Karakterizacija izolata gljive Cryphonectria parasitica Murrill Barr u kalusima raka kore pitomog kestena (Castanea sativa Mill.)

Topić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:041970

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Katarina Topić

Karakterizacija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr u kalusima raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Ljiljani Krstin na uloženom trudu, vremenu, prenesenom znanju i ljubaznosti.

Veliko hvala i dr. sc. Zorani Katanić na strpljenju i pomoći u istraživačkom dijelu diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje i koji su mi od prvoga dana bili velika potpora i bez kojih ovo ništa ne bi bilo moguće. Zahvaljujem se i sestri i bratu koji su mi također bili potpora za vrijeme studiranja.

Veliko hvala i mojemu suprugu koji je uvijek vjerovao u mene, bodrio me tijekom ovih godina i bio moj oslonac.

Hvala i mom malom anđelu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

KARAKTERIZACIJA IZOLATA GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR U KALUSIMA RAKA KORE PITOMOG KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)

Katarina Topić

Rad je izrađen: Laboratorij za molekularnu ekologiju, Odjel za biologiju
Mentor: Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
Neposredni voditelj: Dr.sc. Zorana Katanić

Sažetak: Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* uzročnik je raka kore pitomog kestena *Castanea sativa*. Zaraza gljive hipovirusom, *Cryphonectria hipovirus* 1 (CHV1), smanjuje virulentnost i reproduktivni kapacitet gljive što doprinosi biološkoj kontroli raka kestenove kore. Hipovirulentna gljiva zaražena CHV1 virusom, unosom u aktivni rak uzrokovan virulentnim sojem gljive *C. parasitica*, omogućuje formiranje kalusa i zaustavlja širenje raka. Cilj ovog istraživanja bio je karakterizirati uzorke gljive *C. parasitica* na osnovi morfologije, tipa vegetativne kompatibilnosti (VC) i molekularnih analiza. Rezultati morfologije pokazali su prisutnost 55% žutih virulentnih sojeva i 45% bijelih sojeva gljive zaraženih hipovirusom. Najzastupljeniji vc tip gljive bio je EU2 (37%) zatim EU12 (27%), EU5 (18%) i EU1 (9%) dok je 9% bilo neodređenog VC tipa. U hipovirulentnim sojevima gljive dokazana je prisutnost hipovirusa CHV1 izolacijom dvolančane hipovirusne RNA i RT-PCR metodom, dok je analiza polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) potvrdila da CHV1 pripada talijanskom podtipu, CHV1-I.

Broj stranica: 38
Broj slika: 19
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 39
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: CHV1, *Cryphonectria hipovirus*, vegetativna kompatibilnost, RT-PCR, RFLP

Datum obrane: 09.rujna 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin
2. Doc. dr. sc. Tanja Žuna Pfeiffer
3. Doc. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić
4. Doc. dr. sc. Filip Stević

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate Study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

CHARACTERIZATION OF *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR ISOLATES IN EUROPEAN CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA* MILL.) CALLI

Katarina Topić

Thesis performed at: Biochemistry and Plant Ecophysiology Institute
Supervisor: Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph.D
Assistent in charge: Zorana Katanić, Ph.D

Summary: Phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* is the causal agent of chestnut blight. *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) infects the fungal pathogen and reduces virulence and reproductive capacity of fungus which is important in the biological control of chestnut blight. If a hypovirulent fungal strain carrying CHV1 is introduced into an active canker caused by virulent *C. parasitica* strain, canker expansion ceases and callus is formed. The aim of this study was to characterize isolates of the fungus *C. parasitica* on the basis of morphology, type of vegetative compatibility and molecular analysis. Morphology results showed 55% yellow and 45% white hypovirulent strains. The most common VC type is the EU2 (37%) followed by the EU12 (27%), EU5 (18%) and EU1 (9%), while 9% were indeterminate VC type. Hypovirus CHV1 was found in all tested hypovirulent strains by dsRNA isolation and RT-PCR method, and the analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) confirmed that CHV1 isolates belong to Italian subtype, CHV1-I.

Number of pages: 38
Number of figures: 19
Number of tables: 3
Number of references: 39
Original in : Croatian

Key words: CHV1, *Cryphonectria hypovirus*, vegetative compatibility, RT-PCR, RFLP

Date of the thesis defence: 09th September 2016.

Rewievers:

1. Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph.D
2. Assist. Prof. Tanja Žuna Pfeiffer, Ph.D
3. Assist. Prof. Dubravka Špoljarić Maronić, Ph.D
4. Assist. Prof. Filip Stević, Ph.D

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer in Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Karakteristike europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.).....1
1.2 Karakteristike gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr.....6
1.2.1 Životni ciklus gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr.....7
1.2.1.1. Nespolno razmnožavanje.....7
1.2.1.2. Spolno razmnožavanje.....7
1.3 Rak kestenove kore.....8
1.3.1 Tipovi raka kestenove kore.....9
1.4 Opće karakteristike hipovirusa.....11
1.5 Biološka kontrola hipovirusom.....13
1.6 Cilj istraživanja.....14

2. MATERIJALI I METODE.....15
2.1 Izolati gljive *Cryphonectria parasitica*.....15
2.2 Priprema hranjive podloge za rast gljive.....15
2.3 Precjepljivanje i uzgoj gljivičnih izolata.....17
2.4 Određivanje morfologije izolata gljive *Cryphonectria parasitica*.....18
2.5 Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti izolata gljive *Cryphonectria parasitica*.....18
2.6 Izolacija hipovirusne dsRNA, RT-PCR, RFLP i elektroforeza.....19
2.7 Statistička obrada podataka.....22

3.REZULTATI.....23
3.1 Morfologija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* 23
3.2 Raznolikost VC tipova gljive *Cryphonectria parasitica* 24
3.3 Prisutnost virusa u izolatima gljive *Cryphonectria parasitica*.....26
3.4 Talijanski podtip *Cryphonectria* hipovirusa.....27
3.5. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti.....28

4. RASPRAVA.....29

5. ZAKLJUČAK.....33

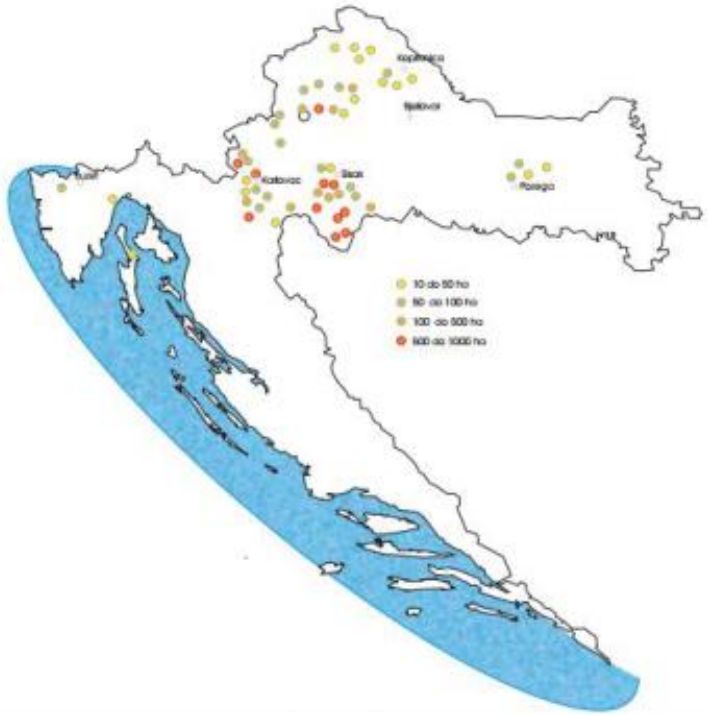
6. LITERATURA.....34

1. UVOD

1.1. Karakteristike europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

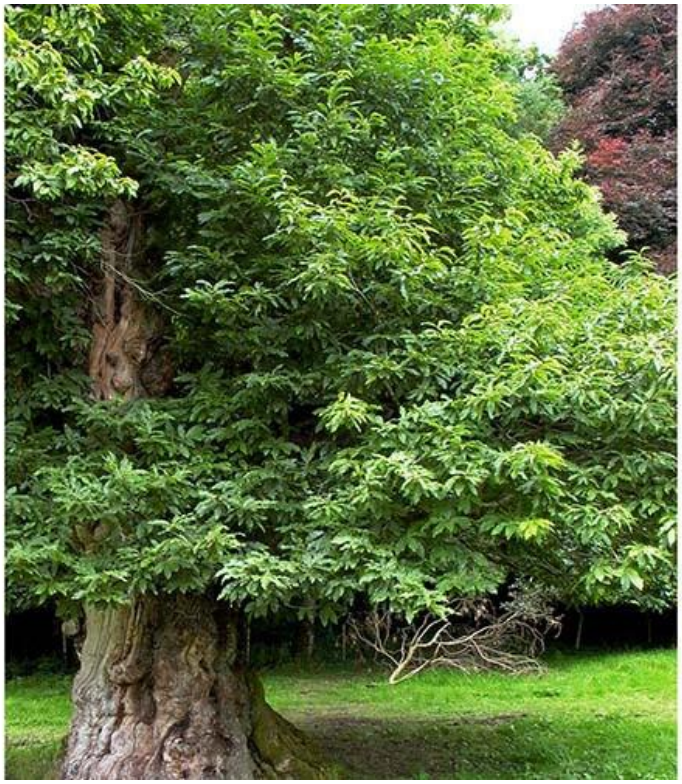
Rod *Castanea* Mill. pripada porodici *Fagaceae*, zajedno s rodovima *Quercus* i *Fagus*. Ovaj rod obuhvaća sedam ekonomski i ekološki značajnih vrsta drveća koje su široko rasprostranjene u umjerenom šumskom pojasu sjeverne hemisfere (Johnson 1988, Dane i sur. 2003, Lang i sur. 2006, Wang i sur. 2008).

Europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) pripada redu *Fagales*, porodici *Fagaceae*, rodu *Castanea*. Kod nas raste u šumama brežuljkasto-brdskog područja kontinentalnog dijela Hrvatske, u Istri te na otocima Krku i Cresu. Veći dio areala pitomog kestena pruža se kroz središnju Hrvatsku, od slovenske granice do granice s Bosnom i Hercegovinom, gdje se najveće i najljepše sastojine nalaze na Zrinskoj i Petrovoj gori te na Medvednici (Medak 2009, Idžojtić i sur. 2010). Ukupno šumskih površina na kojima pitomi kesten dolazi u Hrvatskoj ima oko 136.000 ha (Novak-Agbaba i sur. 2000) (Slika 1).



Slika 1. Rasprostranjenost europskog pitomog kestena u Hrvatskoj (Novak Agbaba i sur., 2000).

Stablo europskog pitomog kestena (Slika 2) može doseći visinu i do 30 m. Kesten je u srodstvu s bukvom i hrastom. Ima bujnu, veliku krošnju, godišnje može dati preko 200 kg plodova i može doseći starost preko 500 godina. U prirodnim sastojinama samoniklog kestena u kojima su biljke guste, krošnja je slabije razvijena, uska je i uspravna. Kora mu je glatka i sivosmeđa. Korijenski sustav je snažan, s izraženom glavnom žilom (Tomić 2010).



Slika 2. Stablo europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Web 1

Listovi su duguljasti, po obodu grubo nazubljeni, 8-18 cm dugi i 3-6 cm široki (Slika 3). Listovi su naizmjenični, lisna plojka tvrda, kožasta, na licu gola, tamnozelena i sjajna, na naličju dlakava, perasto mrežaste nervature, s 12-20 parova žila. Dugi su 12-20 cm, široki 3-6 cm, s peteljkom dugom 1,5-2,5 cm. Zupci imaju tanki, nitasti vrh usmjeren prema vrhu plojke. Listovi u jesen poprimaju žućkastosmeđu boju (Tomić 2010). Listovi dosta rano opadaju, a listaju u svibnju. Sadrže oko 95% tanina, smole i drugih tvari.

Slika 3. List europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Web 2

Pitomi kesten je jednodomna biljka, što znači da se na istom stablu nalaze odvojeno i muški i ženski cvjetovi. Muški cvjetovi (Slika 4a) su skupljeni u uspravne 10-30 cm duge prividne klasove s dlakavim vretenom, a ženski (Slika 4b) se nalaze pri bazi muških cvatova. Sakupljeni su u grupice od 3 do 7 u zajednički omotač (kupolu) (Tomić 2010). Cvjetovi se pojavljuju početkom lipnja, kada su listovi potpuno razvijeni.

Slika 4a. Muške rese europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Web 3

Slika 4b. Ženski cvjetovi europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
Web 3

Plod kestena prirastao je za tobolac u kojem se većinom nalaze po tri ploda. Plod pitomog kestena se odlikuje smeđom bojom i sjajnom površinom. Težina ploda varira od 10 do 25 g za svaki pojedinačni plod pitomog kestena (Tomić 2010). Sastoji se od jezgre (mezokarpa), sjemenjače (epiderme), sjemenke i ljuske (perikarpa). Plodovi mogu biti 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 5). Imaju kožastu lupinu i vršni čuperak te dozrijevaju u listopadu.

Slika 5. Plod europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
Web 4

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

Pitomi kesten je jedna od najkorisnijih i ekonomski najznačajnijih drvenastih vrsta. Ima važnu ulogu u mnogim granama gospodarstva. Zbog velikog sadržaja tanina koristi se kao sirovina za ekstrakciju tanina. U drvnoj industriji se koristi kao kvalitetno građevno i stolarsko drvo. Zbog visoke hranjive vrijednosti, plod se uvelike koristi za ishranu ljudi, ali i divljači u šumama gdje je kesten zastupljen. Zbog velikog udjela nektara upotrebljava se kao medonosna biljka, ali i kao ljekovita biljka zbog ljekovitosti pojedinih dijelova. Zbog svega navedenog pitomi kesten je važna šumska vrsta, ali i voćarica (Novak-Agbaba i sur., 2000).

1.2. Karakteristike gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr

Cryphonectria parasitica Murrill Barr je uzročnik raka kestenove kore koji oštećuje stabla kestena te uzrokuje njihovo propadanje i sušenje. *C. parasitica* je nitasta, fitopatogena gljiva koja po taksonomiji spada u gljive mješinarke (Ascomycota). Pripada carstvu Mycota (Fungi), razredu Sordariomycetes te redu Diaporthales (Hibbet i sur. 2007).

Naziv askomiceta (Askomycetes) potječe od grčke riječi "asco" što znači vrećast jer upravo tako izgledaju sporangiji, tvorevine u kojima se stvaraju spore (plodna tijela). Askomicetama pripadaju jednostanične gljive, kvasci, plijesni te gljive s krupnim plodonosnim tijelima. Askomicete su izuzetno značajna i bogata grupa gljiva s više od 32.000 vrsta. Gljive ovog razreda, s izuzetkom jednostaničnih kvasaca, građene su od septiranih micelija kojeg tvori mreža tankih hranidbenih, cjevastih niti koje se nazivaju hife. Hife su podijeljene na stanice pomoću pregrada (septi). Pore na septama omogućuju strujanje citoplazme između stanica. Na vrhu hife nalaze se zaobljeni izdanci zvani haustorije koji prodiru u stanicu, upijaju hranu i njome hrane gljivu. Micelij ovih gljiva je velike površine jer hranjive tvari upijaju isključivo tijelom. Stanična stijenka sadrži hitin, koji joj daje čvrstoću, kao celuloza zelenim biljkama. Rezervne tvari su glikogen i masti. Stanice sadrže pigment melanin, nemaju plastida i ne sadrže klorofil, što stanicama gljiva daje sličnost sa životinjskom stanicom.

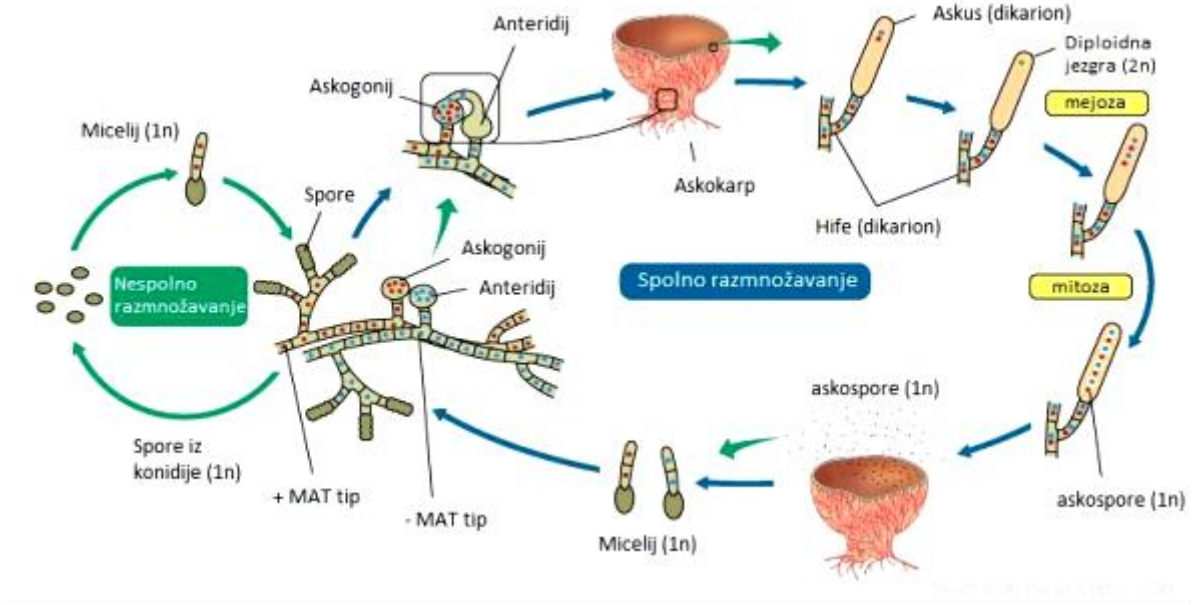
1.2.1 Životni ciklus gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr

1.2.1.1. Nespolno razmnožavanje

Cryphonectria parasitica razmnožava se spolno i nespolno. (Slika 6). Nespolnim razmnožavanjem ne povećava se raznolikost populacije, budući da nisu uključene mejotske diobe. Nespolno se razmnožava konidijima ili dijelovima micelija (Milgroom i Cortesi 1999). 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. Odabir načina razmnožavanja ovisi o okolišnim čimbenicima kao što su dostupnost nutrijenata, temperatura i svjetlo.

