Novi tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive Cryphonectria parasitica Murrill Barr na području Ozlja

Maleničić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:219257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ema Dejanović

Novi tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr na području Ozlja

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Mirni Ćurković Perica, dr.sc. Ljiljani Krstin, dr.sc. Zorani Katanić, i dr.sc. Marinu Ježiću koji su mi omogućili istraživački dio diplomskoga rada u Osijeku i Zagrebu i svojom stručnom pomoći, savjetima i izrazitoj susretljivosti usmjeravali u izradi diplomskoga rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri, cijeloj široj obitelji i prijateljima koji su bili uvijek puni razumijevanja, podržavali me i bili uz mene, te učinili ovo razdoblje ljepšim i lakšim.

Veliko hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Novi tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr na području Ozlja

Ema Dejanović

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* uzročnik je raka kore europskog pitomog kestena *Castanea sativa* Miller. Ova gljiva ujedno je prirodni domaćin virusa *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1), koji smanjuje virulentnost i sposobnost sporulacije zaraženih sojeva gljive. Hipovirus se može širiti samo između sojeva gljive koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC) odnosno sadrže identične alele na svim *vic* lokusima, te s manjom učestalošću između gljiva u kojih je razlika samo u jednom od šest lokusa koji određuju raznolikost VC tipova u Europi. U ovom radu istraživane su populacije gljive *C. parasitica* s područja Ozlja i Kašta. Cilj je bio utvrditi raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti i postotak hipovirulentnih izolata bijele morfologije. U populaciji Ozalj dominantan VC tip bio je EU2 sa zastupljenošću 34%, zatim EU1 sa 19%. Manjim udjelom (svaki sa 4%) bili su zastupljeni VC tipovi EU14, EU39 i EU40. Postoje izolati neodređenog VC tipa, nekompatibilni sa dosada poznatima i čine 35% ukupnih izolata populacije Ozalj. U populaciji Kašt najzastupljeniji je tip bio EU1 s učestalošću 32%, zatim EU17 sa 16%, a manjom učestalošću (svaki sa 12%) prisutni su još EU2 i EU40, te EU3, EU5 i EU12 (svaki sa 4%). Neodređeni izolati čine 16% istraživane populacije Kašta. Vegetativna raznolikost je velika, a prisutnost hipovirusa je relativno mala, do 30%, što otežava prirodnu biološku kontrolu.

(54 stranice, 18 slika, 9 tablica, 110 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: rak kore kestena, pitomi kesten, *Castanea sativa*, hipovirus, *Cryphonectria hypovirus* 1

Voditelj: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica
Neposredni voditelj: dr. sc. Marin Ježić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica
doc. dr. sc. Ana Galov
prof. dr. sc. Božena Mitić

Zamjena: doc. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Rad prihvaćen: 02.04.2015.

BASIC DOKUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation Thesis

New vegetative compatibility types of the fungus *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr from Ozalj area

Ema Dejanović

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* is the causal agent of chestnut blight in the European chestnut *Castanea sativa* Miller. This fungus is also the natural host of the virus *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1), which reduces fungal virulence and sporulation ability. Hypovirus can spread only between fungal strains that belong to the same vegetative compatibility (VC) type, i.e. that contain identical alleles at all *vic* loci, and less frequently from the strains in which there's a a difference in only one of six loci which determine the diversity of VC types in Europe. In this research *C. parasitica* populations from Ozalj and Kašt area were analyzed. The aim was to determine the diversity of VC types and the percentage of hypovirulent isolates with white morphology. In Ozalj population the dominant VC type was EU2 which represented 34% of the total number of isolates, followed by EU1 which represented 19% of the total number of isolates. The prevalence of VC types EU14, EU39 and EU40 was 4% each. The VC type of 35% of isolates from Ozalj could not have been determined, they were incompatible with all of the known VC types. In Kašt population the most common type was EU1 (32% prevalence), followed by EU17 with (16% prevalence). EU2 and EU40 appeared less frequently (each with 12% prevalence) as well as EU3, EU5 and EU12 (each with 4%). Undetermined isolates constituted 16% of the studied Kašt population. Vegetative diversity was high and the presence of hypovirus was relatively low, up to 30%, which makes natural biological control difficult.

(54 pages, 18 figures, 9 tables, 110 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library.
Key words: chestnut blight, European chestnut, *Castanea sativa*, hypovirus, *Cryphonectria hypovirus* 1

Supervisor: dr. sc. Mirna Ćurković Perica, Prof.
Assistant supervisor: dr. sc. Marin Ježić

Reviewers: dr. sc. Mirna Ćurković Perica, Prof.
dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.
dr. sc. Božena Mitić, Prof.

Replacement: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.

Thesis accepted: 02.04.2015.

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr kao uzročnik bolesti 1
   1.2. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) 2
      1.2.1. Taksonomska pripadnost 3
      1.2.2. Habitus 3
      1.2.3. Ekonomska i gospodarska važnost 5
      1.2.4. Proizvodnja kestena u Europi 6
      1.2.5. Rasprostranjenost kestena 6
   1.3. Carstvo gljiva ili Fungi 8
      1.3.1. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr 9
   1.4. Biološka kontrola raka kore pitomog kestena *Castanea sativa* Mill. 16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 19
3. MATERIJALI I METODE 20
   3.1. Područje istraživanja 20
   3.2. Uzorkovanje izolata gljive *C. parasitica* na terenu i uzgoj čistih kultura 21
   3.3. Održavanje kultura *C. parasitica* 21
   3.4. Pohranjivanje izolata gljive *C. parasitica* 23
   3.5. Određivanje morfologije izolata gljive *C. parasitica* 23
   3.6. Test vegetativne kompatibilnosti izolata gljive *C. parasitica* 24
   3.7. Statistička analiza raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti 25
4. REZULTATI 26
   4.1. Zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive u populacijama Ozalj i Kašt 26
   4.2. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* 28
   4.3. Raznolikost gljive *C. parasitica* na genskoj razini 30
5. RASPRAVA 36
6. ZAKLJUČCI 43
7. LITERATURA 44
8. ŽIVOTOPIS 54

1. UVOD

1.1. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr kao uzročnik bolesti

Šume kestena su od sredine prošlog stoljeća jako ugrožene zbog bolesti koja se naziva rak kestenove kore, a izaziva ju patogena gljiva *Cryphonectria parasitica*. Rak kestenove kore 1904. godine pronađen je prvi puta na američkom kestenu u Bronx zoološkom parku u New Yorku (Merkel 1906). Smatra se da je nenamjerno unesen iz Azije na prijelazu 19. u 20. stoljeće (Anagnostakis 1987), gdje je *C. parasitica* već uočena kao slabi patogen na kineskom i japanskom kestenu (Anagnostakis 1988). Iz New Yorka, bolest se brzo širila plodovima kestena i vjetrom. Do 1945. godine *Cryphonectria parasitica* uništila je gotovo sav američki pitomi kesten *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh; duž istočnog dijela Sjeverne Amerike (Appalachians) do Mississippija (Roanne 1986) uništeno je stotine milijuna stabala u razdoblju od samo 50 god. U Europi je rak kore kestena prvi put zabilježen 1938. godine blizu Genove u Italiji. Gljiva *C. parasitica* širila se brzo šumama europskog pitomog kestena i u samo 30 godina zahvatila cijelu Italiju. Iz Italije, bolest se širila na susjedne zemlje, iako je često bila neprimjećena. Bila je zaražena većina područja kestenovih sastojina u Europi uključujući Hrvatsku, Francusku, Švicarsku, Tursku, Španjolsku, Grčku i Mađarsku. Nedavno je nađena i u Austriji, Slovačkoj, Portugalu i Njemačkoj.

Bolest je brzo napredovala, no u Italiji je nekoliko desetljeća nakon pojave prvih simptoma bolesti primjećen i prirodni oporavak kestena. Izolate gljive *C. parasitica* iz ozdravljujućih kestena izolirao je francuski mikolog Grente (Grente 1965, Heiniger i Ringling 1994). Bili su to hipovirulentni izolati gljive zaraženi dsRNA hipovirusom koji se nalazi u citoplazmi gljive. Oni uzrokuju samo površinske rakove na vanjskom dijelu kore i ne dopiru do unutrašnjeg vaskularnog kambija kestena. Hipovirus se nalazi u citoplazmi gljive, može se prenijeti u drugi soj gljive anastomozom hifa (Anagnostakis i Day 1979) i budući da smanjuje virulentnost gljive, kambij zaraženog stabla kestena oko raka u prisutnosti hipovirulentne gljive formira kalusno tkivo, te na taj način kesten preživljava zarazu. Takva prirodna pojava ozdravljenja zabilježena je i u drugim zemljama uključujući Hrvatsku (Novak-Agbaba i sur. 2000). Iako je rak kestenove kore u mnogim populacijama kestena u Europi izazvao jake simtome bolesti, nije se širio tako brzo kao Amerikom, a nije ni uzrokovao toliko štete

(Heiniger 1994). Vjeruje se da je osjetljivost američkog kestena na rak kore veća nego osjetljivost europskog kestena. Nadalje, postoje hipovirulentni sojevi gljive u Europi koji su vegetativno kompatibilni sa virulentnim sojevima što doprinosi oporavku europskog kestena. Što je manja raznolikost VC tipova, lakše je prirodno širenje hipovirusa iz jednog izolata gljive u drugi, te se tako prirodno smanjuje virulentnost populacija gljive *C. parasitica* prema kestenu.

Pojava gljive *C. parasitica* kao karantenskog organizma na teritoriju Republike Hrvatske zabilježena je 1955. godine na području Opatije. Od tada, ova patogena askomiceta proširena je na sve sastojine europskog pitomog kestena *Castanea sativa* Mill. u Hrvatskoj, uzrokujući veće ili manje štete. Formira specijalizirane strukture (hife) koje učinkovito prodiru kroz kemijske i fizičke barijere kestena, te tako zaražava zdravo kambijsko tkivo ispod kore. Dolazi do fiziološke slabosti, sušenja, venuća i odumiranja pojedinih dijelova biljke. Patogen kolonizira koru i kambij sa svojim tipičnim lepezastim, kožom boje micelijem. Micelij raste intercelularno, proizvodi toksine, uništava domaćinsko tkivo razgrađujući enzimima stanične stijenke (Havir i Anagnostakis 1983, Hebard i sur. 1984, Roane i sur. 1986). Izvana se na kestenu mogu vidjeti plodna tijela gljive i uzdužno raspucala kora (Slika 1). Gljiva je vrlo agresivna i može zaraziti stabla bez obzira na njihovu vitalnost i dob (Glavaš 1999), ali na mladim biljkama bolest se razvija brže. U Europi je gljiva proglašena karantenskim patogenom i uvrštena je u EPPO A2 listu (EPPO 2008, Montenegro i sur. 2008).

1.2. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.)

Obzirom na palinološke podatke (Huntley i Birks 1983) kesten je na području cijele Europe i jugo-zapadne Azije bio prisutan tijekom cijelog tercijara, ali je većinom nestao tijekom glacijacije u pleistocenu. Preživjela stabla bila su uglavnom u jugo-zapadnoj Aziji. Prvi fosilni postglacijalni podaci pronađeni su u Španjolskoj i Grčkoj i njihova je starost procijenjena na 9.000 godina. Počevši od rimskog razdoblja, u posljednjih 2000 godina, kesten se brzo širio Europom (Zohary i Hopf 1988): Njemačkom, Francuskom, Švicarskom, Austrijom i Mađarskom (Konstantinidis i sur. 2008).

Među 13 vrsta koje pripadaju rodu *Castanea*, pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) smatra se jedinom vrstom porijeklom iz Europe (Casaoli i sur. 2001). Njegovo evolucijsko

pojavljivanje smatra se kompleksnom mješavinom visoke razine genskog protoka, prirodne i umjetne selekcije, te lokalnim efektima izolacije uvjetovane udaljenošću (isolation by distance, IBD). Ta činjenica podrazumijeva da genetička raznolikost europskog pitomog kestena ovisi o geografskoj distribuciji, povijesnim događajima, okolišnim varijacijama i gospodarenju okolišem (Casaoli i sur. 2001).

Osim u Europi, danas su vrste iz roda *Castanea* rasprostranjene i na sjevernoameričkom i azijskom kontinentu, a rastu i u sjevernim i zapadnim dijelovima Afrike, u Maloj Aziji, na jugu Kavkaza i u Perziji. U sjevernoj Americi pojavljuju se vrste *Castanea dentata* (Marsh.) Borkhausen i *Castanea pumila* (L.) Mill.. U Aziji rastu *Castanea crenata* Sieb. et Zucc., *Castanea mollisima* Bl., *Castanea seguinii* Dode i *Castanea henryi* (Skan) Rehder and Wilson (Haltofová i Ankovský 2003).

1.2.1. Taksonomska pripadnost

Europski pitomi kesten *Castanea sativa* Mill. prema taksonomiji pripada redu Fagales, porodici Fagaceae, rodu *Castanea*. Porodica Fagaceae ili bukve je jedna od najvažnijih porodica Sjeverne hemisfere, dominira šumama umjerenog pojasa i vrlo je korisna za biogeografske analize. Prema botaničkoj bazi podataka *Flora Croatica Database* (FCD) (Nikolić 2015) porodica ima devet rodova: Fagus, Nothofagus, Lithocarpus, Castanopsis, Colombobalanus, Castanea, Chrysolepis, Quercus, Trigonobalanus.

1.2.2. Habitus

Kesten (*C. sativa*) može dosegnuti visinu od 30 m, promjer od 3 m i starost od 500 godina. Mladi kesten ima maslinastu, do maslinasto-smeđu koru svjetlih lenticela, glatku, koja s godinama postaje sivo-smeđa, uzdužno ispucala i značajnije deblja. Korijenski sustav mu je dobro razvijen, prodire duboko u zemlju sa žilom srčanicom i njenim bočnim žilama. Razvija bujnu i veliku okruglastu krošnju. Listovi su naizmjenični, duguljasto kopljasti, šiljastoga vrha, polukožasti, a najprepoznatljiviji su po jako krupno nazubljenim rubovima. Do 20 cm su dugački i do 6 cm široki, s gornje strane tamniji, goli i sjajni, a s donje svjetliji i dlakavi. Kesten je listopadno drvo, pa listovi u jesen poprimaju žuto-smeđu boju (Tomić 2010).

Muški cvjetovi su uspravne rese dugačke 12-30 cm, u grupicama od po 3 i više, sakupljeni u uspravne 10-30 cm duge prividne klasove sa dlakavim vretenom, a pri njihovoj osnovi nalaze se ženski cvjetovi. Ženski cvjetovi tvore tročlane paštitce koji se nalaze u zajedničkom omotaču (kupuli). Ova jednodomna biljka cvjeta početkom lipnja. S botaničkog stajališta, plod pitomog kestena je orah. Sastoji se od jezgre (mezokarpa), sjemenjače (epiderme), sjemenke i ljuske (perikarpa). Plodovi različitih oblika (polukuglasti ili zaobljeno plosnati; obično širi nego duži) zaštićeni su tamnosmeđom, također sjajnom i kožastom ljuskom. Smješten je u loptastoj kupuli, koja je prekrivena gustim igličastim bodljama. Kada bodljikava kupula sazrije, puca na četiri režnja, a u njoj su 1-3 jestiva ploda (Slika 1). Imaju kožastu lupinu i vršni čuperak, dozrijevaju u listopadu.

