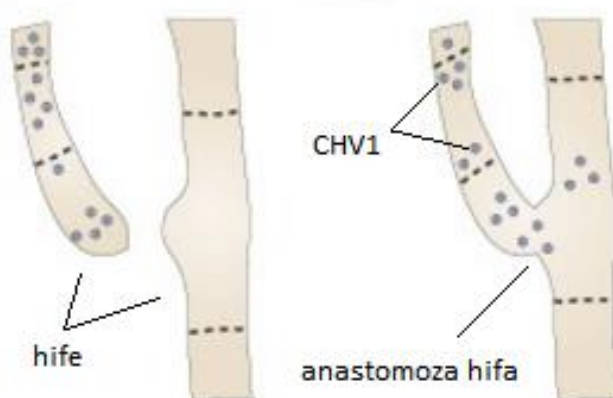
Hipovirus CHV1 može se prenijeti vertikalno iz micelija do konidija (Slika 8) koje se onda mogu širiti na druge rakove utječući tako na virulenciju sojeva gljive unutar raka (Liu i Milgroom 1996). Konidije kliju i prodiru ispod kore kestena te anastomozom hifa mogu prenijeti virus u već prisutne virulentne sojeve gljive, reducirajući na taj način njihov patogeni potencijal. Nažalost, stvaranje konidija u hipovirulentnim sojevima gljive je smanjeno i hipovirus CHV1 prenosi se samo u određeni broj konidija (Elliston 1985b). Virus se ne prenosi vertikalno askosporama niti su nađeni hipovirulentni sojevi gljive koji proizvode peritecij (plodno tijelo s askusima) (Liu i Milgroom 1996).



Slika 8. Vertikalni prijenos hipovirusa CHV1 konidijama (nespolnim sporama)
(Preuređena slika, Nuss 2005)

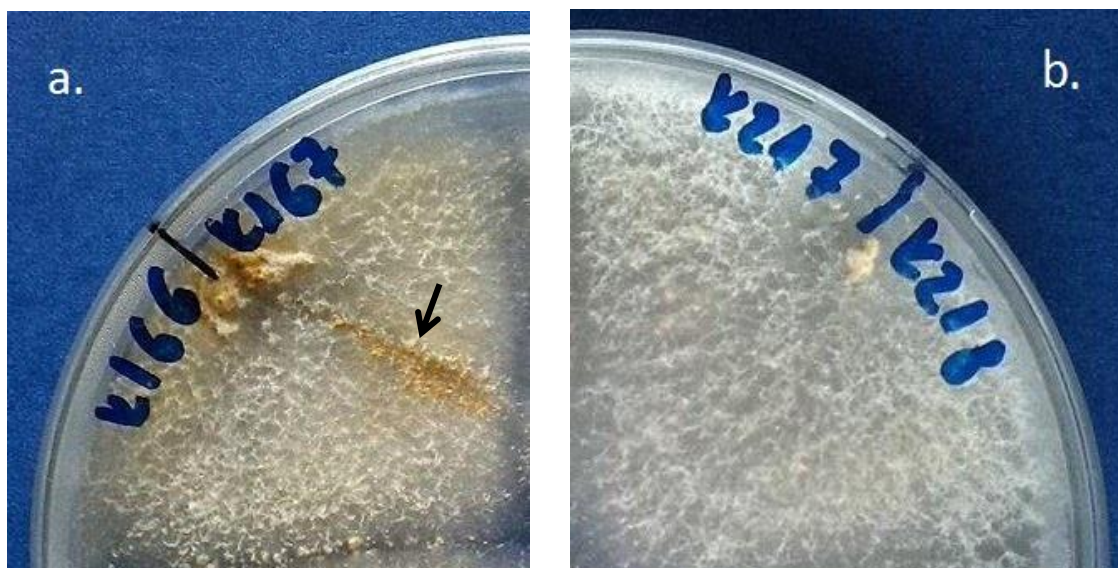
Horizontalni prijenos

Hipovirus CHV1 također može biti i horizontalno prenesen između jedinki gljive miješanjem njihove citoplazme prilikom anastomoze hifa (Slika 9). Horizontalni prijenos virusa omogućen je između sojeva koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC) (Cortesi i sur. 2001). Sustav vegetativne (heterokarionske) kompatibilnosti regulira formiranje heterokariona (višejezgrene stanice) i prijenos citoplazmatskih elemenata između jedinki gljive, a kontroliran je s najmanje šest *vic* lokusa (Cortesi i Milgroom 1998, Choi i sur. 2012). Prijenos hipovirusa CHV1 može se dogoditi i između sojeva gljive koji pripadaju različitom VC tipu, ali heteroalelizam na jednom ili više *vic* lokusa značajno smanjuje razinu prijenosa (Cortesi i sur. 2001, Papazova-Anakieva i sur. 2008). Dakle, ukoliko se broj heteroalelnih lokusa povećava, smanjuje se mogućnost prijenosa virusa među sojevima gljive (Liu i Milgroom 1996). Različiti *vic* geni imaju različit učinak na prijenos virusa pa isto tako razlika u jednom *vic* lokusu između VC tipova može spriječiti prijenos, dok se ponekad u slučaju razlike u dva *vic* lokusa između VC tipova virus može prenijeti (Huber i Fulbright 1992, Liu i Milgroom 1996). Kod anastomoze hifa gljiva različitog VC tipa dolazi do formiranja nestabilnog heterokariona i kaskade biokemijskih reakcija koje dovode do programirane stanične smrti zbog čega se virus ne može prenijeti iz jedne jedinice u drugu (Glass i Kaneko 2003). Ukoliko takve gljive rastu zajedno u kulturi, baražna linija formira se duž zone njihovog kontakta (Slika 10) (Choi i sur. 2012). Ako su jedinice kompatibilne, formira se heterokarionski micelij i ne dolazi do programirane stanične smrti. Takva anastomoza je stabilna i nema baražne linije (Slika 11).



Slika 9. Horizontalni prijenos hipovirusa CHV1 anastomozom hifa

(Preuređena slika, Nuss 2005)



Slika 10. Anastomoza između a) nekompatibilnih i b) kompatibilnih izolata gljive *C. parasitica*. (Baražna linija označena je strelicom.)
(Autorske fotografije)

1.4.3. Poteškoće prilikom prijenosa hipovirusa

Postoji nekoliko razloga zbog kojih je otežan prijenos hipovirusa CHV1 kroz populaciju gljive *C. parasitica*, što negativno utječe na ozdravljenje zaraženih stabala kestena. Glavni razlog je vegetativna nekompatibilnost između sojeva gljive različitog VC tipa. Ne dolazi do stabilne anastomoze hifa zbog čega je onemogućen prijenos virusa. Prijenos je otežan i zbog toga što hipovirulentni sojevi gljive proizvode manje nespolnih konidija od virulentnih sojeva te se virus vertikalno prenosi u samo određen broj konidija zbog čega značajan broj konidija hipovirulentnih izolata ne daje bijele kulture gljive *C. parasitica*. Još jedan od razloga je i taj što se virus ne prenosi vertikalno spolnim askosporama koje su odgovorne za prijenos na velike udaljenosti. Nije u potpunosti jasno kako su se hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* uspjeli proširiti po cijeloj Europi unatoč svim navedenim poteškoćama (Bisseger i sur. 1996).

1.5. Biološka kontrola raka kestenove kore

Hipovirus CHV1 se od jedne do druge jedinice prenosi anastomozom hifa gljive *C. parasitica*. Takav način prijenosa hipovirulencije koristi se kao strategija za biološku kontrolu raka kestenove kore (Nuss 1992, Bissegger i sur. 1997). Međutim, hipovirus se uglavnom ne može prenositi između sojeva gljive koji pripadaju različitom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC), pa raznolikost VC tipova gljive ograničava njegovo širenje unutar populacije gljive *C. parasitica* i na taj način utječe na uspješnost biološke kontrole raka kestenove (Heiniger i Rigling 1994, Liu i Milgroom 1996). Uočen je i prijenos virusa između sojeva gljive različitog VC tipa, ali u jako niskoj frekvenciji (Papazova-Anakieva i sur. 2008).

Raznolikost VC tipova u europskoj populaciji gljive *C. parasitica* je mala, za razliku od američke populacije gdje je jako velika. Smatra se da je to glavni razlog zbog kojeg biološka kontrola raka kestenove kore nije uspjela u Sjevernoj Americi, dok je u Europi bila jako uspješna (Anagnostakis i sur 1986, Heiniger i Rigling 1994, Robin i Heiniger 2001). Raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica* u Europi veća je u područjima gdje je rak kestenove kore prisutan dulje vrijeme kao što su Italija, Francuska, Švicarska i neki dijelovi Španjolske (Robin i Heiniger 2001), dok je manja u područjima gdje je rak prisutan relativno kratko kao što su Portugal (Gouveia i sur. 2001), Švicarska sjeverno od Alpa (Hoegger i sur. 2000) i Njemačka (Robin i Heiniger 2001). U Europi je identificiran 31 VC tip gljive *C. parasitica* za kojeg su napravljeni testeri (Cortesi i Milgroom 1998), a ostala 33 VC tipa dobivena su križanjem između već postojećeg 31 VC tipa gljive te su dodani setu testera. Određeni su genotipovi za 64 EU testera koji uključuju šest *vic* gena (Robin i Heiniger 2001). U zapadnoj Francuskoj nađeni su novi VC tipovi koji se ne mogu objasniti s ovih šest *vic* lokusa te su napravljeni dodatni EU testeri (EU65 – EU74) (Robin i sur. 2000). Najzastupljeniji VC tipovi u Hrvatskoj su EU1, EU2 i EU12 (Krstin i sur. 2008).