1.2.1.2. Spolno razmnožavanje

Za spolno razmnožavanje gljiva stvara spolne stanice: anteridij (muška) i askogonij (ženska). Svaka ova stanica je haploidna. Prilikom spajanja anteridija i askogonija prvo dolazi do plazmogamije (stapanja plazmi stanica bez spajanja jezgara), pri čemu nastaje jedna stanica s dvije haploidne jezgre (dikarionska stanica), iz koje se razvija askogeni micelij. Na askogenom miceliju nastaju askusi s askosporama. Opna na stanici askogenog micelija se počinje izduživati, a jezgre iz stanice prelaze u mladi askus. Nakon nekog vremena jezgre se spajaju procesom kariogamije pri čemu nastaje jedna diploidna jezgra (zigota). Diploidna jezgra se odmah dijeli: prva dioba je mejoza (I i II mejotička dioba), gdje nastanu 4 haploidne jezgre koje se zatim podijele mitozom (dvije mitotičke diobe). Na kraju, od 1 diploidne jezgre nastane 8 haploidnih jezgara. Oko svake jezgre okupi se dio plazme, formira se opna i nastaje askospora. U jednom askusu obično ima osam askospora. One mogu biti poredane u jedan ili dva reda ili plivaju u plazmi. Askospore su endogene spore što znači da nastaju unutar askusa, da bi se mogle širiti i izvršiti zarazu, moraju se osloboditi iz askusa.



Slika 6. Životni ciklus gljiva iz koljena Ascomycota
Modificirana slika; Web 5

1.3 Rak kestenove kore

Rak kestenove kore ne predstavlja veliki problem u Aziji jer su azijski kesteni, prvenstveno *Castanea mollissima* i *Castanea crenata*, razvili rezistenciju na bolest zahvaljujući dugoj koevoluciji s gljivom *C. parasitica*, dok američki i europski kesteni nikad prije nisu bili u kontaktu s tim patogenom što je rezultiralo pojavom tako agresivne bolesti (Anagnostakis 1982, Bryner i sur. 2014). Rak kestenove kore prvi put je uočen na američkom kestenu 1904. godine u Bronx zoološkom vrtu u New Yorku, dok se na europskom pitomom kestenu (*C. sativa*) prvi puta pojavila 1938. godine blizu Genove u Italiji te se ubrzo nakon toga proširila na područje cijele Europe (Merkel 1905, Robin i Heiniger 2001). Bolest je zahvatila i šume kestena na području Hrvatske. Prvi put uočena je 1955. godine u blizini Opatije gdje se najvjerojatnije proširila sa sjevera, iz Slovenije (Krstin i sur. 2008).

Gljiva se može širiti vjetrom, kišom, vektorima (ptice, insekti) te pomoću čovjeka. Zaraza nastaje prodiranjem spora gljive putem otvorenih rana na kori drveta koje su načinili kukci. Spore gljive kliju i dopiru do unutrašnjosti kore tvoreći žućkastosmeđi lepezasti micelij. Budući da je *C. 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).

Na mladim biljkama bolest se razvija vrlo brzo. Prvo se zapažaju promjene na samoj kori. Na mjestu zaraze nastaje plitko ulegnuće, boja kore je nešto tamnija, a ispod nje svijetla boja kambija postaje smeđa. Kora postaje crvenkasta, uzdužno puca, postepeno se odvaja od drveta te nastaje otvorena rak rana (Novak-Agbaba i sur., 2000). Na kori u području rak rane lako se uočavaju plodna tijela gljive, narančaste ili crvenkaste boje.

1.3.1 Tipovi raka kestenove kore

Rak kore dolazi u tri forme: aktivni rak, površinski rak (površinska nekroza kore) i kalusirajući rak. Virulentan soj gljive *C. parasitica* uzrokuje aktivni rak (Slika 7). Prepoznaje se po uzdužno raspucaloj kori, otvorenim ranama, tamnožutom lepezastom miceliju ispod kore i nastalim izbojcima ispod mjesta infekcije. Na tom području vidljiva su i brojna žutosmeđa plodna tijela gljive *C. parasitica* (Novak-Agbaba i sur. 2000). Kada aktivni rak prodre do kambija, zaustavlja se transport vode i hranjivih tvari, što dovodi do sušenja i odumiranja stabla iznad mjesta zaraze (Robin i sur. 2009). U površinskoj nekrozi kora je hrapava, a deblo na mjestu zaraze zadebljano (Slika 8). Uzročnik ovakvih nekroza je hipovirulentni soj gljive *C. parasitica* koji, za razliku od virulentnog soja, nije agresivan. Kako je nekroza površinska, micelij gljive sporo napreduje i ne prodire do kambija (Novak-Agbaba i sur. 2000). *C. parasitica* može biti inficirana hipovirusom koji reducira virulentnost gljive i formira blaže oblike rakastih tvorevina. Prirodno širenje hipovirusa s površinskih nekroza na aktivni rak dovodi do zacjeljivanje rak-rana i pojavu kalusirajućih rakova (Slika 9). Ta pojava predstavlja osnovu za biološku kontrolu bolesti i zaustavljanje sušenja zaraženih stabala (Novak-Agbaba i sur. 2011).

Slika 7. Aktivni rak kestenove kore s plodnim tijelima gljive *C. parasitica*

Web 6

Slika 8. Površinska nekroza kore kestena

Web 7

Slika 9. Kalusirajući rak kestenove kore
(Bryner i sur. 2014)

1.4 Opće karakteristike hipovirusa

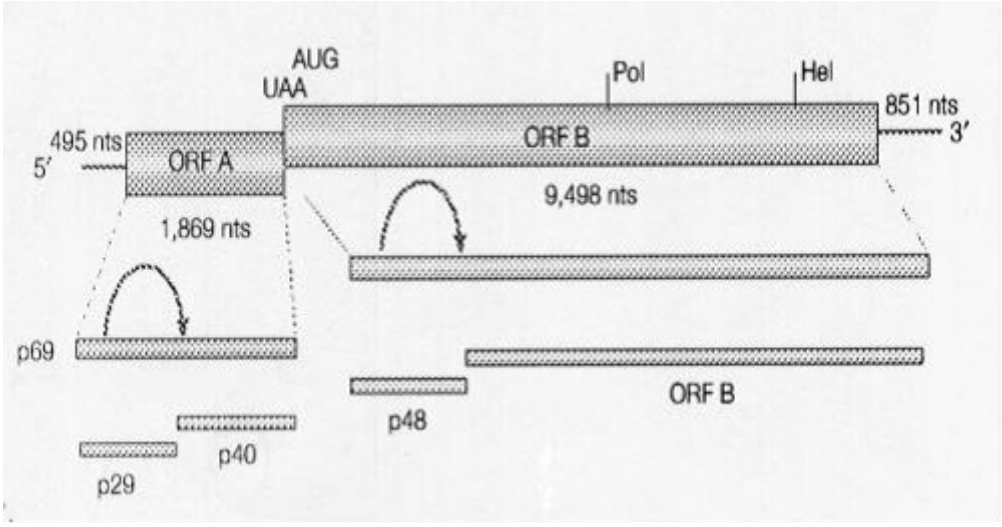
Hipovirulencija se može prenositi na virulentne sojeve gljive koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (Anagnostakis i Waggoner 1981). Vegetativna (ne) kompatibilnost posredovana je *vic* (vegetativnim) genima. Ako su jedinke kompatibilne, za vrijeme rasta micelija doći će u kontakt i formirati će se heterokarionski micelij (više jezgrenih stanica) s 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. Kod 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 virulencije i nije moguće ozdravljenje stabla. Ta pojava naziva se vegetativna inkompatibilnost ili vegetativna nekompatibilnost.

Uzročnik hipovirulentnosti (smanjene virulentnosti) gljive *C. parasitica* je prisutnost dvolančane RNA (dsRNA) virusa *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) iz porodice *Hypoviridae*. Porodica *Hypoviridae* je prva opisana virusna porodica čiji članovi ne sadrže strukturne proteine ni kapsidu, ne stvaraju virione, niti imaju ekstracelularnu fazu životnog ciklusa.

Linearna dvolančana RNA nalazi se unutar membranskih vezikula veličine 50 - 80 nm u citoplazmi stanice gljive. To su sekretorne vezikule koje potječu iz trans-Golgijeve mreže.

Razlikujemo 4 vrste virusa iz porodice *Hypoviridae*: CHV1, CHV2, CHV3, CHV4 od čega je CHV1 virus najzastupljeniji u Europi. Hipovirus CHV1 broji pet različitih podtipova, a to su: španjolski CHV1-E, dva francuska CHV1-F1 i CHV1-F2, talijanski CHV1-I i njemački CHV1-D (Allemann i sur. 1999).

CHV1 je virus bez kapside koji kao genom ima dvolančanu (ds)RNA veličine 12 712 pb (Bryner i sur. 2013), nema strukturnih proteina i ne stvara virione, zrele infektivne virusne čestice. Pozitivni, kodirajući lanac CHV1 je poliadeniliran (ima poliA rep na 3' kraju) i sadrži dva kontinuirana otvorena okvira čitanja (ORF A i ORF B) koja kodiraju poliproteine koji se proteolitički cijepaju (Slika 10) (Choi i sur. 1991).