Ovisno o geografskoj širini, nadmorskoj visini, klimatskim uvjetima, ali i ekspoziciji terena na kojoj raste, kesten se u našim krajevima bere od kraja rujna do kraja listopada. Može se razmnožavati sjemenom, izdancima i cijepljenjem. Sijanci kestena su pogodni za pošumljavanje i mogu se koristiti kao podloga za cijepljenje različitih sorti pitomog kestena koje karakteriziraju krupniji i kvalitetniji plodovi (Zavišić 2014). Spontani način održavanja vrste je uvjetovan svojstvom kestena da stvara veliki broj izdanaka, kojih može biti preko 70, čime se uspostavlja ravnoteža između korijena i stabla.



Slika 1: Plod i listovi pitomog kestena *Castanea sativa* Mill.

(Anonymus 1)

1.2.3. Ekonomska i gospodarska važnost

Kesten je gospodarski vrlo značajna vrsta. U davnoj prošlosti kestenove šume bile su bogati izvor sirovina (Medak i sur. 2009). Još od srednjeg vijeka, uzgoj kestena se može opisati na temelju bogate dokumentacije (Conedera i sur. 2004). Krajem rimske vladavine, te u tursko doba europski pitomi kesten u našim je krajevima umjetno raširen sadnjom izvan svog prirodnog areala zbog izrazite hranjive vrijednosti njegovog ploda. Značaj kestena u prehrani je što sadrži visok udio škroba i šećera, a mali udio ulja, svega 1-2%. On je jedna od ekonomski najznačajnijih, ali i najkorisnijih vrsta šumskog drveća, brzorastuća je, a od njega se mogu upotrijebiti svi dijelovi. Plodovi sadrže 45-58 % škroba, što je po količini usporedivo s krumpirom, zatim 34% saharoze, 4-7% bjelančevina i do 3 % tanina, kao i kalcij, kalij, fosfor, željezo, te mnoge vitamine skupine B. Kao adstrigens, list (Castanae folium) pitomog kestena često se koristi u farmaceutskoj industriji u brojnim preparatima, dok se kora (Castanae cortex) koristi kao taninska sirovina u štavljenju kože. Zbog odličnih mehaničkih svojstava, lake obrade i trajnosti, koristi se u: građevinarstvu (za drvene konstrukcije, mostove, skele, đerme, kuće, brvnare, šindru za krovišta, krovnu građu, te kao tunelsko drvo), drvnoj industriji (proizvodnji parketa, gredica, panel ploča, šperploča, iverice), bačvarstvu (izradi visokokvalitetnih bačvi za čuvanje piva i vina), poljoprivredi (vinogradarstvu) i raznom zanatstvu za izradu galanterije, u tokarstvu, kolarstvu i stolarstvu. Njegova uloga u pčelarstvu također je veoma bitna. Naime, pitomi kesten predstavlja cijenjenu medonosnu biljku obzirom na kasnu cvatnju i obilje peludi. U Istri se tek ponegdje, u privatnom gospodarenju, uzgaja kao voćkarica i to cijepljeni kesten - marun krupnih plodova. Zbog lijepog habitusa, cvijeta i ploda, stablo pitomoga kestena rado se koristi kao dekorativna, hortikulturna vrsta.

Ovakvo intenzivno korištenje kroz povijest ostavilo je trajne posljedice na fizionomiju kestenovih šuma, degradiranost staništa, stabilnost ekosustava i smanjenu biološku raznolikost. Uz sve to, dolazak fitopatogene gljive *C. parasitica* samo je potaknuo sušenje velikih površina kestena i smanjio interes za kestenovim drvetom koje je bilo sve slabije kvalitete.

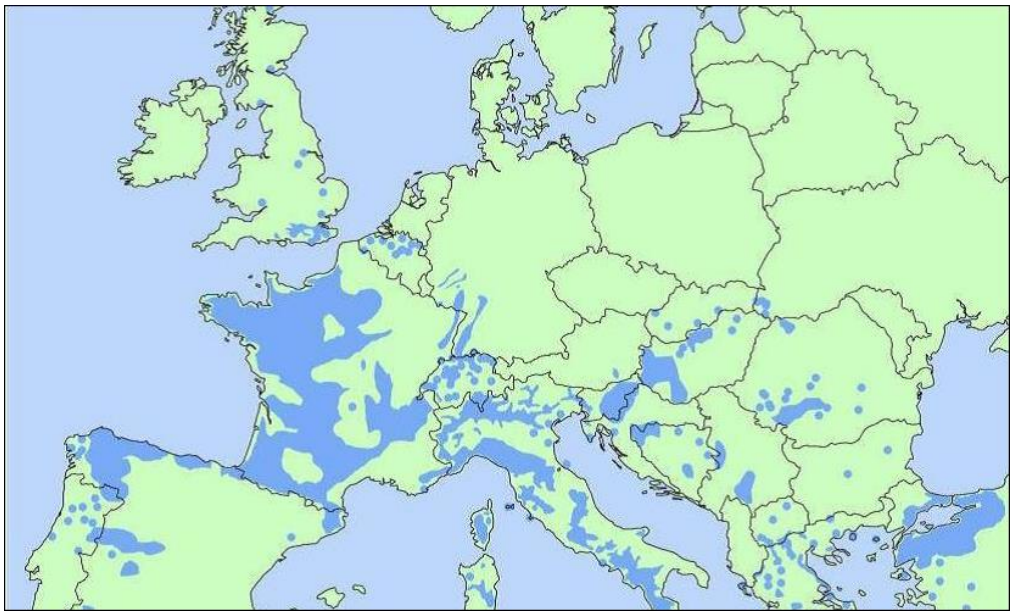
1.2.4. Proizvodnja kestena u Europi

Kesten je višenamjenska drvenasta vrsta, sa velikom ekonomskom važnošću za mediteranske regije. Komercijalna proizvodnja kestena započela je 1980. god. većinom vrstom *Castanea sativa* Mill. i njegovih križanaca sa japanskim *Castanea crenata* i kineskim pitomim kestenom *Castanea mollissima*. U Hrvatskoj samo 0.7 % ili 15 000 ha površine se nalazi pod kestenom, dok su Francuska sa 45.3% ili 1 020 500 ha, te Italija sa 34 % ili 765 837 ha vodeće (Conedera i sur. 2004). U zadnjih 20 godina puno se radi na selekciji novih sorata.

1.2.5. Rasprostranjenost kestena

Kesten raste u području umjerene kontinentalne klime, umjerene submediteranske i mediteranske klime. Heliofilna je vrsta koja traži svjetlo. Ne podnosi dobro ekstremne izmjene temperature. Najbolje raste u područjima sa prosječnom godišnjom temperaturom od 13 °C zimi, te 26°C - 37 °C ljeti, sa prosječnim godišnjim oborinama od 800 – 1600 mm. Kesten uspijeva uglavnom na umjereno vlažnom, propustljivom tlu, blago kisele do kisele reakcije (pH 4-5) (Zavišić 2014). Kao acidofilna vrsta, raste na dubokim kiselim tlima, pjeskovite glinasto-ilovaste teksture tla, silikatnim i eruptivnim podlogama i pješčenjacima. Raste i na istarskoj crvenici (tal. terra rossa), vrsti teškoga, zbijenog tla, sastavljenog od vapnenca, ali sa znatnim količinama padalina. Lako upija vodu i dugo ju zadržava, što mu omogućuje da preživi tijekom vrućeg i suhog ljeta.

U sklopu Eurosibirsko-sjevernoameričke regije, nakon ledenog doba pitomi kesten zadržao se u nekoliko refugija: uz južnu obalu Crnog mora, na širem području srednjeg i južnog Apeninskog poluotoka, u sjevernoj Italiji na južnim obroncima Alpa, na sjevernom dijelu Pirinejskog poluotoka, na Balkanskom poluotoku na području južne Grčke, Makedonije i Bugarske te na bliskom istoku uz Mediteransku obalu (Krebs i sur. 2004) (Slika 2).



Slika 2. Rasprostranjenost europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Europi (Maurer i Fernandez Lopez, 2001)

U Hrvatskoj se prostire najvećim dijelom središnjom Hrvatskom, od slovenske granice do granice s BiH, u submediteranskom području u Istri, te na otocima Cresu i Krku (Medak i sur. 2009) (Slika 3). Čistih kestenovih panjača je malo. Kesten najčešće raste u šumskim zajednicama s drugim vrstama.



Slika 3. Rasprostranjenost europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj (Nikolić 2015)

Prema Medak (2009, 2011) i Vukelić (2012), na području Hrvatske pitomi kesten sa značajnim udjelom raste u četiri šumske zajednice: šumi pitomog kestena s hrastom kitnjakom (*Querco-Castanetum sativae,* Horvat 1938), šumi pitomog kestena s prasećim zeljem (*Aposeri foetidae-Castanetum sativae,* Medak 2011), šumi bukve s pitomim kestenom (*Castaneo sativae-Fagetum,* Marinček i Zupančić 1979, 1995), te u submediteranskoj šumi pitomog kestena s krškim kukurijekom (*Helleboro multifidi-Castanetum sativae,* Anić 1953, Medak 2009). Upravo u brežuljkastom pojasu Eurosibirsko-sjevernoameričke regije, koja čini 60% površine i 45 šumskih zajednica, obitavaju šume hrasta kitnjaka i pitomog kestena i to su ujedno najveće i najljepše sastojine. Razvijene su na Zrinjskoj i Petrovoj gori, te na Medvednici (Medak i sur. 2009, Idžojtić i sur. 2010). Takve šume javljaju se i na ostalom gorju sjeverozapadne Hrvatske, a uz pitomi kesten i hrast kitnjak u sloju drveća mogu rasti i obični grab i bukva (Alegro 2000). Osim šumskih sastojina, na području Učke i Cresa nalaze se i nasadi maruna za uzgoj ploda (Medak i sur. 2009).

1.3. Carstvo gljiva ili Fungi

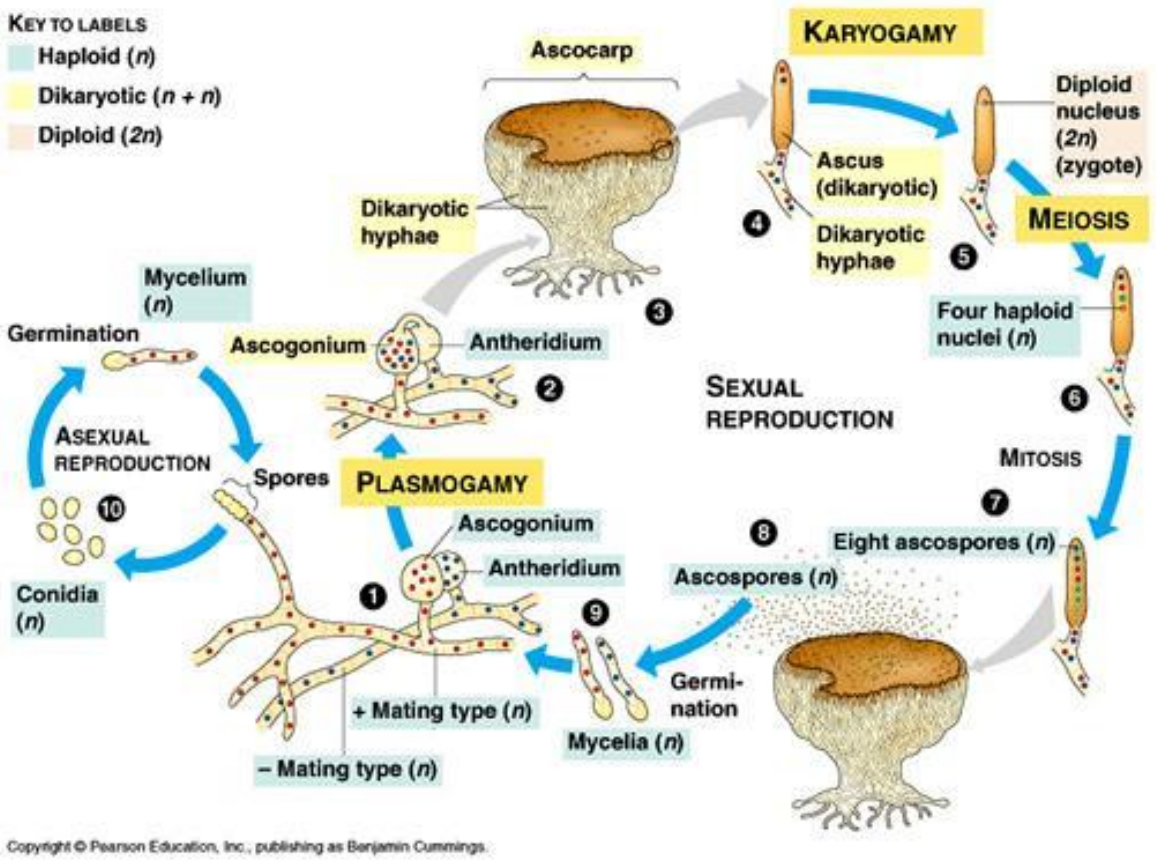
Carstvo gljiva ili Fungi su heterotrofni, višestanični organizmi. Splet hifa (micelij) čini njihovo vegetativno tkivo. To je veliko carstvo sa mnoštvom određenih, ali još većim brojem neodređenih vrsta. Nitko u ovom trenutku sa sigurnošću ne zna koliko ima vrsta gljiva na Zemlji, no opisano je najmanje 99 000 vrsta, a smatra se da se svake godine opisuje oko 1200 novih (Blackwell 2011, Kirk i sur. 2008). Broj ukupnih vrsta procjenjuje se na 1.5 milijuna (Hawksworth 2001). *Ascomycota* ili gljive mješinarke predstavljaju najveće koljeno u carstvu gljiva ili Fungi. Za razliku od gljiva stapčarki (*Basidiomycota*), koje obuhvaćaju sve one gljive na koje ljudi misle u svakodnevnom životu kada pričaju o njima, gljive mješinarke se javljaju na plodovima, stablima i sličnim mjestima u prirodi. Osnovna razlika je u reproduktivnim stanicama. Askomicete imaju višestanični micelij (sa jednom ili više jezgara), vrlo velike sporangije (~ 400 μm) sa sporama unutra – askosporama, dok bazidiomicete imaju bazidije kao sporonosni organ u kojem su bazidiospore. Jedan od najpoznatijih primjera gljive mješinarke je ražena gljivica ili *Claviceps purpurea*. Parazitira u plodnici trava (najčešće raži) gdje se umjesto pšena razvija sklerotecij (Secale cornatum) koji sadrži ergotin, otrovni alkaloid. U prošlosti je izazivao mnoga trovanja, međutim danas je važan sastojak u farmaceutskim proizvodima. Neke gljive te skupine su jestive (smrčak, zdjeličarke, gomoljače), kvaščeve gljivice uzročnici su alkoholnoga vrenja i rabe se u pekarstvu (vinski i

pivski kvasac), od vrste *Penicillium notatum* dobiva se penicilin, dok se druge vrste roda *Penicillium* rabe u proizvodnji određenih vrsta sireva (rokfor, kamamber). Tipični predstavnici mješinarki su i tartufi, snažnog i specifičnog mirisa, gospodarski vrlo važni.

1.3.1. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr

U gljive mješinarke po taksonomiji spada nitasta, fitopatogena i vrlo agresivna gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr. Pripada razredu Sordariomycetes, redu Diaporthales (Hibbet i sur. 2007). Ona se može razmnožavati spolno i nespolno. Važno je naglasiti da se nespolnim putem razmnožavanja ne povećava raznolikost populacije, budući da nisu uključene mejotske diobe. Nespolno se razmnožava konidijima ili dijelovima micelija (Milgroom i Cortesi 1999, Montenegro i sur. 2008). Konidiospore su male, jednostanične nespolne spore koje se oslobađaju za vlažnog vremena i razvijaju se na konidioforima, specijaliziranim zračnim hifama koje nose strukture za razmnožavanje.

