Značaj mikovirusa u poljoprivredi

Košćak, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:341110

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

ZNAČAJ MIKOVIRUSA U POLJOPRIVREDI

DIPLOMSKI RAD

univ. bacc. ing. agr. Laura Košćak

Zagreb, rujan 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Fitomedicina

ZNAČAJ MIKOVIRUSA U POLJOPRIVREDI

DIPLOMSKI RAD

univ. bacc. ing. agr., Laura Košćak

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Laura Košćak, JMBAG 01781009869, rođena 27.09.1994 u Našicama, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ZNAČAJ MIKOVIRUSA U POLJOPRIVREDI

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Laura Košćak, JMBAG 01781009869, naslova

ZNAČAJ MIKOVIRUSA U POLJOPRIVREDI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1.	izv. prof. dr. sc. Darko Vončina	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić	član	_____
3.	prof. dr. sc. Edyta Đermić	član	_____

Sadržaj

1. UVOD **1**
1.1. Cilj rada 2
2. PREGLED LITERATURE **3**
2.1. Povijest mikovirusa 3
2.2. Taksonomija mikovirusa 4
2.2.1. Dvolančani RNA (dlRNA) mikovirusi *6*
2.2.2. Jednolančani RNA (jlRNA) mikovirusi *8*
2.2.3. Jednolančani DNA (lDNA) mikovirusi *9*
3. INTERAKCIJA MIKOVIRUSA I GLJIVA DOMAĆINA **10**
3.1. Životni ciklus mikovirusa 10
3.2. Važnost vegetativne kompatibilnosti gljiva u prijenosu mikovirusa 11
3.3. Obrambeni mehanizam gljiva od virusa 15
4. AGRONOMSKI ZNAČAJNI MIKOVIRUSI **17**
4.1. Mikovirusi gljiva roda *Fusarium* 17
4.2. Mikovirusi gljiva roda *Cryphonectria* 21
4.3. Mikovirusi gljiva roda *Botrytis* 22
4.4. Mikovirusi gljiva roda *Rosellinia* 24
4.5. Mikovirusi gljiva roda *Rhizoctonia* 27
4.6. Ostale vrste 28
5. ZAKLJUČAK **30**
6. LITERATURA **31**
ŽIVOTOPIS **43**

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Laura Košćak**, naslova

ZNAČAJ MIKOVIRUSA U POLJOPRIVREDI

Prvo otkriće mikovirusa zabilježeno je 1962. godine, a izolirao ga je engleski virolog Hollings. U posljednjih pedesetak godina interes za poznavanjem mikovirusa raste. Do danas je poznato da su mikovirusi prisutni u svim taksonomskim skupinama gljiva. Prisutnost mikovirusa u domaćinu može dovesti do smanjenja virulentnosti te utjecati na promjene fenotipa, ali je ipak u nekim slučajevima zaraza mikovirusima latentna. Životni ciklus mikovirusa odvija se u citoplazmi stanice domaćina. Kako bi se virusi uspješno širili u stanicama bitno je da su izolati gljiva vegetativno kompatibilni. Noviji literaturni izvori spominju mogućnost zaobilaženja vegetativne kompatibilnosti fuzijom protoplasta, čime je omogućeno i proširenje spektra domaćina. Prisutnost mikovirusa i njihov hipovirulentni utjecaj dokazani su u laboratorijskim uvjetima na ekonomski značajnim gljivama koje pripadaju rodu *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Cryphonectria*, *Alternaria* i dr. U Europi se fitopatogena vrsta *Cryphonectria parasitica*, uzročnik raka kore pitomog kestena, uspješno suzbija korištenjem Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1). Kod nekih vrsta patogenih gljiva utvrđena je i koinfekcija izolata s dva ili više virusa. Osim što ihnibicijski djeluju na virulentnost patogenih gljiva, mogu povoljno utjecati i na biljke koje su domaćini gljiva i to na način da umanjuju posljedice temperaturnog stresa. Kako bi se mikovirusi mogli koristiti kao biološka mjera suzbijanja patogenih gljiva potrebno je provesti još mnoga istraživanja radi boljeg razumijevanja interakcije mikovirusa i domaćina.

Ključne riječi: *mikovirus, gljiva, vegetativna (in)kompatibilnost, poljoprivreda*

Summary

Of the master's thesis – student **Laura Košćak,** entitled

SIGNIFICANCE OF MYCOVIRUSES IN AGRICULTURE--------

The first discovery of mycovirus was recorded in 1962. by the English virologist Hollings. In the last fifty years, interest in knowledge of mycoviruses is growing. To date, mycoviruses are known to be present in all taxonomic groups of fungi. The presence of mycovirus in the host may lead to a decrease in virulence and affect phenotype changes, but in some cases infections with mycoviruses are latent. The life cycle of mycoviruses takes place in the cytoplasm of host cells. In order to spread successfully in cells, essential is vegetative compatibility of host fungi. Recent literature reports possibility to bypass vegetative compatibility by protoplast fusion thus allowing the widening of mycoviruses host range. The presence of mycoviruses and their hypovirulent influence has been proven in laboratory conditions on economically important fungi belonging to the genus *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Cryphonectria*, *Alternaria*, etc. In Europe, phytopathogenic species *Cryphonectria parasitica,* the causative agent of chestnut blight disease, has been successfully controlled using Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1). In some species of pathogenic fungi coinfection of isolates with two or more mycoviruses has been reported. In addition to their inhibitory effect on virulence of pathogenic fungi, they can also have a beneficial effect on host plants by reducing the temperature stress. In order to be used as a agents for biological control of phytopathogenic fungi additional research is needed, especially to better understand the interaction of mycoviruses and their hosts.

Key words: *mycovirus, fungi, vegetative (in)compatibility, agriculture*

1. UVOD

Mikovirusi su mikroorganizmi koji inficiraju gljive. Razlog njihove pojave do danas nije potpuno razjašnjen, ali su prihvaćene dvije hipoteze podrijetla poznate kao: „*hipoteza drevne koevolucije*“ i „*hipoteza biljka-virus*“ (Abbas, 2016.). Prvi objavljeni nalaz mikovirusa zabilježen je 1962. godine, a izolirao ga je virolog Hollings iz šampinjona (Abid i sur., 2018.; Kumar i Chandel, 2016.). Tijekom posljednjih 50-ak godina otkriveno je da su mikovirusi prisutni u svim taksonomskim skupinama gljiva te je do danas poznato oko 200 različitih vrsta (Gilbert i sur., 2019.; Abid i su., 2018.). Genom većine mikovirusa građen je od dvolančane RNA molekule (dlRNA). Svega 30 % poznatih mikovirusa građeno je od jednolančane RNA (jlRNA) te jednolančane DNA (jlDNA) (*Gemycircularvirus*) (Darissa, 2011.). Klasificirani su u nekoliko porodica, a to su: *Totivirdae, Endornaviridae, Partitiviridae, Megabirnaviridae, Chrysoviridae, Quadriviridae, Reoviridae* (Ghabrial i sur., 2015.; Ghabrial i Suzuki, 2009.). S obzirom da inficiraju i patogene gljive, smatraju se mogućom biološkom mjerom suzbijanja istih, ali najveći problem u suzbijanju predstavlja vegetativna inkompatibilnost gljiva (Leslie, 1993.; Peberdy, 1980.). Međutim, prema novijim istraživanjima moguće je „zaobići“ uvjet inkompatibilnosti u laboratorijskim uvjetima i to fuzijom protoplasta (citoplazme i/ili jezgre) (Madhosingh, 1994.). Mikovirusi domaćina najčešće parazitiraju bez vidljivih simptoma, tj. njihova prisutnost u domaćinu je latentna. Ukoliko se simptomi i pojave oni su najčešće nepravilan rast i razvoj, abnormalna pigmentacija te smanjena seksualna reprodukcija. (Allen i sur., 2013.; Schmitt i Breinig, 2006.; Nuss, 2005.). Stišavanje RNA obrambeni je mehanizam gljiva, a zasniva se na regulaciji ekspresije gena te je posredovan molekulama RNA. Međutim, kako su i virusi evolucijski osiguravali svoj opstanak, mnogi su razvili strategiju borbe od stišavanja RNA kodiranjem proteina RSS (*RNA silencing suppressor*). Prijenos mikovirusa moguć je na dva načina: horizontalni prijenos (s jedne gljive na drugu anastomozom hifa gljiva koje su vegetativno kompatibilne) i vertikalni prijenos (sporulacijom). U radu će biti prikazan opis građe mikovirusa, životni ciklus te njihov prijenos i utjecaj na gljive domaćine koje su česti uzročnici biljnih bolesti. Suzbijanje patogenih gljiva uspješno se provodi kemijskim mjerama, odnosno fungicidima. Ipak, međuprodukti degradacije fungicida često su perzistentniji (postojaniji) od polaznog spoja i ostaju duže vrijeme u zemlji ili vodi (podzemne vode), što može imati posljedice i za biljke u plodoredu, zbog čega bi uvođenje mikovirusa kao mjere biološkog suzbijanja bilo od iznimne koristi (Đorđević, 2008.).

1.1.Cilj rada

Cilj ovoga rada je napraviti literaturni pregled spoznaja vezanih uz mikoviruse važne s agronomskog gledišta. Obradit će se povijest, taksonomija, životni ciklus, domaćini, načini prijenosa te utjecaj pojedinih mikovirusa na njihove domaćine.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Povijest mikovirusa

Razlog pojave mikovirusa do danas nije potpuno razjašnjen, ali su prihvaćene dvije hipoteze njihovog podrijetla poznate kao: „*hipoteza drevne koevolucije*“ i „*hipoteza biljka-virus*“ (Abbas, 2016.). Tako se prema prvoj hipotezi smatra da su mikovirusi, a s obzirom na nepoznato drevno podrijetlo, evoluirali tijekom dugog razdoblja zajedno sa svojim domaćinima. Prema drugoj hipotezi smatra se da su mikovirusi tek ne tako davno prešli s biljaka koje su domaćini pojedinim gljivama, na gljive koje parazitiraju te biljke (Pearson i sur., 2009.). Prvi objavljeni nalaz mikovirusa zabilježen je 1962. godine, a izolirao ga je engleski virolog Hollings iz šampinjona - *Agaricus bisporus* J. E. Lange. (Abid i sur., 2018.; Kumar i Chandel, 2016.; Hollings, 1962.). Prisutnost simptoma poput abnormalnog rasta uzrokovanih mikovirusima čiji je domaćin šampinjon, dovela je do velikih gubitaka prinosa tih jestivih gljiva, nakon čega je bolest kultiviranih gljiva nazvana „*La France disease“* - francuska ili smeđa bolest šampinjona (Abbas, 2016.; Borodynko i sur., 2010.). Osim šampinjona ubrzo su mikovirusi izolirani i iz shiitake - *Lentinula edodes* Berk. Nakon navedenog, mikovirusi postaju ekonomski značajni patogeni jestivih gljiva, a od tada se pojavljuje veliki interes za otkrivanjem uzroka njihove pojave, posebice usmjeren na shiitake u Japanu (Abid i sur., 2018.; Ushiyama i Hashioka., 1973.; Ushiyama i sur., 1977.; Mori i sur., 1978.). Neki dvolančani RNA (dlRNA) virusi također su otkriveni u shiitake gljivama na području Sjedinjenih Američkih Država (SAD), ali za razliku od Japana njihova je parazitacija bila latentna (Pearson i sur., 2009.; Martin i sur., 2011.).

Interes za poznavanjem mikovirusa u posljednjih 50-ak godina raste (Ghabrial i sur., 2015.). Tijekom navedenog razdoblja otkriveno je da su mikovirusi prisutni u svim taksonomskim skupinama gljiva te je do danas poznato oko 200 različitih vrsta (Gilbert i sur., 2019.; Abid, 2018.). Osim u gljivama utvrđena je njihova prisutnost i u mnogim životinjama te nekim biljnim vrstama, ali i u krvnom serumu ljudi te u patogenim dermatofitnim gljivama (*Candida albicans* i *Trichophytone rubrum*), čime mikovirusi dodatno dobivaju na značaju (Almola i sur., 2015.; Lamberto i sur., 2014.). Među prvim rodovima gljiva iz kojih su uspješno izolirani mikovirusi jesu rodovi *Aspergillus* i *Penicillium* (Hollings, 1982.), a do danas su izolirani iz velikog broja različitih ekonomski značajnih fitopatogenih vrsta gljiva koje pripadaju rodovima *Sclerotinia* (Liu i sur., 2015.), *Colletotrichum* (de Figueiredo i sur., 2012.),

Fusarium (Flores-Pacheco i sur., 2017.), *Diaporthe* (Preisig i sur., 2000.), *Metarhizium* (Perinotto i sur., 2014.), *Botrytis* (Donaire i Ayllon, 2017.), *Rhizoctonia* (Zheng i sur., 2018.), *Rosellinia* (Chiba i sur., 2009.), *Cryphonectria* (Krstin i sur., 2016.), *Phomopsis* (Hrabakova i sur., 2017.) i *Alternaria* (Aoki i sur., 2009.).

Prisutnost i analize genoma mikovirusa mogu se istražiti pomoću različitih laboratorijskih dijagnostičkih metoda, a najčešće korištene su elektronska mikroskopija (EM), imunosorbentna elektronska mikroskopija (IEM/ISEM), elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (PAGE), enzimski imunosorbentni test (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) i lančana reakcija polimerazom obrnutog prepisivanja (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) (Kumar i Chandel, 2016.).

2.2. Taksonomija mikovirusa

Do sada je poznato da je genom većine mikovirusa građen od dvolančane RNA molekule (dlRNA). Svega 30 % poznatih mikovirusa građeno je od jednolančane RNA (jlRNA), a nedavno je otkriveno da ovi virusima slični organizmi mogu biti građeni i od jednolančane DNA (jlDNA) (*Gemycircularvirus*) (Darissa, 2011.). Kao i drugi mikroorganizmi i mikovirusi su u posljednjih pedesetak godina intenzivnog istraživanja klasificirani u nekoliko porodica koje se razlikuju prema broju i veličini segmenata koji čine genom što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz pripadajućih porodica i rodova mikovirusa podijeljenih prema genomu i popis domaćina mikovirusa[1]

Genom	**Porodica**	**Rod** (veličina genoma kbp)	**Domaćin**
jlDNA	*Genomoviridae*	*Gemycircularvirus* (30)	*Sclerotinia sclerotiorum*
jlRNA	*Alphaflexiviridae*	*Botrexvirus; Sclerodarnavirus* (5,9 – 9)	*Botrytis cinerea; Sclerotinia sclerotiorum*
	Barnaviridae	*Barnavirus* (4)	*Agaricus bisporus*
	Gammaflexiviridae	*Mycoflexivirus* (13)	*Botrytis cinerea*
	Hypoviridae	*Hypovirus* (9,1 – 12,7)	*Cryphonectria parasitica*
	Narnaviridae	*Mitovirus, Narnavirus* (2,3 – 2,9)	*Saccharomyces cerevisiae, Ophiostoma novo-ulmi; Cryphonetria parasitica*
dlRNA	*Totiviridae*	*Totivirus, Victorivirus* (4, 6 – 7)	*Saccharomyces cerevisiae, Ustilago maydis; Gremmeniella abietina,*
	Partitiviridae	*Alphapartitivirus, Betapartitivirus, Gammapartitivirus* (3 – 4,8)	*Rosellinia necatrix, Heterobasidion annosum, Penicillium stoloniferum, Gremmeniella abietina, Fusarium solani*
	Chrysoviridae	*Alphachrysovirus, Betachrysovirus* (8,9 – 16)	*Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysporum, Fusarium graminearum Alternaria alternata,*
	Reoviridae	*Mycoreovirus**	*Cryphonetria parasitica, Rosellinia necatrix*
	Megabirnaviridae	*Megabirnavirus* (16,1)	*Rosellinia necatrix*

*podatak o veličini genoma nije dostupan

[1] Podatci preuzeti sa stranice Međunarodno povjerenstvo za taksonomiju virusa (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) - https://talk.ictvonline.org/

2.2.1. Dvolančani RNA (dlRNA) mikovirusi

Neke vrste virusa čiji je genom dlRNA, osim gljiva uspješno parazitiraju u protozoama i biljkama. Promjer čestica mikovirusa koji pripadaju porodicama iz Tablice 1 kreće se od 25 do 50 nm, a samo su čestice vrsta roda *Mycoreovirus* promjera oko 80 nm (Ghabrial i Suzuki, 2009.; Pearson i sur., 2009.). Analize najčešće sintetiziranog proteina dlRNA virusa (RNA-ovisna RNA polimeraza (RdRp) koji služi za sintezu novih lanaca RNA, odnosno replikaciju genetskog materijala), sugeriraju da su ovi virusi parafiletski (imaju zajedničkog pretka) (Ghabrial i Suzuki, 2009.). Dvolančani RNA virusi u laboratorijskim uvjetima već su uspješno integrirani u gljive, kukce i druge eukariotske organizme zbog čega se sugerira njihovo korištenje za biološko suzbijanje štetočinja (Chiba i sur., 2009.).