Slika 10. Shematski prikaz genetičke organizacije L-dsRNA hipovirusa CHV1

(Nuss, 2005)

1.5 Biološka kontrola hipovirusom

Mogućnost biološke kontrole raka kestenove kore hipovirusom ovisi o tipu vegetativne kompatibilnosti gljive, njezinom načinu razmnožavanja, te o tipu i izolatu hipovirusa. Stoga je za biološku kontrolu potrebno karakterizirati populacije gljive te prenijeti virus u različite tipove gljive kako bi se što uspješnije prirodno širio, te inokulirati „bolesne“ gljive na oboljela stabla. Biološka kontrola hipovirusom rijedak je primjer kako se može umanjiti intenzitet i širenje bolesti koju je izazvao uneseni patogen. Među četiri opisane vrste virusa (CHV1, CHV2, CHV3, CHV4) najviše pozornosti je dano CHV1 zbog njegove uloge u biološkoj kontroli raka kore kestena i njegove raširenosti u Europi (Hillman i Suzuki, 2004).

Raznolikost VC tipova u europskoj populaciji gljive *C. parasitica* je mala, za razliku od američke populacije gdje je jako velika. Smatra se da je to glavni razlog zbog kojeg biološka kontrola raka kestenove kore nije uspjela u Sjevernoj Americi, dok je u Europi bila jako uspješna (Anagnostakis i sur 1986, Heiniger i Rigling 1994, Robin i Heiniger 2001). Informacije o rasprostranjenosti i raznolikosti VC tipova jako su važne kako bi se primijenili odgovarajući hipovirulentni izolati za što uspješniju biološku kontrolu. Osim što se hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* šire prirodnim putem pridonoseći tako biološkoj kontroli raka kestenove kore, u rak se mogu inokulirati i umjetnim putem (Turchetti i Maresi 1988). Potrebno je odabrati mješavinu hipovirulentnih sojeva gljive koji pokazuju najbolji učinak na smanjenje patogenog potencijala gljive te s njom tretirati rak na zaraženim stablima kestena. Hipovirulentni sojevi prenose virus u virulentne sojeve gljive anastomozom hifa pri čemu gljiva više ne uništava koru i kambij kestena. Na mjestu aktivnog raka formira se kalus i time dolazi do ozdravljenja stabla kestena.

1.6 Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je karakterizirati izolate gljive *C. parasitica* na osnovi morfologije, tipa vegetativne kompatibilnosti i molekularnih analiza (izolacija hipovirusa, reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom, RT-PCR te polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata, RFLP.)

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Izolati gljive *Cryphonectria parasitica*

Uzorke gljive *C. parasitica* prikupila je i izolirala iz kalusnog tkiva kestena prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica sa svojim kolegama s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na području Hrvatske Kostajnice. Iz kore zaraženog kestena izolirali su čiste kulture gljive *C. parasitica* te ih potom uzgojili na hranjivoj krumpirovoj podlozi, PDA, Potato dextrose agar, proizvođača Biolife.

2.2 Priprema i izlijevanje hranjive podloge za rast gljive

Uzorci gljive *C. parasitica* uzgajani su na PDA hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama (Medicplast, promjer 6 ili 9 cm). PDA podloga se pripremala prema uputama proizvođača: 42 g krumpirovog agara otopljeno je u 1 litri hladne destilirane vode. Tako pripremljen agar izlijeva se u staklene Schottove boce koje su otporne na visoke temperature. Agar je potom autoklaviran 15 minuta na temperaturi od 121°C i atmosferi od 1 bara.

Autoklav je hermetički zatvoren uređaj, izrađen od čelika, a sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog plašta između kojih je prostor ispunjen parom pod tlakom (Slika 11). Sterilizacija vlažnom toplinom je najpogodniji način za materijale koji dobro podnose visoke temperature, a određena je temperaturom, tlakom vodene pare i vremenom. Na isti način je provedena i sterilizacija pribora i posuđa koje se koristilo za rad.

Sterilizacija je proces kojim se potpuno odstranjuju ili uništavaju svi mikroorganizmi i njihove spore s predmeta, instrumenata i materijala do te mjere da se na mediju za kultiviranje ne mogu dokazati, što je vrlo bitno za daljnji proces nasađivanja gljive. Nakon autoklaviranja i kratkog hlađenja, tekući topli agar izliven je (25 ml) u sterilne plastične Petrijeve zdjelice.

Izlijevanje hranjive podloge odvijao se u laminaru, prostoru steriliziranom UV svjetlom, uz neprestano strujanje sterilnog zraka (Slika 12). Kada se agar u Petrijevkama ohladi i stvrdne na njega se mogu precjepljivati uzorci gljive.

Slika 11. Autoklav (lijevo- vanjski izgled, desno- unutrašnjost)

(Autorska fotografija)

Slika 12. Laminar (lijevo-vanjski izgled, desno- unutrašnjost)

(Autorska fotografija)

2.3 Precjepljivanje i uzgoj gljivičnih izolata

Uzorci gljive *C. parasitica* precijepljeni su na prethodno pripremljenu plastičnu Petrijevu zdjelicu s PDA hranjivom podlogom. Precjepljivanje se izvodi sterilnim skalpelom pomoću kojeg se izreže komadić micelija (5 mm x 5 mm x 5 mm) iz kulture u kojoj se održavao izolat. Najbolje je izrezati dio micelija koji se nalazi uz rub Petrijeve zdijelice zbog toga što je taj dio najmlađi. Izrezani uzorak gljive stavlja se na sredinu Petrijeve zdjelice, okrenut naopako kako bi micelij bio u doticaju s hranjivom podlogom.

Skalpel kao i sav pribor koji se koristi (škarice, pincete) mora biti steriliziran 70%-tnim alkoholom i flambiran, da ne bi došlo do zagađivanja bakterijama ili plijesnima iz okoline. Prije i poslije rada u laminaru također je potrebno sterilizirati cijelu njegovu unutrašnjost 70%-tnim alkoholom. Na poklopac svake Petrijeve zdjelice napisan je datum rada i oznaka izolata gljive. Nakon precjepljivanja uzoraka oni se prenose u komoru da bi pet dana rasli u tami pri sobnoj temperaturi, a nakon toga se prenose na rast pod svjetlom (Slika 13).

Kulture gljive održavale su se stalnim precjepljivanjem, na način da se pomoću sterilnog skalpela izreže komadić micelija ili se dio micelija samo sastruže i stavi na sredinu Petrijeve posudice, okrenut naopako kako bi micelij bio u doticaju s hranjivom podlogom.

Slika 13. Rast uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* na svjetlu
(Autorska fotografija)

2.4 Određivanje morfologije izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Prisutnost hipovirusa u gljivi procjenjivana je na osnovi morfologije uzgojene gljivične kulture. Kulture gljive uzgajane su pri temperaturi od 20-22˚C u mraku tijekom 7 dana, a potom 7 dana na laboratorijskom stolu na danjem svjetlu i sobnoj temperaturi. U tim uvjetima virulentni izolati razvijaju žutonarančasti micelij s velikim brojem piknida, dok virusom zaraženi izolati gljive ostaju bijeli, bez piknida ili s vrlo malim brojem piknida.

2.5 Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Za određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti (VC) izolata gljive *C. parasitica* koristila se PDA hranjiva podloga (Potato dextrose agar, Difco). Podloga se pripremala prema uputama proizvođača: 19,5 g krumpirovog agara otopljeno je u 500mL destilirane vode. Tako pripremljen agar uliven je u staklene Schottove boce, otporne na visoke temperature. Agar je potom autoklaviran 15 minuta na temperaturi od 121°C i atmosferi od 1 bara. Nakon hlađenja podloga je izlivena u Petrijeve posudice promjera 9cm. Kada su se podloge stvrdnule slijedilo je križanje uzoraka gljive u laminaru pri sterilnim uvjetima.

Uzorci gljive križani su sa standardnim europskim (EU) testerima koji su podijeljeni u 2 seta: prvi set sastoji se od EU 1 do EU 31, a drugi set od EU 32 do EU 64). Test vegetativne kompatibilnosti temelji se na praćenju pojave anastomoze hifa odnosno baražne linije između dva kompatibilna, odnosno nekompatibilna uzorka (Slika 14). Ukoliko su izolati bili kompatibilni njihovi miceliji su u potpunosti prorasli, što znači da su imali identične alele na svih šest *vic* lokusa. Ukoliko se na mjestu kontakta formirala baražna linija to znači da su se izolati razlikovali u najmanje jednom *vic* lokusu i time zaključujemo da su nekompatibilni. Svaka podudarnost se određivala golim okom.

Micelij iz svježeg uzorka sastrugan je sterilnim skalpelom i nacijepljen blizu ruba Petrijeve posudice. Križani izolati međusobno su bili udaljeni 3–5 mm. U jednoj Petrijevoj posudici rađeno je 6 križanja, a svako križanje rađeno je u triplikatu da bi se dobili što točniji rezultati. Nakon 14 dana, moglo se vidjeti koji su izolati kompatibilni, a koji ne. Ukoliko bi rezultati bili nesigurni, testiranje bi se ponovilo. Kod ponovnih testiranja, u jednoj Petrijevoj posudici provedena su 4 sparivanja i svako ponovljeno sparivanje rađeno je također u duplikatu.