Spolno razmnožavanje odvija se askosporama, sporama koje nastaju u osnovnom sporonosnom organu – askusu. Nastanak askospora je važan za spolni proces koji se odvija na različite načine. Pri spolnom razmnožavanju dolazi do razvitka askogonija, koji predstavlja žensku rasplodnu strukturu, i spajanja s mikrokonidijom ili hifom, koji predstavlja mušku spolnu strukturu (Ježić 2013). Stapaju se stanice bez spajanja jezgara i to nazivamo plazmogamija. Spajanjem dolazi do rasta tzv. askogenih hifa u kojima one nastavljaju egzistirati neovisno u dikarionskom stadiju (Read i Beckett 1996, Webster i Weber 2007). U askogenim hifama nastaju askusi sa askosporama. U završnom stadiju formira se završna kopča u kojoj dolazi do spajanja roditeljskih jezgara, mejoze i formiranja spolnih spora (Ježić 2013) (Slika 4).



Slika 4. Razvojni ciklus razmnožavanja gljiva iz koljena Ascomycota (Anonymus 2)

U vrste *Cryphonectria parasitica* spolno razmnožavanje je pod kontrolom dialelnog *MAT* lokusa, koji kontrolira proces oplodnje, naknadne korake sparivanja i *MAT*-specifične ferohormone i receptore (Kues i Casselton 1992). *Cryphonectria parasitica* je heterotalična (dvodomna), pa je sparivanje moguće samo između jedinki koje imaju suprotne alele ili idiomorfe (*MAT1-1 ili MAT1-2*) na tom lokusu (Coppin i sur. 1997, Kronstad i Steben 1997, Ježić 2013). Međutim, rijetke homotalične jedinke žive unutar određenih populacija (McGuire i sur. 2004).

Gljiva se konidiosporama ili askosporama može širiti vjetrom, kišom, kukcima (tvrdokrilcima *Agrilus* spp.), pticama, ali i nepažnjom čovjeka. Najčešće je to vjetrom (Heald 1926). Askospore se mogu prenositi na udaljenosti 300 – 400 m, dok se konidije najčešće prenose ispiranjem sa stabla tijekom kiše na obližnje udaljenosti. Konidije su nešto otpornije, dokazano je da mogu preživjeti u suhoj zemlji oko 2-3 mjeseca (Heald 1926). Iako obje mogu pokrenuti infekcije, askospore su važnije u zaražavanju pitomog kestena.

Mnogo faktora može utjecati na veću važnost askospora u odnosu na konidiospore i micelij kao primarni inokulum za iniciranje novih rakova ili za razvoj bolesti, kao što su održivost i patogenost askospora i dostupnost osjetljivih mjesta domaćina (rana). Učestalost zaraze je maksimalna u svibnju, jer je to razdoblje kada pitomi kesten *C. sativa* raste, osjetljivost na patogena je najviša, a tome pridonose i povoljni vremenski uvjeti. Prirodne inokulacije koje se dese u jesen i zimu ne rezultiraju vidljivim simptomima zaraze (Guérin i Robin 2003).

Budući da je *Cryphonectria parasitica* filamentozna gljiva, raste apikalnim produživanjem hifa, grananjem i fuzijom (anastomozom) hifa (Matić 2012). Micelij može živjeti i do 10 mjeseci u suhoj kori stabla (Hepting 1974). Ono što se prvo primjećuje pri zarazi su promjene na kori stabla, tamnija je od okolne kore (kambij na tom mjestu je također nešto tamniji), plitko ulegnuta, blago crvena (Slika 5). Otvorena rak raka nastaje polaganim uzdužnim pucanjem kore i odvajanjem od stabla. Na tom području vidljiva su žuto-narančasta ili crvenkasta plodna tijela gljive (Slika 6). Ovako opisani rak naziva se aktivni rak i njega uzrokuje virulentan ili agresivni soj gljive (Slika 7). Simptomi su još i: žućenje i gubitak lišća, pojave različitih nekroza, hipertrofija, formiranje živića, rak-rane na granama i suhi listovi koji ostaju preko zime (Halambek 1988, Glavaš 1999). Druga, površinska forma raka, kao što i sam naziv govori, izaziva infekciju površinskog sloja, dakle, ne dopire do kambija (Slika 8). Sposobnost izazivanja površinske nekroze ima hipovirulentan ili neagresivan soj gljive. Posebno je zanimljiv jer svoja svojstva hipovirulencije, zahvaljujući hipovirusu, može prenijeti na aktivni rak, pri čemu tada dolazi do ozdravljenja stabla. On je ujedno osnova biološke kontrole raka pitomog kestena i zaustavlja sušenje stabala. Treća forma, kalusirajući rak prepoznaje se po formiranom kalusnom staničju oko rane (Pagliarini 2011) (Slika 8). Virulentni soj gljive prodire do kambija, ali zaraza tog soja hipovirusom iz hipovirulentnog soja gljive uzrokuje nastanak kalusa (Krstin 2009).



Slika 5. Početna faza raka kore kestena

(Anonymus 3)



Slika 6. Rak kestenove kore sa vidljivo raspucalom korom i plodnim tijelima gljive *C. parasitica*

(Anonymus 4)



Slika 7. Napredna faza zaraze gljivom *C. parasitica* na grani kestena, primjećuje se odvajanje dijela kore

(Anonymus 5)



Slika 8. Površinska nekroza (lijevo) i kalusirajući rak – oporavak (desno) kore kestena *Castanea sativa*

(Anonymus 6; Ljiljana Krstin)

Hipovirulencija se može prenositi na virulentne sojeve gljive koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (Anagnostakis i Waggoner 1981). Vegetativna (ne) kompatibilnost posredovana je *vic* (vegetativnim) genima. Ako su jedinke kompatibilne, za vrijeme rasta micelija doći će u kontakt i formirati heterokarionski micelij (više jezgrenih stanica) sa jezgrama porijeklom od različitih jedinki. To su tzv. stabilne anastomoze. U tom slučaju se miceliji stope, odnosno hife međusobno prorastu i tada nema baražne linije (Slika 9). U genetički nekompatibilnih jedinki, u interakcijskoj zoni doći će do programirane stanične smrti, propadanja hifa, što znači da se virus ne može prenijeti u drugu jedinku, ne dolazi do smanjenja virulecije i nije moguće ozdravljenje stabla. To se naziva vegetativna inkompatibilnost ili vegetativna nekompatibilnost (Slika 10). Definirana je sa najmanje šest *vic* genskih lokusa, od kojih svaki sadrži najmanje dva alela (Milgroom i Cortesi 1999). Sukladno tome, moguća su najmanje 64 (2^6) različita genotipa (Adamčíková i sur. 2006, Nuss 2011). Za ostvarivanje vegetativne kompatibilnosti između dva različita soja gljive (dvije različite jedinke) njihovi aleli moraju se podudarati na svih šest *vic* lokusa (Montenegro i sur. 2008). Dok je u Americi zabilježeno preko 70 kompatibilnih grupa, u Europi je situacija povoljnija. Općenito je zabilježeno relativno malo kompatibilnih tipova gljive *C. parasitica*, što dovodi do široke distribucije pojedinačnih kompatibilnih grupa koje favoriziraju širenje hipovirulencije. Krajem prošlog stoljeća, križanjima prirodno raširenih izolata gljive *C. parasitica* u Europi dobivena su 64 (2^6) moguća VC tipa (Cortesi i sur. 1998, Cortesi i Milgroom 1999).



Slika 9. Kompatibilni izolati gljive *C. parasitica*

(Autorska fotografija)



Slika 10. Nekompatibilni izolati gljive *C. parasitica*.

Strelicom je obilježena baražna linija između dva izolata.

(Autorska fotografija)

Unazad nekoliko godina, pojavljuje se problem uzoraka gljive koji nisu kompatibilni s niti jednim poznatim izolatom do sada. U laboratorijskim uvjetima međusobnim križanjima poznatih EU tipova, mogu se dobiti 64 (2^6) različita EU tipa (tipa vegetativne kompatibilnosti), pa se pretpostavlja da se to događa i u prirodnim uvjetima u populacijama pitomog kestena. No, u istraživanjima u Francuskoj i Španjolskoj (Robin i sur. 2009), te Njemačkoj (Peters i sur. 2012), utvrđeno je nekoliko uzoraka nekompatibilnih sa svim do sad poznatim EU tipovima.

1.4. Biološka kontrola raka kore pitomog kestena *Castanea sativa* Mill.

Zahvaljujući dvolančanom (ds) RNA virusu - *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) smanjuje se virulentnost i sposobnost sporulacije zaraženih sojeva gljive *C. parasitica* (Ježić 2013), te gotovo u potpunosti smanjuje spolno razmnožavanje domaćina. Virus se nalazi u citoplazmi gljive, unutar membranskih vezikula (Gobbin i sur. 2003) promjera (50 – 80 nm). Nema proteinski omotač, odnosno kapsidu, gola je infektivna molekula RNA, nema strukturnih proteina i ne stvara virione, zrele infektivne virusne čestice. *Cryphonectria hypovirus* 1 smanjuje pigmentaciju gljive, pa izolat poprima bijelu ili blijedo-žutu boju. Prvi kalusirajući rakovi kore, kao i hipovirulentni uzorci gljive *C. parasitica* bijele morfologije koji ukazuju na prisutnost virusa CHV-1 u citoplazmi primijećeni su ranih 60-tih godina 20-tog stoljeća u Italiji i Francuskoj (Robin i Heiniger 2001), dok su u Hrvatskoj i Sloveniji zabilježeni početkom 80-tih godina (Halambek 1986, Robin i Heiniger 2001). Hipovirus omogućava prirodni oporavak sastojina pitomog kestena, naročito tamo gdje se kroz duži vremenski period uspio proširiti i zadržati u populacijama gljive (Italija, južni dio Alpa u Švicarskoj, jugozapadna Francuska). No, rak kore kestena uzrokuje ozbiljne štete u područjima gdje je nedavno unesen patogen i hipovirulencija još nije uspostavljena.

Do sada su poznata 4 različita virusa iz porodice Hypoviridae: CHV 1, CHV 2, CHV 3, CHV 4. One su taksonomski povezani, ali genetički vrlo različiti. *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) je najbolje opisan i najzastupljeniji u Europi, te se smatra da je unesen u Europu zajedno sa gljivom *Cryphonectria parasitica* izravno iz Azije na početku 19. stoljeća, što potvrđuje prisutnost CHV-1 u Europi, Japanu i Kini, ali ne i u Sjevernoj Americi. U dosadašnjim istraživanjima virus CHV-1 utvrđen je u svim istraživanim populacijama gljive

C. parasitica u Hrvatskoj što omogućuje prirodnu biološku kontrolu raka kestenove kore (Krstin i sur. 2008).

Cryphonectria hypovirus 1, mikovirus iz porodice Hypoviridae, veličine RNA genoma 12.712 kbp, sadrži dva velika kontinuirana otvorena okvira čitanja određena kao ORF regije: ORF A i ORF B. Dvije regije odvojene su UAAUG pentanukleotidom, gdje UAA predstavlja stop kodon ORF A regije, a AUG inicijalni start kodon ORF B regije. ORF regije su na strani koja sadrži 3'-terminalni poly A rep. Proteini ovim otvorenim okvirima čitanja odgovorni su za ekspresiju hipovirulencije i povezanih značajki, te za patološke promjene tijekom bolesti domaćina. Obzirom na razlike u regijama u rasponu od 11-19 % (Gobbin i sur. 2003), okarakterizirano je pet različitih podtipova virusa CHV-1. Podtip I raširen je u južnoj i jugoistočnoj Europi od jugoistočne Francuske do Turske (Sotirovski i sur. 2006, Robin i sur. 2010, Krstin i sur. 2011). Filogenetske i vremenske procjene sugeriraju da je CHV-1 unesen u Italiju zajedno sa *C. parasitica*. Podtipovi F1 i F2 prvotno su nađeni u Francuskoj, pa se nazivaju francuski podtipovi, ali su nedavno zabilježeni i u Španjolskoj (Zamora i sur. 2012) i Turskoj (Akilli i sur. 2013). Podtip D je njemački, a E španjolski. S izuzetkom slobodnih virusnih čestica (Yu i sur. 2013), mikovirusi se općenito uspješno prenose intracelularnim putem unutar populacije domaćina. Intracelularni ili unutarstanični prijenos može uključivati vertikalni prijenos putem gljivičnih spora ili horizontalni putem anastomoze i heterokarionskih događaja. Horizontalan prijenos ograničen je vegetativnom ili heterojezgrenom nekompatibilnošću (Cortesi i sur. 2001) koja je genetski kontrolirana „self/non self“ sustavom prepoznavanja. Može rezultirati programiranom staničnom smrti (propadanjem hifa) između nespojivih genotipova (Biella i sur. 2002, Glass i Kaneko 2003). Ona smanjuje horizontalni prijenost virusa, plazmida ili drugih citoplazmatskih elemenata (Cortesi i sur. 2001). Budući da se hipovirus može širiti samo između sojeva gljive koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC), odnosno sadrže identične alele na svim *vic* lokusima, te s manjom učestalošću između gljiva u kojih je razlika samo u jednom od šest lokusa koji određuju raznolikost VC tipova u Europi (Robin i sur. 2010), velika raznolikost VC tipova znatno umanjuje mogućnost biološke kontrole bolesti (Krstin i sur. 2011). Detaljna laboratorijska istraživanja su pokazala da svaki *vic* alel ima različite kvantitativne učinke na smanjenje vjerojatnosti prijenosa virusa (Cortesi i sur. 2001). Moguće je procijeniti prosječni prijenos između *vic* genotipova, no te procjene ne moraju nužno odražavati stvarni prijenos u prirodnim uvjetima. U prirodi, na prijenos može utjecati broj kontakata između izolata, vrijeme kontakta, prostorna heterogenost genotipova ili mnogi

drugi, još nepoznati faktori. Biološka kontrola primjenjuje se zadnjih 50-tak godina u Europi i predstavlja vrlo važan izvor saznanja o raznolikosti populacije gljive *C. parasitica.* Problem je u velikim površinama kestenovih sastojina koje bi trebale biti tretirane unosom hipovirulentnog soja, te u dugom periodu primjene i vremenskom razmaku između primjene i mogućeg oporavka ili smanjenja zaraze.