Informacije o rasprostranjenosti i raznolikosti VC tipova jako su važne kako bi se primijenili odgovarajući hipovirulentni izolati za što uspješniju biološku kontrolu. Osim što se hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* šire prirodnim putem pridonoseći tako biološkoj kontroli raka kestenove kore, u rak se mogu inokulirati i umjetnim putem (Turchetti i Maresi 1988). Potrebno je odabrati mješavinu hipovirulentnih sojeva gljive koji pokazuju najbolji učinak na smanjenje patogenog potencijala gljive te s njom tretirati rak na zaraženim stablima kestena. Hipovirulentni sojevi prenose virus u virulentne sojeve gljive anastomozom hifa pri

čemu gljiva više ne uništava koru i kambij kestena. Na mjestu aktivnog raka formira se kalus i time dolazi do ozdravljenja stabla kestena.

Različiti podtipovi hipovirusa CHV1 nisu jednako virulentni pa se kod biološke kontrole mogu koristiti na različite načine. Na primjer, izolati podtipova CHV1-F1 i CHV1-F2 znatno reduciraju rast i sporulaciju gljive omogućavajući na taj način brzo zarastanje tretiranih rakova pa su jako vrijedni kod terapijskih tretmana individualnih rakova. Međutim, takvi podtipovi slabo se šire i teško održavaju u populaciji gljive *C. parasitica* pa se trebaju iznova inokulirati da bi se postigla visoka prevalencija hipovirulencije. Za razliku od izolata podtipova CHV1-F1 i CHV1-F2, izolati podtipa CHV1-I puno su pogodniji za klasičnu biološku kontrolu zbog toga što se sami održavaju u populaciji gljive *C. parasitica*. Zbog slabije virulencije, podtip CHV1-I ima veći ekološki fitness pa samim time i veću mogućnost širenja i održavanja u populaciji gljive *C. parasitica*. Iako je podtip CHV1-I slabiji od podtipova CHV1-F1 i CHV1-F2, on i dalje značajno reducira virulenciju gljive i omogućuje zarastanje raka (Bisseger i sur. 1997, Peever i sur. 2000, Heiniger i Rigling 2009, Robin i sur. 2010). Prema tome, da bi se populacije kestena zaštitile od razvoja bolesti, važno je i da se hipovirulentni sojevi održe u populaciji gljive *C. parasitica*, a naročito u kalusima čije su formiranje omogućili.

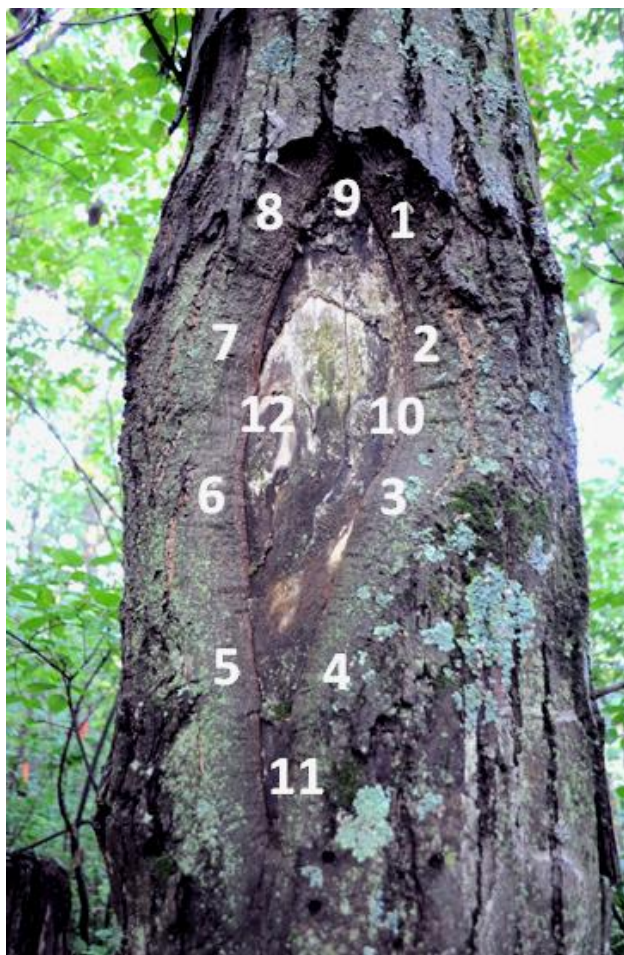
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ustanoviti prisutnost virusa *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) u različitim tipovima vegetativne kompatibilnosti (VC) izolata gljive *Cryphonectria parasitica* prikupljenih iz kalusa kestena na području Ozlja i Markuševca te odrediti VC tipove izolata gljive i prevalenciju virusa u pojedinim tipovima gljive koji se pojavljuju u kalusu i tkivu na granici kalusa i debla. Bitno je utvrditi opstaje li CHV1 i u kojoj mjeri u kalusima, te može li na taj način biti zaštita od ponovnih infekcija virulentnim gljivama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Prikupljanje i izolaciju uzoraka gljive *C. parasitica* iz kalusa kestena na području Ozlja i Markuševca obavili su prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica i dr. sc. Marin Ježić sa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koru iz kalusnog tkiva i tkiva na granici kalusa i debla uzorkovali su iz 24 kalusa (16 na području Ozlja i 8 na području Markuševca) prema predloženoj shemi na Slici 11. Iz kore su izolirali čiste kulture gljive *C. parasitica* te ih uzgojili na hranjivoj krumpirovoj podlozi (Potato Dextrose Agar, PDA). Sitne kockice čiste kulture svakog pojedinog izolata gljive *C. parasitica* pohranili su u sterilne Eppendorf mikroeprovete u 22%-tni glicerol te ih zamrznuli na -80 °C.



Slika 11. Predložena shema uzorkovanja kore kestena iz kalusnog tkiva (1-8) i tkiva na granici kalusa i debla (9-12).

(Preuređena slika, www.acf.org)

3.2. Uzgoj kultura izolata gljive *C. parasitica*

Sitne kockice kulture izolata gljive *C. parasitica* prethodno zamrznute u 22%-tnom glicerolu na -80 °C inokulirane su na hranjivu krumpirovu podlogu (Potato Dextrose Agar – PDA, Difco) u Petrijeve posudice (Medicplast; promjer 90 mm ili 60 mm). Agar je prethodno pripremljen prema uputama proizvođača na način da je 39 g PDA agra dodano u 1 L destilirane vode. Ta mješavina autoklavirana je 30 min na temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bara radi sterilizacije. Nakon autoklaviranja i kratkog hlađenja, tekući agar izliven je u sterilne Petrijeve posudice (Medicplast; promjer 90 mm ili 60 mm). Izlijevanje agra odvijalo se u laminaru, prostoru steriliziranom UV svjetlom u kojem je stalno prisutno strujanje zraka.

Inokulacija sitnih kockica kulture izolata gljive *C. parasitica* na ohlađeni PDA agar u Petrijeve posudice također se odvijala u laminaru u sterilnim uvjetima. Sitna kockica kulture svakog pojedinog izolata gljive pažljivo je izvučena sterilnom pincetom iz Eppendorf mikroepruvete i stavljena na sredinu nove Petrijeve posudice. Pinceta, kao i sav pribor koji se koristio, sterilizirana je 70%-tnim alkoholom i flambirana kako ne bi došlo do zagađenja plijesnima ili bakterijama iz okoline. Petrijeve posudice zatvorene su parafilmom da ne bi došlo do kontaminacije. Uzorci gljive inkubirani su pri sobnoj temperaturi u periodu od sedam dana u mraku, a zatim su nekoliko dana bili izloženi danjem svjetlu. Kulture gljive održavale su se precjepljivanjem, koje se provodilo u laminaru, tako da bi se pomoću sterilnog skalpela izrezao (ili sastrugao) komadić micelija i stavio na sredinu Petrijeve posudice, okrenut naopako kako bi micelij bio u doticaju s hranjivom podlogom.

3.3. Određivanje morfologije izolata gljive *C. parasitica*

Na temelju morfologije svježe izraslih kultura gljive određeni su virulentni i hipovirulentni izolati gljive. Hipovirulentni izolati prepoznati su po bijeloj do blijedo žutoj boji kulture jer imaju smanjenu proizvodnju pigmentacije zbog infekcije virusom CHV1, dok su virulentni sojevi prepoznati po žutoj do narančastožutoj boji micelija.