Na svakoj Petrijevki napisan je datum i broj ponavljanja, a uz rub Petrijevke označeni su uzorci i EU tipovi.

Slika 14. Test vegetativne kompatibilnosti/nekompatibilnosti

2.6 Izolacija hipovirusne dsRNA, RT-PCR, RFLP i elektroforeza

Nasumično je odabrano 5 izolata gljive *C. parasitica*, 4 izolata bijele morfologije i 1 izolat žute morfologije, (HK58A (bijeli), HK29A (bijeli), HK29A_2x (bijeli), HK16 (žuti), HK54B (bijeli)) kojima je testirana prisutnost hipovirusne dvolančane RNA, dsRNA. Odabrani uzorci gljive rasli su na PDA podlozi koja je bila prekrivena celofanom zbog lakšeg struganja micelija gljive. Približno 50 mg micelija svakog uzorka je izvagano te homogenizirano s tekućim dušikom. Izolacija dsRNA rađena je prema protokolu Double-RNA Viral dsRNA Extraction Mini Kit (For Plant Tissue).

Nakon izolacije dsRNA provedena je reverzna transkripcija (RT) kako bi se iz izolirane dsRNA mogla dobiti komplementarna cDNA koja se potom umnožava lančanom reakcijom polimerazom, PCR. Svaka reakcijska smjesa za RT, za jedan uzorak, sadržavala je 2 µl 10x reakcijskog pufera, 0,8 µl 25xdNTP MIX (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl Multi Scribe Reverse Transcriptase, 1 µl Rnase Inhibitor, 3,2 µl vode bez nukleaza. Od tih komponenata pripremljen je Master Mix koji je podijeljen u epice (po 10 µl) i zatim mu je

dodano 10 µl uzorka izolirane dsRNA. Priprema reakcijske smjese odvijala se na ledu. PCR epice s uzorcima posloženi su u PCR-uređaj na inkubaciju od 10min na temperaturi od 25°C, zatim 120min pri 37°C i na 5min pri 85°C, nakon čega su uzorci čuvani na stalnoj temperaturi od 4°C.

Lančana reakcija polimerazom provedena je pomoću EmeraldAmp MAX PCR Master Mix-a prema uputama proizvođača. Emerald PCR Mix je zelene boje pa uzorke nije potrebno dodatno bojati prilikom elektroforeze. Reakcijska smjesa za jedan uzorak, sastojala se od 25 µl Emerald Mix-a (pufer + $MgCl_2$ + dNTP + Taq polimeraza), 1 µl EP5 početnice (10 µM), 1 µl R početnice (10 µM) i 22 µl H_2O. Od tih komponenti načinjen je PCR Master Mix koji je podijeljen u epice kojemu je dodano po 1 µl uzorka. Također je korištena i slijepa proba u koju je umjesto uzorka dodano 1 µl vode. Pipetirani uzorci slaženi su u PCR-uređaj u kojemu se reakcija odvijala prema sljedećim uvjetima: 2min početne denaturacije pri 94°C, zatim je slijedilo 35 ciklusa koji su se sastojali od 1min denaturacije pri 94°C, sparivanja početnica s kalupom 1,5min pri 55°C i produljivanja lanca DNA 2min pri 72°C. Završno produljivanje lanca DNA trajalo je 10min pri 72°C, nakon čega se uzorci čuvaju na temperaturi od 4°C.

Za analizu polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) koristila su se tri različita restrikcijska enzima, *BsuRI* (GG′CC), *HinfI* (G′AnTC) i *EcoRI* (G′AATTC). Reakcijska smjesa za jedan uzorak sastojala se od 2 µl pufera, 7,25 µl H_2O, 0,75 enzima (BsuRI/HinfI/EcoRI) i 10 µl svakog uzorka. Restrikcija se odvijala na temperaturi od 37°C u trajanju od 2 sata.

Uspješnost PCR reakcije i RFLP-a provjerena je pomoću agarozne gel elektroforeze. Za elektroforezu PCR-a korišten je 1%-tni agarozni gel. Odvagano je 0,2g agaroze i usipano u Erlenmayerovu tikvicu. Agarozi je dodano 20mL 1xTBE pufera te je tikvica prekrivena prozirnom folijom i stavljena u mikrovalnu pećnicu kako bi se agaroza u potpunosti otopila. Otopljenoj i malo ohlađenoj agarozi dodano je 2 µl DNA boje (SYBR safe DNA gel stain) te je potom izlivena u elektroforetsku kadicu. Nakon polimerizacije gela uklonjeni su češljići i gel je preliven 1xTBE puferom. U nastale jažice unešeno je po 9 µl uzorka i 1 µl loading buffer-a što je ukupno činilo 10 µl uzorka u svakoj pojedinoj jažici. Na gel je također dodana i negativna kontrola te 2 µl markera (50bp DNA ladder Takara). Elektroforeza se odvijala tijekom 40minuta pri 100V. Umnoženi fragmenti vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru.

Za elektroforezu RFLP-a korišten je 2%-tni agarozni gel. Odvagano je 2g agaroze i pomiješano sa 100mL 1xTBE pufera kojemu je, nakon što se agaroza otopila, dodano 5 µl boje

(SYBR safe DNA gel stain). Na gel je naneseno 20 µl uzorka i 4 µl loading buffer-a. Dodana je također i slijepa proba te 2 µl markera (50bp DNA ladder Takara) kojemu je dodan1 µl loading buffer-a. Elektroforeza se odvijala tijekom 120minuta pri 100V. Umnoženi fragmenti vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru i fotografirani kamerom (Kodak EDAS 290 System) (Slika 15).

Slika 15. Transiluminator s kamerom Kodek EDAS 209 System

Autorska fotografija

2.7 Statistička obrada podataka

Raznolikost VC tipova gljive *Cryphonectria parasitica* unutar istraživanih uzoraka dobivena je Shannon-Wiener-ovim indeksom (Anagnostakis i sur., 1986), koji je izračunat prema slijedećoj jednadžbi:

$$H' = - \sum pi \ln pi$$

gdje je:

H′ - Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti

pi – frekvencija pojedinog VC tipa

dok se *pi* računa prema formuli:

$$pi = ni / N$$

gdje je:

ni – brojnost vrste *i* u uzorku

N – ukupna brojnost u uzorku

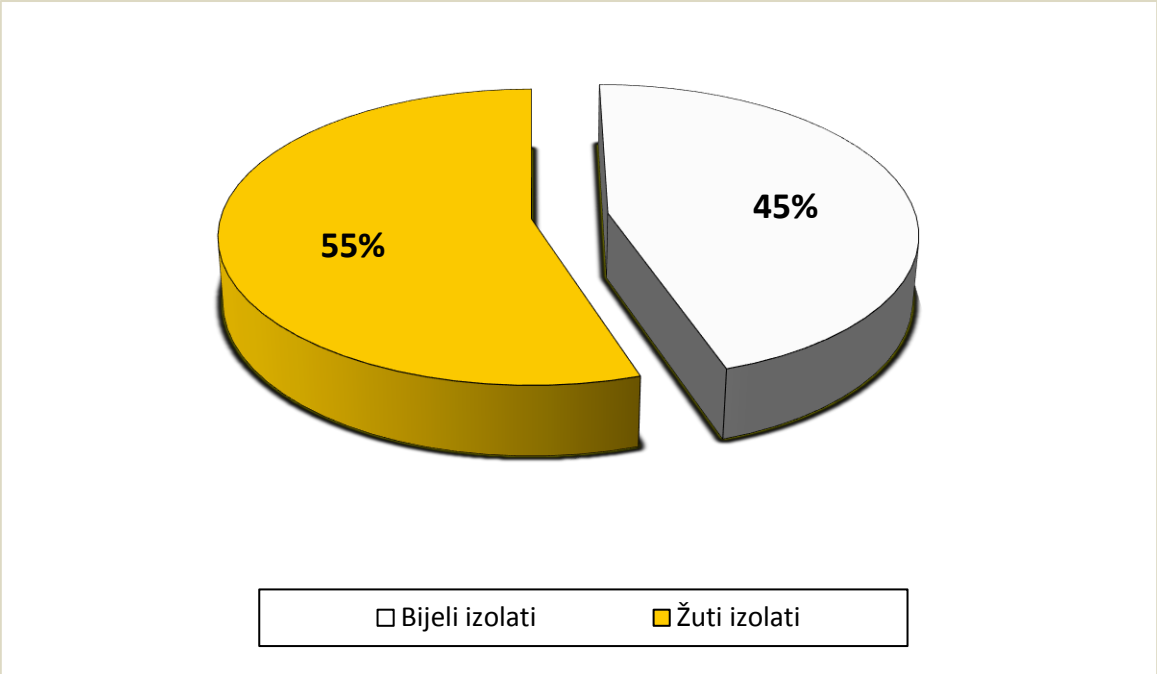
3. REZULTATI

3.1 Morfologija izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Analizom morfologije kultura gljive *Cryphonectria parasitica* utvrđeno je, od ukupno 11 uzoraka, 5 bijelih (45%) i 6 žutih (55%) izolata gljive (Tablica 1, Slika 16). Karakterističnu bijelu do svijetložutu boju micelija razvijaju hipovirulentni sojevi gljive zaraženi hipovirusom. Smanjena produkcija žutog pigmenta prilikom zaraze gljive s CHV1 virusom koristan je pokazatelj pri identifikaciji zaraženih izolata gljive *C. parasitica*. Virulentni izolati gljive koji su izuzetno štetni za pitomi kesten su bez virusa i razvijaju žutu do narančastu boju micelija, a karakterizira ih i jaka sporulacija. Podaci o tipu raka kestenove kore dobiveni su ljubeznošću prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica. Unutar kalusa prevladavaju bijeli sojevi gljive, ali tri kalusa od ukupno osam, imala su gljivu žutog micelija. Iz ostala 3 raka, aktivni/kalurirajući, izoliran je žuti soj gljive.