Sve je više dokaza da globalne klimatske promjene (primjerice zatopljenje) mogu potaknuti različito ponašanje biljnih patogena, npr. njihovo povećano širenje i uzrokovanje bolesti, te posljedično sušenje stabala. Zbog toga su mikovirusi obećavajuća sredstva za ublažavanje bolesti, jer smanjuju gljivičnu virulentnost i time su korisni za biljku domaćina. Iako su mikovirusi široko rasprostranjeni u različitim vrstama gljiva (Ghabrial i Suzuki 2009, Pearson i sur. 2009), studije o njihovoj genetskoj i fenotipskoj raznolikosti su malobrojne a predviđanja kako će se mikovirusi razvijati su nesigurna. Kao posljedica toga, upotreba mikovirusa za što bolju biološku kontrolu zahtijeva razumijevanje njihove ekologije i evolucije (Roderick i sur. 2012). Nekoliko točaka treba ispitati prije predviđanja uspjeha mikovirusa kao biološkog sredstva. Takav virus mora pokazivati ograničen raspon domaćina kako se ne bi proširio na nepredviđene i neočekivane vrste, a mora se širiti unutar ciljane populacije domaćina. Učinkovitost širenja mikovirusa izravno ovisi o kombinacijama gena unutar populacije domaćina (Cortesi i sur. 2001). Prema tome, različita strategija upravljanja mora biti dizajnirana za različite regije, a najprikladnija biološka kontrola mora se primjenjivati za svaki slučaj pojedinačno (Bryner i Rigling 2011, Krstin 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Odrediti morfologiju izolata gljive *C. parasitica* prikupljenih na području Ozlja i Kašta

- Odrediti tipove vegetativne kompatibilnosti (VC) izolata i njihovu raznolikost

- Usporediti raznolikost populacije patogena s raznolikošću utvrđenom prethodnim istraživanjima

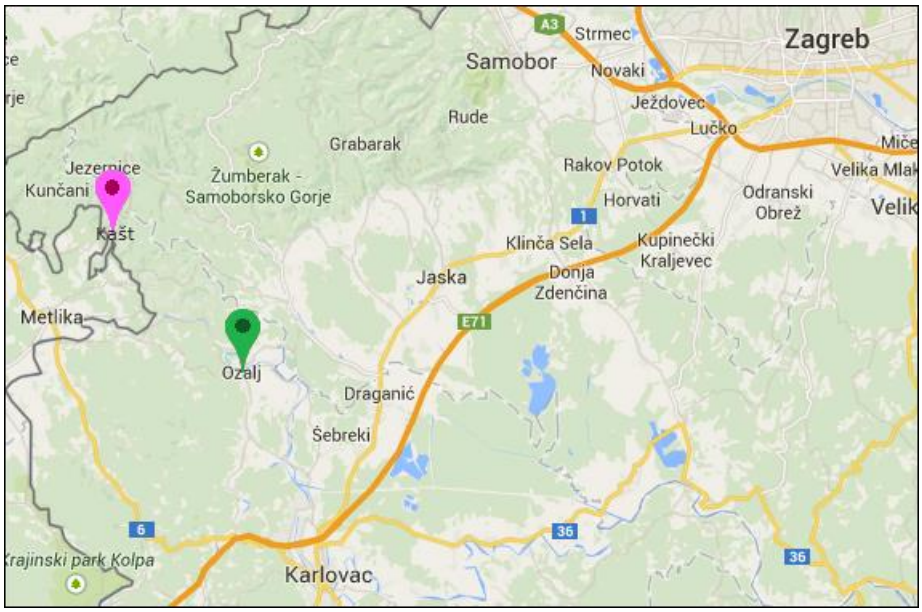
- Utvrditi utjecaj raznolikosti populacija gljive na prevalenciju virusa

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Prije deset godina na području Ozlja provedena su istraživanja raznolikosti gena na vic lokusima VC tipova gljive *C. parasitica*. Raznolikost gena ukazivala je na mogućnost povećanja raznolikosti populacije gljive ako se ona bude spolno razmnožavala. Zbog toga, potrebno je provjeriti je li se to uistinu dogodilo.

Grad Ozalj nalazi se na litici iznad donjeg toka rijeke Kupe i njene desne pritoke rijeke Dobre u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, u Karlovačkoj županiji 15-tak kilometara od Slovenije (Slika 11). Nalazi se u pograničnom području nedaleko glavnih prometnih tokova, na rubu Karlovačke županije i središnje Hrvatske.



Slika 11. Položaj istraživanih lokaliteta

Područje Grada povezuje se sa Belom Krajinom u Republici Sloveniji i Bosanskom krajinom u Bosni i Hercegovini u važnom prometnom čvorištu grada Karlovca, najznačajnijem razvojnom središtu unutar ovog dijela Središnje Hrvatske. Područje Ozlja zauzima površinu od 179.4 km^2 i prostorno je najveća među srednje velikim jedinicama lokalne samouprave na području Karlovačke županije, gdje čini 4.95% sveukupne površine županije, sa oko 6840 stanovnika. Spoj je brežuljkastog i nizinskog prostora, s mnoštvom prirodnih i antropogenih potencijala.

Prema Köppenovoj klasifikaciji područje pripada umjereno toploj vlažnoj klimi s toplim ljetom (Cfb) (Crkvenčić i sur. 1974), koju karakteriziraju nešto niže temperature zraka (u hladnijem dijelu godine), a izostaje duže suho razdoblje. Prosječna temperatura najtoplijeg mjeseca (srpanj) je iznad 20 °C, a najhladnijeg (siječanj), između 0 i -2 °C. Prosječna godišnja količina padalina je 1105 mm, najviše ih ima u listopadu.

Obzirom na blizinu grada Ozlja, drugo područje istraživanja sa sastojinama europskog pitomog kestena *Castanea sativa* Mill. je Kašt (Slika 11). Naselje je u sastavu grada Ozlja, 20 km sjeverozapadno od njega. Nalazi se na nadmorskoj visini od 423 m u mikroregiji Žumberačkog prigorja središnje Hrvatske.

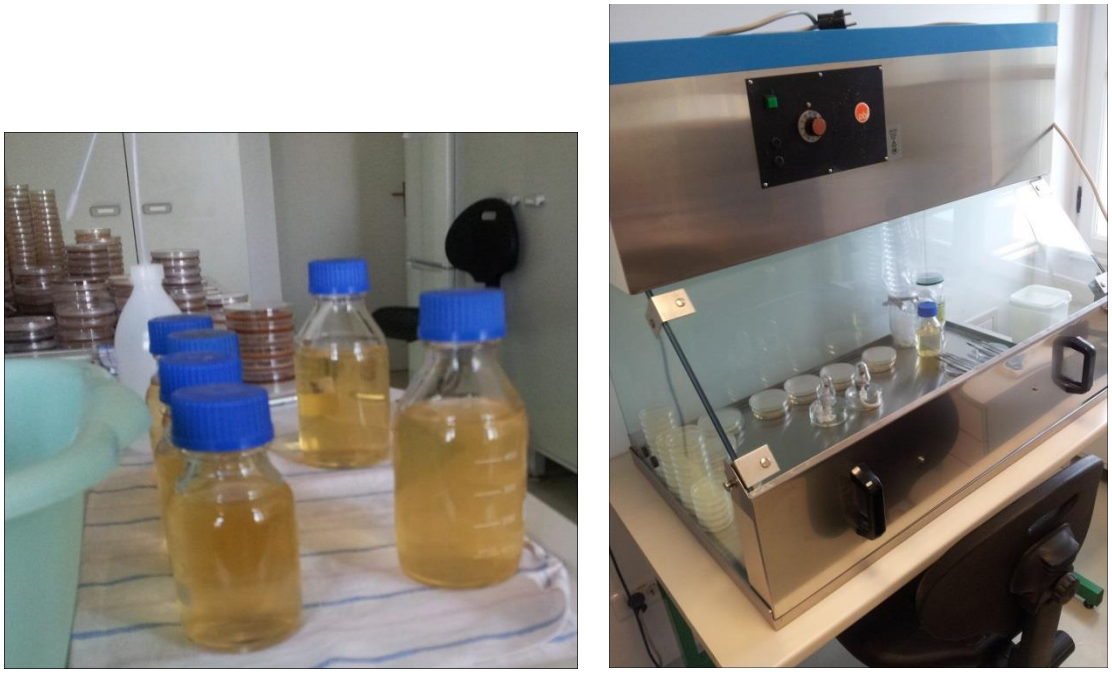
3.2. Uzorkovanje izolata gljive *C. parasitica* na terenu i uzgoj čistih kultura

Uzorci *C. parasitica* prikupljali su se u srpnju 2014. god. sa područja populacije kestena u Ozlju i Kaštu. Po jednoj lokaciji uzorkovalo se po 10 stabala, a iz svakog stabla tri izolata (a,b,c) najpristupačnijeg raka. Rak je uzorkovan iglom za punkciju promjera 2 mm, a između svakog uzorkovanja igla je bila namočena u 70% EtOH i flambirana, kako bi se osigurala sterilnost između izolata. Uzorci kore/raka su zatim pospremljeni na +4 ºC 2 dana, nakon čega su kratko uronjeni (10-tak sekundi) u 70% EtOH, osušeni na filtar papiru i utisnuti u hranjivu krumpirovu podlogu (Potato Dextrose Agar, PDA). Na podlozi je praćen njihov rast i kada bi micelij bio vidljiv, maleni komadić podloge sa micelijem presađivao se na svježu podlogu. To se ponavljalo dok se nisu dobile čiste kulture. Prikupljanje i izolaciju uzoraka gljive *C. parasitica* obavili su prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica i dr. sc. Marin Ježić (Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu) i prof. dr. Marilena Idžojtić (Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

3.3. Održavanje kultura *C. parasitica*

Prethodno prikupljeni i pročišćeni uzorci gljive *C. parasitica* presađeni su na hranjivu krumpirovu podlogu (Potato Dextrose Agar, PDA) u Petrijeve posudice (Medicplast; φ 90 mm ili 60 mm). Agar je prije pripremljen prema uputama proizvođača (Biolife). U 1L destilirane vode stavljeno je 42 g krumpirovog agara. Mješavina se kuhala dok se sav agar

nije otopio (~15 min). Raspodjeljena je u Shottove boce (Slika 12) koje podnose visoke temperature sterilizacije u autoklavu koje je slijedilo. Agar je autoklaviran (Sutjeska) 15 min pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bara. Nakon autoklaviranja, tekući blijedožuti hranjivi agar izliven je u sterilne, veće i manje, Petrijeve posudice (Medicplast; φ 90 mm ili 60 mm) do visine 5 mm. Izlijevalo se u tzv. laminaru (Slika 12), sterilnom prostoru prethodno steriliziranom UV-svjetlom (~30 min) gdje je stalno prisutno strujanje zraka.



Slika 12. Hranjiva PDA podloga u Shottovim bovama (lijevo) i sterilni prostor – laminar (desno)
(Autorske fotografije)

Kulture su se inkubirale pri sobnoj temperaturi u periodu od 14 dana: sedam dana u mraku (da bi došlo do rasta micelija), zatim sedam dana na danjem svjetlu (da bi došlo do sporulacije) (Slika 13).



Slika 13. Inkubiranje u ormariću u mraku (lijevo) i inkubiranje na danjem svjetlu (desno) (Autorske fotografije)

Precjepljivanje za održavanje kultura dok traje istraživanje provodilo se u laminaru sterilnim skalpelom kojim se sastrugao (ili izrezao) micelij i stavljao u sredinu nove Petrijeve posudice sa podlogom. Svaka Petrijeva posudica bila je označena kraticom izolata i datumom. Sav pribor koji se koristio bio je steriliziran 70% EtOH i flambiran, kako ne bi došlo do zagađenja eventualnim bakterijama i plijesnima iz okoline, te da slučajno ne bi došlo do miješanja izolata.

3.4. Pohranjivanje izolata gljive *C. parasitica*

Za moguća buduća istraživanja, 4-5 sitnih kockica (3x3x3 mm) svakog pojedinog izolata pohranjeno je u sterilne Eppendorf mikroepruvete sa 22%-tnim glicerolom, te se kao takve na -80 ºC mogu čuvati nekoliko godina.

3.5. Određivanje morfologije izolata gljive *C. parasitica*

Svježe izraslim kulturama određivana je morfologija. Razlikovali su se virulentni izolati karakteristične narančaste do narančasto-smeđe boje bogati sporama i hipovirulentni

izolati bijele do blijedo žute boje s vrlo malo spora. Hipovirulenti izolati, zbog zaraze virusom CHV-1 imaju smanjenu produkciju pigmenata i to se vrlo lako uočava.

3.6. Test vegetativne kompatibilnosti izolata gljive *C. parasitica*

Raznolikost tipova vegetativne kompatibilonsti (VC) gljive *C. parasitica* određuje se testom vegetativne kompatibilnosti (VC-test). Test vegetativne kompatibilnosti temelji se na praćenju pojave anastomoze hifa/baražne linije između dva kompatibilna/nekompatibilna uzorka. Ukoliko su izolati kompatibilni, njihovi micelij će u potpunosti prorasti, a to znači da imaju identične alele na svih šest *vic* lokusa. Ukoliko se na mjestu kontakta formira baražna linija, izolati se razlikuju u najmanje jednom *vic* lokusu i nekompatibilni su. Na mjestu kontakta dolazi do programirane stanične smrti.

Testiranje je trajalo od kolovoza 2014. godine do početka prosinca 2014. godine. Sterilnim skalpelom sastrugan je (ili izrezan) svježi micelij iz kulture i nacijepljen uz rub Petrijeve zdjelice (udaljen ~ 3 mm) sa prethodno pripremljenom krumpirovom podlogom zajedno sa micelijem testera – EU tester. Tester i izolat međusobno su bili udaljeni 2-5 mm. Na jednoj Petrijevoj zdjelici zbog njene veličine bilo je moguće napraviti šest sparivanja. Korišteno je 64 testera poznate vegetativne kompatibilnosti od kojih su neki već ranije nađeni u Hrvatskoj i Sloveniji. Posebno su sparivane populacije gljive iz Ozlja i Kašta. Svaki izolat gljive je sparivan najprije sa testerima od EU1 - EU31, a zatim i sa testerima od EU32 - EU64. Paralelno s tim, izolati su sparivani i međusobno. Svako sparivanje rađeno je u triplikatu radi dobivanja točnijih rezultata. Nakon nekoliko dana rasta, već se moglo odrediti podudaraju li se izolati ili ne. Podudarnost se određivala golim okom. Ukoliko kompatibilnost nije mogla biti određena sa sigurnošću, miceliji su rasli još nekoliko dana ili je testiranje ponovljeno. Cijeli postupak se provodio u sterilnom laminaru steriliziranim priborom, a svaka prethodno označena Petrijeva posuda zatvorena je parafilmom zbog sprječavanja kontaminacije.

3.7. Statistička analiza raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti

Dobivena raznolikost VC tipova testom vegetativne kompatibilnosti izračunavana je *Shannon - Wiener* indeksom (Shannon i Weaner 1949)

$$H = -\sum pi\ lnpi$$

i indeksom genotipske raznolikosti Stoddarta i Taylora (Stoddart i Taylor 1988)

$$G = 1/\sum pi^2$$

gdje *pi* predstavlja frekvenciju pojedinih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica.*

Obzirom da su Cortesi i Milgroom (1998) odredili sastav alela za 64 (2^6) europska VC tipa, moguće je procijeniti raznolikost alela za svaki lokus i predvidjeti moguće povećanje broja vegetativno kompatibilnih tipova u populaciji gljive *C. parasitica* u Ozlju i Kaštu. Raznolikost alela za svaki lokus (Nei 1973) izračunavan je prema formuli:

$$h = n\ (1 - p^2 - q^2)\ /\ (n - 1)$$

pri čemu je p frekvencija alela 1, q = 1 – p, a n je ukupan broj izolata u populaciji. Maksimalni broj VC tipova računala sam po formuli 2^k gdje je k broj polimorfnih šest *vic* lokusa u populaciji.