Porodica Totiviridae

Mikovirusi koji pripadaju porodici ***Totiviridae*** građeni su od genoma koji nije segmentiran, a veličine je od 4,6 do 7 kilo baznih parova (kbp) te promjera čestica oko 40 nm. Sadrže dva otvorena okvira čitanja (*open reading frames,* ORF) koji kodiraju protein omotača (*coat protein*, CP) i RdRp protein. Podijeljeni su na dva roda koja parazitiraju u gljivama, a to su: *Totivirus* (prisutan u *Saccharomyces cerevisiae* – kvasac i *Ustilago maydis* – mjehurasta snijet kukuruza) i *Victorvirus* koji parazitiraju na filamentoznim gljivama (*Rosellinia necatrix*-uzročnik truleži korijena, *Beauveria bassiana* - entomopatogena gljiva i dr.). Filamentozne gljive karakterizira polarizirani rast hifa u obliku niti (hife koje se razvijaju iz stanica gljive). Rastom glavne hife dolazi do stvaranja mreže hifa koja se naziva micelij (Žnidaršić i Pavko, 2001.). Mikovirusi dlRNA koji pripadaju rodu *Totivirus* poznati su po fenomenu koji se naziva *„yeast and smut killer system"* zbog značajne stimulacije tvorbe toksina koji direktno inhibiraju rast i razvoj ovih gljiva, dok to nije slučaj s vrstama roda *Victorvirus* (Park i sur., 1996.; Bostian i sur., 1980.). Virusi koji pripadaju porodici *Totiviridae* osim gljiva parazitiraju i u protozoama i kukcima. Međutim, i dalje nije poznato mogu li se u prirodi širiti s jednog carstva na drugo ili su se zbog nekog evolucijskog razloga prebacili s jednog domaćina (npr. kukac) na drugog (npr. gljiva) što bi bilo zanimljivo istražiti (Isawa, 2011.).

Porodica Partitiviridae

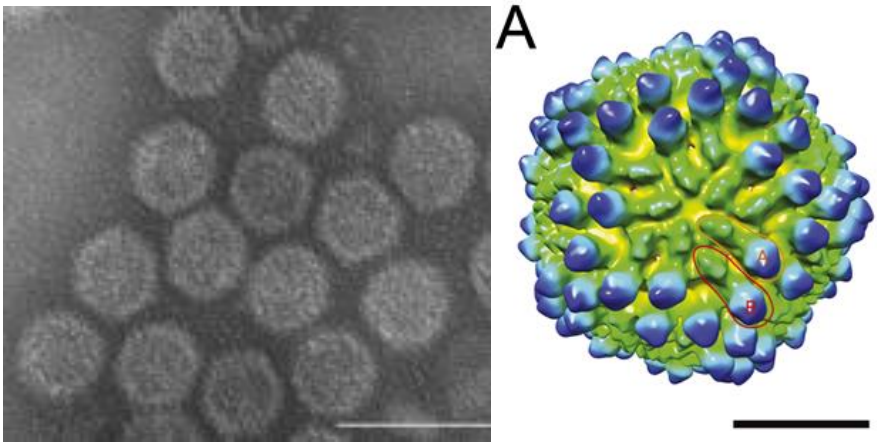
Genom dlRNA mikovirusa koji pripadaju porodici ***Partitiviridae*** podijeljen je na dva segmenta, a promjer čestica je 30 do 40 nm. Jedan segment zadužen je za sintezu proteina omotača (CP), a drugi za RdRp (Darissa, 2011.). Prijenos vrsta roda *Partitivirus* odvija se putem aseksualnih spora ili anastomozom (fuzijom) hifa gljive domaćina. Potpuna sekvenca genoma mikovirusa koji pripadaju ovom rodu poznata je samo za vrste Atkinsonella hypoxylon virus, Fusarium solani virus 1 i Fusarium poae virus 1. Filogenetski neki mikovirusi slični su virusima koji parazitiraju na biljkama, zbog čega se sugerira mogućnost horizontalnog prijenosa sa gljive domaćina na biljke (Ghabrial i sur., 2008.).

Porodica Chrysoviridae i Reoviridae

Genom dlRNA mikovirusa koji pripadaju porodici ***Chrysoviridae*** podijeljen je na četiri segmenta, promjera čestica 35 do 40 nm. Iako se do nedavno smatralo da su genetski sličniji porodici *Partitiviridae*, detaljnijom analizom genoma utvrđena je veća sličnost s porodicom *Totiviridae*. Kako se ipak razlikuju od navedenih, svrstani su u zasebnu porodicu. Virusi koji pripadaju ovoj porodici često su u domaćinu prisutni zajedno s još nekim mikovirusima te uzrokuju vidljive simptome zaraze. Neki od primjera jesu Helminthosporium victoriae 145S virus (Hv145SV) i Helminthosporium victoriae 190S virus (Hv190SV) koji inficiraju fitopatogenu gljivu *Helminthosporium victoriae*. Također su i virusi Amasya cherry disease associated chrysovirus (ACDACV) i Cherry chlorotic rusty spot associated chrysovirus (CCRSACV) najčešće prisutni u koinfekciji s virusima Agaricus bisporus virus 1 (AbV 1) (porodica *Chrysoviridae*) i Mushroom bacilliform virus (MBV) (porodica *Barnaviridae*), koji su povezani s *La France disease* na šampinjonu. Nadalje, mikovirusi koji pripadaju porodici ***Reoviridae*** svrstani su u rod *Mycoreovirus*. Genom ovih virusa podijeljen je na 11-12 segmenata, promjera čestica oko 80 nm. Do danas su poznate samo tri vrste mikovirusa koji pripadaju ovom rodu, a to su dva koja parazitiraju na *C. parasitica* (Cryphonectria parasitica mycoreovirus-1, CpMYRV-1 i Cryphonectria parasitica mycoreovirus-2, CpMYRV-2) i jedan na *R. necatrix* (Rosellinia necatrix mycoreovirus-3, RnMYRV-3), a njihova parazitacija dovodi do značajne hipovirulencije gljive domaćina (Darissa, 2011.).

Porodica Megabirnaviridae

Unutar najnovije porodice ***Megabirnaviridae*** uvršten je samo jedan rod - *Megabirnavirus*. Genom čine segmenta, a veličina viriona je 52 nm (Slika 1). Kodira protein omotača i RdRp. Jedina vrsta koja je svrstana u rod *Megabirnavirus* je Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 – W779 (RnMBV1 - W779). Ovaj virus uspješno parazitira u domaćinu *R. necatrix* gdje je hipovirulencija značajno istaknuta. Na domaćina se prenosi horizontalno, a moguća je i interspecifična infekcija na gljivu *C. parasitica*. Učestalost vertikalnog prijenosa na domaćina manja je od 1 % (Salaipeth i sur., 2014.; Chiba i sur., 2009.).



Slika 1. Izgled i veličina čestica Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1).Slika koja se nalazi s lijeve strane prikazuje virione mikovirusa Rosellinia necatrix megabirnavirus 1-W779 (RnMBV 1-W779) snimljeno elektronskim mikroskopom, a linija koja se nalazi u desnom donjem kutu označava veličinu od 100 nm iz čega se može iščitati da su čestice ovoga mikovirusa veličine oko 50 nm; desna slika pod oznakom A prikazuje trodimenzionialni oblik dobiven pomoću rekonstrukcije slike elektornskog mikroskopa, a linija koja se nalazi u donjem desnom kutu označava veličinu od 20 nm čime se potvrđuje veličina viriona od 52 nm). (izvor: Chiba i sur., 2009 i ICTV - https://talk.ictvonline.org/)

2.2.2. Jednolančani RNA (jlRNA) mikovirusi

Prisutnost jednolančanih RNA (jlRNA) mikovirusa vrlo je mala. Svrstani su u nekoliko porodica: *Alphaflexiviridae, Barnaviridae, Gammaflexviridae, Hypoviridae* i *Narnaviridae,* a osim navedenih postoje i neklasificirani jlRNA mikovirusi čije je detaljnije istraživanje još uvijek aktualno (Abbas, 2016.). Do danas je dokazano postojanje nekoliko različita mikovirusa jlRNA genoma, a od agronomski značajnijih to su Mushroom bacilliform virus (MBV) u vrsti *Agaricus bisporus* koji pripada porodici *Barnaviridae* (Revill i sur., 1999.). Veličina genoma je 4 kbp te se prenosi horizontalno micelijem i basidiosporama, a najčešće se u šam-

pinjonu nalazi u koinfekciji s La France isometric virus (LFIV) koji je uzročnik *La France* bolesti šampinjona (Romaine i Schlagnhaufer, 1995.). Zatim Selerophthora macrospora Virus B (SmVB) u *Selerophthora macrospora* koja uzrokuje plijesan žitarica (Yokoi i sur., 1999.). Nadalje, poznart je i Botrytis virus F (BVF), u *Botrytis cinerea* koji je jedina vrsta unutar porodice *Gammaflexiviridae* (Robyn i sur., 2001.). Čestice ovoga virusa promjera su oko 13 nm te kodira samo protein omotača (CP) dok način prijenosa i dalje nije utvrđen (Howitt i sur., 2001.). Otkriven je i Oyster mushroom spherical virus (OMSV) u bukovači - *Pleurotus ostreatus*. Ovaj mikovirus taksonomski nije svrstan. Čestice su promjera 27 nm, a povezan je sa značajnim odumiranjem gljiva bukovača. (Yu i sur., 2003.). Jedan od najvažnijih mikovirusa čiji je genom jlRNA je Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) koji je detaljnije opisan u poglavlju 4.2.

2.2.3. Jednolančani DNA (jlDNA) mikovirusi

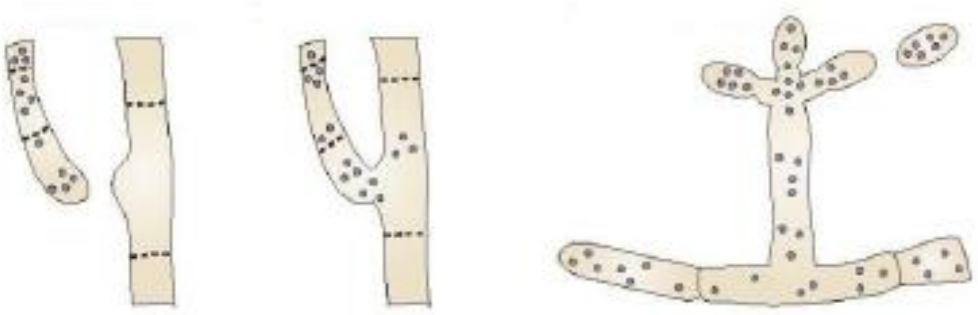
Jedini poznati mikovirus čiji je genom jednolančana DNA je Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1 (SsHADV-1) koji parazitira fitopatogenu gljivu *Sclerotinia sclerotiorum* (Krupovic i sur., 2016.). Promjer čestica ovog mikovirusa je 22 nm. Za razliku od opisanih dlRNA mikovirusa, jlDNA mikovirusi ne sintetiziraju RdRp već Rep protein (*replication initiation protein*) i CP (*coat protein*). Ovaj virus svrstan je u rod *Gemycircularvirus* (porodica *Genomoviridae*). Utvrđen je hipovirulentan utjecaj na domaćina *S. sclerotiorum*, ali je zanimljivo što se može prenositi između vegetativno inkompatibilnih populacija gljive (Darissa, 2011.). Vegetativna kompatibilnost ograničavajući je čimbenik u prijenosu mikovirusa, stoga je važnost ovog „fenomena“ opisana u poglavlju 3.2. DNA mikovirus Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence - associated DNA virus 1 (SsHADV 1) jedan je od uspješnih primjera suzbijanja truleži koriiena repe kao i jlRNA Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) na kestenu (Yu i sur., 2013.; Nuss, 2005.).

3. INTERAKCIJA MIKOVIRUSA I GLJIVA DOMAĆINA

3.1. Životni ciklus mikovirusa

Životi ciklus mikovirusa odvija se u citoplazmi stanica domaćina, a podijeljen je u četiri faze (Nuss, 2005.):

1) širenje u stanicama domaćina,
2) širenje iz jedne stanice u drugu rastom hifa nakon dijeljenja stanica,
3) lateralni prijenos fuzijom razgranatih hifa koje stvaraju micelij,
4) horizontalni prijenos s jedne gljive na drugu anastomozom hifa gljiva koje su vegetativno kompatibilne. Vertikalni prijenos moguć je sporulacijom (Slika 2).



Slika 2. Prijenos virusa CHV1 anastomozom hifa (lijevo) i konidijama (nespolna sporulacija) (desno). Lijevi dio slike prikazuje prijenos virusa anastomozom hifa koja se odvija tijekom vegetativne faze nitastih gljiva, anastomoza podrazumijeva spajanje hifa, miješanja citoplazmi pa se na taj način mikovirus može širiti sa zaražene jedinke na druge nezaražene; desna slika prikazuje prijenos mikovirusa pomoću nespolnih spora ili konidija koje nastaju mitozom te se šire na manje udaljenosti, tako se virus koji je prisutan u sporama može prenositi i vjetrom, kišom ili čovjekom na veće udaljenosti . (Izvor: preuzeto iz Nuss, 2005.)