3.4. Izolacija hipovirusne dsRNA, RT-PCR i elektroforeza

Iz izolata gljive *C. parasitica* intermedijerne boje kulture (između bijele i žute) izolirana je dsRNA te je rađen RT-PCR i elektroforeza da bi se utvrdila prisutnost hipovirusa CHV1. Uzorci su presađeni na podlogu prekrivenu celofanom kako bi se mogla izolirati virusna dsRNA iz micelija. Izolacija dsRNA rađena je po protokolu Viral dsRNA extraction kit Protocol (www.abcsscientific.com/viral_RNA_plant). Oko 45 g micelija gljive usitnjeno je pomoću tučka u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. DsRNA izolirana je iz izolata K07 1 (K07- kalus iz kojeg je izolirana gljiva, 1- mjesto na kalusu iz kojeg je izolirana gljiva (Slika 11)), K14 3, K18 10, K22 6 i K23 7, a uspješnost izolacije dsRNA provjerena je pomoću agarozne gel elektroforeze. Korišten je 0,5%-tni agarozni gel (30 ml) na kojeg je nanošeno 10 µl svakog uzorka izolirane dsRNA, 5 µl markera GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher) i 5 µl markera GeneRuler High Range (10000-20000 pb, Thermo Fisher). U gel je prethodno dodano 0,3 µl boje GelStar (Lonza). Elektroforeza se odvijala u 1xTBE puferu tijekom 90 minuta pri 80 V. Rezultati elektroforeze vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru. Koncentracije izolirane dsRNA izmjerene su pomoću NanoDropa (Thermo Scientific).

Napravljene su dvije RT-PCR reakcije zbog toga što su u PCR-u korištena dva različita seta početnica: set EP713-5 (F- forward)/R2280 (R- reverse) koji je specifičan za jednu regiju u otvorenom okviru čitanja A (ORF A) virusa i set EP713-6 (F)/EP713-7 (R) specifičan za jednu regiju u ORF B virusa. Kao negativna kontrola u reverznoj transkripciji (RT) korištena je voda bez nukleaza ("*nuclease-free*"), a u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) destilirana voda. Kao pozitivna kontrola korištena je već izolirana dsRNA iz gljive CR23 za koju se znalo da ima virus. Pripremljeni su uzorci izolirane dsRNA koncentracije 25 ng/µl.

Reverzna transkripcija (RT) korištena je kako bi se iz izolirane dsRNA mogla dobiti cDNA koja se kasnije umnožava PCR reakcijom. Svaka reakcijska smjesa za RT sadržavala je 4 µl 5xGoScript reakcijskog pufera, 4 µl magnezijevog klorida (5 mM), 1 µl dNTP (0,5 mM svaki), 0,5 µl rekombinantnog RNazinog ribonukleotidnog inhibitora (20 U), 1 µl GoScript reverzne transkriptaze (RT), 4,5 µl vode bez nukleaza i 5 µl mješavine uzorka izolirane dsRNA i nasumičnih početnica (4 µl uzorka koncentracije 25 ng/µl i 1 µl početnica, odnosno 0,5 µg po reakciji). Priprema reakcijske smjese odvijala se na ledu. Uzorci s početnicama inkubirani su 5 minuta pri 70 °C radi denaturacije, nakon čega su premješteni na

led 5 minuta. Reakcijska smjesa inkubirana je 5 minuta pri 25 °C, zatim 60 minuta pri 42 °C i 15 minuta pri 70 °C, nakon čega je stavljena na led.

Kod lančane reakcije polimerazom (PCR-a) svaka reakcijska smjesa sadržavala je 5 µl 5xTaq reakcijskog pufera, 0,5 µl dNTP (0,5 mM svaki), 0,5 µl početnice F (10 µM), 0,5 µl početnice R (10 µM), 0,5 µl Taq polimeraze, 0,5 µl RT produkta (cDNA) i 17,5 µl destilirane vode. Reakcija se odvijala u sljedećim uvjetima: 2 minute početne denaturacije pri 94 °C, nakon čega je slijedilo 35 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije pri 94 °C tijekom 1 minute, sparivanja početnica s kalupom pri 55 °C tijekom 1 minute i 30 sekundi, i produljivanja lanca DNA pri 72 °C tijekom 2 minute. Završno produljivanje DNA trajalo je 10 minuta pri 72 °C.

Uspješnost PCR reakcije provjerena je pomoću agarozne gel elektroforeze. Korišten je 1%-tni agarozni gel (50 ml) na kojeg je nanošeno 5 µl svakog PCR produkta i 5 µl markera GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher). U gel je prethodno dodano 2,5 µl boje GelStar (Lonza). Elektroforeza se odvijala u 1xTBE puferu tijekom 68 minuta pri 100 V. Umnoženi fragmenti vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru.

3.5. Test vegetativne kompatibilnosti i određivanje VC tipova izolata gljive *C. parasitica*

Testom vegetativne kompatibilnosti prati se pojava anastomoze hifa i baražne linije na temelju čega se određuje jesu li određeni uzorci gljive kompatibilni ili nisu. Ukoliko su izolati gljive kompatibilni, njihovi miceliji su u potpunosti srasli što je karakteristično za stabilnu anastomozu. Kod nekompatibilnih izolata anastomoza je nestabilna pa duž linije njihovog kontakta dolazi do programirane stanične smrti i samim time do pojave baražne linije.

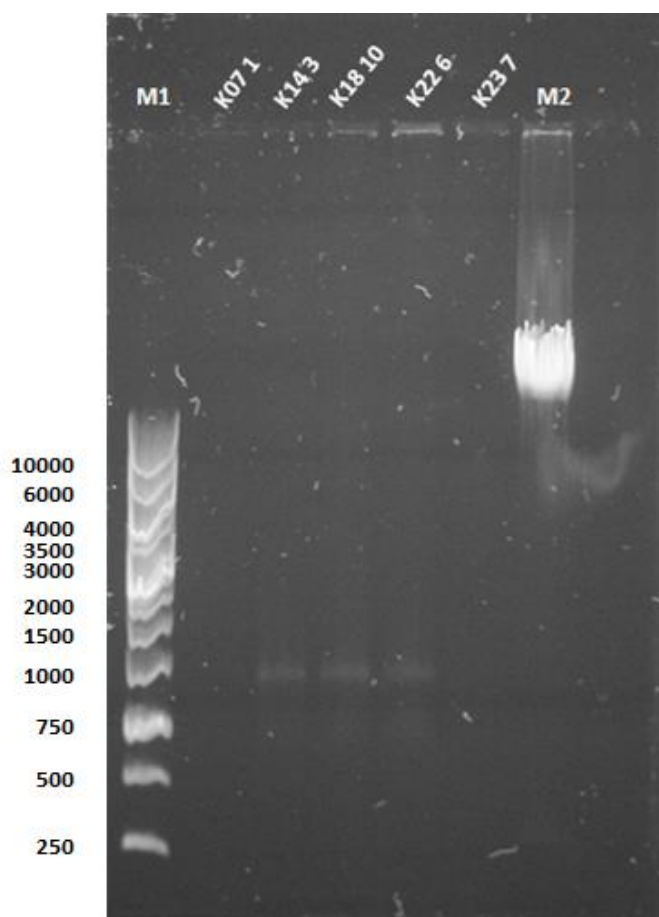
Izolati gljive iz svakog pojedinog raka međusobno su sparivani da bi se utvrdila njihova kompatibilnost. Nakon toga, izolati različitog VC tipa unutar pojedinog raka sparivani su sa standardnim europskim testerima EU1, EU2, EU12 i EU13 (poznati VC tipovi već prije nađeni u Hrvatskoj) da bi se odredio njihov VC tip, ukoliko bi to bilo moguće. Sparivanja su rađena u Petrijevim posudicama (promjer 90 mm) na hranjivoj krumpirovoj podlozi (PDA) na način da je micelij iz svježe kulture sastrugan sterilnim skalpelom i naciepljen blizu ruba Petrijeve posudice. Sparivani izolati međusobno su bili udaljeni 3–5 mm. U jednoj Petrijevoj

posudici rađeno je 6 sparivanja, a svako sparivanje rađeno je u triplicatu da bi se dobili što točniji rezultati. Kod određivanja VC tipova, sparivani tester i izolat također su bili međusobno udaljeni 3–5 mm, a u jednoj Petrijevoj posudici rađena su 4 sparivanja, a svako sparivanje rađeno je u duplikatu. Nakon nekoliko dana, moglo se vidjeti koji su izolati kompatibilni, a koji ne. Ukoliko bi rezultati bili nesigurni, testiranje bi se ponovilo. Kod ponovnih testiranja, u jednoj Petrijevoj posudici rađena su 4 sparivanja i svako ponovljeno sparivanje rađeno je također u duplikatu. Cijeli postupak provodio se u laminaru u sterilnim uvjetima.