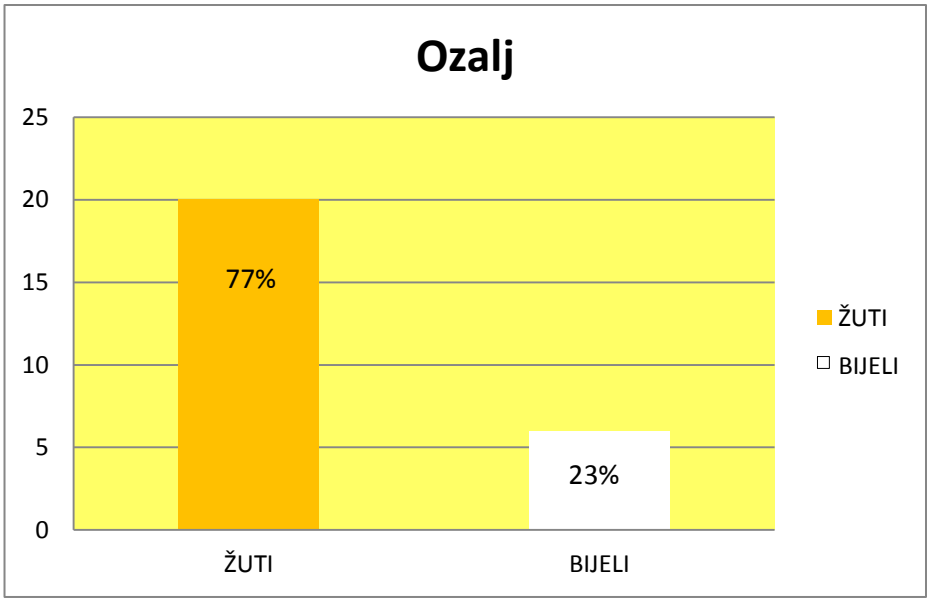
4. REZULTATI

4.1. Zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive u populacijama Ozalj i Kašt

U svim istraživanim populacijama kestena u Hrvatskoj zabilježena je prisutnost fitopatogene gljive *C. parasitica*, uzročnika raka kore pitomog kestena. Žutu do narančasto-smeđu boju micelija imaju virulentni sojevi, dok bijelu boju imaju hipovirulentni sojevi koji sadrže CHV-1 (Slika 14). Analizom morfoloških karakteristika izolata gljive *C. parasitica* u sastojinama pitomog kestena na području Ozlja od njih ukupno 26, dvadeset ih je bilo karakteristične žute boje, dok je 6 izolata bilo bijele boje (Slika 15). Na području Ozlja prijelazni tipovi, nedefinirane boje, nisu utvrđeni.

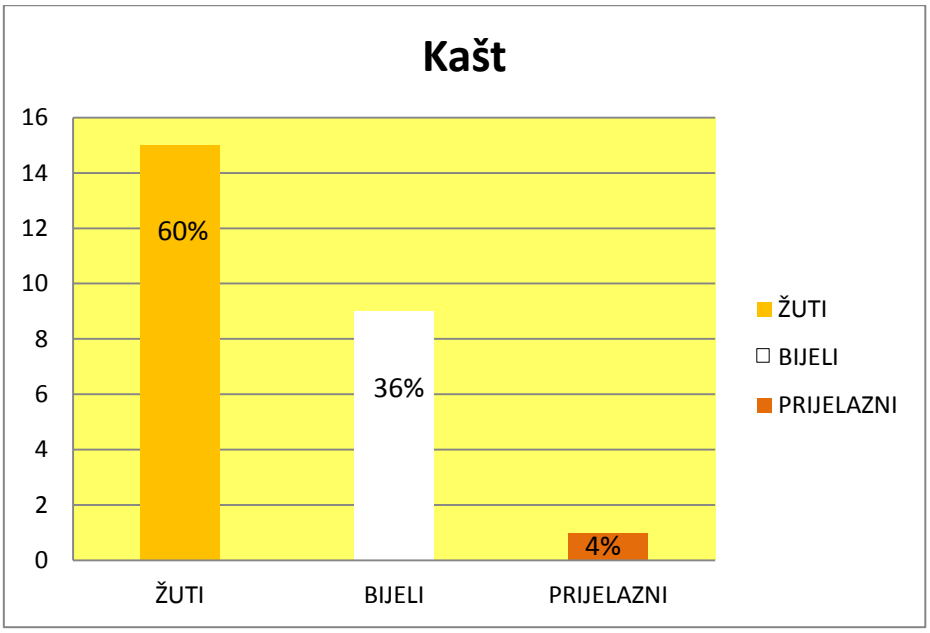


Slika 14. Izolat gljive *Cryphonectria parasitica* smeđe-narančaste morfologije (lijevo) i izolat bijele morfologije (desno)
(Autorske fotografije)



Slika 15. Udio žutih i bijelih izolata gljive *C. parasitica* na području Ozlja

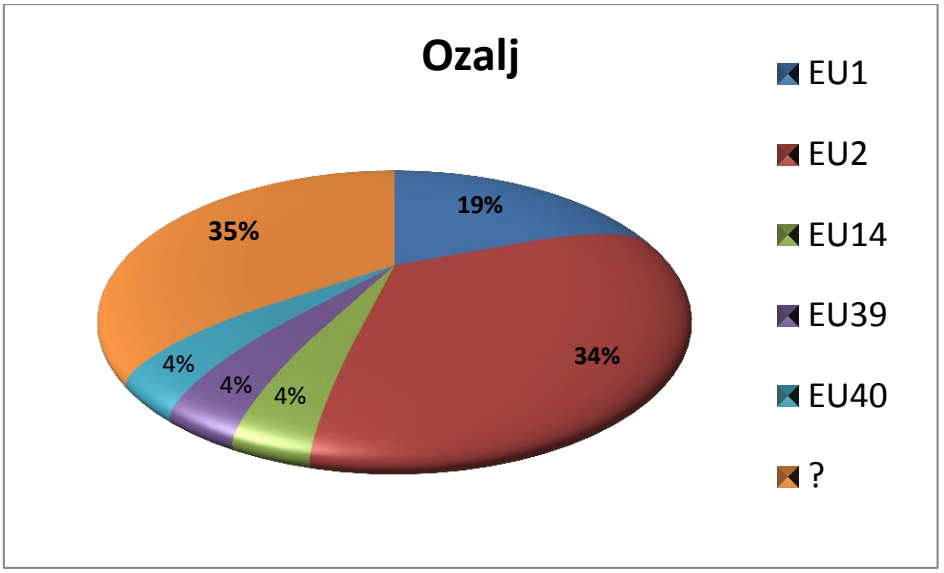
U sastojinama pitomog kestena na području Kašta virulentnih (žutih) izolata *C. parasitica* bilo je 15 od 25, dok je hipovirulentnih (bijelih) izolata bilo 9. Utvrđen je i jedan prijelazni oblik, nedefiniran kao hipovirulentni ili virulentni (Slika 16).



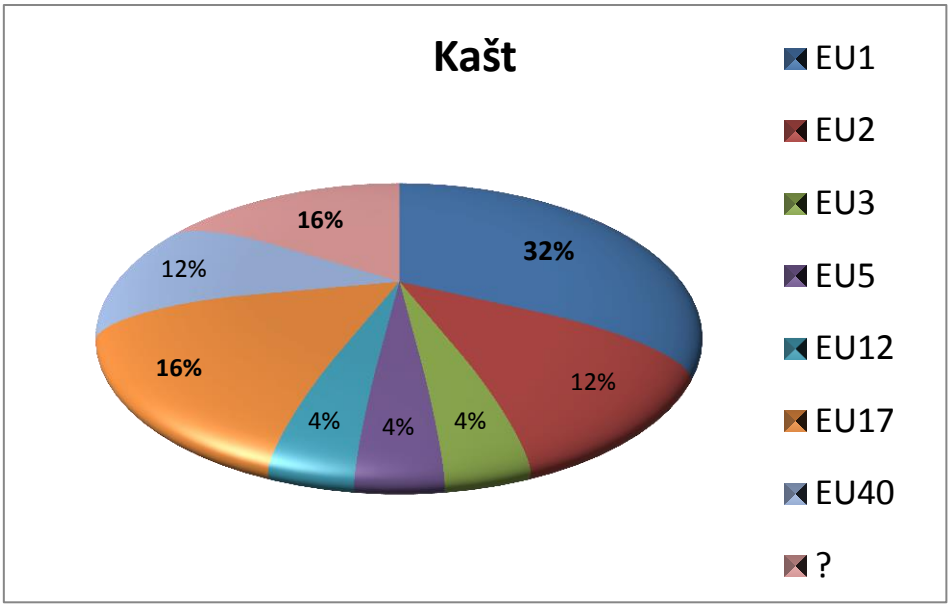
Slika 16. Udio žutih, bijelih i prijelaznih izolata gljive *C. parasitica* na području Kašta

4.2. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica*

Pedeset i jedan uzorak gljive *C. parasitica* s područja Ozlja i Kašta testom vegetativne kompatibilnosti svrstan je u 16 različitih VC tipova. U populaciji Ozalj pronađeno je 10 različitih, a u populaciji Kašt 9 različitih VC tipova. Nema VC tipa koji je dominantan za obje populacije. U populaciji Ozalj najzastupljeniji je tip EU2, čini ga 9 izolata od ukupno 26, a slijedi ga EU1 sa 5 izolata. Najveći udjel pripada neodređenim izolatima, međutim, među tim neodređenima (9 izolata) postoji 5 različitih VC tipova i stoga niti jedan nepoznati VC tip ne može biti dominantniji od EU2. Prisutni su još i VC tipovi EU14, EU39 i EU40 (Slika 17). U populaciji Kašt dominira EU1 sa ukupno 8 izolata od 25, a zatim EU17 sa 4 izolata. Prisutni su još i VC tipovi EU2 i EU40, te EU3, EU5, EU12 (Slika 18). Neodređenih izolata ima 4 od ukupno 25. Nepoznati izolati pripadaju dvama različitim VC tipovima, jer međusobnim testom križanja nisu kompatibilni. Križani su i neodređeni izolati iz Ozlja i Kašta međusobno i nije utvrđena kompatibilnost.



Slika 17. Zastupljenost VC tipova u populaciji Ozalj



Slika 18. Zastupljenost VC tipova u populaciji Kašt

Kada bi promatrali zastupljenost pojedinog neodređenog VC tipa obzirom na broj pronađenih izolata za taj VC tip i obzirom na određene i poznate izolate u populaciji Ozalj, VC tip O2 činio bi 3 izolata, što je dosta u odnosu na cijelu populaciju i na VC tipove EU1 i EU2. Slijede ih VC tipovi O4 i 05 (Tablica 1).

Tablica 1: Zastupljenost VC tipova zajedno sa neodređenim VC tipovima u populaciji Ozalj. Zelenom bojom označen je najzastupljeniji novi VC tip.

OZALJ										
VC tip	**EU1**	**EU2**	**EU14**	**EU39**	**EU40**	**O1^0**	**O2^0**	**O3^0**	**O4^0**	**O5^0**
N*	5	9	1	1	1	1	3	1	2	2
udio	19%	34%	4%	4%	4%	4%	**11%**	4%	8%	8%

* N označava broj pronađenih izolata određenog VC tipa

^{0} slovo „O“ označava nepoznati VC tip redom od 1-5 u populaciji Ozalj

Promatramo li populaciju Kašt na isti način, VC tipovi K1 i K2 jednako su zastupljeni, a njihova zastupljenost je tada veća od određenih VC tipova EU3, EU5 i EU12, ali manja od VC tipova EU1, EU17, EU2 i EU40. Takvom zastupljenošću su nepoznati VC tipovi u populaciji Kašt tek na četvrtom i petom mjestu (Tablica 2).

Tablica 2: Zastupljenost VC tipova zajedno sa neodređenim VC tipovima u populaciji Kašt. Ružičastom bojom označeni su novi VC tipovi i njihova zastupljenost.

KAŠT									
VC tip	**EU1**	**EU2**	**EU3**	**EU5**	**EU12**	**EU17**	**EU40**	**K1[k]**	**K2[k]**
N[*]	8	3	1	1	1	4	3	2	2
udio	32%	12%	4%	4%	4%	16%	12%	**8%**	**8%**

* N označava broj pronađenih izolata određenog vc tipa

[k] slovo „K“ označava nepoznati VC tip 1 i 2 u populaciji Kašt

4.3. Raznolikost gljive *C. parasitica* na genskoj razini

Raznolikost VC tipova procijenjena *Shannon-Wiener* indeksom (H) za populaciju Ozalj iznosila je 1.941, za populaciju Kašt 1.953. Indeks genotipske raznolikosti (G) za populaciju Ozalj iznosio je 5.46 (Tablica 3), a za populaciju Kašt 4.59 (Tablica 4).

Tablica 3: *Shannon-Wiener* indeks (H) i indeks genotipske raznolikosti (G) za populaciju s područja **Ozlja**

VC tip	**n[a]**	**p_i=n/N**	**p_i x lnp_1**	**p_i^2**
EU1	5	0.192	0.316	0.036
EU2	9	0.346	0.367	0.119
EU14	1	0.038	0.124	0.001
EU39	1	0.038	0.124	0.001
EU40	1	0.038	0.124	0.001
O_1	1	0.038	0.124	0.001
O_2	3	0.115	0.248	0.013
O_3	1	0.038	0.124	0.001
O_4	2	0.076	0.195	0.005
O_5	2	0.076	0.195	0.005
N[b]=ukupno	26	0.995	**H[c]=1.941**	∑=0.183 **G[d]=5.46**

a broj izolata određenog VC tipa u populaciji

[b] ukupan broj izolata u populaciji s područja Ozlja

[c] *Shannon-Wiener* indeks, H=-$\sum p_i \ln p_i$

[d] Indeks genotipske raznolikosti, G = $1/\Sigma pi^2$

Tablica 4: *Shannon-Wiener* indeks (H) i indeks genotipske raznolikosti (G) za populaciju s područja **Kašta**

VC tip	n	p_1=n/N	p_1 x lnp_1	p_i^2
EU1	8	0.32	0.364	0.1024
EU2	3	0.12	0.254	0.0144
EU3	1	0.04	0.128	0.0016
EU5	1	0.04	0.128	0.0016
EU12	1	0.04	0.128	0.0016
EU17	4	0.16	0.293	0.0256
EU40	3	0.12	0.254	0.0144
K1	2	0.08	0.202	0.0064
K2	2	0.08	0.202	0.0064
N[b]=ukupno	25	1	**H[c]=1.953**	∑=0.2176
				G[d]=4.59

a broj izolata određenog VC tipa u populaciji

[b] ukupan broj izolata u populaciji s područja Kašta

[c] *Shannon-Wiener* indeks, $H=-\sum p_i \ln p_i$

[d] Indeks genotipske raznolikosti, $G = 1/\Sigma pi^2$

Cortesi i Milgroom (1998) objavili su genotipe za 64 europska VC tipa (Tablica 5), pa je određen sastav alela za VC tipove pronađene u populacijama Ozalj i Kašt i ukupan broj alela 1 (Tablice 6 i 7). Za njih su poznati aleli na svih šest *vic* lokusa što omogućuje praćenje mogućih križanja između različitih kompatibilnih izolata.

Tablica 5: Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za 64 europska VC tipa (prema Cortesi i Milgroom 1998). Plavom bojom označeni su EU tipovi pronađeni na lokaciji Ozlja i Kašta, ružičastom bojom označeni su EU tipovi pronađeni samo na lokaciji Kašt, a zelenom samo na lokaciji Ozalj.

Vc tip	**Aleli na lokusima *vic 1, vic 2, vic 3, vic 4–vic 6, vic 7***
EU-42	1111-11
EU-12	1112-11
EU-34	1121-11
EU-40	1122-11
EU-13	1211-11
EU-11	1212-11
EU-37	1221-11

EU-45	1222-11
EU-9	2111-11
EU-17	2112-11
EU-36	2121-11
EU-10	2122-11
EU-15	2211-11
EU-28	2212-11
EU-46	2221-11
EU-33	2222-11
EU-27	1111-12
EU-29	1112-12
EU-50	1121-12
EU-56	1122-12
EU-24	1211-12
EU-30	1212-12
EU-52	1221-12
EU-48	1222-12
EU-23	2111-12
EU-14	2112-12
EU-58	2121-12
EU-32	2122-12
EU-21	2211-12
EU-3	2212-12
EU-51	2221-12
EU-35	2222-12
EU-43	1111-21
EU-8	1112-21
EU-53	1121-21
EU-49	1122-21
EU-19	1211-21
EU-25	1212-21
EU-63	1221-21
EU-47	1222-21
EU-16	2111-21
EU-22	2112-21
EU-57	2121-21
EU-39	2122-21
EU-18	2211-21
EU-7	2212-21
EU-64	2221-21
EU-41	2222-21
EU-20	1111-22
EU-4	1112-22
EU-61	1121-22
EU-62	1122-22
EU-31	1211-22
EU-26	1212-22
EU-55	1221-22

EU-54	1222-22
EU-6	2111-22
EU-2	2112-22
EU-59	2121-22
EU-38	2122-22
EU-5	2211-22
EU-1	2212-22
EU-60	2221-22
EU-44	2222-22

Tablica 6: Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za VC tipove pronađene u populaciji **Ozalj,** te ukupan broj alela 1 na svakom pojedinom lokusu.