Mogućnost postojanja mikovirusa izvan stanice još uvijek nije otkrivena kao ni prijenos vektorom. Međutim, u laboratorijskim uvjetima moguće je ostvariti interspecifični (između različitih vrsta) prijenos mikovirusa, što je dokazano kod izolata gljiva roda *Aspergillus, Sclerotinia, Cryphonectria i Heterobasiidion* (Coenen i sur., 1997.; Melzer i sur., 2002.; Liu i sur., 2003.; Vainio i sur., 2010.). Također, Cortesi i sur. (2001.) dokazuju mogućnost intraspecifičnog (unutar vrste) prijenosa virusa roda *Hypovirus* između vegetativno inkompatibilnih

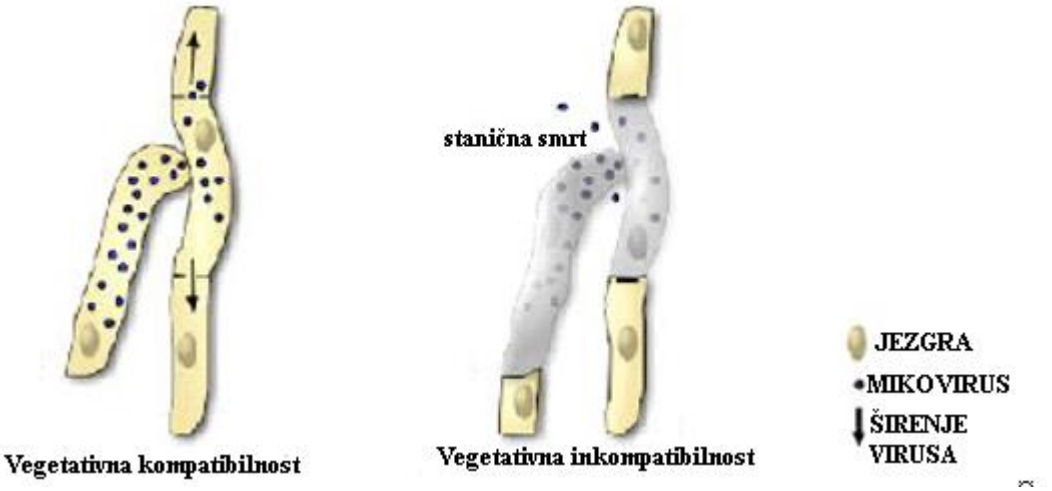
izolata gljiva *C. parasitica*. Zbog ovog fenomena, pred istraživačima je izazov prema kojem je potrebno istražiti mogu li se mikovirusi prenositi između različitih vrsta (interspecifično) ili različitih populacija iste vrste (intraspecifično) u prirodi.

Također je dokazano da se mikovirusi mogu prenositi horizontalnim ili vertikalnim putem. Vertikalno širenje unutar stanica odvija se zajedno s procesima mejoze i mitoze, a horizontalno anastomozom hifa ili seksualnom reprodukcijom (Castillo i sur., 2011.). Horizontalni prijenos virusa moguć je samo između vegetativno kompatibilnih populacija gljiva, što je dovelo u pitanje uspješnost suzbijanja filogenetički različitih populacija gljiva iste vrste (Pearson, 2009.). U filamentoznim, askomicetnim gljivama (npr. *R. necatrix* i *C. parasitica*) grananjem hifa dolazi do stvaranja (fuzije) micelija unutar kolonije (Glass i Fleissner, 2006.; Hickey i sur., 2002.; Buller,1933.). Vjeruje se da se prijenos mikovirusa u koloniji gljive odvija pasivno zajedno s organelima u citoplazmi, stoga se može zaključiti da se kreću citoplazmom u smjeru produživanja hifa usporedno s njihovom fuzijom (McKerracher i Heath, 1987.; Ross, 1976.).

Osim što inficiraju gljive te potencijalno utječu na njihovu virulentnost i fenotip, ipak u nekim slučajevima prisutnost mikovirusa može utjecati povoljno na biljke koje su domaćini gljiva. Tako je zbog prisutnosti virusa u endofitskoj gljivi roda *Culvularia*, utvrđena veća otpornost biljke na visoke temperature (Marquez i sur., 2007.).

3.2.Važnost vegetativne kompatibilnosti gljiva u prijenosu mikovirusa

Vegetativna (in)kompatibilnost gljiva (Slika 3) potaknuta je ekspresijom različitih gena, a s ciljem sprječavanja širenja mikovirusa na različite kolonije ili populacije gljiva kao svojevrsni obrambeni mehanizam kontroliran s najmanje šest nevezanih *vic* lokusa. Jedinke s različitim alelima na jednom ili više *vic* lokusa (specifična pozicija na kromosomu jednog gena u DNA sekvenci, a moguće varijante iste DNA sekvence na jednom lokusu označavaju se kao aleli) su vegetativno nekompatibilne, odnosno gljive su vegetativno kompatibilne ukoliko sadrže identične alele na vic likusima. Nakon anastomoze hifa vegetativno inkompatibilnih jedinki gljiva dolazi do programirane stanične smrti i nemogućnosti stvaranja stabilnih heterokariona (Choi i sur. 2012.).

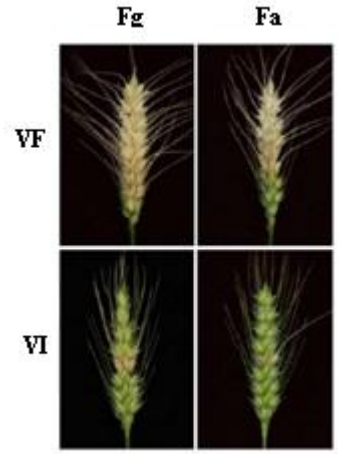


Slika 3. Utjecaj vegetativne (in)kompatibilnosti gljiva na prijenos mikovirusa. Širenje virusa ograničeno je vegetativnom kompatibilnošću gljiva domaćina. Na lijevom crtežu prikazano je nesmetano širenje mikovirusa između hifa gljiva koje su vegetativno kompatibilne, što znači da imaju jednake alele na lokusima. Na crtežu koji se nalazi s desne strane prikazan je utjecaj vegetativne inkomatibilnosti na širenje mikovirusa između gljiva koje imaju različite alele na samo jednom lokusu. Fuzija takvih hifa dovodi do programirane stanične smrti zbog čega se virusi ne mogu dalje širiti. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Kumar i Chandel, 2016.)

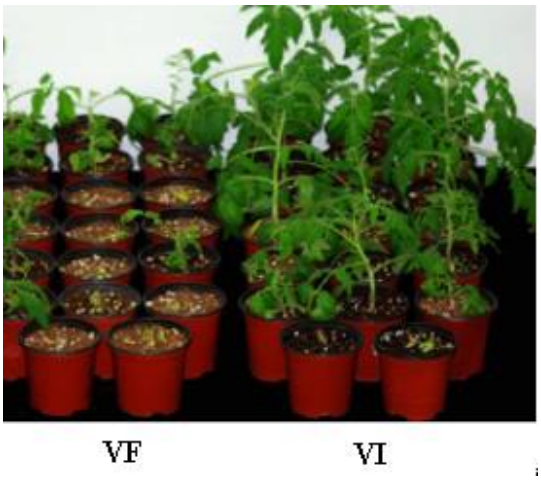
Ograničavajući čimbenik u primjeni mikovirusa kao potencijalnih agensa za biološko suzbijanje patogenih gljiva predstavlja prijenos između vegetativno inkompatibilnih gljiva koje pripadaju taksonomski različitim skupinama (Leslie, 1993.; Peberdy, 1980.). Primjerice, u Europi se uspješno suzbija vrsta *Cryphonectria parasitica* mikovirusom Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1). Međutim, isto nije bilo moguće postići u Americi jer je na tom području vegetativna raznolikost ove gljive značajno veća u odnosu na europske populacije (Nuss, 2005.).

Prema novijim istraživanjima, moguće je „zaobići“ uvjet inkompatibilnosti u laboratorijskim uvjetima fuzijom protoplasta (citoplazme i/ili jezgre) (Madhosingh, 1994.). Ova metoda najčešće se koristi u istraživanjima u kojima je potrebno istražiti prolazak određenih tvari kroz staničnu membranu (Mathur i Koncz, 1998.). Fuzija protoplasta pokazala se uspješnom kada je primijenjena na gljivama roda *Aspergillus* (van Diepeningen i sur., 1998.), *Fusarium* (van Diepeningen i sur., 2000.) i *Rosellinia* (Kanematsu i sur., 2014.). Uspješnim se pokazalo i istraživanje provedeno na različitim vrstama gljiva roda *Fusarium*. Naime, utvrđen je hipovirulentan utjecaj mikovirusa Fusarium graminearum virus DK21 (FgV 1 - DK21) na izolatima gljive *F. asiaticum*, *F. graminearum i F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Simptomi su bili vidljivi na razvijenom miceliju gljiva i to u vidu smanjenog rasta i pojačane pigmentacije u odnosu na izolate koji nisu bili inficirani (Lee i sur., 2011.). Također su test biljke pšenice i rajčice bile značajno boljeg fitnesa ako su bile zaražene gljivom koja je inficirana virusom od

onih koje su bile zaražene gljivom u kojoj nije bio prisutan virus (Slika 4 i 5). Stoga je fuzijom protoplasta moguće utjecati na proširenje spektra gljiva domaćina.



Slika 4. Utjecaj mikovirsa Fusarium graminearum virus 1 – DK21 (FgV 1-DK21) na zaraženost klasova pšenice vrstom *Fusarium graminearum i F. asiaticum*. VF-prikaz klasa pšenice zaraženog s izolatima *Fusarium* vrsta u koje nije inokuliran virus; VI-prikaz klasa pšenice zaraženog s izolatima *Fusarium* vrsta u kojima je prisutan mikovirus. Inokulacijom virusa u izolate gljiva značajno je primjetan inhibicijski utjecaj na zaraženost klasa pšenice. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Lee i sur., 2011.)



Slika 5. Utjecaj mikovirsa Fusarium graminearum virus 1 – DK21 (FgV 1-DK 21) na zaraženost biljaka rajčice vrstom *Fusarium oxysporum*. VF- prikaz biljaka rajčice zaražene izolatom *Fusarium oxysporum* u kojeg nije inokuliran virus; VI-prikaz biljaka rajčice zaraženih s izolatima *Fusarium oxysporum* u kojem je prisutan mikovirus. Inokulacijom virusa u izolat gljive značajno je primjetan inhibicijski utjecaj na zaraženost biljaka. Izolat bez virusa (VF) uzrokovao je značajno propadanje biljaka rajčice. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Lee i sur., 2011.)

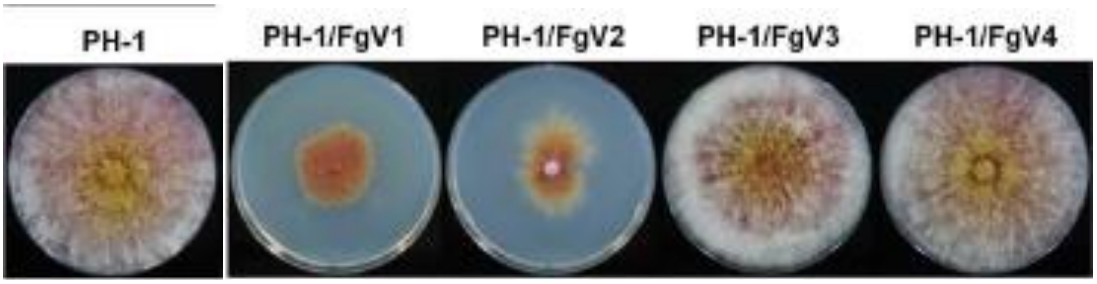
Da je vegetativna kompatibilnost važna u prijenosu mikovirusa ovisi i o vrsti virusa i gljive domaćina. Naime, Yaegashi i sur. (2013.) uspješno prenose mikovirus između vegetativno inkompatibilnih izolata gljive *Rosellinia necatrix*. Tri vegetativno inkompatibilna izolata gljive inokulirana su na korijen jabuke te je utvrđen prijenos s jednog izolata na drugi, ali je otkriven i novi mikovirus. Zbog neočekivanih rezultata, pretpostavka je da je u prijenosu sudjelovao i kakav vektor jer su na miceliju bili prisutni kukci i nematode. Prije postavljanja pokusa na jabuci, obavljena je analiza vjerojatnosti pojave novog dlRNA mikovirusa inokulacijom različitih izolata na jedan korijen jabuke. Vjerojatnost pojave novog mikovirusa bila je 52,4 % (RT-PCR), što je značajno veća vjerojatnost od prije objavljenih podataka gdje je iznosila svega 19,3 % na 424 izolata *R. necatrix* (Ikeda i sur., 2004.). Filogenetskom analizom novi mikovirus Rosellinia necatrix victorivirus 1 svrstan je u rod *Victorivirus* (porodica *Totiviridae*).

S obzirom da su u *R. necatrix* najčešće prisutni virusi koji pripadaju porodici *Partitiviridae*, može se zaključiti da je *R. necatrix* njihov stalni domaćin. Za novootkriveni *Totiviridae*

mikovirus primarni domaćin nije otkriven, stoga njegova prisutnost u izolatu *R. necatrix* nije očekivana. Pojava novih dlRNA genoma mikovirusa u izolatima gljiva sugerira na nekoliko mogućnosti:

a) dlRNA molekule prenesene su **anastomozom hifa** od nativne *R. necatrix* na korijen jabuke iako su sva stabla jabuke bila zdrava prije postavljanja pokusa i inkubacije *R. necatrix* te su svi ostali izolati originalno potekli od inkubiranog micelija gljive pa mogućnost zaraze prije pokusa nije postojala. Također, smatraju da nije postojala mogućnost intraspecifičnog prijenosa novo virusa anastomozom ako su miceliji nastali od inkubirane gljive koja nije bila inficirana virusom iz porodice *Totiviridae,*
b) **interspecifičan prijenos** s druge vrste gljive prisutne u tlu ili korijenu jabuke,
c) dlRNA su potekli endogeno **mutacijom genoma** gljive,
d) izolati su bili **latentno zaraženi** ili je prisutnost novootkrivenog dlRNA bila tolika da se nije mogla detektirati pomoću metode lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR), stoga se naknadno uspješno propagirao u uvjetima tla.

U ovom istraživanju određeni dlRNA mikovirusi doveli su do smanjenog rasta micelija, ali i smanjenja virulencije gljive što ih čini potencijalno povoljnim agensima za suzbijanje ove gljive bez potrebe korištenja fungicida. Za sada se kao potencijalni agensi za suzbijanje *R. necatrix* predlažu Rosellinia necatrix mycoreovirus - 3 (RnMRV - 3) i Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 - W779 (RnMBV 1 - W779) (Chiba i sur., 2009.; Kanematsu i sur., 2004.). Fuzija protoplasta pokazala se uspješnom i na izolatu gljive *F. graminearum* PH - 1 sa četiri različita mikovirusa Fusarium graminearum virus 1 (FgV 1), Fusarium graminearum virus 2 (FgV 2), Fusarium graminearum virus 3 (FgV 3) i Fusarium graminearum virus 4 (FgV 4). Inokulacija mikovirusa u izolat koji nije bio inficiran dovela je do značajnih morfoloških promjena ovisno o vrsti virusa (Slika 6).



Slika 6. Utjecaj različitih sojeva Fusarium graminearum virus 1 - 4 na morfologiju kolonije vrste *F. graminearum* PH-1. PH-1-kontrolni izolat vrste *Fusarium graminearum*; PH-1/FgV1-izolat vrste *Fusarium graminearum* u kojem je prisutan Fusarium graminearum virus 1; PH-1/FgV2- izolat vrste *Fusarium graminearum* u kojem je prisutan Fusarium graminearum virus 2; PH-1/FgV3- izolat vrste *Fusarium graminearum* u kojem je prisutan Fusarium graminearum virus 3; PH-1/FgV4- izolat vrste *Fusarium graminearum* u kojem je prisutan Fusarium graminearum virus 4. Značajni hipoviruletni utjecaj vidljiv je na izolatima s pristunim FgV 1 i FgV 2, gdje je došlo do smanjenograsta micelija te promjene boje izolata dok je na izolatima s pristunim FgV 3 i FgV 4 razvoj micelija nije bio značajno promijenjen u odnosu na kontrolni izolat. (Izvor: Lee i sur., 2014.)