4. REZULTATI

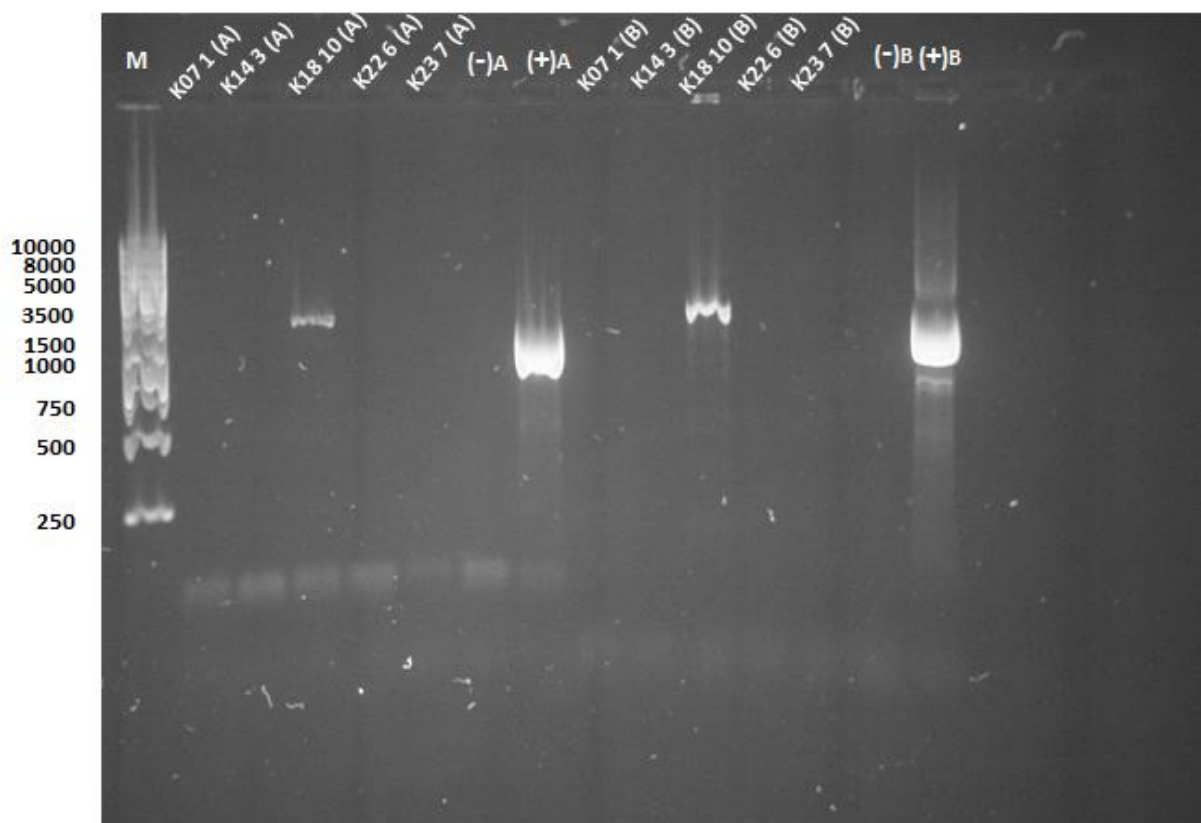
4.1. Prisutnost virusa u izolatima gljive *C. parasitica* u slučaju intermedijarne boje micelija

Iz izolata gljive koji su imali intermedijernu boju micelija (K07 1, K14 3, K18 10, K22 6 i K23 7) izolirana je dsRNA radi utvrđivanja prisutnosti virusa. Nakon izolacije dsRNA i agarozne gel elektroforeze, nije bila vidljiva niti jedna vrpca koja bi ukazivala na prisutnost hipovirusne dsRNA (Slika 12). Negativni rezultati mogli su se dobiti zbog male količine izolirane dsRNA koja nije bila dovoljna za vizualizaciju na gelu. Da bi se provjerila ta mogućnost, rađen je RT-PCR.



Slika 12. Elektroforeza uzoraka dsRNA izolirane iz micelija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Ozlja (K07 1 i K14 3) i Markuševca (K18 10, K22 6 i K23 7) u 0,5%-tnom agaroznom gelu. M1: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher), M2: GeneRuler High Range (10000-20000 pb, Thermo Fisher) - nije se uspio razdvojiti. Brojevi označavaju duljinu fragmenta u parovima baza.

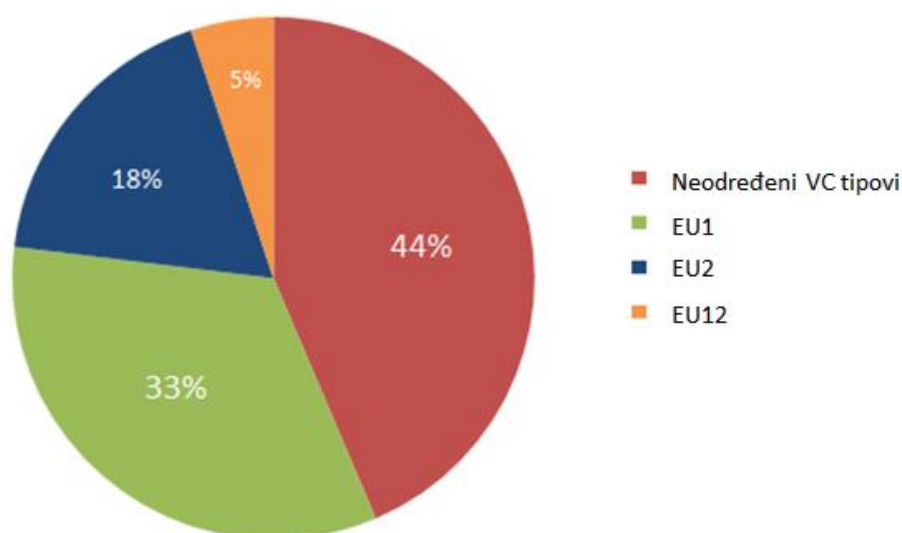
Nakon RT-PCR-a i agarozne gel elektroforeze, na gelu su bile vidljive dvije vrpce koje su ukazivale na prisutnost hipovirusa CHV1 u izolatu K18 10 (Slika 13). Budući da su rađene dvije RT-PCR reakcije, kod uzorka K18 10 u jednoj reakciji umnoženi su fragmenti regije u ORF A virusa, a u drugoj fragmenti regije u ORF B virusa. Korišteni su setovi početnica za obje regije jer se ponekad dogodi da se jedna od regija ne umnoži. Hipovirus nije bio prisutan u uzorcima K07 1, K14 3, K22 6 i K23 7.



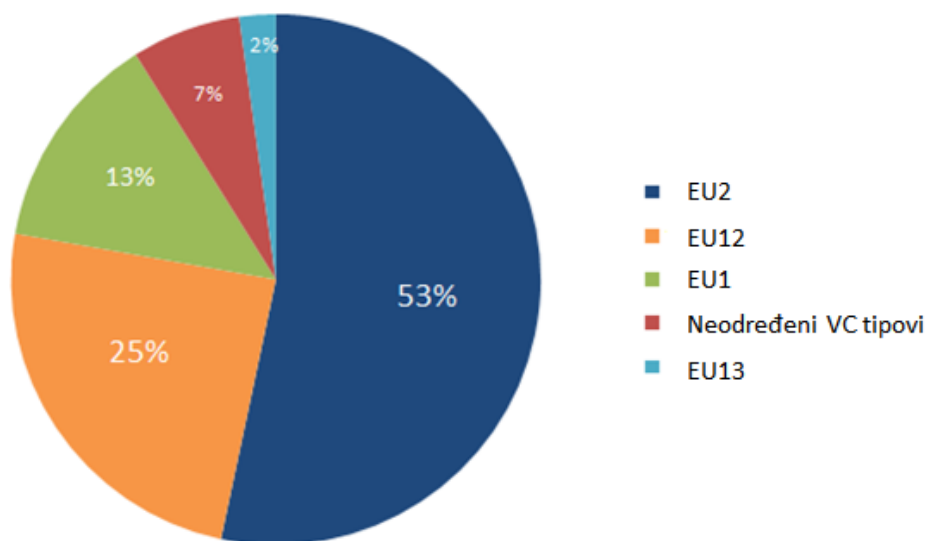
Slika 13. Elektroforeza RT-PCR produkata dobivenih umnožavanjem regije u ORF A (uzorci označeni slovom A) virusa i regije u ORF B virusa (uzorci označeni slovom B) iz dsRNA izolirane iz micelija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Ozlja (K07 1 i K14 3) i Markuševca (K18 10, K22 6 i K23 7) u 1%-tnom agaroznom gelu. (-): destilirana voda (negativna kontrola), (+): izolirana dsRNA iz gljive CR23 za koju se znalo da ima virus (pozitivna kontrola). M: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher). Brojevi označavaju duljinu fragmenta u parovima baza.