Tablica 1. Morfologija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* i tip raka kestenove kore

Oznaka uzorka gljive *C. parasitica*	**Morfologija gljive *C. parasitica***	**Tip raka kestenove kore**
1 A	ŽUTI	AKTIVNI/KALUS
2 C	ŽUTI	AKTIVNI/KALUS
3 B	BIJELI	KALUS
4 C	BIJELI	KALUS
5 C	ŽUTI	KALUS
6 B	BIJELI	KALUS
7 A	ŽUTI	KALUS
8 B	BIJELI	KALUS
9 C	ŽUTI	KALUS
10 B	BIJELI	KALUS
11 C	ŽUTI	AKTIVNI/KALUS



Slika 16. Udio bijelih i žutih izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

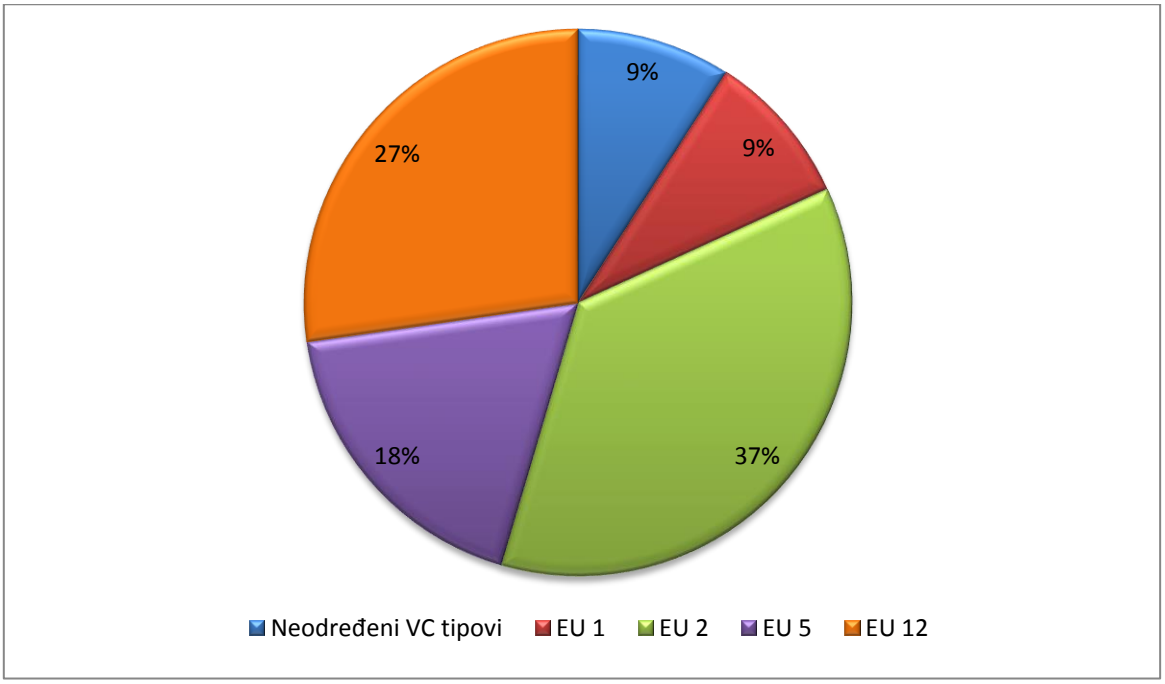
3.2 Raznolikost VC tipova gljive *Cryphonectria parasitica*

Raznolikost VC tipova gljive određivana je pomoću VC-testa. Izolati gljive su testirani međusobno kao i standardnim europskim VC tipovima iz setova EU-1 do EU-31, te EU-32 do EU-64. U mnogim slučajevima test vegetativne kompatibilnosti nije dao jasne rezultate što je otežavalo određivanje vc tipova. Nakon što je između dva uzorka potvrđena kompatibilnost, testiranje se ponavlja u triplikatu kako bi se mogla utvrditi točnost rezultata. Izolati su smatrani kompatibilni kada bi im se miceliji spojili, odnosno kada bi prorasle hife. Između nekompatibilnih izolata se pojavila baražna linija i/ili linija piknida. Dodatni čimbenik koji je bio od pomoći prilikom potvrde nekompatibilnosti jeste pojava tamne crte na granici između dva izolata kada se Petrijeva posudica okrene naopako.

Od ukupno 11 uzoraka gljive *C. parasitica*, za njih 10 određeni su tipovi vegetativne kompatibilnosti pomoću standardnih europskih testera EU1, EU2, EU5 i EU12 dok je tip vegetativne kompatibilnosti za 1 uzorak ostao neodređen (Tablica 2). Od određenih VC tipova najzastupljeniji je EU2 s 4 izolata (37%), zatim EU12 s 3 izolata (27%), EU5 s 2 izolata (18%) i EU1 sa 1 izolatom (9%) (Slika 17).

Tablica 2. Morfologija i vegetativna kompatibilnost (VC) izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Oznaka uzorka gljive *C. parasitica*	**Morfologija gljive *C. parasitica***	**VC tip gljive *C. parasitica***
1 A	ŽUTI	EU 2
2 C	ŽUTI	EU 2
3 B	BIJELI	EU 1
4 C	BIJELI	EU 2
5 C	ŽUTI	NEODREĐEN
6 B	BIJELI	EU 5
7 A	ŽUTI	EU 2
8 B	BIJELI	EU 12
9 C	ŽUTI	EU 12
10 B	BIJELI	EU 5
11 C	ŽUTI	EU 12

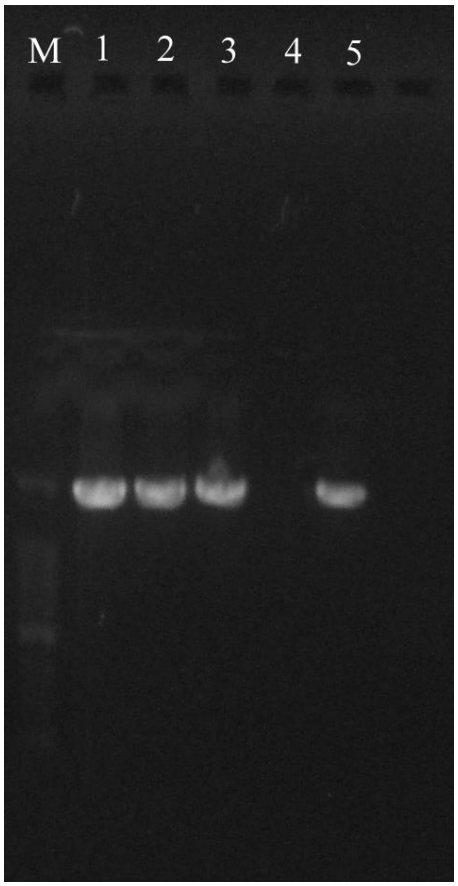


Slika 17. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (VC) gljive *Cryphonectia parasitica*

3.3 Prisutnost virusa u izolatima gljive *Cryphonectria parasitica*

Iz nasumično odabranih uzoraka gljive nakon uzgoja na hranjivoj podlozi PDA, izolirana je dsRNA kako bi se potvrdila prisutnost virusa CHV1. Nakon izolacije hipovirusne dsRNA prisutnosti virusa nije potvrđena agaroznom gel elektroforezom, nego je odmah provedena metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR) nakon čega je uslijedila agarozna gel elektroforeza.