Hipovirulencija je bila značajna inkubacijom virusa Fusarium graminearum virus 1 (FgV 1) i Fusarium graminearum virus 2 (FgV 2) što je dovelo do smanjenog rasta, pojačane pigmentacije, smanjene virulentnosti te nepravilnog oblika micelija. Kod Fusarium graminearum virus 1 (FgV 1) prisutnog izolata, uz sve navedeno došlo je i do povećane tvorbe toksina i smanjenje veličine kondija što nije bio slučaj kod izolata s prisutnim Fusarium graminearum virus 2 (FgV 2). Inkubacijom vrste Fusarium graminearum virus 3 (FgV 3) i Fusarium graminearum virus 4 (FgV 4) nije zabilježen značajan hipovirulentan utjecaj. Iako ovi mikovirusi nisu utjecali na virulentnost gljive, detaljnijim analizama genoma primijećeno je da su utjecali na ekspresiju gena gljive domaćina zbog čega je pretpostavka da su izolati s ovim mikovirusima stvorili obrambeni mehanizam prema virusima. Ova pretpostavka temelj je za daljnja istraživanja interakcija mikovirusa i gljiva domaćina (Lee i sur., 2014.).

3.3. Obrambeni mehanizam gljiva od virusa

Utišavanje RNA obrambeni je mehanizam eukariotskih organizama na virusne infekcije, posebice istražena kod biljaka (Ding i Voinnet, 2007.; Wang i Metzlaff, 2005.). Ovaj mehanizam zasniva se na regulaciji ekspresije gena te je posredovana molekulama RNA, a najčešće dolazi do supresije translacije gena. mRNA (glasnička ili informacijska RNA) koja iz jezgre odlazi na ribosome koji se nalaze u citoplazmi s uputom za sintezu proteina. Male RNA molekule integriraju s mRNA što rezultira degradacijom mRNA, odnosno događa se utišavanje mRNA određenog gena, stoga RNA utišavanje kontrolira razvoj drugih organizama. Ovaj mehanizam često se koristi u istraživanjima gdje se u organizam unose specifični

dupleksi molekula RNA čiji slijed prati slijed neke ciljane mRNA. Zatim, određeni enzim razdvaja duplekse u kraće siRNA (*small interfering/silencing RNA*) čiji se lanac veže na komplementarnu mRNA i utišava ju (Nelson i Cox, 2017.). Ova metoda još se naziva i „*gene knockdown*" jer se ekspresija gena stišava, ali nije u potpunosti onemogućena (Berg i sur., 2015.). Pretpostavka je da uz vegetativnu kompatibilnost, veliku ulogu ima i mogućnost utišavanja virusne RNA u gljivi domaćinu.

Međutim, kako su i virusi evolucijski morali osigurati svoj opstanak, mnogi su razvili strategiju od stišavanja RNA kodiranjem proteina RSS (*RNA silencing suppressor*). U literaturi se navodi supresija RNA utišavanja Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) u gljivi *C. parasitica* ekspresijom RSS (Segers i sur., 2007.; Segers i sur., 2006.). Isto je utvrđeno i kod inficirane gljive *Aspergillus nidulans* (Hammond i sur., 2008.). U novijim podacima iz literature utvrđeno je da je od četiri inokulirana mikovirusa Rosellinia necatrix partitivirus 1 (RnPV 1), Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMyRV 3), Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1) i Rosellinia necatrix quadrivirus 1 (RnQV 1) u izolat gljive *R. necatrix* kojem je egzogeno inokuliran GFP gen za utišavanje RNA, samo mikovirus Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMyRV 3) doveo je do supresije RNA utišavanja *R. necatrix* (Yaegashi i sur., 2013.). Ovo otkriće obećavajuće je u smislu korištenja RnMyRV 3 kao biološke metode suzbijanja *R. necatrix.*

4. AGRONOMSKI ZNAČAJNI MIKOVIRUSI

U nastavku rada opisani su mikovirusi koji mogu biti od velikog značaja pri suzbijanju fitopatogenih vrsta gljiva, što je od važnosti s agronomskog aspekta. Posebna važnost ovih mikroorganizama s agronomskog gledišta je fenomen „hipovirulencije“, tj. njihov direktan utjecaj na smanjenje virulentnosti domaćina, a zbog potencijalnog smanjenja gubitka prinosa kultiviranog bilja te šumskih biljnih vrsta uzrokovanih zarazom patogenim gljivama. Hipovirulencija omogućava smanjenje patogenosti gljiva čiji su domaćini ekonomski važne kulture, što je dovoljan razlog korištenja mikovirusa kao bioloških agensa za suzbijanje biljnih bolesti (Abbas, 2016.).

4.1. Mikovirusi gljiva roda *Fusarium*

Fusarium spp. je kompleks patogenih gljiva koje parazitiraju na pšenici, kukuruzu, ječmu i drugim žitaricama smanjujući prinos (Desjardins i Proctor, 2007.). Uzročnici su paleži klasa žitarica (Abbas, 2016.). Fakultativni su paraziti te napadaju veliki broj korovnih i kultiviranih biljnih vrsta. Jedan od razloga zašto je rod *Fusarium* rasprostranjen u svim područjima svijeta je izrazita sposobnost prilagođavanju različitim agroklimatskim uvjetima. Kod kukuruza uzrokuju palež klijanaca, trulež korijena, stabljike i klipa, a kod pšenice i ostalih strnih žitarica palež klijanaca, trulež korijena i donjeg dijela vlati te palež klasova. Izvor zaraze mogu biti biljni ostaci u tlu, zaraženo sjeme i korovi (Ćosić i sur., 2004.). Napad bolesti koje uzrokuju *Fusarium* vrste utječe na prinos na kojem se javljaju značajne štete te urod može biti smanjen za više od 50 %, a iznimno i do 85 %. Smanjenje uroda je direktna šteta koju uzrokuju ove gljive, ali i indirektne štete su iznimno značajne, a očituju se u produkciji mikotoksina te smanjenju klijavosti i energije klijanja. U 2002. godini u Hrvatskoj zabilježeni su veliki problemi u sjemenskoj i merkantilnoj proizvodnji kukuruza zbog izuzetno jakog napada *Fusarium spp*. (Korić, 2003.). Naime, patogen se u tlu održava u obliku spora (hlamidospora) na biljnim ostacima. Pri povoljnim uvjetima hlamidospore prokliju formirajući hife, konidije ili nove hlamidospore. Hife u biljku ulaze kroz epidermu. Na bolesnim dijelovima biljke micelij stvara konidiofore s makrokonidijama i mikrokonidijama kojima se bolest širi s biljke na biljku. Prema višegodišnjim istraživanjima Ćosić i Vrandečić (2003.) i Ćosić i sur. (2004.) najčešća vrsta na zrnu pšenice u Hrvatskoj je *F. graminearum* (telemorf: *Gibberella zeae*), a manje su zastupljene *F. verticillioides* i *F. avenaceum*. U vrsti *F. graminearum* do sada je otkrivena prisutnost nekoliko mikovirusa te je od nekih dostupna kompletna sekvenca genoma (Darissa

i sur., 2011.; Yu i sur., 2009.; Chu i sur., 2002.; Compel i Fekete, 1999.; Nogawa i sur., 1996.).

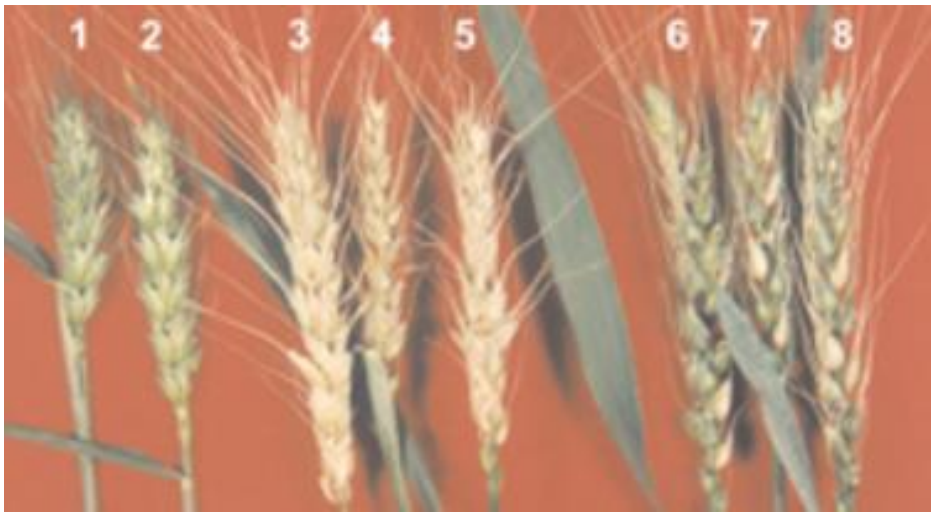
U kukuruzu i ječmu utvrđena je prisutnost sada već poznatih Fusarium graminearum virus 1 (FgV 1), Fusarium graminearum virus 2 (FgV 2), Fusarium graminearum virus 3 (FgV 3) i Fusarium graminearum virus 4 (FgV 4). Iako su taksonomski povezani, genetički se značajno razlikuju. Veličina genoma ovih dlRNA mikovirusa kreće se od 1,7 do 9,3 kpb. Do sada je samo za Fusarium graminearum virus 1 (FgV 1) otkriven hipovirulentan utjecaj na domaćina i to u vidu promjene morfologije i pigmentacije te općenito rasta micelija vrste *Fusarium graminearum* (Lee i sur., 2014.; Chu i sur., 2002.). Filogenetska analiza cijelog slijeda nukleotida ukazuje da je Fusarium graminearum virus 3 (FgV 3) usko povezan s porodicama *Totiviridae* i *Chrysoviridae*, ali nije svrstan, dok je virus Fusarium graminearum virus 4 (FgV 4) sličniji porodici *Partitiviridae* (Yu i sur., 2009.). Pretpostavlja se da je različita ekspresija različitih mikovirusa uzrokovala „reprogramiranje" metabolizma domaćina, odnosno ekspresija gena bila je različita kod zaraženih gljiva ako je prisutan drugačiji soj istog virusa.

Autor Chu i sur. (2002.) istraživali su utjecaj dlRNA mikovirusa na vrstu *F. graminearum* koja je parazitirala na sjemenu kukuruza. Cilj je bio utvrditi prisutnost dlRNA virusa u izolatima prikupljenih sa četrdeset polja na osam proizvodnih površina u Koreji. Nadalje, istraživan je i utjecaj na morfologiju inficirane gljive te je obavljeno sekvenciranje detektiranog dlRNA u izolatu *F. graminearum* - DK21. Ekstrakcija dlRNA iz micelija obavljena je pomoću CF-11 kromatografije te je molekulska masa utvrđena elektroforezom na agaroznom gelu. Kako bi potvrdili potencijalni hipovirulentni utjecaj na *F. graminearum*, kontrolni i hipovirulentni izolati gljive inokulirani su u biljke pšenice. Na inficiranim biljkama utvrđena je i količina mikotoksina te utjecaj na morfologiju i anastomozu hifa. Od 286 izolata gljive, dlRNA (7,5 kbp) je bio prisutan u 13 izolata. U nekim izolatima bili su prisutni veličinom manji dlRNA (5,5 kbp), ali na istima nije primijećena nikakva promjena u odnosu na kontrolni izolat. Otkriveni virus nazvan je Fusarium graminearum virus – DK21. Nadalje, utvrđena je i značajna razlika u veličini micelija kod inficiranih izolata gljive (Tablica 2). Produkcija konidija nije se značajno razlikovala, a rast i boja micelija bili su promijenjeni. Zaraženost klasova pšenice bila je manja kod hipovirulentnih izolata gljive u odnosu na kontrolni izolat (Slika 7). Količina toksina DON (deoxynivalenol) bila je značajno manja (3 - 7 mg/L) kod hipovirulentnog izolata nego kod kontrolnog izolata (76 - 84 mg/L).

Tablica 2. Prikaz utjecaja Fusarium graminearum virus DK21 na morfologiju i veličinu kolonija različitih izolata vrste *Fusarium graminearum*

Izolat[a]	dlRNA	Morfologija[b]	Promjer kolonije (cm)[c]
dlRNA-DK21	+	Tamno crveno, nepravilno	0,8±0,25[d]
dlRNA-bez DK21	-	Ružičasto, kružnica	2,34±0,13
T-DK B2	+	Tamno crveno, nepravilno	1,01±0,33[d]
T-DK C5	+	Tamno crveno, nepravilno	0,98±0,51[d]
T-DK D1	+	Tamno crveno, nepravilno	0,88±0,08[d]
T-DK F1	-	Ružičasto, kružnica	2,38±0,04

[a] *F. graminearum* izolati T-DK B2, T-DK C5, T-DK D1 i T-DK F1 dobiveni su anastomozom dlRNA-bez DK21 i dlRNA-DK21; [b]dlRNA-DK21 rezultirali su produkcijom tamno crvenog pigmenta, a kolonije su bile ameboidnog oblika. dlRNA-bez DK21 bile su ružičaste boje, a kolonije oblika kružnice; [c]prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti i standardna devijacija od 20 neovisnih pokusa. Promjer kolonija utvrđen je tri dana nakon inkubacije, a veličina je izražena u cm: [d] prikazane vrijenosti značajno su različite prema t-testu pri P=0,05 u odnosu na izolat dlRNA-bez DK21. (Izvor: preuzeto i prevedeno iz Chu i sur., 2002.)



Slika 7. Utjecaj izolata *Fusarium graminearum* s prisutnim Fusarium graminearum virus DK - 21 na širenje bolesti na klasu pšenice. 1, 2 -kontrolne biljke pšenice bez prisutne vrste *F. graminearum*; 3, 4, 5 – biljke pšenice zaražene izolatom *F. graminearum* u kojem nije prisutan mikovirus; 6, 7, 8 – biljke pšenice zaražene izolatom *F. graminearum* s prisutnim Fusarium graminearum virus DK - 21. Na slici je vidljivo da je zaraženost klasova manja kod hipovirulentog izolata vrste *F. graminearum* (6, 7, 8). (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Chu i sur., 2002.)

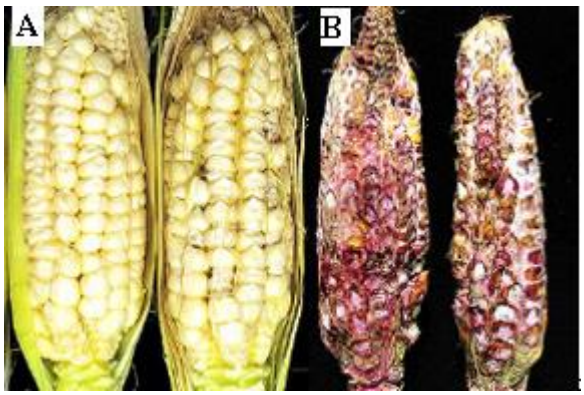
Sekvenciranjem dlRNA (RNA ovisna RNA polimeraza (RdRp)) utvrđena je podudarnost s nekoliko virusa, uključujući viruse Cryphonectria hypovirus 1 i Barley yellow mosaic virus (Chu i sur., 2002.). Filogenetski je ovaj virus bio sličniji virusima Cryphonectria hypovirus 3 (CHV 3) i Cryphonectria hypovirus 4 (CHV 4), dok je utvrđena manja sličnost s porodicom *Flexiviridae* (uključujući i *Potexvirus*) iako je sličnost u organizaciji genoma bila vrlo visoka.

Ovaj virus i dalje nije taksonomski svrstan[2] (Kwon i sur., 2007.). S obzirom da su različite populacije gljive *F. graminearum* često vegetativno kompatibilne, postoji velika mogućnost korištenja otkrivenog virusa kao potencijalnog agensa u biološkom suzbijanju ove vrste (Moon i sur., 1999.; Bowden i Leslie, 1992.).