4.2. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* na području Ozlja i Markuševca

Pomoću standardnih europskih testera EU1, EU2, EU12 i EU13 određeni su tipovi vegetativne kompatibilnosti za 64 uzorka gljive *C. parasitica* s područja Ozlja i Markuševca, dok je tip vegetativne kompatibilnosti za 20 uzoraka ostao neodređen. U populaciji na području Ozlja najviše je izolata neodređenog VC tipa, čak 17 od ukupno 39. Od određenih VC tipova najzastupljeniji je EU1 sa 13 izolata, zatim EU2 sa 7 izolata i EU12 sa 2 izolata, dok nije zabilježen niti jedan EU13 VC tip (Slika 14). U populaciji na području Markuševca najzastupljeniji je EU2 sa 24 od ukupno 45 izolata, zatim EU12 sa 11 izolata, EU1 sa 6 izolata i EU13 sa 1 izolatom, dok su 3 izolata bila neodređenog VC tipa (Slika 15).



Slika 14. Zastupljenost VC tipova na području Ozlja



Slika 15. Zastupljenost VC tipova na području Markuševca

4.3. Zastupljenost virusa CHV1 u kalusima kestena

Analizom morfoloških karakteristika izolata gljive *C. parasitica* određeni su hipovirulentni i virulentni izolati gljive za svakog od 24 kalusa kestena s područja Ozlja i Markuševca te je ispitana vegetativna kompatibilnost između sojeva koji su nađeni unutar pojedinog kalusa da bi se procijenila mogućnost prijenosa virusa među gljivama. Uočeno je da se unutar pojedinog kalusa mogu nalaziti samo hipovirulentni sojevi gljive, samo virulentni sojevi ili njihova kombinacija. U 6 od ukupno 16 kalusa s područja Ozlja nađeni su samo hipovirulentni sojevi gljive, u 5 kalusa nađeni su samo virulentni sojevi, dok je u preostalih 5 kalusa nađena kombinacija hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive (Tablica 1). Od ukupno 8 kalusa s područja Markuševca, u 6 kalusa nađena je kombinacija hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive, dok su u preostala 2 nađeni samo virulentni sojevi. U Markuševcu nije nađen nijedan kalus sa samo hipovirulentnim sojevima gljive (Tablica 2). Gledajući sve kaluse ukupno, 25% kalusa ima samo hipovirulentne sojeve gljive, 29,16% kalusa ima samo virulentne sojeve, dok 45,84% kalusa ima kombinaciju hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive (Slika 16). Najviše različitih VC tipova gljive nađeno je u kalusima koji imaju kombinaciju hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive (Tablica 3 i Tablica 4).

Tablica 1. Morfološke karakteristike kultura gljive *C. parasitica* izoliranih iz kalusnog tkiva (1-8) i tkiva na granici kalusa i debla (9-12) iz kalusa kestena (K01A-K15) na području Ozlja te vegetativna kompatibilnost između sojeva nađenih unutar pojedinog kalusa. Hipovirulentni izolati označeni su slovom 'w' (*white*), a virulentni izolati označeni su slovom 'y' (*yellow*). Kompatibilni izolati unutar pojedinog kalusa označeni su tamnoplavom i svijetloplavom bojom. Kalusi u kojima su prisutni samo hipovirulentni sojevi gljive označeni su sivom bojom, kalusi u kojima su prisutni samo virulentni sojevi gljive žutom i kalusi koji imaju kombinaciju hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive zelenom bojom.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
K01A							y		w			
K01B								y	w	y		
K02			w					w ^a	w ^a	w		
K03				y	w		w		w			y
K04	w	y						w				
K05					y	y	y					
K06					w	w						
K07	y*								w	w		
K08			w	w	w			w				w
K09		w	w	w								
K10					w			w				
K11								y				
K12			y									
K13				w								
K14			y*									
K15					y			y				

* izolati u kojima je prisutnost virusa određena izolacijom dsRNA i RT-PCR-om

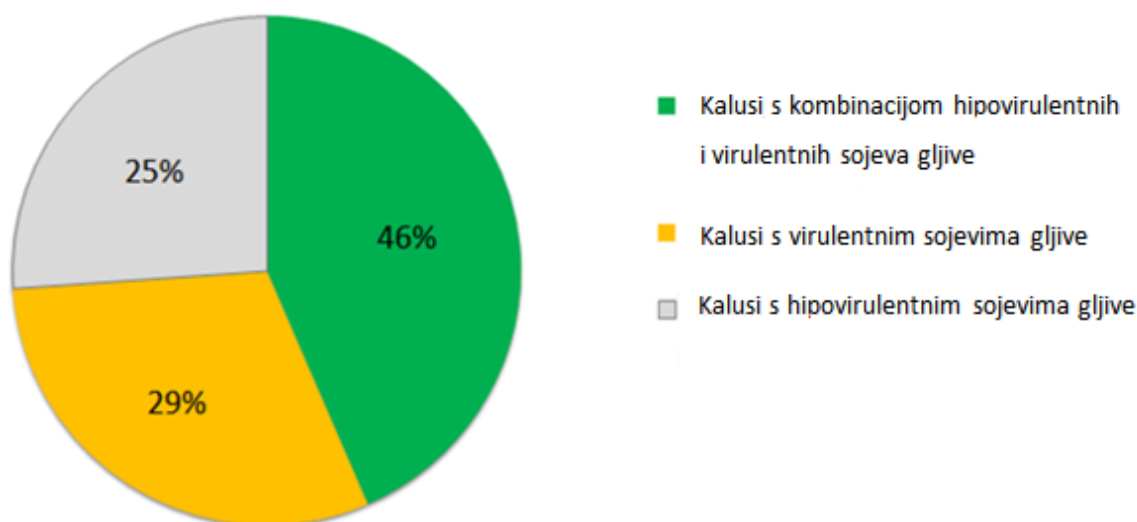
^a izolati koji nisu korišteni u ovom istraživanju (rezultati prethodnog istraživanja dr. sc. Marina Ježića)

Tablica 2. Morfološke karakteristike kultura gljive *C. parasitica* izoliranih iz kalusnog tkiva (1-8) i tkiva na granici kalusa i debla (9-12) iz kalusa kestena (K16-K23) na području Markuševca te vegetativna kompatibilnost između sojeva nađenih unutar pojedinog kalusa. Hipovirulentni i virulentni sojevi kao i kalusi i kompatibilni izolati unutar pojedinog kalusa označeni su kao u Tablici 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
K16				y		y	y	w			y	
K17					y	y	w	w				
K18	w	w	w	w	w	w	y		w	w*		
K19						y ^b			y		y	
K20	y			y			y	y				
K21	y	y	w	w		y	y	w	y	w		
K22	w	w				y*		w				
K23	w	y	y		w		y*	w	w	w		

* izolati u kojima je prisutnost virusa određena izolacijom dsRNA i RT-PCR-om

^b izolat izbačen iz istraživanja zbog toga što nije rastao



Slika 16. Udio kalusa kestena s područja Ozlja i Markuševca u kojima su prisutni samo hipovirulentni, samo virulentni ili kombinacija hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive *C. parasitica*.

Tablica 3. Broj različitih VC tipova u pojedinim kalusima kestena s područja Ozlja. Kalusi su označeni kao u Tablici 1.

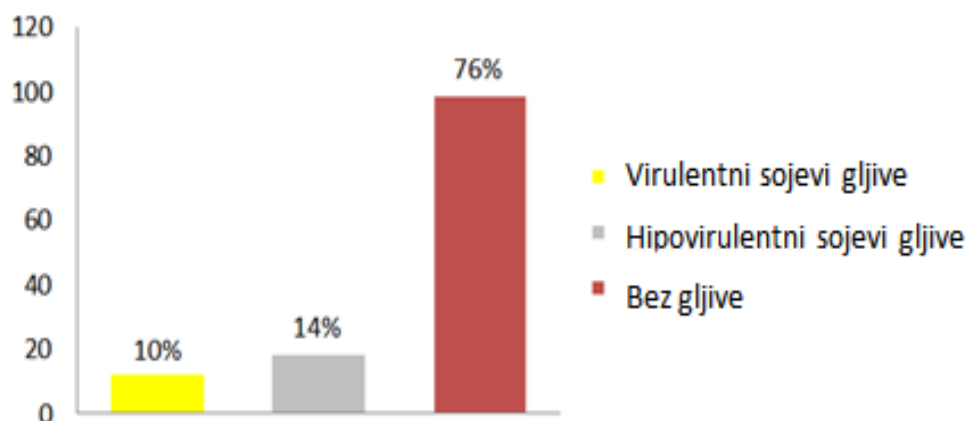
Kalus	K01A	K01B	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K08	K09	K10	K11	K12	K13	K14	K15
N (VC tipovi)	1	2	1	3	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Tablica 4. Broj različitih VC tipova u pojedinim kalusima kestena s područja Markuševca. Kalusi su označeni kao u Tablici 1.