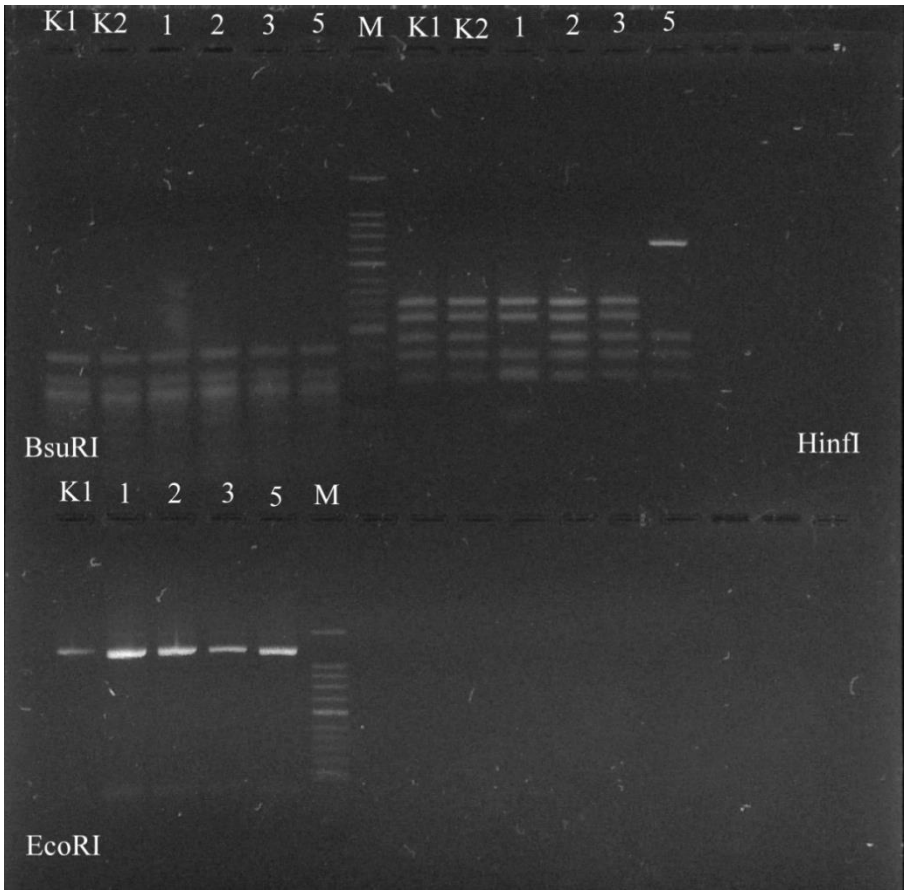
Rezultati dobiveni elektroforezom u agaroznom gelu ukazuju na prisutnost hipovirusa CHV1 u izolata 1, 2, 3 i 5, dok hipovirus nije bio prisutan u izolatu 4 čiji je micelij bio žute morfologije i koji je služio kao kontrola (Slika 18). RT-PCR metodom umnoženi su fragmenti jedne regije hipovirusnog genoma za ORF A.



Slika 18. Elektroforeza PCR produkata dobivenih umnožavanjem regije u ORF A iz dsRNA izolirane iz micelija izolata gljive *Cryphonectria parasitica.* (-): destilirana voda, negativna kontrola; M: 50bp DNA ladder Takara

3.4 Talijanski podtip *Cryphonectria* hipovirusa

Za analizu polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka, RFLP korišteni su uzorci kojima je potvrđena prisutnost virusa CHV1. Prilikom cijepanja PCR produkata restrikcijskim enzimima *BsuRI* i *HinfI*, korištena su, kao pozitivne kontrole, dva prethodno istražena CHV1 izolata koje sam dobila ljubaznošću doc. dr. sc. Ljiljane Krstin. Za te je uzorke bilo poznato da pripadaju talijanskom podtipu CHV1 virusa. Za enzim *EcoRI* koristila sam samo jednu pozitivnu kontrolu zbog toga što sam pretpostavila da taj enzim neće uspješno pocijepati PCR produkte, što je i vidljivo na gelu. Rezultat agarozne gel elektroforeze dobivene cijepanjem PCR produkata enzimima *BsuRI* i *HinfI*, ukazuju da istraživani hipovirusi pripadaju talijanskom podtipu, CHV1-I (Slika 19).



Slika 19. Restrikcijski elektroforetski obrazac umnoženih produkata ORF-A *Cryphonectria* hipovirusa talijanskog podtipa pocijepanih enzimima *BsuRI*, *HinfI* i *EcoRI*. K1 i K2: pozitivna kontrola; M: 50bp DNA ladder Takara.

3.5. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti

Raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica* izražena pomoću Shannon-Wiener-ovog indeksa raznolikosti (H′) unutar istraživanih uzoraka iznosi 1,5102. (Tablica 3)

Tablica 3. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti (H′) VC tipova gljive *Cryphonectria parasitica*

VC tip	**n[a]**	***pi* = n/N**	***pi* * ln (*pi*)**
EU 1	1	0,1	-0,2303
EU 2	4	0,4	-0,3665
EU 5	2	0,2	-0,3219
EU 12	3	0,3	-0,3612
HK 1	1	0,1	-0,2303
N[b]	10	-	**H[c] = 1,5102**

[a] Broj izolata određenog VC tipa.

[b] Ukupan broj izolata.

[c] Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti, H′ = - ∑ *pi* ln *pi*, gdje je *pi* frekvencija pojedinog VC tipa.

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju karakterizirani su uzorci gljive *C. parasitica* izolirani iz kalusnog tkiva raka kore pitomog kestena. Čiste kulture gljive *C. parasitica* uzgajaju se na krumpirovim hranjivim podlogama PDA. Uzgoj u Petrijevkama na PDA podlozi olakšava praćenje rasta gljive, uočavanje razvoja zagađenja kao što su plijesni i bakterije te pojednostavljuje postupak presađivanja. Uzgojem gljive na hranjivoj podlozi moguće je procijeniti njenu morfologiju koja je pokazatelj prisutnosti virusa. Hipovirus mijenja morfologiju gljive, pri čemu je micelij hipovirulentnih sojeva bijeli do bijeložuti, dok virulentni sojevi bez virusa imaju izrazito žut ili narančasti micelij (Anagnostakis, 1982; Novak-Agbaba i sur., 2000). U ovom istraživanju utvrđeno je 55% izolata žute morfologije, dok je bijelih izolata bilo 45%.

Hipovirus se širi konidijama gljive *C. parasitica*, na način da konidije nose hipovirus koji će razviti novi rak, vertikalni prijenos, ili se virus prenosi na drugu gljivu putem anastomoze hifa, horizontalni prijenos. Ukoliko se gljiva zaražena hipovirusom unese u aktivni rak uzrokovan virulentnim sojem gljive *C. parasitica*, prestaje širenje raka te se formira kalus. Pojava kalusa predstavlja osnovu za biološku kontrolu bolesti i zaustavljanje sušenja zaraženih stabala. (Novak-Agbaba i sur. 2011). Ovim istraživanjem utvrđeno je osam rakova na kori kestena koji su formirali kalus, dok su tri bila zabilježena kao aktivni rak/kalus. Prema podacima u literaturi poznato je da se kalusi razvijaju iz hipovirulentnih sojeva gljive bijele morfologije. Međutim, u kalusima su utvrđeni i virulentni žuti sojevi što ukazuje na mogućnost naknadnog zaražavanja kestena virulentnim sojem gljive te opasnost od ponovnog širenja virulentnog agresivnog soja i razvitka bolesti. Aktivni rak na stablima većih promjera ima veću mogućnost konverzije u kalusirajući rak uslijed prirodne biološke kontrole. Za poboljšanje zdravstvenog stanja i kvalitete sastojina pitomog kestena neophodno je provoditi šumsko-uzgojne mjere prorede i čišćenje s naglaskom na uklanjanje stabala zaraženih aktivnim rakom i nekvalitetnih stabala.

Uzgoj gljive *C. parasitica* na hranjivoj podlozi PDA omogućuje i testiranje vegetativne kompatibilnosti. Uspjeh biološke kontrole hipovirulencijom ovisi o nekoliko čimbenika, kao što je raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica*, tipu hipovirusa, okolišnim uvjetima, starosti i otpornosti biljke. U Europi je znatno manja raznolikost VC tipova gljive nego u Americi, zbog toga je zabilježena veća uspješnost biološke kontrole bolesti u Europi (Heiniger i Rigling, 1994). U ovom istraživanju određena su četiri različita VC tipa gljive *C. parasitica,* između 11 prikupljenih izolata, koji su razvili kalus na ranama kore kestena. Najzastupljeniji VC tip u

istraživanju je EU 2 s udjelom od 37%. Nakon njega slijedi EU 12 s udjelom od 27%, zatim EU 5 s udjelom od 18% i EU 1 s udjelom od svega 9%. Jednom uzorku gljive nije bilo moguće odrediti VC tip.

Prilikom prethodnih istraživanja na području Republike Hrvatske je određeno 18 VC tipova unutar 338 prikupljenih izolata (Krstin i sur., 2008). U Sloveniji je određeno ukupno 15 VC tipova unutar 254 prikupljena izolata (Ježić i sur., 2012), a u Bosni i Hercegovini 25 VC tipova unutar čak 920 izolata (Trestić i sur., 2001). Jugozapadni dio Njemačke ima 9 različitih VC tipova od prikupljenih 368 izolata (Peters i sur., 2012).