Autor Darissa (2011.) u izolatu gljive *F. graminearum* (kineski tip gljive) s prisutnim Fusarium graminearum virus – ch9 (FgV - ch9) dokazuje hipovirulentni utjecaj. Neki od simptoma bile su promjene u strukturi stanica, smanjen rast, morfologija kolonija, tvorba konidija i virulentnost na pšenici i kukuruzu (Slika 8 i 9). Na razini stanice došlo je do djelomične reorganizacije citoplazme u odnosu na uobičajen izgled (Slika 10). Pomoću poliklonalnih antitijela utvrđeno je da su mikovirusi smješteni u citoplazmi u tvorevinama koje sliče vakuolama. Svi izolati s prisutnim mikovirusima uzrokovali su hipovirulentnost gljive *F. graminearum* u odnosu na kontrolni izolat, ali je jačina ovisila o biljci domaćinu. Prisutnost dlRNA virusa potvrđena je i u vrstama *F. poae* i *F. solani* f. sp. *robiniae* (Compel i sur., 1999.; Nogawa i sur., 1996.). Isti dlRNA identificirani su u vegetativno kompatibilnim izolatima gljiva, ali na inficiranim izolatima nije primijećena promjena u fenotipu.

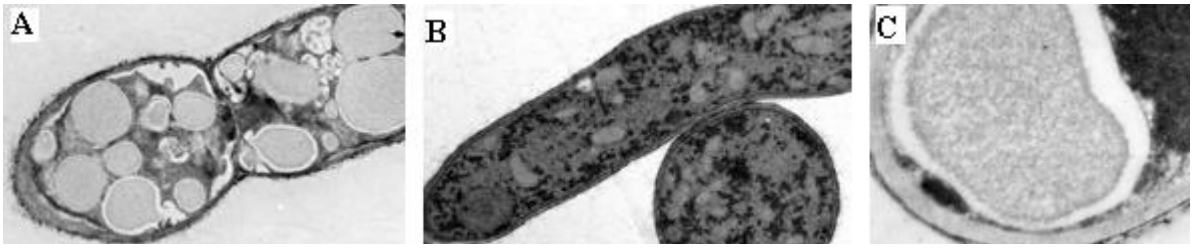


Slika 8. Utjecaj hipovirulencije izolata s Fusarium graminearum virus – ch9 na klasu pšenice. A - zaraženost klasa pšenice s izolatom *F. gramineaum* u kojem je pristuran mikovirus; B - zaraženost klasa pšenice izolatom *F. graminearum* u kojem nije prisutan mikovirus. Na slici je vidljiv značajan hipovirulentan utjecaj na vrstu *F. graminearum*, klasovi pšenice slabije su zaraženi u odnosu na izolat bez prisutnog mikovirusa. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Darissa, 2011.).



Slika 9. Utjecaj hipovirulencije izolata s Fusarium graminearum virus – ch9 na klipu kukuruza. A - zaraženost klipa kukuruza s izolatom *F. gramineaum* u kojem je pristuran mikovirus; B - zaraženost klasa pšenice izolatom *F. graminearum* u kojem nije prisutan mikovirus. Na slici je vidljiv značajan hipovirulentan utjecaj na vrstu *F. graminearum*, klipovi kukuruza slabije su zaraženi u odnosu na izolat bez prisutnog mikovirusa. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Darissa, 2011.).

[2] *https://talk.ictvonline.org/search-124283882/?q=fusarium%20graminearum%20virus#gsc.tab=0&gsc.q=fusarium%20graminearum%20virus&gsc.page=1*

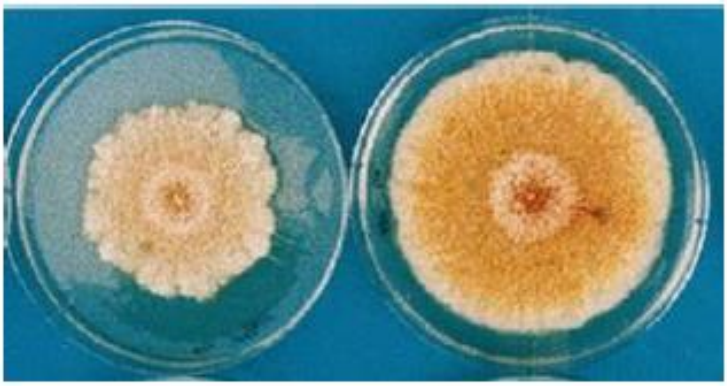


Slika 10. Položaj čestica mikovirusa u stanici gljive domaćina. A - vidljiva reorganizacija citoplazme u prisutnosti mikovirusa; B - uobičajen izgled stanice vrste *Fusarium graminearum*; C-smještaj mikovirusa u citoplazmi stanice domaćina. (Izvor: Darissa, 2011.)

4.2. Mikovirusi gljiva roda *Cryphonectria*

Hipovirulencija se može prenositi na virulentne sojeve gljive uz uvjet da su izolati gljiva vegetativno kompatibilni što je prethodno objašnjeno, a česta je to pojava na vrsti ***C. parasitica***. U Europi je prisutnost ovoga patogena prvi puta zabilježena 1938. godine, a tek 1955. godine utvrđena je i u Republici Hrvatskoj u okolici Opatije (Kišpatić, 1956.). *C. parasitica* je uzročnik raka kore zbog čega odumiru stabla kestena. Prilikom zaraze dolazi do promjena na kori stabla koja postaje tamnija, blago ulegnuta i crvena. Virulentni izolat gljive dovodi do promjene boje i uzdužnog pucanja kore što uzrokuje njezino odvajanje i stvaranje raka. Na zaraženim područjima lako se uočavaju žuto-narančasta ili crvenkasta plodna tijela gljive. Pored navedenog dolazi do žućenja i gubitka lišća, pojave nekroza, hipertrofije te izostanka apscizije suhih listova u jesen (Glavaš, 1999.; Halambek, 1988.).

Velike probleme zaraza sa *C. parasitica* uzrokuje na području Europe, Amerike i Azije gdje je biodiverzitet i zdravlje šuma pitomog kestena ugrožena. Iako se pojavljuje kao najznačajniji patogen kestena, posljednjih godina uočeno je ozdravljenje zaraženih stabala koje se pripisuje mikovirusu Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) (Nuss, 2005.). Naime, prisutnost Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) dovodi do smanjenja virulentnosti i depigmentacije gljive domaćina (hipovirulentna gljiva) (Slika 11).



Slika 11. Utjecaj hipovirulentnog izolata na morfologiju kolonije *Cryphonectria parasitica*. Na slici lijevo prikazan je izolat *C. parasitica* s prisutnim Cryphonectria hypovirus 1; na slici desno prikazan je izolat *C. parasitica* bez prisutnog mikovirusa Cryphonectria hypovirus 1. Vidljivo je da je izolat s prisutnim mikovirusom značajno manjeg promjera i smanjenje pigmentacije u odnosu na kontrolni izolat, čime je dokazan hipovirulentni utjecaj na vrstu *C. parasitica*. (Izvor: preuzeto iz Chen i Nuss, 1999.)

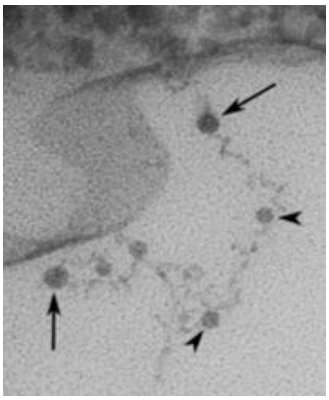
Ova pojava od velike je važnosti za očuvanje šuma kestena te se ovi mikovirusi u današnje vrijeme uspješno koriste kao biološki agensi u suzbijanju *C. parasitica* (Nuss, 2005.). Na području Republike Hrvatske već se godinama intenzivno proučava utjecaj mikovirusa Cryphonectria hypovirus 1 (CHV 1) na virulenciju *C. parasitica* (Krstin i sur., 2016.). U ovom dijelu interakcije mikovirusa s gljivom domaćinom utvrđeno je da će uspješnost hipovirulencije najviše ovisiti o vegetativnoj kompatibilnosti između različitih skupina gljiva koje pripadaju istoj vrsti. Ako to nije slučaj, prijenos mikovirusa bit će ograničen ili nemoguć. Smanjenje uspješnosti hipovirulencije *C. parasitica* zamijećena je već pri razlici na samo jednom lokusu s parom alela (Choi i sur., 2002.). Spolno razmnožavanje također inhibira širenje virusa jer askospore ne sadrže virus, a osim navedenog problem nastaje i rekombinacijom gena *C. parasitica* što povećava raznolikost populacija i time ograničava prijenos mikovirusa na virulentne tipove patogena (Cortesi i Milgroom 1998.).

4.3. Mikovirusi gljiva roda *Botrytis*

Botrytis cinerea (teleomorf *Botryotionia fuckeliana*) je fitopatogena gljiva sa širokim spektrom domaćina. Kozmopolitska je vrsta te uzročnik sive plijesni na više od 200 biljnih vrsta (Miličević, 2016.). Kulture koje najčešće parazitira su jagode, kupina, kruška i vinova loza. U kontinentalnom dijelu Hrvatske nanosi štete koje se kreću od 50 do 60 %, a u mediteranskom od 3 do 5 % (Topolovec-Pintarić, 2000.). Smanjuje urod i kakvoću grožđa čime direktno utječe na proces vinifikacije. Troškovi primjene fungicida za zaštitu od sive plijesni (botriticidi) prosječno iznose 540 milijuna eura, što je oko 10 % vrijednosti fungicida na

svjetskom tržištu, a zaštita vinove loze iznosi 50 % ukupne vrijednosti korištenih botriticida (Orkić, 2015.). Bolest napada sve nadzemne dijelove vinove loze (pupove, listove, internodije i vrhove mladica, cvatove, grozdove, bobice, peteljčice i peteljku grozda) (Kišpatić i Maceljski, 1991.). Grožđe koje je zaraženo sivom plijesni ima povećanu pH vrijednost, veću količinu metanola, glicerola, limunske, jabučne, glukonske i octene kiseline, a smanjen sadržaj vinske kiseline zbog čega su vina podložnija oksidaciji (Ribereau-Gayon, 1960.).

Najčešće se na jednom domaćinu nalazi samo jedan mikovirus, ali je i ta pojava postala fenomen jer se u posljednje vrijeme na jednom domaćinu mogu detektirati više prisutnih mikovirusa, odnosno u jednom hipovirulentnom izolatu gljive moguća je infekcija s dva različita mikovirusa. Takva pojava naziva se koinfekcija, a utvrđena je u mnogim gljivama uključujući i ekonomski značajnu gljivu *Botrytis cinerea* (Donaire i Ayllon, 2017.). Utjecaj mikovirusa na *B. cinerea* slabo je zastupljen u dostupnoj literaturi. Tek autor Potgieter i sur. (2013.) na izolatu *B. cinerea* CCg378, utvrđuju prisutnost dva mikovirusa različite veličine (32 nm i 23 nm, dlRNA) purifikacijom pomoću komatografske separacije koristeći CF11 celulozu koja omogućuje selektivno odvajanje dlRNA od DNA i jlRNA i elektoroforezom produkta na agaroznom gelu, potvrđuju učestalost koinfekcije u *B. cinerea*. Oba virusa bila su prisutna u jednoj stanici micelija te je primijećena i značajno smanjena enzimatska aktivnost i sporulacija kod izolata *B. cinerea* s prisutnom dlRNA molekulom u odnosu na kontrolni izolat (Castillo i sur., 2011.). Ovim istraživanjem sugerira se mogućnost suzbijanja *B. cinerea*. Međutim, kako bi se mikovirusi mogli koristiti kao biološka mjera suzbijanja, potrebno je provesti još mnogo detaljnijih istraživanja, a s ciljem boljeg poznavanja mikovirusa te mehanizama kojim utječu na gljivu *B. cinerea* (Slika 12).



Slika 12. Prisutnost dva virusa različite veličine (23 i 32 nm, dlRNA) u stanici micelija izolata *Botrytis cinerea* CCg378. Na slici su prikazani mikovirusi pristuni u jednoj stanici micelija vrste *Botrytis cinerea*. Dužom strijelicom označene su čestice većeg virusa (32 nm), a kraćom čestice veličinom manjeg virusa (23 nm), čime je potvrđena koinfekcija u vrsti *B. cinerea*. (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Potgieter i sur., 2013.)

Koinfekcija je dokazana i kod vrsta *C. parasitica*, *Diaphorte ambigua* (Chung i sur., 2008.; Smit i sur., 1996.; Rigling i van Alfen, 1993.), *Aspergillus fumigatus* (Bhatti i sur., 2012.; van Diepeningen i sur., 2006.), *Scletorinia sclerotiorum* (Xie i Ghabrial, 2012.) i *Fusarium graminearum* (Chu i sur., 2004.).

4.4. Mikovirusi gljiva roda *Rosellinia*

Veliki broj istraživanja mikovirusa posvećen je onima koji inficiraju fitopatogenu askomicetnu gljivu ***Rosellinia necatrix*** Prilleux. Ova patogena gljiva parazitira na preko 200 domaćina koji su svrstani u 50 različitih porodica. Uzrokuje trulež korijen jabuka, vinove loze i drugih voćnih vrsta (Pliego i sur., 2012.; Ito i Nakamura, 1984.). Jedna je od mnogih patogenih gljiva čija je važnost preventivnog suzbijanja na našem području od iznimne važnosti kod voćnih sadnica. Također je često prisutna na maslini koja je najznačajnija mediteranska voćna vrsta u Hrvatskoj gdje proizvodnja sadnica svake godine bilježi neprekidan porast. Samo je tijekom 2006. godine proizvedeno 575.881 sadnica od 22 sorte masline (Gugić i sur., 2007.). Utvrđeno je da je *R. necatrix* domaćin mikovirusima koji su svrstani u pet različitih porodica, a to su: *Partitviridae*, *Quadriviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae* i *Megabirnaviridae* (Chiba i sur., 2013a.; Chiba i sur., 2013b.; Lin i sur., 2012.; Chiba i sur., 2009.; Sasaki i sur., 2005.; Wei i sur., 2003.).