Sivo su označeni izolati nepoznatog genotipa.

VC tip	n[a]	Alel na lokusu *vic1*	Alel na lokusu *vic2*	Alel na lokusu *vic3*	Alel na lokusu *vic4*	Alel na lokusu *vic6*	Alel na lokusu *vic7*
EU1	5	2	2	1	2	2	2
EU2	9	2	1	1	2	2	2
EU14	1	2	1	1	2	1	2
EU39	1	2	1	2	2	2	1
EU40	1	1	1	2	2	1	1
O1	1	?	?	?	?	?	?
O2	3	?	?	?	?	?	?
O3	1	?	?	?	?	?	?
O4	2	?	?	?	?	?	?
O5	2	?	?	?	?	?	?
Broj alela 1		**1**	**12**	**15**	**0**	**2**	**2**
N[b]	26						

[a] broj izolata određenog VC tipa

[b] ukupan broj izolata u populaciji s područja Ozlja

Tablica 7: Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za VC tipove pronađene u populaciji **Kašt**, te ukupan broj alela 1 na svakom pojedinom lokusu.
Sivo su označeni izolati nepoznatog genotipa.

VC tip	n[a]	Alel na lokusu *vic1*	Alel na lokusu *vic2*	Alel na lokusu *vic3*	Alel na lokusu *vic4*	Alel na lokusu *vic6*	Alel na lokusu *vic7*
EU1	8	2	2	1	2	2	2
EU2	3	2	1	1	2	2	2
EU3	1	2	2	1	2	1	2
EU5	1	2	2	1	1	2	2
EU12	1	1	1	1	2	1	1
EU17	4	2	1	1	2	1	1
EU40	3	1	1	2	2	1	1
K1	2	?	?	?	?	?	?
K2	2	?	?	?	?	?	?
Broj alela 1		4	11	18	1	9	8
N[b]	25						

[a] broj izolata određenog VC tipa

[b] ukupan broj izolata u populaciji s područja Kašta

Pomoću ukupnog broja alela 1 za svaki pojedini lokus određena je frekvencija alela na 6 *vic* lokusa u populaciji gljive *C. parasitica* na području Ozlja i Kašta (Tablica 8). Uvršteni su samo izolati poznatoga EU tipa.

Tablica 8: Frekvencija alela na 6 *vic* lokusa u populacijama gljive *C. parasitica* na području Ozlja i Kašta.

		vic 1		*vic 2*		*vic 3*	
Populacija	**N**	**1[a]**	**2[a]**	**1**	**2**	**1**	**2**
Ozalj	17	0.0588	0.9412	0.7058	0.2942	0.8823	0.1177
Kašt	21	0.1904	0.8096	0.5238	0.4762	0.8571	0.1429
		vic 4		*vic 6*		*vic 7*	
Populacija	**N**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Ozalj	17	0	1	0.1176	0.8824	0.1176	0.8824
Kašt	21	0.0476	0.9524	0.4285	0.5715	0.3809	0.6191

1[a] i 2[a] odnose se na dva alela koja se mogu nalaziti na svakom *vic* lokusu.

Frekvencija je poslužila izračunavanju raznolikosti alela i broju polimorfnih lokusa (Tablica 9). Srednja vrijednost raznolikosti alela za populaciju Ozalj iznosila je 0.2, a za populaciju Kašt 0.37. Populacija Ozalj ima 5 polimorfnih lokusa, samo lokus *vic 4* nije polimorfan. Međusobnim rekombinacijama broj VC tipova mogao bi se povećati do maksimalnih 32 (2^5). U populaciji Kašt svih 6 *vic* lokusa je polimorfno, pa broj maksimalnih VC tipova seže do 2^6 (64). Treba napomenuti da izolati gljive koji nisu kompatibilni sa do sada poznatim EU testerima, nisu uzimani u obzir, obzirom da nije poznat njihov genotip. To znači da se raznolikost VC tipova već povećala, samo što to nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi.

Tablica 9: Raznolikost alela i broj polimorfnih lokusa na šest *vic* lokusa u populacijama gljive *C. parasitica* na području Ozlja i Kašta.

Populacija	**N**	***vic 1***	***vic 2***	***vic 3***	***vic 4***	***vic 6***	***vic 7***	Srednja vrijednost	Broj max polimorfnih *vic* lokusa	Max broj VC tipova
Ozalj	17	0.1176	0.4412	0.2206	0	0.2205	0.2205	0.2034	5	32
Kašt	21	0.3237	0.5238	0.2572	0.0952	0.5142	0.4952	0.3682	6	64

5. RASPRAVA

Na istraživanom području Ozlja i Kašta, nedaleko od granice sa Republikom Slovenijom, od ukupno 51 izolata gljive *Cryphonectria parasitica*, zabilježeno je 16 različitih VC tipova. Od 16 različitih, njih 9 je poznatih i kompatibilni su s EU testerima od 1-64. U populaciji Ozalj najveći udio ima VC tip EU2 sa 34%, a onda EU1 sa 19%. To je malo neobično obzirom na istraživanje prije 10-tak godina, provedeno u razdoblju od 2004-2005 godine, kada je na tom području dominantan EU tip bio EU1 sa čak 83.7%, a EU2 zastupljen sa 9.3%. Tada su zabilježeni i tipovi EU5, EU7 i EU17 sa 2.3 %. Sada u Ozlju nije potvrđena prisutnost tih EU tipova, ali prisutni su EU14, EU39 i EU40, svaki sa zastupljenošću od 4%. EU39 i EU40 nisu ranije pronađeni u Hrvatskoj, a sada je i u populaciji Kašt nađen izolat kompatibilan sa EU40. U populaciji Kašt dominantni su tipovi EU1 sa 32% i EU17 sa zastupljenošću od 16%. Zanimljivo je da se u obje populacije javljaju izolati nekompatibilni sa EU testerima od 1-64. Vegetativna nekompatibilnost (inkompatibilnost) se koristi kao fenotipski marker za testiranje varijabilnosti unutar i među prirodnim populacijama (Cortesi i sur. 1996, Cortesi i Milgroom 1998, Milgroom i Cortesi 1999) i kao procjena učestalosti spolnog razmnožavanja u prirodnim populacijama gljive *C. parasitica* (Milgroom i Cortesi 1999, Marra i sur. 2004). Tako je u populaciji Ozalj utvrđeno pet novih VC tipova vegetativno nekompatibilnih sa testerima, a u populaciji Kašt dva. Novi VC tipovi učestaliji su od nekih već poznatih, npr. O2 iz populacije Ozalj zastupljen je sa 11%, a K1 i K2 u populaciji Kašt sa 8%. Za usporedbu, prilikom prijašnjih istraživanja u Hrvatskoj nađeno je 18 VC tipova u 338 prikupljenih izolata (Krstin i sur. 2008). U susjednim zemljama, npr. u Sloveniji 15 VC tipova unutar 254 prikupljena izolata (Krstin i sur. 2011), u Bosni i Hercegovini 25 VC tipova unutar 920 izolata (Trestić i sur. 2001), a u Italiji 8 unutar 194 prikupljena izolata (Milgroom i Cortesi 1999). Malo dalje, u sjeverozapadnoj Španjolskoj 6 VC tipova od ukupno 539 prikupljena izolata (Montenegro i sur. 2008), a u Portugalu 9 VC tipova unutar 617 prikupljenih izolata (Braganca i sur. 2007). U Japanu i Kini, azijskim zemljama u kojima je gljiva *C. parasitica* autohtona vrsta, 79 prikupljenih izolata svrstano je u čak 71 različit VC tip (Liu i Milgroom 2007). U Americi, populacije gljive *C. parasitica* veće su raznolikosti od europskih, a u Gruziji su nađeni mnogi VC tipovi nepoznati u ostalim dijelovima Europe koji su se pojavili na lokalnoj razini kroz spolno razmnožavanje i rekombinaciju (Prospero i sur. 2013).

Razlike u dominantnosti VC tipova u Europi također su velike. U zapadnijim zemljama Europe, kao npr. u Portugalu, sjevernoj Španjolskoj i jugozapadnoj Francuskoj populacije su sasvim drugačije od onih u drugim zemljama Europe, dominiraju VC tipovi EU11, EU33, EU66 i EU72 što dovodi do zaključka da je patogen podrijetla drugačijeg od onog proširenog iz Italije (Robin i sur. 2000, Montenegro i sur. 2008, Robin i sur. 2009). U središnjoj i južnoj Europi: Slovačkoj, Grčkoj, južnoj Italiji, Makedoniji, Rumunjskoj i Bugarskoj dominantan VC tip je EU12 (Sotirovski i sur. 2004, Perlerou and Diamandis 2006, Milgroom i sur. 2008, Erincik i sur. 2011). U Italiji, Francuskoj i južnoj Švicarskoj veća je raznolikost jer je bolest prisutna duže vremensko razdoblje. Na samom pragu Europe, u Turskoj, koegzistiraju EU12 i EU1 (Gurer i sur. 2001, Akilli i sur. 2009).

Što se tiče Europe, iz gore navedenoga zaključuje se da je veća genska raznolikost populacija u široj okolici sjeverne Italije (Ježić 2013), gdje je prvi puta zabilježena bolest 1938. god. U Hrvatskoj i Sloveniji zabilježena je gljiva *C. parasitica* samo 15-tak godina kasnije, dok ostali dijelovi Europe još nisu bili zahvaćeni ovom bolešću. Pošto je prisutna u Hrvatskoj i Sloveniji već 60-ak godina, što je mnogo duže nego u istočnoj Europi, populacije patogena se smještaju među starije u Europi (Ježić 2013) i ne čudi veća raznolikost, koja se među prvima u Europi i povećavala.

U susjednoj Sloveniji, na nekoliko područja koja su udaljena samo 60-100 km od Ozlja i/ili Kašta, pronađeni su VC tipovi izvan prvih opisani EU1-EU32. Tako su npr. u Brežicama dominantni EU1, EU39 i EU40. Sva tri su prilikom uzorkovanja 2014. godine potvrđena i u populaciji Ozalj, a u populaciji Kašt samo dva (EU1 i EU40). U dva lokusa razlikuju se međusobno EU39 i EU40, u tri EU1 i EU39, dok se u pet lokusa razlikuju VC tipovi EU1 i EU40. Njihovim rekombinacijama po tome mogu nastati ukupno 32 (2^5) nova VC tipa i u Ozlju i u Kaštu.

VC tip koji je slabije zastupljen u populacijama Hrvatske je EU17, a važno je napomenuti da je jedino dominantan u populaciji Lovran, nedaleko od Opatije, gdje čini 41.64% (Matković 2012) istraživane populacije. Sada je pronađen i u populaciji Kašt, čini 16% kompatibilnih izolata, te je po tome na drugom mjestu po zastupljenosti. I u populaciji Lovran i u populaciji Kašt mogao je nastati rekombinacijom VC tipova EU12 sa EU1, EU5 ili EU3. Obzirom da je u populaciji Kašt prisutan i EU40, koji se razlikuje od EU12 u samo jednom *vic* lokusu, mogao je nastati i njihovom rekombinacijom. U Sloveniji, koja mu je relativno blizu, zastupljen je slabom učestalošću od 5.1% (Krstin i sur. 2011), kao i u većini

ostalih europskih zemalja. Međutim, dominantan je u Austriji, a nekoliko izolata tog VC tipa zabilježeno je i u populacijama Bosne i Hercegovine (Trestić i sur. 2001). VC tip EU13 nisam pronašla u istraživanim populacijama, iako je on uobičajen za susjedne zemlje Europe, kao za sjeverozapadnu Bosnu i Hercegovinu (Trestić i sur. 2001), Mađarsku (Radócz 2001), Slovačku (Adamčíková i sur. 2006), a dolazi i u nekim populacijama u sjevernoj Italiji, Švicarskoj i Češkoj.

Drugi pokazatelj raznolikosti populacije je vrijednost *Shannon-Wiener* indeksa (H) u čiju su statističku obradu uneseni i podaci neodređenih izolata. Za populaciju Ozalj *Shannon-Wiener* indeks iznosi 1.941, a za populaciju Kašt 1.953. Iako je indeks europskih zemalja većinom manji od 2.0 (Garbelotto i sur. 1992, Cortesi i sur. 1998, Robin i sur. 2000, Trestić i sur. 2001, Sotirovski i sur. 2004, Montenegro i sur. 2008), za populacije Ozalj i Kašt on je gotovo dosegao tu vrijednost. Što se tiče Hrvatske, područje Istre − Buje je imalo *Shannon-Wiener* indeks raznolikosti do sada najveći, iznosa 1.69, pa bi se raznolikost populacija Ozalj i Kašt ipak bolje mogla usporediti sa južnom Švicarskom gdje je u Luminu indeks iznosio 1.94, a u Gnosci 2.18, te je pronađeno od 14-16 VC tipova (Bissegger i sur. 1997). Nešto manja raznolikost prisutna je u sjevernoj Italiji u Bergamu (1.76) (Cortesi i sur. 1998). Najveća raznolikost je tamo gde se bolest kestena prvotno javila, pa je već došlo do povećanog spolnog razmnožavanja. To su jugozapadna Francuska, Italija i Švicarska, a svakako i Amerika, te kineske i japanske populacije, gdje je, kao što je već spomenuto, gljiva autohtona. Nasuprot tome, u populacijma jugoistočne Europe (Milgroom i sur. 2008) utvrđena je mnogo manja raznolikost, sukladno sa kasnijim dolaskom patogena na ta područja.

Po indeksima genotipske raznolikosti (G), koji se kreće od 4.59 - 5.46, populacije Kašt i Ozalj nisu usporedive sa hrvatskim istraživanim populacijama, naime, opet su sličnije švicarskim. Prijašnjim istraživanjima utvrđeni indeks genotipske raznolikost u Portugalu i Makedoniji bio je do 2, u Italiji do 4, Švicarskoj do 6 (Cortesi i sur. 1996, Bissegger i sur. 1997, Milgroom i Cortesi 1999, Sotirovski i sur. 2004, Bragança i sur. 2007), a u Hrvatskoj (Krstin i sur. 2008) do 4.2 u Samoboru. U Samoboru su istovremeno pronađeni neki malo drugačiji VC tipovi od ostalih hrvatskih populacija, kao što su EU21 i EU22. Obzirom da je Ozalj u blizini Samobora, a indeks se od 2008. god. povećao za skoro 4X, od 1.41 do sadašnjih 5.46, kao što se povećala i VC raznolikost, može se pretpostavit da je došlo do međusobnih križanja između populacija. Za Samobor nisu rađena novija istraživanja, pa se ne zna trenutna situaciju, ali može se pretpostaviti da se slične promjene događaju, da se indeks genotipske i VC raznolikosti povećava.