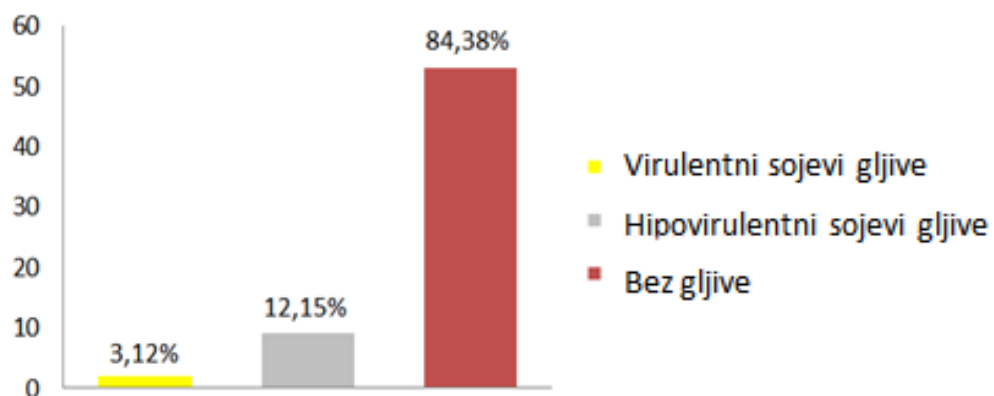
Kalus	K16	K17	K18	K19	K20	K21	K22	K23
N (VC tipovi)	3	2	3	1	1	1	1	1

Izolati gljive *C. parasitica* uzorkovani su iz tkiva kalusa i tkiva na granici kalusa i debla te je određena prisutnost hipovirulentnih i virulentnih sojeva za svako od tkiva. Gljiva nije izolirana iz svakog mjesta na kalusu iz kojeg se uzorkovalo tkivo. U kalusima kestena na području Ozlja, u tkivima kalusa nađeno je 10% virulentnih i 14 % hipovirulentnih sojeva gljive, dok u 76% slučajeva gljiva nije bila prisutna (Slika 17a). U tkivima na granici kalusa i debla nađeno je 3,12% virulentnih i 12,5% hipovirulentnih sojeva gljive, dok u 84,38% slučajeva gljiva nije bila prisutna (Slika 17b). U kalusima kestena na području Markuševca, u tkivima kalusa nađeno je 29,68% virulentnih i 28,12% hipovirulentnih sojeva gljive, dok u 42,2% slučajeva gljiva nije bila prisutna (Slika 18a). U tkivima na granici kalusa i debla nađeno je 12,5% virulentnih i 15,62% hipovirulentnih sojeva gljive, dok u 71,88% slučajeva gljiva nije bila prisutna (Slika 18b). U kalusima kestena na području Ozlja i Markuševca uglavnom dominiraju hipovirulentni sojevi, ali je značajna i zastupljenost virulentnih sojeva. Gljiva je više zastupljena u samom tkivu kalusa, nego u tkivu na granici kalusa i debla.

a.

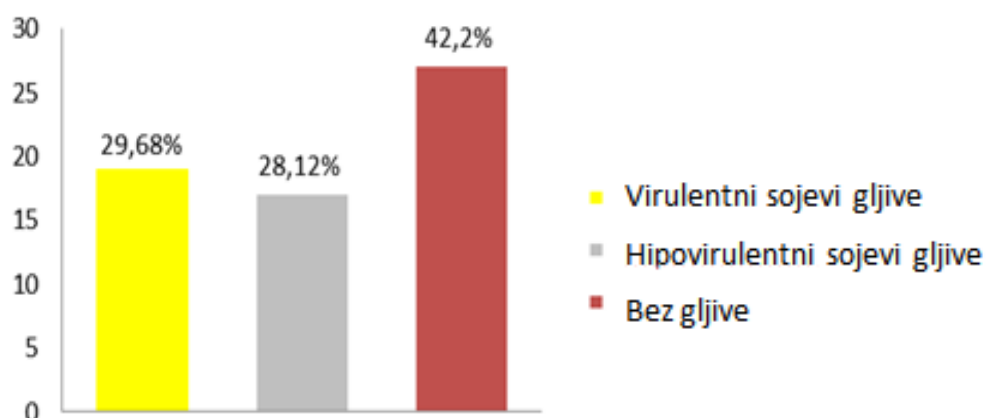


b.

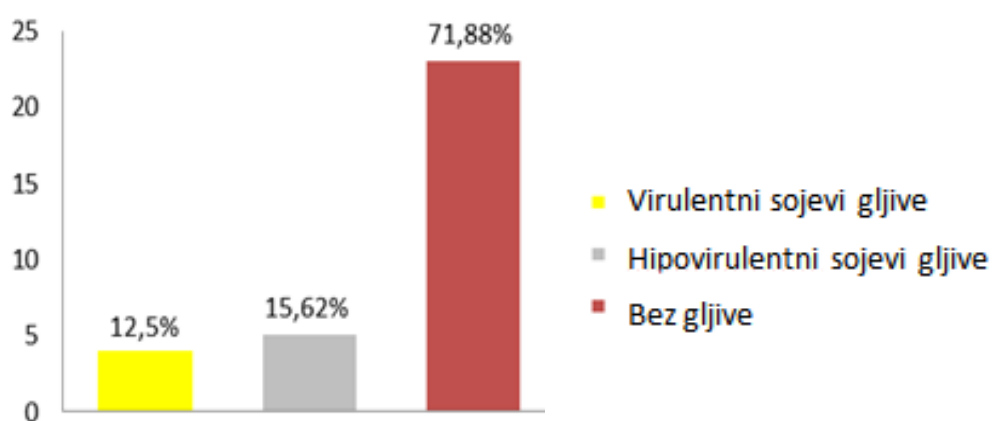


Slika 17. Zastupljenost virulentnih i hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* a) u tkivu kalusa i b) tkivu na granici kalusa i debla u kalusima kestena na području Ozlja. Gljiva nije izolirana iz svakog uzorka kore kalusa. Os y – broj uzoraka kore.

a.



b.



Slika 18. Zastupljenost virulentnih i hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* a) u tkivu kalusa i b) tkivu na granici kalusa i debla u kalusima kestena na području Markuševca. Gljiva nije izolirana iz svakog uzorka kore kalusa. Os y – broj uzoraka kore.

5. RASPRAVA

Hipovirus *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) prenosi se anastomozom hifa od jedne do druge gljive ukoliko te gljive pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC), tj. imaju identične alele na svim *vic* lokusima. Taj način prijenosa je jako bitan kod biološke kontrole jer se koristi kao strategija obrane protiv virusa (Nuss 1992, Bissegger i sur. 1997). U ovom istraživanju vegetativna kompatibilnost određivana je između izolata gljive iz svakog pojedinog kalusa da bi se procijenila mogućnost prijenosa virusa među gljivama. Treba spomenuti i mogućnost da bi pojedini izolati mogli biti uzorci micelija iste gljive. U pojedinim kalusima (npr. K08, K09) svi izolati gljive bili su kompatibilni i hipovirulentni što ukazuje na to da se virus anastomozom hifa prenio u svaku gljivu unutar kalusa ili da se radi o jednom velikom hipovirulentnom miceliju uzorkovanom na više mjesta. U nekim kalusima (npr. K04, K07) primijećeno je da su hipovirulentni izolati bili kompatibilni – došlo je do prijenosa virusa, dok se virus nije prenio u virulentne izolate koji su bili drukčijeg VC tipa. Međutim, zamijećeni su kalusi (K21, K22, K23) u kojima su hipovirulentni izolati bili istog VC tipa kao i virulentni, ali između njih nije došlo do prijenosa virusa koji bi inače trebao biti omogućen među sojevima gljive istog VC tipa. Pretpostavlja se da je moglo doći do oslabljenja hipovirulentnih sojeva u kalusu čime je omogućena invazija virulentnih sojeva ili da su dijelovi prethodno hipovirulentnog micelija izgubili virus. Najviše različitih VC tipova gljive nađeno je u kalusima koji imaju kombinaciju hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive što je očekivano i objašnjava činjenicu zašto se virus nije prenio u virulentne sojeve. VC tipovi određeni su za pojedine izolate gljive *C. parasitica*. Za određivanje VC tipova gljive korišteni su tester EU1, EU2, EU12 i EU13 jer su najzastupljeniji u Hrvatskoj (Krstin i sur. 2008). U populaciji kestena na području Ozlja u 56% izolata gljive određeni su VC tipovi, od kojih je najzastupljeniji bio EU1, dok u ostalih 44% VC tip nije bio utvrđen. U populaciji na području Markuševca samo 7% izolata bilo je neodređenog VC tipa, dok je VC tip bio određen za ostalih 93% od kojih je najzastupljeniji bio EU2. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je raznolikost VC tipova veća na području Ozlja gdje je, uz očekivane VC tipove, velika zastupljenost i nekih drugih VC tipova.