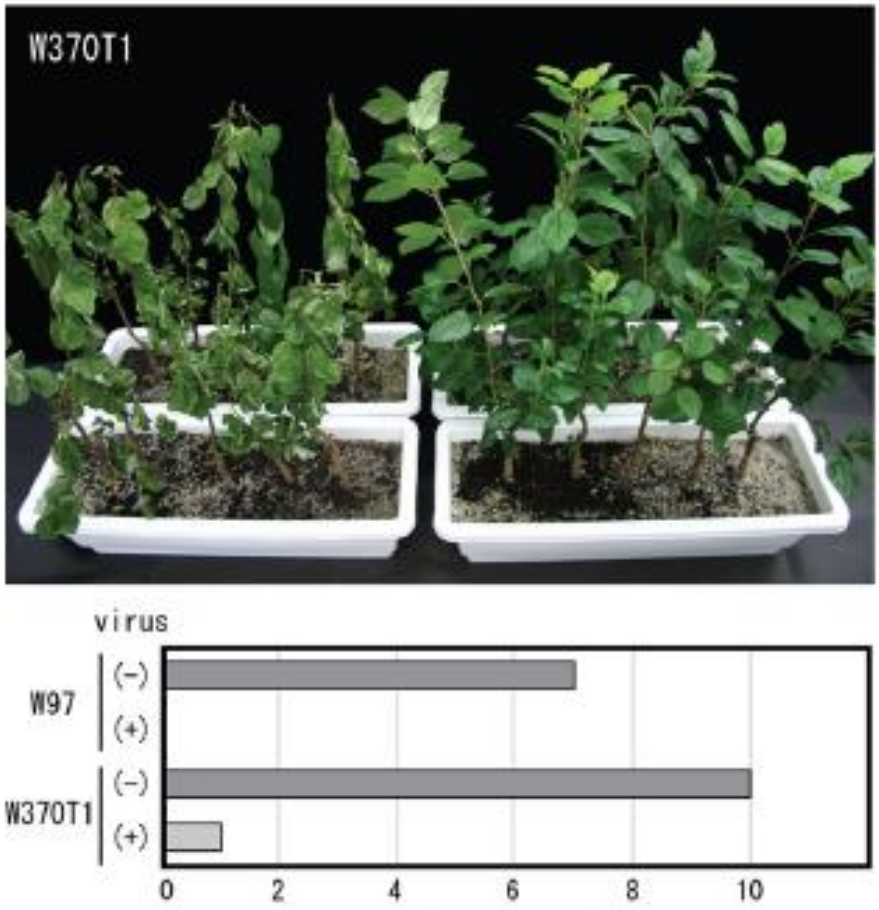
Potaknuti uspješnom biokontrolom *C. parasitica* u Europi, skupina japanskih istraživača okreće se prema izolaciji mikovirusa iz više od tisuću izolata gljive *R. necatrix* (Ghabrial i Suzuki, 2009.). Od svih sakupljenih izolata *R. necatrix*, u 20 % utvrđena je prisutnost dlRNA. Utvrđena je i prisutnost već poznatih mikovirusa poput Mycoreovirus 3 (MyRV 3) i Rosellinia necatrix partitivirus 1 (RnPV 1) (Sasaki i sur., 2005.). Navedeni mikovirusi infektivni su u domaćinu *R. necatrix* (Sasaki i sur., 2007.; Sasaki i sur., 2006.). Za Mycoreovirus 3 (MyRV 3) dokazano je da smanjuje virulentnost gljive čak i kod vegetativno inkompatibilnih populacija. Također je i Rosellinia necatrix partitivirus 1 (RnPV 1) infektivan u domaćinu, ali bez vidljivih simptoma. Nadalje, autor Chiba i sur. (2009) na izolatu *R. necatrix* W779 utvrđuju prisutnost dva dlRNA virusa u vegetativno inkompatibilnim izolatima. Filogenetskom analizom RdRp utvrđeno je da virus nije sličan već poznatim porodicama kojima pripadaju Mycoreovirus 3 (MyRV 3) i Rosellinia necatrix partitivirus 1 (RnPV 1), čime otkrivaju prisutnost novog virusa kojeg nazivaju Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1), a kao potencijalnog biološkog agensa za suzbijanje gljive *R. necatrix* te predlažu uvrštavanje nove porodice

- *Megabirnaviridae* među već postojeće. Godine 2012. priznata je porodica *Megabirnaviridae* s vrstom Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1) od strane Međunarodnog povjerenstva za taksonomiju virusa (*International Committee onTaxonomy of Viruses, ICTV*) (Kanematsu i sur., 2014.). Infekcijom izolata *R. necatrix* novootkrivenim mikovirusom potvrđuju njegov značajan hipovirulentni utjecaj na vrstu *R. necatrix*. Također je primijećen i utjecaj na fenotip domaćina (Slika 13).



Slika 13. Utjecaj prisutnosti Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 na morfologiju kolonije vrste *Rosellinia necatrix*. Na slici desno prikazana je kolonija izolata vrste *Rosellinia necatrix* bez prisutnog mikovirusa, dok je na slici lijevo prikazana kolonija izolata gljive s prisutnim mikovirusom. Vidljivo je da je mikovirus imao hipovirulentan utjecaj na širenje kolonije *R. necatrix*. (Izvor: Chiba i sur., 2009.)

Autor Yaegashi i sur. (2013.) utvrđuju uspješnu koinfekciju izolata *R. necatrix* zaraženog s Rosellinia necatrix quadrivirus 1 (RnQV 1), Rosellinia necatrix partitivirus 1 (RnPV 1), Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1) i Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMYV 3), ali je koinfekcija bila ograničena na izolatu s prisutnim Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMYV 3). Dobivene rezultate objašnjavaju nedovoljnom anastomozom hifa zaraženih izolata gljive. Prijenos Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMYV 3) bio je moguć i na vegetativno inkompatibilne izolate gljiva gdje je primijećena redukcija rasta micelija te bolji fitnes biljaka parazitiranih *R. necatrix* (Slika 14). U ovom istraživanju Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV 1) doveo je do smanjenog rasta micelija, ali i virulencije gljive te je potencijalni agens za suzbijanje bez potrebe korištenja fungicida, čime bi se zahtjevi za ekološki prihvatljivim mjerama suzbijanja mogli zadovoljiti (Chiba i sur., 2009.; Kanematsu i sur., 2004.).



Slika 14. Utjecaj izolata *R. necatrix* W97 i W370T1 s prisutnim Rosellinia necatrix mega-birnavirus 1 na sadnice jabuke. Na slici desno prikazane su sadnice jabuke u koje su inokulirani izolati *R. necatrix* s prisutnim mikovirusom, dok su na slici lijevo prikazane sadnice jabuke zaražene s izolatima *R. necatrix* u kojima nije bio prisutan mikovirus. Grafikon ispod slike prikazuje utjecaj prisutnosti mikovirusa u izolatima na broj propalih sadnica jabuke nakon četiri tjedna od zaraze. Vidljivo je da su sadnice jabuke na izolatima u kojima nije prisutan mikovirus značajno slabijeg fitnesa. Zaraza izolatom W97 s prisutnim mikovirusom nije zabilježena niti jedna propala sadnica jabuke dok je kod oba izolata bez prisutnog mikovirusa zabilježen veći broj propalih sadnica. (Izvor: Chiba i sur., 2009.)

S obzirom da je istraživanje provedeno na izolatima gljive s područja Japana, dovodi se u pitanje učinkovitost suzbijanja *R. necatrix* u ostalim geografski različitim područjima. Tako je ograničavajući čimbenik u suzbijanju *C. parasitica* u Americi bila vegetativna raznolikost populacija gljive na tom području, dok je ovakav način suzbijanja bio uspješan u Europi (Krstin i sur., 2016.; Nuss, 2005.). Zbog navedenog, veliki interes se usmjerava prema boljem razumijevanju interakcije te pronalaženju mogućnosti proširenja spektra domaćina mikovirusa (Ghabrial i Suzuki, 2009.; Matsumoto, 1998.).

4.5. Mikovirusi gljiva roda *Rhizoctonia*

Rhizoctonia spp. je polifagna skupina gljiva čiji su domaćini okopavinski usjevi, povrtnice, voće, ukrasno bilje i šumske vrste na kojima uzrokuje ekonomski značajne gubitke diljem svijeta (Zheng i sur., 2013.). Rod *Rhizoctonia* broji mnogo vrsta, ali je s agronomskog gledišta najvažnija *R. solani* koja je uzročnih smeđe truleži korijena. Na našem području može uzrokovati velike gubitke u proizvodnji šećerne repe. Prosječni gubitci prinosa kreću se oko 2 do 50 %, dok gubitci šećera mogu biti i do 60 %. Nadalje, u skladištima krumpira ova gljiva može utjecati na smanjenje tržišne vrijednosti gomolja narušavajući njihov izgled i kvalitetu (Sever i Miličević, 2013.). Telemorfni oblik *Thanatephorus rijetok* rijetko je uočen u prirodi, a problem je i *in vitro* uzgoj istog (Zheng i sur., 2014.). Zbog stalne upotrebe fungicida kao učinkovite mjere suzbijanja ove patogene gljive, dolazi do velikih ekoloških problema te pojave rezistentnih biotipova, stoga je cilj pronaći povoljnije biološke metode suzbijanja (Zhang i sur., 2012.).

Prvo otkriće dlRNA virusa u *R. solani* zabilježeno je 1978. godine, a otkrili su ga Castanho i Butler (1978.). Daljnjim istraživanjima otkrivena je prisutnost tri različita mikovirusa u gljivi *R. solani* tip AG-1 IA, a to su Rhizoctonia solani RNA virus 1 (RsRV 1), Rhizoctonia. solani partitivirus 2 (RsPV 2) i Rhizoctonia solani virus - HN008 (RsRV - HN008) (Zhong i sur., 2015.; Zheng i sur., 2014.; Zheng i sur., 2013.).

Autor Zheng i sur. (2018.) dokazuju prisutnost dlRNA u 16 od 43 izolata gljive *R. solani* AG-1 IA. Na jednom izolatu utvrđena je i koinfekcija s dva različita mikovirusa (Rhizoctonia solani RNA virus 1 (RsRV 1) i Rhizoctonia solani virus - HN008 (RsRV - HN008)). U poljskim uvjetima populacije *R. solani* mogu biti virulentne ili hipovirulentne. Hipovirulencija je u takvim populacijama uzrokovana genetski, a ne isključivo zbog prisutnosti mikovirusa, kao što je bio slučaj kod prethodno navedenih vrsta. S gledišta fitopatologije, oba slučaja su zanimljiva (Ghabrial, 2001.). Kako je ovo jedna od prvih vrsta u kojoj je otkrivena hipovirulencija, do sada već postoje sojevi koji se koriste u biološkom suzbijanju *R. solani* putem antagonizma (Sneh i sur., 1996.; Ogoshi, 1978.). Također je nedavno otkriven hipovirulentni izolat Rhizoctonia solani virus 717 (rod *Partitivirus*), a koristi se na način da tijekom aplikacije hipovirulentnog soja u virulentni dolazi do širenja hipovirulentnog koji antagonistički djeluje na virulentni tip *R. solani* (Nuss, 2005.; Milgroom i Cortesi, 2004.; Ghabrial, 2001.; Lakshman i sur., 1998.).

4.6. Ostale vrste

Prisutnost dlRNA utvrđena je i u gljivi ***Alternaria alternata*** (Fr.) Keissler na pamuku i kruški. (Shepherd, 1988.; Hayashi i sur., 1988.). Kod *A. alternata* nije došlo do promjena u fenotipu niti povećane tvorbe toksina na zaraženim izolatima. Međutim, prema novijim istraživanjima prisutnost dlRNA u izolatu gljive *A. alternata* uzrokovao je abnormalnosti u fenotipu poput smanjenog rasta micelija, promjene boje te citolize stanica (Aoki i sur., 2009.). Simptomi poput smanjenog rasta micelija i promjene boje najsličniji su hipovirulentnom izolatu gljive *C. parasitica* (Cryphonectria hypovirus 1, CHV 1) (Nuss, 2005.). Izolirani mikovirus iz gljive *A. alternata* EGS 35-193 nazivan je Alternaria alternata virus 1 (AaV 1). Purifikacijom ovog mikovirusa utvrđeno je da je sličan mikovirusima iz porodice *Totiviridae, Partitiviridae* i *Chrysoviridae*. Prema Međunarodnom povjerenstvu za taksonomiju virusa (*International committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*) svrstan je u porodicu *Chrysoviridae* te se naziva Alternaria alternata chrysovirus 1 (AaCV 1). Od velikog značaja bio bi uspješan prijenos na vrstu *A. solani* koja uzrokuje koncentričnu pjegavost krumpira, a na području Hrvatske najčešće se pojavljuje na krumpiru i rajčici uzrokujući do 40 % manje prinosa (Miličević i sur., 2013.).

U literaturi se dostupni podatci i o prisutnosti mikovirusa u gljivi ***Gremmeniella abietina*** koja parazitira u šumama četinjača uzrokujući deklorofilacjiu iglica, što posljedično rezultira odumiranjem stabala. Mikovirus izoliran iz gljive *G. abietina* nazvan je Gremmeniella abietina RNA Virus 6 (GaRV 6), odnosno prema novijim podatcima Gremmeniella abietina RNA viurus MS 1 (GaRNAVMS 1) (porodica *Partitiviridae*). Također je istražena genetska raznolikost 162 izolata ove gljive iz mnogih zemalja Europe poput: Češke, Španjolske, Finske, Italije, Turske i dr., ali i Kanade i SAD-a. Metodom lančane reakcije polimerazom obrnutim prepisivanjem (*Real time-polymerase chain reaction, RT-PCR*) RdRp sekvence utvrđena je prisutnost ovog mikovirusa samo na području Španjolske gdje je genetski izrazito uniforman (Botella i sur., 2015.). Zbog smanjene prisutnosti na većem području Europe, važno je pratiti njezino širenje, ali potrebe za suzbijanjem i dalje nisu neophodne.

Od većeg značaja je prisutnost mikovirusa i u entomopatogenoj gljivi ***Beauveria bassiana***. Ekstrakcijom dlRNA genoma CF 11 kromatografijom te elektoforezom produkata na agaroznom gelu, utvrđena je prisutnost dlRNA u 40 od 73 izolata *B. basiana* što je ukupno 54,8 % od ukupnog broja izolata. Raznolikost dlRNA u pogledu veličine bila je značajna (0,8 do 12 kbp). Genomom su najsličniji virusima koji pripadaju porodicama *Chrysoviridae* i *Par-*

titiviridae. Najveća pojavnost bila je genoma veličine 5,5 kbp. Genom navedene veličine u nekim je izolatima gljive bio samostalno prisutan, dok je u nekima bio prisutan zajedno s još nekoliko dlRNA, stoga sugeriraju da je većina izolata inficirana s više mikovirusa (koinfekcija). Prvi identificirani virus u *B. bassiana* nazvan je Beauveria bassiana RNA virus 1 (BbRv 1), koji je 2013. godine preimenovan u Beauveria bassiana victorivirus 1 (BbV 1) (porodica *Totiviridae*) (Herrero i sur., 2012.). Mikvirusi prisutni u *B. bassiana* nisu utjecali na fenotip izolata gljive.

Koinfekcija mikovirusima utvrđena je i u entomopatogenoj gljivi ***Tolypocladium clyndorsporum*** čiji je domaćin komarac (Herrero i Zabalgogeazcoa, 2011.). Sekvenciranjem je otkriveno da je najsličniji virusima roda *Victorivirus* (porodica *Totiviridae*) kao i kod vrste *B. bassiana,* a koji inficiraju i filamentozne gljive (Ghabrial i Nibert, 2009.). S obzirom da je hipovirulencija entomopatogenih gljiva nepoželjna pri suzbijanju štetnih kukaca, kod vrste *T. clyndosporum* ipak se uspješno mogu „izliječiti“ hipovirulentni izolati pomoću ribavirina (Herrero i Zabalgogeazcoa, 2011.). Pojava hipovirulencije poželjna je tek kod zaraze korisnih vrsta kukaca.

Mikovirusi su često i latentni u svom domaćinu. Tako primjerice, nije utvrđena korelacija između mikovirusa i gljive u vrsti *Rhipicephalus microplus* (azijski plavi krpelj) koji parazitira na životinjama, a često je prisutan na različitim vrstama stoke (Perinotto i sur., 2014.). Tu tezu potvrđuju i na izolatima entomopatogene gljive roda ***Metarhizium***, gdje je najbolji entomopatogeni utjecaj utvrđen kada je korišten izolat gljive koji nije bio inficiran virusom. Slične rezultate pokazuju i Martins i sur., (1999.) i Arruda i sur. (2005.). Pretpostavka je da mikovirusi mogu utjecati na povećano izlučivanje hidrolitičkih enzima, ali to nije bio slučaj u ovom radu, stoga sugeriraju da je prisutnost virusa u *Metarhizium spp.* latentan, no kako bi se ta pretpostavka mogla potvrditi potrebno je istražiti puno više izolata ove entomopatogene gljive.