Budući da je genetska osnova za vegetativnu (ne)kompatibilnost poznata za gotovo sve europske VC tipove (Cortesi i Milgroom 1998, Robin i sur. 2000) moguće je odrediti vjerojatnost povećanja broja VC tipova obzirom na sadašnju situaciju. Populacija Ozalj ima pet polimorfnih lokusa, samo lokus *vic4* nije polimorfan, pa bi se spolnom rekombinacijom na svih pet polimorfnih *vic* lokusa broj VC tipova mogao povećati na 32 (2^5) VC tipa. Prethodno rečeno, genetska osnova za vegetativno nekompatibilnost poznata je za gotovo sve europske tipove VC tipove, ali u posljednje vrijeme pojavili su se i neki novi (izvan 64 poznata) (Robin i sur. 2000, Braganca i sur. 2007, Montenegro i sur. 2008, Ježić 2013), a za njih nema poznate genetske osnove i nisu uvrštavani u računanje. To bi značilo da uz ukupno 5 definiranih VC tipova ima još 5 neodređenih u populaciji Ozalj, te da se raznolikost povećala za 100%. Prije 10-tak godina u populaciji Ozalj pretpostavljeno je da će maksimalni broj VC tipova biti 16 (2^4), no tada dva *vic* lokusa nisu bila polimorfna, *vic1* i *vic3*. Za sve ostale populacije u Hrvatskoj bio je pretpostavljen broj od najviše 32 VC tipa. No što se dogodilo? Samo dva EU tipa su jednaka kao i 2008. godine u populaciji Ozalj. Testiranjem mogućih rekombinacija EU tipova prisutnih 2008. godine i ovih sada 2014. godine, EU14 bi mogao nastati rekombinacijom EU1 ili EU2 sa EU17, koji su bili prisutni prije. EU39 i EU40 se razlikuju u samo dva lokusa, međutim rekombinacijom prisutnih VC tipova, nije pronađen način za njihov nastanak. Tim više što EU40 ima na lokusu *vic1* alel 1, za razliku od većine EU tipova koji imaju za lokus *vic1* alel 2, osim EU12 koji je vrlo često jedan od prva tri dominantna VC tipa u populacijama Hrvatske, a koji nije pronađen ni prije ni sada u Ozlju. U populaciji Kašt svi su lokusi izolata poznatih VC tipova polimorfni, pa se u budućnosti također očekuje povećanje raznolikosti gljive *C. parasitica* na tom području. Povećanje raznolikosti očekuje se u populacijama gdje se VC tip EU1 pojavljuje sa EU12, kao što je u populaciji Kašt, jer se oni razlikuju međusobno u četiri *vic* lokusa. Inače je poznato da se rekombinantni tipovi između glavnih VC tipova javljaju rjeđe, no ovdje je jedan od rekombinantnih tipova EU17 zastupljen sa 16%, dominantan odmah nakon EU1. U Hrvatskoj su Krstin i sur. (2008) rekombinantne tipove pronašli još samo u Istri i Samoboru (EU18, EU21, EU22). U Sloveniji i Italiji pronađeni su mali postotci takvih tipova. U Kaštu je prisutan i EU40, koji se razlikuje od EU12 u jednom lokusu, *vic3*, no upravo je taj lokus za većinu prisutnih tipova u Hrvatskoj različit od EU40. Broj EU tipova koji imaju alel 2 za lokus *vic3* je 32, dakle samo rekombinacijom na jednom *vic* lokusu sa EU40 uvelike se povećava broj novih VC tipova. U vrlo malom postotku od svega 4% prisutan je u populaciji Kašt VC tip EU5. Zbog tog jednog pronađenog izolata, koji na lokusu *vic4* ima alel 1, polimoran je i taj lokus, pa se u

budućnosti, obzirom na polimorfnost svih šest *vic* lokusa očekuje povećanje raznolikosti gljive *C. parasitica* na 64 VC tipa.

Robin i sur. (2000) već su prije 15 godina objavili da su u pojedinim europskim zemljama pronađeni novi VC tipovi, nekompatibilni sa poznatima. To su zabilježili i Bragança i sur. (2007) u Portugalu, Montenegro i sur. (2008) na području sjeverozapadne Španjolske, Robin i sur. (2009) u jugozapadnoj Francuskoj i sjevernoj Španjolskoj te nedavno Castano i sur. (2015) u sjeverozapadnoj Španjolskoj. Nalaz tako nekompatibilnih izolata, kao i vrlo velika raznolikost VC tipova u Aziji, potvrđuje da genetika vegetativne kompatibilnosti ne može biti objašnjena u potpunosti sa šest bialelnih *vic* lokusa (Robin i sur. 2009). U Japanu 68 nepoznatih genotipova implicira na postojanje najmanje dva dodatna polimorfna *vic* gena (Liu i Milgroom 2007). Pojava novih VC tipova gljive *C. parasitica* u Europi nije dobila značajniju pozornost znanstvene zajednice, unatoč bolesti raka kore kestena u Španjolskoj i Francuskoj gdje su prvotno i zabilježeni nepoznati izolati i unatoč gospodarskoj i društvenoj važnosti kestena na ovim prostorima. Rezultati gore navedenih znanstvenih grupa i rezultati prikazani u ovom diplomskom radu naglašavaju kvalitativnu i kvantitativnu važnost novih VC tipova, čija je vegetativna nekompatibilnost vrlo vjerojatno kontrolirana dodatnim polimorfnim lokusom ili trećim alelom (Robin i sur. 2000). Poznato je da interakcija biljka-patogen ovisi o njihovim genotipovima, starosti biljke i okolišnim uvjetima. U slučaju raka kore kestena, razvoj bolesti ovisi o kompleksnoj interakciji hipovirusa, gljive i kestena (Ježić i sur. 2013). Velika raznolikost VC tipova gljive znatno ograničava širenje hipovirusa, jer je onemogućena anastomoza hifa između dvije jedinke što rezultira pojavom vegetativne nekompatibilnosti tj. propadanjem hifa u interaktivnom području (Marra i Milgroom 2001). Razlike između sojeva u nekom *vic* lokusu mogu snažno inhibirati horizontalni prijenos virusa (Cortesi i sur. 2001), dok s druge strane neki lokusi imaju vrlo mali učinak na prijenos virusa. Takve razlike mogu mijenjati frekvencije alela, time i VC raznolikost populacije, jer neki VC tipovi mogu biti pod pritiskom selekcije (Ježić 2013). Vjerojatno je to razlog pronalaska 77% žutih izolata, a samo 23% bijelih na području Ozlja, te 60% žutih i 36% bijelih na području Kašta. Zabilježeno je 4% prijelaznih izolata u populaciji Kašt. Bijela morfologija ne mora uvijek nužno reflektirati prisutnost hipovirusa (Bryner i sur. 2013), no najčešće je tako. Hipovirus se može naći i u nekim izolatima prijelazne morfologije, pa je zbog toga ipak sigurnije testirati izolate na prisutnost hipovirusne dsRNA. U populaciji Ozalj su bijele morfologije većinom izolati EU2 tipa, koji čini i većinu određenih izolata. Slično je pronađeno u Italiji i Švicarskoj (Cortesi i sur. 1998), sjeverozapadnoj Španjolskoj (Trestić i

sur. 2001), sjeveroistočnoj Španjolskoj (Castano i sur. 2014) i Francuskoj (Robin i sur. 2000, 2009). Ovakvi rezultati pokazuju da je hipovirus uveden ili se spontano širi sa gljivom iz južne Francuske (Castano i sur. 2014). U populacijama sa *Shannon-Wiener* indeksom do 2.0 zabilježeno je prirodno širenje hipovirusa dok se u populacijama koje imaju vrijednosti *Shannon-Wiener* indeksa iznad 2.0 ne očekuje prirodno uspostavljanje hipovirulentnosti (Milgroom i Cortesi 2004). Iako je za populacije Ozalj i Kašt vrijednost indeksa nešto manja od 2.0, mala je vjerojatnost za učinkovito prirodno uspostavljanje hipovirulencije, zbog prisutnosti novih VC tipova nekompatibilnih sa svim drugima utvrđenim na tom području. Zbog toga bi se trebalo brzo reagirati biološkom kontrolom. Brine spoznaja da je desetljeće prije u populaciji Ozalj skoro 50% izolata bilo bijele morfologije i inficirano virusom CHV-1 implicirajući uspješnu prirodnu biološku kontrolu bolesti. Znatan pad širenja virusa i znatno povećanje raznolikosti VC tipova otežava biološku kontrolu. U Hrvatskoj je inače hipovirus raširen u mnogim populacijama gljive *C. parasitica*. Najčešće je to na mjestima gdje je rak kore kestena prisutan duže vrijeme, pa se smatra da je hipovirulenca uspostavljena prirodno te da će rezultirati oporavkom kestenovih sastojina (Heiniger i Rigling 1994).

Biološka kontrola hipovirulencijom provodi se unošenjem mješavine hipovirulentnih sojeva odgovarajućeg tipa vegetativne kompatibilnosti gljive. Kako bi se spriječilo eventualno unošenje nepoznatih sojeva koji bi mogli ometati prirodno širenje hipovirulence, pri odabiru takve mješavine sojeva za biološku kontrolu važno je koristiti lokalne VC tipove (Robin i Heiniger 2001). Time se pospješuje kalusiranje rana na stablima, odnosno zacjeljivanje. Biološka kontrola pomoću hipovirulence je uspješna ukoliko je širenje virusa kroz populaciju gljive brže nego razmnožavanje gljive (Krstin 2009). Za što bolju biološku kontrolu i uvid u populacijsku strukturu gljive *C. parasitica* potrebna su daljnja nadziranja populacija gljive, raznolikosti VC tipova i širenja virusa, te dodatna istraživanja s mikrosatelitnim markerima (Davis i sur. 2005, Breuillin i sur. 2006, Kubisiak i sur. 2007, Robin i sur. 2009) koji su pogodniji za precizniju genetičku analizu (Milgroom i sur. 2008) i karakterizaciju populacija gljive *C. parasitica*.

Kao ideju za biološku kontrolu Novak-Agbaba (2013) je provela pokus djelovanja gljive antagonista *Trichoderma viride* na rast gljive *C. parasitica* u laboratorijskim uvjetima. Vrsta gljive *T. viride* prerasla je gljivu *C. parasitica* šesti dan rasta, i obzirom na to brzo prerastanje ukazuje na moguću primjenu u prirodnim uvjetima u borbi protiv uzročnika raka kore kestena.

Zdravstveno stanje kestenovih sastojima razlikuje se od područja do područja. Neke sastojine su u vrlo dobrom stanju dok su druge u prilično lošem. To ovisi o mnogim biotičkim i abiotičkim čimbenicima (Novak-Agbaba i sur. 2000). Kod biotičkih čimbenika svakako treba obratiti pažnju na insekte vektore. Iako se nije mislilo da igraju važnu ulogu u prijenosu bolesti, važno je spomenuti da rak kore kestena ima vrlo veliku i bogatu faunu. U jednom eksperimentu u Americi, 495 vrsta kukaca je nađeno na starim aktivnim rakovima. Znatan broj njih proveo je veći dio svog životnog ciklusa upravo na njemu, a za gotovo 70 vrsta otkriveno je da nose inokulum *C. parasitica* (Russin i Shain 1984).

Većina kestenovih sastojina izgubila je svoj tipični florni sastav i strukturu, što je povezano s mijenjanjem vegetacije, načinom gospodarenja i širenjem bolesti. Bukva i obični grab značajnim udjelom popunjavaju praznine nastale zbog propadanja kestena.

Negativan utjecaj na biološku kontrolu bi moglo imati spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica*, rekombinacija gena i postojanje mogućeg dodatnog polimorfnog lokusa ili trećeg alela, jer samim tim utječu na povećanje broja VC tipova. Iako se sustav vegetativne kompatibilnosti više ne smatra neprobojnom barijerom, jer je zabilježen prijenos hipovirusa između vegetativno nekompatibilnih izolata, što bi moglo pozitivno utjecati na biološku kontrolu raka kore kestena, situacija u populaciji Ozalj nije se razvijala povoljno. Svakim novim VC tipom povećava se mogućnost i vjerojatnost povećanja raznolikosti, svakom raznolikošću povećava se vjerojatnost smanjenja prijenosa virusa, otežan je nastanak hipovirulentnih sojeva, a bude li se takav trend nastavio kestenovim šumama prijeti još veća zaraza i posljedično odumiranje stabala. Područje Kašta nije prije bilo istraživano, pa nema podataka za usporedbu, no budući da je vrlo blizu Ozlju i granici sa Slovenijom, gdje se populacije kestena također intenzivno istražuju, važno je znati raznolikost i na ovom području.

Potrebno je svakako pratiti sastojine pitomog kestena *Castanea sativa* kroz duže vremensko razdoblje, nastaviti započeta istraživanja, reagirati u svrhu očuvanja krajobrazne i biološke raznolikosti, čuvati popularnost ukusnih plodova kestena i omogućiti da njegove šume svake jeseni budu i dalje najposjećenije.

6. ZAKLJUČCI

- Od ukupno 26 istraženih izolata gljive *C. parasitica* u populacijama pitomog kestena *Castanea sativa* Mill. u Ozlju određeno je 5 VC tipova, dok za 9 izolata nije utvrđena vegetativna kompatibilnost niti sa jednim do sada poznatim VC tipom. Dominantan VC tip je EU2.
- Od ukupno 25 istraženih izolata gljive *C. parasitica* u populacijama pitomog kestena *Castanea sativa* Mill. u Kaštu utvrđeno je 7 VC tipova, a za 4 izolata nije bilo moguće utvrditi vegetativnu kompatibilnost sa do sada poznatim VC tipovima. Dominantan VC tip je EU1.
- Raznolikost VC tipova i genotipska raznolikost gljive *C. parasitica* u Ozlju i Kaštu mogu se usporediti sa švicarskim i sjevernom-talijanskim populacijama, u kojima je bolest prvi puta i zabilježena.
- Indeksi vegetativne raznolikosti (*Shannon-Wiener* indeks) za populacije gljive *C. parasitica* u Ozlju i Kaštu su visoki, blizu 2.0, pa je smanjena vjerojatnost za učinkovito prirodno uspostavljanje hipovirulencije na ovim područjima.
- Hipovirus je u objema populacijama relativno slabo zastupljen, oko 30%.
- Obzirom na rezultate istraživanja prije 10 godina na području Ozlja, veliko je povećanje raznolikosti VC tipova, zbog unosa novih poznatih i nepoznatih VC tipova gljive, te zbog njenog spolnog razmožavanja.
- I ovo istraživanje potvrđuje hipotezu vjerojatnog postojanja dodatnog polimorfnog lokusa ili trećeg alela na postojećim *vic* lokusima gljive *C. parasitica*.
- Zbog povećanja raznolikosti VC tipova gljive smanjena je zastupljenost hipovirulencije.

7. LITERATURA

Adamčiková K., Juhasova G., Kobza M. (2006): Genetic Diversity of *Cryphonectria parasitica* Population in the Štiavnicko – Krupinska Subpopulation in Slovakia. Plant Protection Science 42: 119 –124.

Aguin O., Mata M., Mansilla J. P., Romero A. (2005): Occurrence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Galicia (NW Spain). Acta Horticulturae 693: 597 – 603.

Akilli S., Katircioğlu Y. Z., Maden S. (2009): Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. Forest Pathology 39: 390 – 396.

Akilli S., Sercß C. U., Katircioglu Y. Z., Maden S., Rigling D. (2013): Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus,Cryphonectria parasitica from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. European Journal of Plant Pathology 135*:* 323 – 334.

Alegro A. (2000): Vegetacija Hrvatske. URL:http://www.vusz.hr/Cms_Data/Contents/VSZ/Folders/dokumenti/javanustanovazaupravljanjezasticenimprirodnimvrijednostima/arhiva/~contents/NDW2SALP92LHTQZ7/2011-3-15-5947916-2009-12-7-5331263 vegetacijahrvatske.pdf. (3.3.2015.).

Anagnostakis S. L. (1987): Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. Mycologia 79: 23 – 37.

Anagnostakis S. L. (1988): Cryphonectria parasitica, cause of chestnut blight. Advances in Plant Pathology 6: 123 – 136.

Anagnostakis S. L., Day P. R. (1979): Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. Phytopathology 69: 1226 – 1229.

Anagnostakis S. L., Waggoner P. E. (1981): Hypovirulence, vegetative incompatibility, and growth of cankers of chestnut blight. Phytopathology 71: 1198 – 1202.