Određena je prevalencija virusa u gljivama koje se pojavljuju u samom kalusu i tkivu na granici kalusa i debla. Virulentni i hipovirulentni sojevi gljive nisu nađeni u više od polovice uzoraka kore izoliranih iz kalusa kestena. Dakle, gljiva naseljava samo dio površine kalusa. U kalusima kestena na području Ozlja u samom tkivu kalusa kao i u tkivu na granici

kalusa i debla veća je zastupljenost hipovirulentnih nego virulentnih sojeva gljive, mada ta razlika i nije toliko velika u samom tkivu kalusa (14% - hipovirulentni, 10% - virulentni). U kalusima kestena na području Markuševca u tkivu između kalusa i debla razlika u zastupljenosti hipovirulentnih i virulentnih sojeva je jako mala i ide u korist hipovirulentnih sojeva (15,62% - hipovirulentni, 12,5% virulentni), dok u samom tkivu kalusa dominiraju virulentni sojevi, mada s malom razlikom (29,68% - virulentni, 28,12% - hipovirulentni). Iako je ukupno u kalusima nađeno malo više hipovirulentnih nego virulentnih izolata gljive *C. parasitica*, neočekivano je velika zastupljenost virulentnih sojeva što predstavlja opasnost od mogućih ponovnih širenja infekcija i razvitka bolesti. Može se uočiti da je odnos hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive jako dinamičan unutar kalusa kestena.

U ovom istraživanju po prvi put je uočeno da se u kalusima kestena mogu nalaziti virulentni sojevi gljive *C. parasitica* s visokom stopom pojavnosti. Na području Ozlja i Markuševca 45,84% ispitivanih kalusa u svom tkivu imalo je kombinaciju virulentnih i hipovirulentnih sojeva gljive, dok ih je čak 29,16% imalo samo virulentne sojeve. To je jako velik postotak s obzirom da virulentni (agresivni) sojevi gljive zaražavaju zdravo kambijsko tkivo kestena uzrokujući tako aktivni rak kestenove kore koji uništava stabla kestena. Kalus nastaje ukoliko se virulentni sojevi gljive unutar aktivnog raka zaraze hipovirusom CHV1, koji reducira patogeni potencijal gljive, pri čemu dolazi do oporavka bolesnog stabla zatvaranjem rane. Prema tome, u kalusu bi se trebali nalaziti hipovirulentni sojevi gljive jer oni omogućuju formiranje samog kalusa. Postavlja se pitanje zašto je toliko velika zastupljenost kalusa koji u svom tkivu imaju virulentne sojeve gljive.

Jedna od mogućnosti je ta da je hipovirulentna gljiva nakon nekog vremena izgubila virus i postala virulentna. Nuskern i sur. (2015) radili su istraživanje u kojem su *in vitro* prenijeli različite sojeve virusa u izolate gljive različitih VC tipova te su primijetili da je opstojnost virusa u miceliju akceptoru ovisila o tome pripadaju li donorski i akceptorski micelij istom ili različitom VC tipu. Ukoliko bi pripadali različitom VC tipu, nakon nekog vremena došlo bi do gubitka virusa. Pretpostavili su da je do gubitka virusa iz micelija moglo doći zbog njegove nedovoljne prilagodbe na novog domaćina koji je različitog VC tipa. Iako je prijenos virusa između gljiva različitih VC tipova otežan, on se puno češće događa u prirodi nego u laboratorijskim uvjetima pa bi to mogao biti i razlog gubitka virusa u kalusima kestena. U gljivi *C. parasitica* RNA interferencija služi kao mehanizam obrane od virusa pa bi ona mogla imati važnu ulogu u gubitku virusa iz micelija. Gljiva ima dva Dicer-like gena i četiri Argonaute-like gena, ali samo Dicer 2 (*dcl2*) i Argonaute 2 (*agl2*) potrebni su za obranu

od virusa (Segers i sur. 2007, Sun i sur. 2009). Prilikom infekcije virusom, u gljivi je značajno povećana ekspresija (12 – 20 puta) *dcl2* gena, a ekspresija je još veća (35 puta) ukoliko se gljiva zarazi CHV1 mutantom kojem nedostaje polipeptid p29 što ukazuje na to da p29 služi kao supresor RNA interferencije (Zhang i sur. 2008). Kod RNA interferencije protein Dicer cijepa endogene dsRNA pri čemu nastaju dvolančane siRNA (small interfering RNA, 21 – 24 nt) koje se ugrađuju u RISC kompleks (RNA-induced silencing complex). Taj RISC kompleks cilja i razgrađuje homologne RNA u citoplazmi (Tomari i Zamore 2005), a jedna od meta je i hipovirusna RNA.

Druga mogućnost mogla bi biti ta da se iz nekog razloga cijela hipovirulentna gljiva izgubila iz kalusa kestena i da se na njeno mjesto naselila nova virulentna gljiva koja bi ponovo mogla izazvati infekciju i ugroziti stablo kestena. Bez obzira na razlog gubitka virusa u kalusima, stablima kestena prijeti opasnost od ponovne infekcije i pojave aktivnog raka. Da bi se ustanovilo što se točno dogodilo i koji je razlog gubitka hipovirulencije, potrebno je pratiti promjene u kalusima kroz određeni vremenski period.

6. ZAKLJUČAK

Za 64 uzorka gljive *Cryphonectria parasitica* prikupljenih iz kalusa pitomog kestena *Castanea sativa* na području Ozlja i Markuševca određeni su tipovi vegetativne kompatibilnosti (VC), dok je tip vegetativne kompatibilnosti za 20 uzoraka ostao neutvrđen. Na području Ozlja najzastupljeniji VC tip je EU1, dok je na području Markuševca dominantan VC tip EU2. Raznolikost VC tipova veća je na području Ozlja.

U pojedinim kalusima nije došlo do prijenosa virusa *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) između hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* istog VC tipa zbog mogućeg slabljenja hipovirulentnih sojeva u kalusu čime je omogućena opstojnost virulentnih sojeva.

Odnos hipovirulentnih i virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* jako je dinamičan unutar kalusa kestena. U kalusima uglavnom dominiraju hipovirulentni sojevi gljive, ali je velika zastupljenost i virulentnih sojeva koji bi ponovno mogli izazvati bolest.

Virulentni sojevi gljive *C. parasitica* u kalusima pitomog kestena pojavljuju se u visokoj stopi. Mogući razlozi za to su spontani gubitak virusa iz hipovirulentnih sojeva gljive koji postaju virulentni ili gubitak cijele hipovirulentne gljive na čije se mjesto naselila nova virulentna gljiva koja bi mogla izazvati infekciju i uništiti stablo kestena.

Da bi se ustanovio razlog gubitka hipovirulencije, potrebno je pratiti promjene u kalusima kestena kroz određeni vremenski period.

7. LITERATURA

- Allemann C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 843 – 854.
- Anagnostakis S. L. (1982): Biological control of chestnut blight. *Science* 215: 466 – 471.
- Anagnostakis S. L., Hau B., Kranz J. (1986): Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70: 536 – 538.
- Anagnostakis S. L. (1987): Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79: 23 – 37.
- Bisseger M., Rigling D., Heiniger U. (1997): Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* 87: 50 – 59.
- Blomhoff R., Carlsen M. H., Andersen L. F., Jacobs D. R. (2006): Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* 96: 52 – 60.
- Borges O., Gonçalves B., Soeiro de Carvalho J. L., Correia P., Silva A. P. (2008): Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry* 106: 976 – 984.
- Bounous G., Marinoni D. T. (2005): Chestnut: Botany, horticulture, and utilization. *Horticultural Reviews* 31: 291 – 347.
- Bryner S. F., Sotirovski K., Akilli S., Risteski M., Perlerou C., Rigling D. (2013): Informative value of canker morphology on the presence or absence of virus infection in chestnut blight cankers. *Forest Pathology* 43: 496 – 504.
- Bryner S. F., Prospero S., Rigling D. (2014): Dynamics of *Cryphonectria hypovirus* infection in chestnut blight. *Forest Pathology* 43: 496 – 504.
- Chen B., Nuss D. L. (1999): Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1/Euro7: a comparative virology approach to investigate virus – mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 73: 985 – 992.

- Choi G. H., Shapira R., Nuss D. L. (1991): Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 1167 – 1171.
- Choi G. H., Dawe A. L., Churbanov A., Smith M. L., Milgroom M. G., Nuss D.L. (2012): Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 190: 113 – 127.
- Cortesi P., Milgroom M. G. (1998): Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2988 – 2994.
- Cortesi P., McCulloch C.E., Song H., Lin H., Milgroom M. G. (2001): Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159: 107 – 118.
- Dawe A. L., Nuss D. L. (2001): Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35: 1 – 29.
- Elliston J. E. (1985a): Characteristics of dsRNA – free and dsRNA – containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75: 151 – 158.
- Elliston J. E. (1985b): Further evidence for two cytoplasmic hypovirulence agents in a strain of *Endothia parasitica* from western Michigan. *Phytopathology* 75: 1405 – 1413.
- Feau N., Dutech C., Brusini J., Rigling D., Robin C. (2014): Multiple introductions and recombination in *Cryphonectria hypovirus* 1: perspective for a sustainable biological control of chestnut blight. *Evolutionary Applications* 7: 580 – 596.
- Fulbright D. W., Weidlich W. H., Haufler K. Z., Thomas C. S., Paul C. P. (1983): Chestnut blight and recovering American chestnut trees in Michigan. *Canadian Journal of Botany* 61: 3164 – 3171.
- Glass N. L., Kaneko I. (2003): Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2: 1 – 8.