5. ZAKLJUČAK

S obzirom na potrebu nalaženja ekološki prihvatljivijih mjera suzbijanja, uključivanje mikovirusa kao biološke mjere suzbijanja patogenih gljiva, uvelike bi doprinijelo potrebama današnjice. Osim što inhibitorno utječu na razvoj i virulentnost gljiva, mogu i povoljno djelovati na biljke, a na način da umanjuju posljedice nastale od temperaturnog stresa. Budući izazovi usmjereni su prema boljem shvaćanju interakcije virusa i gljiva domaćina te pronalasku načina uspješnije introdukcije hipovirulentnih populacija gljiva na područja gdje virulentne populacije čine ekonomski značajne štete. U obzir bi se trebala uzeti i mogućnost genetske modifikacije gljiva, a u smislu smanjenja ograničavajućih čimbenika koji utječu na prijenos mikovirusa. Također je potrebno provesti još mnoga istraživanja u poljskim uvjetima kako bi se problemi koji se inače ne javljaju u laboratorijskim uvjetima mogli uočiti i riješiti. U poljskim uvjetima bilo bi moguće otkriti i postojanje vektora. Korištenje mikovirusa kao bioloških agenasa u suzbijanju patogenih gljiva uvelike bi smanjilo negativan utjecaj sintetskih fungicida na okoliš, što bi imalo direktan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja te bi se značajno smanjila kontaminacija tla i podzemnih i površinskih voda. Dodatno, uvođenje mikovirusa dovelo bi do smanjenja razvoja biotipova rezistentnih na fungicide. Kombinirana primjena mikovirusa i fungicida također bi se mogla uzeti u obzir. Iako fungicidi uspješno suzbijaju mnoge bolesti uzrokovane fitopatogenim gljivama, ipak su gljive i dalje uzrok najvećem broju biljnih bolesti. Nove tehnike analize genetskog materijala prisutnog u gljivama, prije svega sekvenciranje visoke propusnosti (*High throughput sequencing*) omogućuju otkrivanje novih mikovirusa te njihovo detaljnije istraživanje u prirodnim populacijama gljiva. Za očekivati je da će ovakva istraživanja doprinijeti dodatnim saznanjima o broju i vrstama mikovirusa te potencijalu za njihovu primjenu u biološkom suzbijanju fitopatogenih gljiva važnih u poljoprivrednoj proizvodnji.

6. LITERATURA

1. **Abbas** A. (2016). A Review paper on Mycoviruses. Journal of Plant Pathology. & Microbiology. 7 (12): 1-4. doi: 10.4172/2157-7471.1000390 – pristup 01. 02. 2020.
2. **Abid** M., Khan M. A. U., Mushtaq S., Afzaal S., Haider M. S. (2018). Comprehensive review on mycoviruses as biological control agent. World Journal of Biology and Biotechnology. 3(2): 187-192.
3. **Allen** A., Islamovich E., Kaura J., Goldb S., Shaha D., Smith T. J. (2013). The virally encoded killer proteins from *Ustilago maydis*. Fungal Biology Review. 26:166–173.
4. **Almola** G. A., Al-Zubaidi Z. H., Imran Z. K. (2015). Molecular characterization of Mycovirus in the dermatophyte and non-dermatophyte fungi. International.Journal.of Innovation.and Applied Studies. 10 (4): 1073-1075.
5. **Aoki** N., Moriyama H., Kodama M., Arie T., Teraoka T., Fukuhara T. (2009). A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. Virus Research. 140: 179-187.
6. **Arruda** W., Lübeck I., Schrank A., Vainstein M.H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Experimental Applied Acarology. 37: 231–244.
7. **Berg** J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr. Stryer L. (2015). Exploring genes and genomes. U: Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr. Stryer L. (ur.)Biochemistry. W. H. Freeman and Company. New York. NY. 135-168.
8. **Bhatti** M. F., Jamal A., Bignell E. M., Petrou M. A., Coutts R. H. (2012). Incidence of dsRNA mycoviruses in a collection of *Aspergillus fumigatus* isolates. Mycopathologia. 174: 323–326.
9. **Borodynko** N., Jaroszewska, B. H., Rymelska N., Pospieszny, H. (2010). La France disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* in Poland. Acta Virologica. 54(3): 217-219.
10. **Bostian** K. A., Hopper J. E., Rogers D. T., Tipper D. J. (1980). Translation analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. Cell. 19: 403-414.
11. **Botella** L., Vainio E. J., Hantula J., Diez J. J., Jankovsky L. (2015). Description and prevalence of a putative novel mycovirus within the conifer pathogen *Gremmeniella abietina*. Archives of. Vriology. 160: 1967-1975.

12. **Bowden** R. L., Leslie J. F. (1992). Nitrate-nonutilizing mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. Experomental Mycology. 16: 308–315.
13. **Buller** A. H. R. (1933). Hyphal Fusions and Protoplasmic Streaming in the Higher Fungi, Together with an Account of the Production and Liberation of Spores in the *Sporobolomyces*, *Tilletia*, and *Sphaerobolus*. Green and Co., Longmans. Researches on Fungi, Volume 5.
14. **Castanho** B., Butler E. E.(1978). *Rhizoctonia* decline: Adegenerative disease of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 68: 1505–1510.
15. **Castillo** A., Cottet L., Castro M., Sepúlveda F. (2011). Rapid isolation of mycoviral-double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. Virolpgy Journal. 8: 38.
16. **Chiba** S., Lin Y. H., Kondo H., Kanematsu S., Suzuki N. (2013a). Effects of defective- interfering RNA on symptom induction by, and replication of, a novel Partiti- virus from a phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix*. Journal of Virology.87: 2330–2341.
17. **Chiba** S., Lin Y. H., Kondo H., Kanematsu S., Suzuki N. (2013b).A novel victorivirus from a phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*, is infectious as particle sand targetedbyRNAsilencing. Journal of Virology.87: 6727–6738.
18. **Chiba** S., Salaipeth L., Lin Y. H., Sasaki A., Kanematsu S., Suzuki N. (2009). A Novel Bipartite Double-Strainded RNA Mycovirus from the White Root Rot Fungus *Rosellinia necatrix*: Molecular and Biological Characterization, Taxonomic Considerations, and Potential for Biological Control. Journal of Virology. 83 (24): 12801-12812. doi:10.1128/JVI.01830-09 – pristup 25. 09. 2019.
19. **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 parasiticia*. Genetics. 190: 113–127.
20. **Chu** Y. M., Jeon J. J., Yea S. J., Kim Y. H., Yun S. H., Lee Y. W., Kim K. H. (2002). Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. Applied and Environmental Microbiology. 68 (5): 2529-2534.
21. **Chu** Y. M., Lim W. S., Yea S. J., Cho J. D., Lee Y. W., Kim K. H. (2004). Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. Virus Genes. 28: 135–143.

22. **Chung** H. J., Kwon B. R., Kim J. M., Park S. M., Park J. K., Cha B. J., Yang M. S., Kim D. H. (2008). A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated Laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Molecular Plant Microbiological Interactions. 21: 1582–1590.

23. **Coenen** A., Kevei F., Hoekstra R. F. (1997). Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. Genetic Research. 69: 1–10.

24. **Compel** P., Fekete C. (1999). Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. Virus Genes. 18: 49–56.

25. **Compel** P., Papp I., Bibo M., Fekete C., Hornok L. (1999). Genetic inter-relationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. Virus Genes. 18: 49–56.

26. **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.

27. **Cortesi** P., Milgroom M. G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 2988-2994.

28. **Ćosić** J., Vrandečić K., Svitlica B. (2004). *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda. 10(1): 5-8.

29. **Ćosić** J., Vrandečić, K. (2003). Fuzarijske bolesti pšenice. Glasilo biljne zaštite. 5: 284-288.

30. **Darissa** O. (2011). Molecular characterization of a novel segmented dsRNA mycovirus and its association with hypovirulence of *Fusarium graminearum*. Hamburg. Dissertation.

31. **de Figueiredo** L. C., de Figueiredo G. S., Giancoli A. C. H., Tanaka F. A. O., da Silva L. A. O., Kitajima E. W., Filho S. A, Azevedo J. L. (2012). Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. Tropical Plant Pathology. 37(2): 142-145.

32. **Desjardins** A., Proctor R. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. International Journal of Food Microbiology. 119: 47–50.

33. **Ding** S. W., Voinnet O. (2007).Antiviral immunity directed by small RNAs.Cell.130: 413–426.

34. **Donaire** L., Ayllon M. A. (2017). Deep sequencing of mycovirus-derived small RNAs from *Botrytis* species. Molecular Plant Pathology. 18(8): 1127-1137.

35. **Đorđević** S. (2008). Primena mikroorganizama u organskoj proizvodnji. Organska poljoprivreda. Institut za ratarstvo i povrtlarstvo. Novi Sad. 534-539.
36. **Flores-Pacheco** J. A., Munoz-Adalia E. J., Martinez-Alvarez P., Pando V., Diez-Casero J. J., Martin-Garcia J. (2017). Effect of mycoviruses on growth, spore germination and pathogenecity of the fungus *Fusarium circinatum*. Forest Systems. 26(3): eSC07 . https://doi.org/10.5424/fs/2017263-11060 - pristup 01. 03. 2020.
37. **Ghabrial** A. S., Caston J. R., Jiang D., Nibert M. L., Suzuki N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. Virology. 479-480: 356-368.
38. **Ghabrial** S. A. (2001). Fungal viruses. U: Maloy O., Murray T., eds. Encyclopedia of Plant Pathology. John Wileyand Sons, New York. 1: 478-483.
39. **Ghabrial** S. A. (2008), *Totiviruses*. U: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. H. V. eds Encyclopedia of virology. Elsevier. Oxford. 5(3): 163–174.
40. **Ghabrial** S. A., Nibert M. L. (2009). *Victorivirus*, a new genus of fungal viruses in the family *Totiviridae*. Archives of Virology. 154: 373–379.
41. **Ghabrial** S.A., Suzuki N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology. 47: 353–384.
42. **Gilbert** K. B., Holcomb E. E., Allscheid R. L., Carrington J. C. (2019). Discovery of new mycoviral genomes within publicly available fungal transcriptomic datasets. 1 - 86. doi: http://dx.doi.org/10.1101/510404 - pristup 25. 09. 2019.
43. **Glass** N. L., Fleissner A. (2006). Re-wiring the network: understanding the mechanismand function of anastomosis in filamentous ascomycete fungi, U: Kues U., Fischer R. (ur.), The Mycota I, Growth, Differentation and Sexuality, second ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 123–139.
44. **Glavaš** M. (1999). Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu. Šumarski fakultet, Zagreb.
45. **Gugić** J., Strikić F., Perica S. (2007). Proizvodnja sadnog materijala masline u Republici Hrvatskoj. Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva. 13(49): 229-250.
46. **Halambek** M. (1988). Istraživanje virulentnosti gljive *Endothia parasitica* (Murr. And.) uzročnika raka kore pitomog kesetena (*Castanea sativa* Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. Doktorska disertacija.
47. **Hammond** T. M., Andrewski M. D., Roossinck M. J., Keller N. P. (2008). *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. Eukaryotic Cell. 7: 35–357.

48. **Hayashi** N., Tsuge T., Kobayashi H., Nishimura S. (1988). The presence of doublestranded RNAs in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype and their participation in AK-toxin productivity. Annual Phytopathology Society of Japan. 54: 250–252.
49. **Herrero** N., Duenas E., Quesada-Moraga E., Zabalgogeazcoa I. (2012). Prevalence and Diversity of Viruses in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology. 78(24): 8523-8530.
50. **Herrero** N., Zabalgogeazcoa I. (2011). Mycoviruses infecting the endophytic and entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum*. Virus Research. 160: 409–413.
51. **Hickey** P. C., Jacobson D. J., Read N. D., Glass N. L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology. 37: 109–119.
52. **Hollings** M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature. 196: 962-963.
53. **Hollings** M. (1982). Mycoviruses and Plant Pathology. Plant Disease. 66(12): 1106-1112.
54. **Howitt** R. L. J., Beever R. E., Pearson M. N., Forster R. L. S. (2001). Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant "potex-like" viruses. Journal of Genetics and Virology. 82: 67–78.
55. **Hrabakova** L., Koloniuk I., Petrzik K. (2017). *Phomopsis longicolla* RNA virus 1 – Novel virus at the edge of myco- and plant viruses. Virology. 506: 14-18.
56. **Ikeda** K., Nakamura H., Arakawa M., Matsumoto N. (2004). Diversity and vertical transmission of double-stranded RNAelements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. Mycological Research. 108: 626–634.
57. **Isawa** H. (2011). Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. Virus Research. 155: 147–155.
58. **Ito** S., Nakamura N. (1984). An outbreak of white root-rot and its environmental conditions in the experimental arboretum. Journal of Japanese Forestry Society. 66: 262–267.
59. **Ivić** D., Popović L., Roglić A., Bjeliš M. (2014). Nalaz crne truleži, antraknoze i sive plijesni na plodovima mandarine nakon berbe. Agronomski glasnik. 1-2: 83-94.
60. **Kanematsu** S., Arakawa M., Oikawa Y. (2004). A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. Phytopathology. 94: 561–568.

61. **Kanematsu** S., Shimizu T., Salaipeth L., Yaegashi H., Sasaki A., Ito T., Suzuki N. (2014). Genome rearrangement of a mycovirus *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. Virology. 450-451: 308-315.

62. **Kišpatić** J. (1956). Rak kestenove kore (*Endothia parasitica* Anders.). Zavod za zaštitu bilja. Uputstva iz zaštite bilja. 19: 1-12.

63. **Kišpatić** J., Maceljski M. (1991). Zaštita vinove loze od bolesti, štetnika i korova. Nakladni zavod znanje. Zagreb.

64. **Korić** B. (2003). *Fusarium spp.* na sjemenskim i merkantilnim usjevima pšenice u Hrvatskoj u 2002. godini. Zbornik radova i eseja. XI. Slovenska konferencija o zaštiti bilja. Zreče. 165-169.

65. **Krstin** Lj., Katanić Z., Ježić M., Poljak I., Nuskern L., Matković I., Idžojtić M., Ćurković-Perica M. (2016). Biological control of chesnut blight in Croatia: an interaction between host sweet chesnut, its pathogen *Cryphonectria parasitica* and the biocontrol agent *Cryphonectria hypovirus 1*. Pesticide Management Science. DOI 10.1002/ps.4335 – pristup 20.05.2020.

66. **Krupovic** M., Ghabrial S. A., Jiang D., Varsani A.(2016). *Genomoviridae*: a new family of widespread single-stranded DNAviruses. Archive of .Virology. 161: 2633–2643. doi:10.1007/s00705-016-2943-3 – pristup 20.05.2020.

67. **Kumar** V., Chandel S. (2016). Mycoviruses and their role in biological control of plant diseases. International Journal of Plant Science. 11(2): 375-382. DOI: 10.15740/HAS/IJPS/11.2/375-382. – pristup 05.06.2020,

68. **Kwon** S. J., Lim W. S., Park S. H., Park M. R., Kim K. H. (2007). Molecular Characterization of a dsRNA Mycovirus, *Fusarium graminearum* Virus – DK21, which Is Phylogenetically Related to *Hypoviruses* but Has a Genome Organization and Gene Expression Strategy Resembling Those of Plant *Potex-like Viruses*. Molecular Cells. 23(3): 304-315.

69. **Lakshman** D. K., Jian J., Tavantzis (1998). A double stranded RNA element from a hypovirulent strain *of Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. Proceeding of National Academy of Sciences. 95: 6425-6429.