Anonymus 1. URL: http://www.rasadnik-strk.com/cvjetovi. (6.3.2015.).

Anonymus 2. URL: https://www.studyblue.com. (6.3.2015.).

Anonymus 3. URL: http://www.uzb.minpolj.gov.rs. (18.3.2015.).

Anonymus 4. URL: http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases. (5.3.2015.).

Anonymus 5. URL: http://www.uzb.minpolj.gov.rs. (18.3.2015.).

Anonymus 6. URL: https://www.wsl.ch. (18.3.2015.).

Biella S. M., Smith L., Aist J. R., Cortesi P., Milgroom M. G. (2002): Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. Proceedings of the Royal Society 269: 2269 – 2276.

Bissegger M., Rigling D., Heiniger U. (1997): Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. Phytopathology 87: 50 – 59.

Blackwell M. (2011): The Fungi: 1, 2, 3…5.1 million species?. American Journal of Botany 98: 426 – 438.

Bragança H., Simões S., Onofre N., Tenreiro R., Rigling D. (2007): *Cryphonectria parasitica* in Portugal – diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. Forest Pathology 37: 391 – 402.

Breuillin F., Dutech C., Robin C. (2006): Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. Mycological Research 110: 288 – 296.

Bryner S. F., Rigling D. (2011): Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. American Naturalist 177: 65 –74.

Bryner S. F., Sotirovski K., Akilli S., Risteski M., Perlerou C., Rigling D. (2013): Informative value of canker morphology on the presence or absence of virus infection in chestnut blight cankers. Forest Pathology 43: 496 – 504.

Casasoli M., Mattioni, C., Cherubini M., Villani F. (2001): A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. Theoretical and Applied Genetics 102: 1190 – 1199.

Castano C., Bassie L., Oliach D., Gomez M., Medina V., Liu B., Colinas C. (2015): Cryphonectria hypovirus1 (CHV-1) survey reveals low occurrence and diversity of Subtypes in NE Spain. Forest Pathology 45: 51 – 59.

Choi G. H., Nuss D. L. (1992): Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science 257: 800 – 803.

Conedera M., Krebs P., Tinner W., Pradella M., Torriani D. (2004): The cultivation of Castanea sativa (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. Vegetation History and Archaeobotany 13: 161 – 179.

Conedera M., Manetti M. C., Giudici F., Amorini E. (2004): Distibition and economic potential of the Sweet chestnut (Castanea sativa Mill.) in Europe. Ecologia mediterranea, tome 30, fascicule 2: 179 –193.

Coppin E., Debuchy R., Arnaise S., Picard M. (1997): Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 411 – 428.

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.

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

Cortesi P., Milgroom M. G., Bisiach M. (1996): Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. Mycological Research 100: 1087 – 1093.

Cortesi P., Rigling D., Heiniger U. (1998): Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. European Journal of Forest Pathology 28: 167 – 176.

Crkvenčić I., Derado K., Friganović M., Kalođera A., Mirković D., Radica T., Riđanović J., Rogić V., Roglić J., Stražičić N., Šegota T. (1974): Geografija SR Hrvatske 6. Južno Hrvatsko primorje. Školska knjiga, Zagreb.

Davis J. E., Kubisiak T. L., Milgroom M. G. (2005): Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Molecular Ecology Notes 5: 195–197.

Day P. R., Dodds J. A., Elliston J. E., Jaynes R. A., Anagnostakis S. L. (1977): Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. Phytopathology 67: 1393 – 1396.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2005): Cryphonectria parasitica. EPPO Bulletin 35: 295 – 298.

Garbelotto M., Frigimelica G., Mutto-Accordi S. (1992): Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among isolates of Cryphonectria parasitica from northern Italy. European Journal of Forest Pathology 22: 337 – 348.

Ghabrial S. A., Suzuki N. (2009): Viruses of plant pathogenic fungi. Annual Review Phytopathology 47: 353 – 384.

Glass N. L., Kaneko I. (2003): Fatal attraction: nonself recognation and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. Eukaryot Cell 2 1: 1 – 8.

Glavaš M. (1999): Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

Gobbin D., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D. (2003): Sequence variation and evolution of Cryphonectria hypovirus 1 (CHV-1) in Europe. Virus research 97: 39 – 46.

Grente J. (1965): Les formes hypovirulentes d' *Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. C.R. Academy of Agriculture of France 51: 1033 – 1037.

Guérin L., Robin C. (2003): Seasonal effect on infection and development of lesions caused by *Cryphonectria parasitica* in *Castanea sativa*. Forest Pathology 33: 223 – 235.

Gurer M., Ottaviani M., Cortesi P. (2001): Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut-growing regions in Turky. Forest Snow and Landscape Research 76: 383 – 386.

Halambek M. (1988): Istraživanje virulentnosti gljive Endothia parasitica (Murr.) i uzročnika raka pitomoga kestena (Castanea sativa Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, doktorska disertacija.

Haltofová P., Ankovský L. J. (2003): Distribution of sweet chestnut Castanea sativa Mill. in the Czech Republic. Journal of Forest Science 49(6): 259 – 272.

Havir E. A., Anagnostakis S. L. (1983): Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of Endothia-parasitica. Physiological Plant Pathology 23: 369 – 376.

Hawksworth D. L. (2001): The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105: 1422 – 1432.

Heald F. D. (1926): Manual of Plant Diseases. McGraw-Hill, New York: 891.

Hebard F., Griffin G., Elkins J. (1984): Developmental histopathology of cankers incited by hypovirulent and virulent isolates of Endothia parasitica on susceptible and resistant chestnut trees. Phytopathology 74: 140 – 149.

Heiniger U., Rigling D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. Annual Review of Phytopathology 32: 581 – 599.

Hepting G. H. (1974): Death of the American Chestnut. Journal of Forest History 18: 60 – 67.

Hibbet D. S., Binder M., Bischoff J. F. i sur. (2007): A higher level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 3: 509 – 547.

Hillman B. I., Fulbright D. W., Nuss D. L., van Alfen N. K. (1995): Hypoviridae. Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses 6th (eds. F.A. Marphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summer). Springer-Verlag, New York: 261 – 264.

Huntley B., Birks H. J. B. (1983): An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13,000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.

Idžojtić M., Medak J., Poljak I., Zebec M.,Tutić B. (2010): Slijedeći tragove pitomog kestena (*Castanea* spp.) – Uzgoj i kultura,folklor i povijest, tradicija i korištenje. Šumarski list 134 (5–6): 294 – 300.

Ježić M. (2013): Raznolikost gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr i njezin utjecaj na populacije pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, doktorska disertacija.

Ježić M., Krstin Lj., Rigling D., Ćurković Perica M. (2012): High diversity in populations of the introduced plant pathogen, Cryphonectria parasitica, due to encounters between genetically divergent genotypes. Molecular Ecology 21: 87 – 99.

Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. (2008): Dictionary of the Fungi. 10th Edition. CAB International, Wallingford, UK.

Konstantinidis P., Tsiourlis G., Xofis P., Buckley G. P. (2008): Taxonomy and ecology of Castanea sativa Mill. forests in Greece. Plant Ecology 195: 235 – 256.

Krebs P., Conedera M., Pradella M., Torriani D., Felber M., Tinner W. (2004): Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. Vegetation History and Archaeobotany 13: 145 – 160.

Kronstad J. W., Staben C. (1997): Mating type in filamentous fungi. Annual Review of Genetics 31: 245 – 276.

Krstin Lj. (2009): Genska varijabilnost hipovirusa na području Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, doktorska disertacija.

Krstin Lj., Novak-Agbaba S., Rigling D., Ćurkovic Perica M. (2011): Diversity of vegetative compatibility types and mating types of Cryphonectria parasitica in Slovenia and occurrence of associated Cryphonectria hypovirus1. Plant Pathology 60: 752 – 761.

Krstin Lj., Novak-Agbaba S., Rigling D., Krajačić M., Ćurković Perica M. (2008): Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated Cryphonectria hypovirus 1. Plant Pathology 57: 1086 – 1096.

Kubisiak T. L., Dutech C., Milgroom M. G. (2007): Fifty-three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Molecular Ecology Notes 7: 428 – 432.

Kues U., Casselton L. A. (1992): Fungal mating type genes – regulators of sexual development. Mycological Research 12: 993 – 1006.

Liu Y-C., Milgroom M. G. (2007): High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. Mycologia 99: 279 – 284.

Marra R. E., Milgroom M. G. (2001) The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. Heredity 86: 134 – 1343.

Matić R. (2012): Hipovirulentni izolati gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr pogodni za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena (Castanea sativa Mill.). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, diplomski rad.

Matković I. (2012): Priprema hipovirulentnih izolata gljive Chryphonectria parasitica (Murrill) Barr za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena na području Lovrana. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, diplomski rad.

Maurer W. D., Fernández – López J. (2001): Establishing an international sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) provenance test: preliminary steps. Forest Snow and Landscape Research 3: 482 – 486.

McGuire I. C., Marra R. E., Milgroom M. G. (2004): Mating type heterokaryosis and selfing in Cryphonectria parasitica. Fungal Genetics and Biology 41: 521 – 533.

Medak J. (2009): Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (Castanea sativa Mill.) u Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, doktorska disertacija.

Medak J. (2011): Šume pitomog kestena s prasećim zeljem (Aposeri foetidae - Castanetum sativae ass. nova) u Hrvatskoj. Šumarski list 135 (posebni broj): 5 – 24.

Medak J., Idžojtić M., Novak-Agbaba S., Ćurković Perica M., Mujić I., Poljak I., Juretić D., Prgomet Ž. (2009): Croatia. U: D. Avanzato (ur.), Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – Cultivation and culture, folklore and history, traditions and use. Scripta Horticulture 9: 40 – 43.

Merkel H. W. (1906): A deadly fungus on the American chestnut. New York Zoological Society 10: 97 – 103.

Milgroom M. G., Cortesi P. (1999): Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences 96: 10518 – 10523.

Milgroom M. G., Sotirovski K., Spica D., Davis J. E., Brewer M. T., Milev M., Cortesi P. (2008): Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. Molecular Ecology 17: 4446 – 4458.

Montenegro D., Aguin O., Sainz M. J., Hermida M., Mansilla J. P. (2008): Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of Cryphonectria parasitica in chestnut stands in NW Spain. Forest Ecology and Management 256: 973 – 980.

Nei M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science, USA 70: 3321 – 3323.

Nikolić T. ur. (2015): Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 7.3.2015).

Novak-Agbaba S., Liović B., Pernek M. (2000): Prikaz sastojina pitomog kestena (Castanea sativa Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr. Radovi Šumarskog instituta Jastrebarsko 35(1): 91 – 110.

Novak-Agbaba (2013): Sveobuhvatna zaštita šuma pitomog kestena. URL: http://www.sumins.hr/pipser/wpcontent/uploads/2014/10/Izvjesce_NovakAgbaba_Sveobuhvatna_zastita.pdf. (19.3.2015.)

Nuss D. L. (2011): Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. Advances in Virus Research 80: 25 – 48.

Pagliarini C. (2011): Bolesti i štetnici pitomog kestena. Poljoprivredni glasnik 6: 44.

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 (1): 115 – 128.

Perlerou C., Diamandis S. (2006): Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. Forest Pathology 36: 413 – 421.

Peters F. S., Holweg C. L., Rigling D., Metzler B. (2012): Chestnut blight in south-western Germany: multiple introductions of *Cryphonectria parasitica* and slow hypovirus spread. Forest Pathology 42: 397 – 404.

Prospero S., Lutz A., Tavadze B., Supatashvili A., Rigling D. (2013): Discovery of a new gene pool and a high genetic diversity of the chestnut blight fungus Cryphonectria parasitica in Caucasian Georgia. Infection Genetics and Evolution 20: 131 – 139.

Radócz L. (2001): Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. Forest Snow and Landscape Research 76: 368 – 372.

Read N. D., Beckett A. (1996): Ascus and ascospore morphogenesis. Mycological Research 100: 1281 – 1314.

Roane M., Griffin G., Elkins J. (1986): Chestnut blight, other Endothia diseases, and the genus Endothia. The American Phytopathological Society Press, St. Paul: 53.

Robin C., Anziani C., Cortesi P. (2000): Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. Phytopathology 90: 730 – 737.

Robin C., Capdevielle X., Martin M., Traver C., Colinas C. (2009): *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south – western France and northern Spain. Plant Pathology 58: 527 – 535.

Robin C., Heiniger U. (2001): Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research 76: 361 − 367.

Robin C., Lanz S., Soutrenon A., Riglin D. (2010): Dominance of natural over releasedbiological control agents of the chestnut blight fungus Cryphonectria parasiticain south-eastern France is associated with fitness-related traits. Biological Control 53: 55 – 61.

Roderick G. K, Hufbauer R., Navajas M. (2012): Evolution and biological control. Evolutionary Applications 5: 419 – 423.

Russin J. S., Shain L. (1984): Colonization of chestnut blight cankers by Ceratocystis mucrospora and *C. eucastaneae*. Phytopathology 74: 1257 – 1261.

Sotirovski K., Milgroom M. G., Rigling D., Heiniger U. (2006): Occurrence of Cryphonectria hypovirus 1 in the chestnut blight fungus in Macedonia. Forest Pathology 36: 136 – 143.

Sotirovski K., Papazova-Anakieva I., Grünwald N., Milgroom M. G. (2004): Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. Plant Pathology 53: 325 – 333.

Stoddart J. A., Taylor J. F. (1988): Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. Genetics 118: 705 – 711.

Tomić I. (2010): Pitomi kesten (Castanea). Hrvatske šume 161: 23 – 25.

Trestić T., Uščuplić M., Colinas C., Rolland G., Giraud A., Robin C. (2001): Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. Forest Snow and Landscape Research 76: 391 – 396.

Vukelić J. (2012): Šumska vegetacija Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet i Državni zavod za zaštitu prirode, p403, Zagreb.

Zamora P., Martín A. B., Rigling D., Diez J. J. (2012): Diversity of Cryphonectria parasitica in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. Forest Pathology 42: 412 – 419.

Zohary D., Hopf M. (1988): Domestication of plants in the Old World. Clarendon Press, Oxford.

Zavišić N., Rosić Ž., Trubajić T. (2014): Utjecaj tipa tla na morfološka svojstva sijanaca pitomog kestena (Castanea sativa Mill.). 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture, Book of abstracts, p740 –744, Dubrovnik, Hrvatska.

Webster J., Weber R. (2007): Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16. ožujka 1991. godine u Vinkovcima. Tamo sam završila Osnovnu školu Josipa Kozarca i prirodoslovno-matematički smjer u Gimnaziji Matija-Antun Reljković. Preddiplomski studij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu upisala sam 2010. godine, a 2013. godine stekla zvanje sveučilišne prvostupnice biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije. Tijekom zadnje dvije godine studiranja volontirala sam, ovisno o fakultetskim obavezama, na tri mjesta na fakultetu (u Laboratoriju za ekotoksikologiju, Laboratoriju za fiziologiju bilja i u Botaničkom vrtu), te u firmi Hortilab d.o.o. Sudjelovala sam dvije godine na manifestaciji Noći biologije i jedne godine na Noći istraživača. U slobodno vrijeme bavim se fitoaromaterapijom.

Fakultetsko obrazovanje, ali i rad van nastave, su mi dali širok spektar kako teorijskog, tako i praktičnog znanja i iskustva.

Sažetak u zborniku skupova:

Katanić Z., Ježić M., Krstin Lj., Dejanović E., Idžojtić M., Ćurković-Perica M.: Biological control of chestnut blight: effect of host diversity on the prevalence of biocontrol agent – *Cryphonectria hypovirus 1*. 1st Croatian Virus Workshop, Book of abstracts, p13, Rijeka, Hrvatska.