- Gouveia M. E., Cordoso P., do Loreto Monteiro M. (2001): Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatibility type of *Cryphonectria parasitica* in Tras-os-Montes (Portugal). *Forest Snow and Landscape Research* 76: 387 – 390.
- Halambek M. (1991): Hipovirulentni sojevi *Cryphonectria parasitica* – nova mogućnost za oporavak pitomog kestena. *Radovi* 26: 223 – 240.
- Heiniger U., Rigling D. (1995): Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581 – 599.
- Heiniger U., Rigling D. (2009): Application of the *Cryphonectria hypovirus* (CHV1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland. *Acta Horticulturae* 815: 233 – 245.
- Hepting G. H. (1974): Death of the American chestnut. *Journal of Forest History* 18: 60 – 67.
- Hoegger P. J., Rigling D., Holdenrieder O., Heiniger U. (2000): Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycological Research* 104: 1108 – 1116.
- Huber D. H., Fulbright D. W. (1992): Preliminary investigations on the effect of individual vic genes upon the transmission of dsRNA in *Cryphonectria parasitica*. U: Double M. L., MacDonald W. L. (ur.) *Proceedings of the International Chestnut Conference*. Morgantown, WV, West Virginia University Press, str. 15 – 19.
- Jacob-Wilk D., Turina M., Van Alfen N. K. (2006): Mycovirus *Cryphonectria hypovirus* 1 elements cofractionate with trans – Golgi network membranes of the fungal host *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 80: 6588 – 6596.
- Jaynes R. A., DePalma N. K. (1984): Natural infection of nuts of *Castanea dentata* by *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 74: 296 – 299.
- Kazmierczak P., Pfeiffer P., Zhang L., Van Alfen N. K. (1996): Transcriptional repression of specific host genes by the mycovirus *Cryphonectria hypovirus* 1. *Journal of Virology* 70: 1137 – 1142.
- Koonin E. V., Choi G. H., Nuss D. L., Shapira R., Carrington J.C. (1991). Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double – stranded

- RNA and a group of positive – strand RNA plant viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: 10647 – 10651.
- Košnovská J. (2013): The origin, archaeobotany and ethnobotany of sweet chestnut (*Castanea sativa* Miller) in Czech Republic. Interdisciplinaria Archaeologica: Natural Sciences in Archaeology 4: 163 – 176.
- Krstin L., Novak-Agbaba S., Rigling D., Krajačić M., Ćurković Perica M. (2008): Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. Plant Pathology 57: 1086 – 1096.
- Kües U., Casselton L. A. (1992): Fungal mating type genes - regulators of sexual development. Mycological Research 96: 993 – 1006.
- Liu Y. C., Milgroom M. G. (1996): Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology 86: 79 – 86.
- Markel H. W. (1905): A deadly fungus on the American chestnut. New York Zoological Society, 10th Annual Report, str. 97 – 103.
- Marra R. E., Milgroom M. G. (2001): The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. Heredity 86: 134 – 143.
- Milgroom M. G., Cortesi P. (2004): Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annual Review of Phytopathology 42: 311 – 338.
- Montenegro D., Aguin O., Sainz M. J., Hermida M., Mansilla J. P. (2008): Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. Forest Ecology and Management 256: 973 – 980.
- Novak-Agbaba S., Liović B., Pernek M. (2000): Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Radovi 35: 91 – 110.
- Nuskern L., Katanić Z., Krstin Lj., Ježić M., Ćurković Perica M. (2015): Opstojnost virusa *Cryphonectria hypovirus* 1 može ovisiti o njegovom prijenosu između različitih tipova

- vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica*. 12. Hrvatski biološki kongres. Zbornik sažetaka, str. 129.
- Nuss D. L. (1992): Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews* 56: 561 – 576.
- Nuss D. L. (2005): Hypovirulence: mycoviruses at the fungal – plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3: 632 – 642.
- OEPP/EPPO (2005): *Cryphonectria parasitica*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 295 – 298.
- Papazova – Ankieva I., Sotirovski K., Cortesi P., Milgroom M. G. (2008): Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *European Journal of Plant Pathology* 120: 35 – 42.
- Peever T. L., Liu Y.-C., Cortesi P., Milgroom M. G. (2000): Variation in tolerance and virulence in chestnut blight fungus – hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4863 – 4869.
- Robin C., Anziani C., Cortesi P. (2000): Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, chestnut blight severity and the population structure of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730 – 737.
- Robin C., Heiniger U. (2001): Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 361 – 367.
- Robin C., Lanz S., Soutrenon A., Rigling D. (2010): Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south – eastern France is associated with fitness – related traits. *Biological control* 53: 55 – 61.
- Rossman A. Y., Farr D. F., Castlebury L. A. (2007): A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48: 135 – 144.
- Segers G. C., Zhang X., Deng F., Sun Q., Nuss D. L. (2007): Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 12902 – 12906.

- Sotirovski K., Rigling D., Heiniger U., Milgroom M. G. (2011): Variation in virulence of *Cryphonectria hypovirus 1* in Macedonia. *Forest Pathology* 41: 59 – 65.
- Sun Q., Choi G. H., Nuss D. L. (2009): A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 17927 – 17932.
- Tomari Y., Zamore P. D. (2005): Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development* 19: 517 – 529.
- Tomić I. (2010): Pitomi kesten (*Castanea*). *Hrvatske šume* 161: 23 – 25.
- Turchetti T., Maresi G. (1988): Mixed inoculum for the biological control of chestnut blight. *Bulletin OEPP* 18: 67 – 72.
- Van Zeist W., Bottema S. (1991): Late quaternary vegetation of the Near East. L. Reichert, Wiesbaden.
- Wickner R. B. (2001): Viruses of yeasts, fungi and parasitic microorganisms. U: Knipe D. M., Howley P. M. (ur.) *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, str. 629 – 658.
- Zhang X., Segers G. C., Sun Q., Deng F., Nuss D. L. (2008): Characterization of hypovirus – derived small RNAs generated in the chestnut blight fungus by an inducible DCL-2-dependent pathway. *Journal of Virology* 82: 2613 – 2619.
- Zohary D., Hopf M. (1988): Domestication of of plants in the Old World. Clarednon Press, Oxford.
- online.science.psu.edu/biol110_sandbox_8862/node/8972
- www.acf.org/newsletter12.17.12West_Salem.php
- www.aphotoflora.com/images/fagaceae/castanea_sativa_sweet_chestnut_tree_flowers_12-07-07_1.jpg
- www.cabi.org/isc/datasheet/21108
- www.floralimages.co.uk/page.php?taxon=castanea_sativa%2C3

www.naturescene.co.uk/flowers/plants/Castanea%20sativa.html

www.wsl.ch/forest/wus/phytopath/reschestnut/reschest-en.ehtml

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.11.1991. godine u Splitu. U Imotskom sam završila opći smjer u Gimnaziji dr. Mate Ujevića s odličnim uspjehom. Preddiplomski studij molekularne biologije upisala sam 2010. godine na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a zvanje sveučilišne prvostupnice molekularne biologije stekla sam 2013. godine kada sam upisala i Diplomski studij molekularne biologije. Sudjelovala sam na manifestaciji Noć biologije. Kao članica hrvatskog tima sudjelovala sam u izvođenju multilateralnog međunarodnog znanstvenog projekta koji financira Švicarska nacionalna zaklada za znanost pod nazivom „Invasive chestnut diseases in the Balkans and Georgia – epidemiological research and management options“. Koautor sam znanstvenog priloga na međunarodnom kongresu „International Plant Protection Congress (IPPC) 2015“ održanom u Berlinu od 24.-27. kolovoza 2015. Sudjelovala sam na 12. Hrvatskom biološkom kongresu gdje sam usmeno izložila rezultate istraživanja pod nazivom „Diversity of *Cryphonectria parasitica* in healed chestnut cankers“. Stipendiju za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu dobila sam 2015. godine.

Od srednjoškolskih dana moji interesi usmjereni su prema području molekularne biologije, razumijevanju svih molekularnih mehanizama koji pokreću živuću stanicu i otkrivanju tajne života. Kroz fakultetsko obrazovanje moj interes se produbio i usmjerio prema području istraživanja virusa, osobito humanih virusa, njihovim mehanizmima djelovanja i mehanizmima obrane organizma. Fascinira me kako izrazito male čestice uvelike utječu na cijeli organizam. Prema tome, moji interesi usmjereni su na stručno napredovanje i usavršavanje tog područja kako bih svojim znanjem i stručnošću doprinijela društvu. Uz viruse, područja koja me također izrazito zanimaju su biologija staničnog starenja, epigenetika, mutageneza i kancerogeneza te biologija matičnih stanica.