70. **Lamberto** I., Gunst K., Muller H., zur Hausen H., de Villers E. M. (2014). Mycovirus-Like DNA Virus Sequences from Cattle Serum and Human Brain and Serum

Samples from Multiple Sclerosis Patients. Genome Announcment. 2(4): doi:10.1128/genomeA.00848-14. - pristup 01.04.2020.

71. **Lee** K. M., Cho W. K., Yu J., Son M., Choi H., Min K., Lee Y. W., Kim K. H. (2014). A Comparison of Transcriptional Patterns and Mycological Phenotypes following Infection of *Fusarium graminearum* by Four Mycoviruses. PLoS ONE 9(6): e100989. doi:10.1371/journal.pone.0100989 - -pristup 13.05.2020.
72. **Lee** K. M., Yu J., Son M., Lee Y. W., Kim K. H. (2011). Transmission of *Fusarium boothii* Mycovirus via Protoplast Fusion Causes Hypovirulence in Other Phytophatogenic Fungi. PLoS ONE. 6(6): e21629. doi:10.1371/journal.pone.0021629 – pristup 3.06.2020.
73. **Leslie** J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology. 31: 127–150.
74. **Lin** Y. H., Chiba S.,Tani A., Kondo H., Sasaki A., Kanematsu S., Suzuki N. (2012). A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. Virology. 426: 42–50.
75. **Liu** L., Wang Q., Cheng J., Fu Y., Jiang D., Xie J. (2015). Molecular characterization of a bipartite double-stranded RNA virus and its satellite-like RNA co-infecting the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Frontiers in Microbiology. 6: 406. doi: 10.3389/fmicb.2015.00406. – pristup 03.0.2020.
76. **Madhosingh** C. (1994). Production of intraspecific hybrids of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by protoplast fusions. Journal of Phytopathology. 142: 301–309.
77. Márquez L. M., Redman R. S., Rodriguez R. J., Roossinck M. J. (2007). A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. Science. 315: 513–515.
78. **Martin** R. R., Zhou J., Tzanetakis I. E. (2011). Blueberry latent virus: an amalgam of the *Partitiviridae* and *Totiviridae*. Virus Research. 155 (1): 175–180.
79. **Martins** M. K., Furlaneto M. C., Sosa-Gomes D. R., Faria M. R. (1999). Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. Current Genetics. 36: 94–97.
80. **Mathur** J., Koncz C. (1998). Protoplast Isolation, Culture, and Regeneration. Methods In Molecular Biology. 82: 35-42.
81. **Matsumoto** N. (1998). Biological control of root diseases with dsRNA based on population structure of pathogenes. JARQ. 32: 31–35.

82. **McKerracher** L. J., Heath I. B. (1987). Cytoplasmic migration and intracellular organelle movements during tip growth of fungal hyphae. Experimental Mycology. 11: 79–100.

83. **Melzer** M. S., Ikeda S. S., Boland G. J. (2002). Interspecific transmission of double-stranded RNA and Hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. Phytopathology. 92: 780–784

84. **Milgroom** M. G., Cortesi P. (2004). Biological Controlof Chestnut Blight with Hypovirulence: A Critical Analysis. Annual Review. of Phytopathology. 42: 311-338.

85. **Miličević** T. (2016). Siva plijesan rajčice (*Botrytis cinerea* Pers.). Glasilo biljne zaštite. 16(5): 497-499.

86. **Miličević** T., Kaliterna J., Sever Z. (2013). Koncentrična pjegavost krumpira. Glasilo biljne zaštite. 13(4): 334-337.

87. **Moon** J. H., Lee Y. H., Lee Y.W. (1999). Vegetative compatibility groups in *Fusarium graminearum* isolates from corn and barley in Korea. Plant Pathology Journal. 15: 53–56.

88. **Mori** K., Kuida K., Hosokawa D., Takehara M. (1978). Virus-like particle in several mushrooms. Mushroom Sci: Proceedings of the Tenth Internationl Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, 10: 773-787.

89. **Nelson** D. L., Cox M. M. (2017). Regulation of gene expression. U:Nelson D. L., Cox M. M. (ur.) Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, NY. 2343-2436.

90. **Nogawa** M., Kageyama T., Nakatani A., Taguchi G., Shimosaka M., Okazaki M. (1996). Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. Bioscience Biotechnology. Biochemistry. 60: 784–788.

91. **Nuss** D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. National Review of Microbiology. 3: 632–642.

92. **Ogoshi** A. (1987). Ecology and pathogenicity ofanastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology. 25: 125-143.

93. **Orkić** V. (2015). Ampelografske, biološke i kemjiske mjere zaštite u suzbijanju *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi. Sveučilište u Osijeku. Poljoprivredni fakultet. Diplomski rad.

94. **Park** C. M., Banerjee N., Koltin Y. Bruenn J. A. (1996). The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. Molecular Microbiolology. 20: 957-963.

95. **Pearson** M. N., Beever R. E., Boine B., Arthur K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Molecular Plant Pathology. 10: 115–128.

96. **Peberdy** J. F. (1980). Protoplast fusion - a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. Enzyme and Microbial Technology. 2: 23–29.

97. **Perinotto** W. M. S., Golo P. S., Coutinho Rodrigues C. J. B., Sa F. A., Santi L., Beys da Silva W. O., Junges A., Vainstein M. H., Schrank A., Salles C. M. C., Bittencourt V. R. E. P. (2014). Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology. 203: 189-196.

98. **Pliego** C., López-Herrera C., Ramos C., Cazorla F. M. (2012).Developing tools to unravel the biological secrets of *Rosellinia necatrix*, an emergent threat to woody crops.Molecular Plant Pathology.13: 226–239.

99. **Potgieter** C. A., Castillo A., Castro M., Cottet L., Morales A. (2013). A wild-type *Botrytis cinerea* strain co-infected by double-stranded RNA mycoviruses presents hypovirulence-associated traits. Virology Journal. 10(220): 1-9. http://www.virologyj.com/content/10/1/220 – pristup 01.05.2020.

100. **Preisig** O., Moleleki N., Smit W. A., Wingfield B. D., Wingfield M. J. (2000). A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. Journal of General Virology. 81: 3107-3114.

101. **Revill** P. A., Davidson A. D., Wright P. J. (1999). Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. Virology. 260, 273–276

102. **Ribėreau-Gayon** G. (1960). Les Modalites de l' Action de *Botrytis cinerea* sur la Baie de Raisin. Vitis. 2: 113-116.

103. **Rigling** D., Van Alfen N. K. (1993). Extra- and Intracellular Laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. Applied Environmental. Microbiology. 59: 3634–3639.

104. **Robyn** L. J. H., Beever R. E., Pearson M. N., Foster R. L. S. (2001). Genomic characterization of Botrytis virus F, a flexous rod-shaped mycovirus resembling plant "potex-like" viruses. Journal of General Virology. 82: 67–78.

105. **Romaine** C. P., Schlagnhaufer B. (1995). PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. Applied Environmental Microbiology. 61: 2322–2325.

106. **Ross** I.K. (1976). Nuclear migration rates in *Coprinus congregatus*: a new record? Mycologia. 68: 418–422.

107. **Salaipeth** L. (2014). A novel mycovirus Rosellinia necatrix megabirnavirus 1: Biological and molecular characterization, gene expression strategy and genome rearrangements. Okayama University, Okayama. Doctoral thesis.

108. **Sasaki** A., Kanematsu S., Onoue M., Oikawa Y., Nakamura H., Yoshida K. (2007). Artificial infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of the genus mycoreovirus reveals its uneven distribution in single colonies. Phytopathology. 97: 278–286.

109. **Sasaki** A., Kanematsu S., Onoue M., Oyama Y., Yoshida K. (2006). Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of Partitiviridae (RnPV1-W8). Archives of Virology. 151: 697–707.

110. **Sasaki** A., Miyanishi M., Ozaki K., Onoue M., Yoshida K. (2005). Molecular characterization of a partitivirus from the plant pathogenic ascomycete *Rosellinia necatrix*. Archives of Virology. 150: 1069–1083.

111. **Schmitt** M. J., Breinig F. (2006). Yeast viral kller toxins: lethality and self-protection. National Review of Microbiology. 4: 212–221.

112. **Segers** G. C., van Wezel R., Zhang X., Hong Y., Nuss D. L. (2006). Hypovirus papain- like protease p29s uppresses RNA silencing in the natural fungal host andina heterologous plant system.Eukaryotic Cell. 5: 896–904.

113. **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 National Academy of Science. U.S.A. 104: 12902–12906.

114. **Sever** Z., Miličević T. (2013). Bolesti uskladištenih gomolja krumpira. Glasilo biljne zaštite. 13(4): 361-367.

115. **Shepherd** H. S. (1988). Virus-like particles in tentoxin-production strains of *Alternaria alternata*. Journal of Virology. 62: 3888–3891.

116. **Smit** W. A., Wingfield B. D., Wingfield M. J. (1996). Reduction of laccase activity andother hypovirulence-associated traits in dsRNA containing strains of *Diaporthe ambigua*. Phytopathology. 86: 1311–1316.

117. **Sneh** B., Jabaji-Hare S., Neate S., Dijst G. (1996). *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology,Ecology, Pathology, and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 578.

118. **Toplovec-Pintarić** S. (2000). Urođena i stečena otpornost *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. na botriticide u vinogradima i suodnos rezistentnih patotipova. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Doktorska disertacija.

119. **Ushiyama** N., Nakai Y., Ikegami M. (1977). Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (BERK) SING. Virology, 77: 880-883.

120. **Ushiyama** R., Hashioka Y. (1973). Viruses associated with Hymenomycetes I Filamentous virus-like particles in the cells of a fruit body of shiitake, *Lentinus edode* (Berk). SING. Reports of th Tottori Mycological Institute. 10: 797-805.

121. **Vainio** E. J., Korhonen K., Tuomivirta T. T., Hantulav J. (2010). A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. Fungal Biology. 114: 955–965.

122. **van Diepeningen** A. D., Debets A. J. M., Hoekstra R. F. (1998). Intra- and interspecies virus transfer in Aspergilli via protoplast fusion. Fungal Genetics and Biology. 25: 171–180.

123. **van Diepeningen** A. D., Debets A. J. M., Slakhors S. M., Fekete C., Hornok L., (2000). Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. Fungal Genetics. Newsletter. 47: 99–100.

124. **van Diepeningen** A. D., Debets A. J., Hoekstra R. F. (2006). Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus populations*. Fungal Genetics and Biology. 43: 446–452.

125. **Wang** M. B., Metzlaff M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. Current Opinion in Plant Biology. 8: 216–222.

126. **Wei** C. Z., Osaki H., Iwanami T., Matsumoto N., Ohtsu Y. (2003). Molecular characterization ofdsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel reovirus from a hypovirulen tisolate,W370,of the plantpathogen *Rosellinia necatrix*. Journal of General Virology.84: 2431–2437.

127. **Xie** J., Ghabrial S. A. (2012). Molecular characterization of two mitoviruses coinfecting a hypovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Virology. 428: 77–85.

128. **Yaegashi** H., Nakamura H., Sawahata T., Sasaki A., Iwanami Y., Ito T., Kanematsu K. (2013). Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. FEMS. Microbial Ecology. 83: 49-62. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01454.x. – pristup 26.10.2019.

129. **Yokoi** T., Takemoto Y., Suzuki M., Yamashita S., Hibi T. (1999). The nucleotide sequence and genome orgnization of Sclerophthora macrospora virus B. Virology. 264, 344–349.

130. **Yu** H. J., Lim D., Lee H. S. (2003). Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. Virology. 314: 9-15.

131. **Yu** J., Kwon S. J., Lee K. M., Son M., Kim K. H. (2009). Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. Archives of Virology. 154: 1855–1858.

132. **Yu** J., Lee K. M., Son M., Kim K. H. (2011). Molecular characterization of *Fusarium graminearum* virus 2 isolated from *Fusarium graminearum* strain 98-8-60. Plant Pathology Journal. 27: 285–290.

133. **Yu** X., Li B., Fu Y. P., Xie J. T., Cheng J. S., Ghabrial S. A., Li G.Q., Yi X.H., Jiang D.H. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a nature fungicide. Proceedings of Natinal Academy of Science. 110(4): 1452–1457.

134. **Zhang** D. T., Peng Z. K., Cao Q. Q., Yang M., Zheng L., Zhou E. X. (2012).Colonization of three antagonistic strains on rice plant and their biocontrol effects on rice sheath blight. Journal of Northwest Agricultural Forestry University. 40: 97–102.

135. **Zheng** L., Liu C., Zhang M., Yang M., Zhou E. (2018). Diversity of dsRNA Viruses Infecting Rice Sheath Blight Fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Rice Science. 25(1): 57-60.

136. **Zheng** L., Liu H. Q., Zhang M. L., Cao X., Zhou E. X. (2013).The complete genomic sequence of a novel mycovirus from *Rhizoctonia solani*AG-1 IA strain B275. Archives of Virology. 158(7): 1609–1612.

137. **Zheng** L., Zhang M. L., Chen Q. G., Zhu M. H., Zhou E. X. (2014).A novel mycovirus closely related to viruses in the genus *Alphapartitivirus* confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Virology. 456-457(4): 220–226.

138. **Zhong** J., Chen C. Y., Gao B. D. (2015). Genome sequence of a novel mycovirus of *Rhizoctonia solani*, a plant pathogenic fungus. Virus Genes. 51(1): 167–170.

139. **Žnidaršić** P., Pavko A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parametar. Food Techology and Biotechnolgy. 39: 237-252.

ŽIVOTOPIS

Laura Košćak rođena je 27. rujna 1994. u Našicama. Godine 2014. upisuje Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer Zaštita bilja na kojem obranom rada pod nazivom „*Interakcije virusa i biljaka domaćina*“, dobiva titulu prvostupnika inženjera agronomije. Godine 2017. nastavlja studiranje na istom fakultetu na MS studiju Fitomedicine, a iste godine predstavlja Agronomski fakultet na Smotri Sveučilišta u Zagrebu. U prosincu 2018. godine kao član izvannastavne aktivnosti „Čudesni svijet korova“ sudjeluje kao izlagač na Međunarodnom sajmu poljoprivrede, poljoopreme i mehanizacije – „*CroAgro*“. U akademskoj godini 2018./2019. nagrađena je Dekanovom nagradom za rad „*Alelopatski potencijal pokrovnih biljaka na klijavost, dinamiku klijanja i početni rast koštana (Echinochloa crus-galli L.) i sivog muhara (Setaria glauca L.)*“. Rezultati ovoga rada nagrađeni su najboljim studentskim posterom u znanstvenoj kategoriji na 64. Seminaru biljne zaštite, Opatija, 4. – 7. veljače 2020. U sklopu edicije „Čudesni svijet korova“ u Gospodarskom listu objavila je stručni rad pod nazivom „*Zombi krastavac*“ o korisnoj strani korovne vrste *Datura stramonium,* a u znanstvenom časopisu Fragmenta phytomedica objavila je pregledni znanstveni rad Košćak, L., Šoštarčić, V., Šćepanović, M. (2019) „*Biologija, ekologija i štetnosti korovne vrste Solanum nigrum*“. Koautorica je i na a1 znanstvenom radu Brijačak, E., Košćak, L., Šoštarčić, V., Kljak, K., Šćepanović, M. (2020) „*Sensitivity of yellow foxtail (Setaria glauca L.) and barnyardgrass (Echinochloa crus-galli L.) to the aqueous extracts or dry biomass of cover* crops (DOI: 10.1002/jsfa.10603)„ objavljenom u časopisu Journal of The Science of Food and Agriculture. Članica je izvannastavne aktivnosti „Čudesni svijet korova“ od akademske godine 2017./2018., a od akademske godine 2019./2020. voditeljica je znanstvene sekcije ove izvannastavne aktivnosti.