Ovo istraživanje je pokazalo da je najzastupljeniji VC tip bio EU 2. Prema prethodnim istraživanjima taj VC tip zastupljen je u Hrvatskoj s udjelom od 21%. Osim VC tipa EU 2 u Hrvatskoj su prisutni još i VC tipovi EU 1 i EU 12 (Krstin i sur., 2008). U Sloveniji je najzastupljeniji bio EU 13 (40,1%), VC tipovi EU 1 (19,7%) i EU 2 (12,2%) su također imali veliku učestalost, dok je VC tip EU 12 (9%) bio vrlo rijedak. Smatra se da su se VC tipovi EU 1 i EU 2 proširili u Hrvatsku i Sloveniju iz sjeverne Italije (Ježić i sur., 2012), gdje su ujedno i najzastupljeniji. VC tipovi EU 1 i EU 2 su dominantni u Italiji, zapadnoj Francuskoj, Švicarskoj, Austriji, sjeveroistočnoj Španjolskoj i Njemačkoj (Cortesi i sur., 1998; Robin i Heiniger, 2001). VC tip EU 1 je dominantan i u Turskoj gdje je od 72 istražena izolata njih 69 bilo ovog VC tipa (Akilli i sur., 2013). U Španjolskoj točnije u Kataloniji najzastupljeniji VC tipovi su EU 1, EU 2 i EU 5 (Castano i sur., 2015).

Pokazatelj raznolikosti VC tipova gljive je vrijednost Shannon-Wiener-ovog indeksa (H′). Za istraživane uzorke gljive Shannon-Wiener-ov indeks iznosi 1,5102. U prethodnim istraživanjima na području Hrvatske utvrđeno je da su vrijednosti za raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica*, izražene pomoću Shannon-Wiener-ovog indeksa raznolikosti, dosta visoke i iznose 0,63 – 1,69 (Krstin i sur., 2008). U susjednoj Bosni i Hercegovin, velika raznolikost prevladava u sjeverozapadnim krajevima, dok je u ostalim krajevima relativno niska raznolikost VC tipova (Trestić i sur., 2001). Područje Istre − Buje je imalo Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti do sada najveći i iznosio je 1,69.

Južna Švicarska ima indeks od 1,94, a u Gnosci Shannon-Wiener-ov indeks iznosi 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 gdje 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 gljiva autohtona. Nasuprot tome, u populacijma jugoistočne Europe (Milgroom i sur. 2008) utvrđena je mnogo manja raznolikost, sukladno s kasnijim dolaskom patogena na ta područja.

Iako je u Hrvatskoj utvrđena relativno velika raznolikost VC tipova, hipovirus je dobro raširen u populacijama gljive *C. parasitica*. Kako bi bili sigurni u prisutnost CHV1 u pojedinim populacijama, potrebno je testirati bijele i prijelazne (žutobijele) izolate na prisutnost hipovirusne dsRNA. Na području Hrvatske najveći postotak bijelih izolata koji pripadaju VC tipu EU 1 pronađeni su u populacijama Markuševac (56%), Ozalj (42,2%), Hrvatska Kostajnica (58,8%) i Šamarica (62,5%), dok su izolati bijele morfologije koji pripadaju VC tipu EU 2 zabilježeni u populacijama Hrvatske Kostajnice (50%), Šamarice (77,7%) i Požege (80,9%) (Krstin i sur., 2008). Pojava hipovirulentnosi u Europi je povezana s dugom povijesti raka kore pitomog kestena (Heiniger i Rigling, 1994; Robin i Heiniger, 2001) i upravo zbog toga je prisutna na područjima istraživanja s malom raznolikošću VC tipova (Sotirovski i sur., 2006).

U ovom istraživanju odabrano je pet uzoraka, njih četiri pokazivalo je bijelu morfologiju, dok je jedan uzorak bio žute boje. Prisutnost hipovirusa CHV1 u gljivi bijele morfologije testirana je pomoću izolacije virusne dvolančane RNA. Za izolaciju dsRNA gljiva je uzgajana na na podlozi PDA prekrivenoj celofanom kako ne bi urasla u agar. Elektroforeza dsRNA u agaroznom gelu često puta nije dovoljno osjetljiva metoda za detekciju male količine dsRNA virusa CHV1 izolirane iz hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica*. Tada je za detekciju virusne dsRNA preporučljivo koristiti metodu reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (Krstin i sur. 2008). Stoga je nakon izolacije dsRNA rađena metoda RT-PCR i agarozna gel elektroforeza. Hipovirusna dsRNA je uspješno izolirana iz četiri bijela hipovirulentna soja gljive *C. parasitica,* dok je iz žute gljive nije bilo moguće izolirati, što je bilo i očekivano, te virulentnom soju gljive nije utvrđena prisutnost hipovirusa.

Analizom polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) u ovom istraživanju je dokazano da svi testirani izolati pripadaju talijanskom podtipu CHV1- I. Ovakvi rezultati su i očekivani jer je u prethodnim istraživanjima dokazano da izolati s područja Hrvatske vjerojatno pripadaju talijanskom podtipu CHV1 koji je najrasprostranjeniji na području južne i jugoistočne Europe, a ujedno i jedini dosada zabilježeni podtip u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Makedoniji, Mađarskoj, Švicarskoj, Grčkoj i Italiji (Alleman i sur., 1999; Krstin i sur., 2008).

Za razliku od talijanskog podtipa CHV1, pojava četiriju drugih podtipova CHV1 geografski su ograničena na zapadnu Europu. Dva podtipa su pronađena u Francuskoj, dok je

po jedan podtip pronađen u Njemačkoj i Španjolskoj, u blizini francuske granice. Prisutnost nekoliko podtipova CHV1 i njihova distribucija u Europi može se objasniti višestrukim unošenjem CHV1. Uvezeni kesten iz Japana i / ili Sjeverne Amerike smatraju se kao izvor *C. parasitica* u Europi (Heiniger i Rigling 1994). Zabilježeno je nekoliko uvoza u različite zemlje (Italija, Francuska, Španjolska), što znači da su i uzročnik i njegov virus mogli biti uvedeni više puta. Malo je informacija o širenju CHV1 u Europi. U prvim godinama (1964.-65.) otkrića, bijeli izolati CHV1 već su pronađeni u sjevernoj Italiji, u južnoj Francuskoj i na Pirinejima u zapadnoj Francuskoj (Heiniger & Rigling 1994), što podržava hipotezu o postojanju više vrsta podtipova CHV1. CHV1 nije otkriven u istraživanju u Sjevernoj Americi (Peever et al., 1997), što ukazuje da CHV1 vjerojatno nije unesen u Europu preko Sjeverne Amerike.

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). 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*.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK

Analizom morfologije kultura gljive *Cryphonectria parasitica* utvrđeno je, od ukupno 11 uzoraka, 5 bijelih hipovirulentnih sojeva (45%) i 6 žutih virulentnih (55%) sojeva gljive.

Osim hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* u kalusima su utvrđeni virulentni žuti sojevi što ukazuje na mogućnost naknadnog zaražavanja kestena virulentnim sojem gljive te opasnost od ponovnog širenja virulentnog agresivnog soja i razvitka bolesti.

Od ukupno 11 uzoraka gljive *C. parasitica* određeno je četiri VC tipa što ukazuje na relativno veliku raznolikost VC tipova gljive unutar istraživanih uzoraka. Najzastupljeniji VC tip bio je EU 2 (37%). Drugi po učestalosti je VC tip EU 12 (27%), zatim slijedi VC tip EU 5 (18%) i VC tip EU 1 sa svega 9%. Jednom uzorku nije određen VC tip.

Indeks vegetativne raznolikosti (Shannon-Wiener-ov indeks) za istraživane uzorke gljive *C. parasitica* iznosi 1,5102. Visoki indeks raznolikosti mogao bi smanjiti vjerojatnost za učinkovito prirodno uspostavljanje hipovirulencije na istraživanom području.

Prisutnost hipovirusa CHV1 u gljivi *C. parasitica* bijele morfologije potvrđena je pomoću izolacije virusne dvolančane RNA, Analizom polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) je dokazano da CHV1 izolati pripadaju talijanskom podtipu virusa (CHV1 – I), što je bilo i očekivano, jer je talijanski podtip CHV1 najrasprostranjeniji na području južne i jugoistočne Europe, a ujedno i jedini do sada zabilježeni podtip u Hrvatskoj.

6. LITERATURA

Akilli S, Serçe CU, Katircioğlu YZ, 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 Plant Pathology* 135: 323 – 334.

Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV 1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 843 – 854.

Anagnostakis SL, Hau B, Kranz J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70: 536 – 538.

Anagnostakis SL, Waggoner P. E. 1981. Hypovirulence, vegetative incompatibility, and growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology* 71: 1198 – 1202.

Anagnostakis SL. 1982. Biological control of chestnut blight. *Science* 215: 466 – 471.

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.

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 SF, Prospero S, Rigling D. 2014. Dynamics of *Cryphonectria hypovirus* infection in chestnut blight. *Forest Pathology* 43: 496 – 504.

Bryner SF, 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.

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

Choi GH, Shapira R, Nuss D. L. 1991. Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the

chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 1167 – 1171.

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

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: 167–76.

Dane F, Lang P, Huang H, Fu Y. 2003. Intercontinental genetic divergence of Castanea species in eastern Asia and eastern North America. *Heredity* 91: 314–321.

Davis JE, Kubisiak TL, Milgroom MG. 2005 Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology Notes* 5: 195–197.

Heiniger U, Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu Rev Phytopathol* 32: 581-599.

Hibbet DS, Binder M, Bischoff JF i sur., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 3: 509-547.

Hillman BI, Suzuki N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in Virus Research* 63: 423-472.

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

Johnson GP. 1988. Revision of Castanea sect. Balanocastanon (Fagaceae). *Journal of Arnold Arboretum* 69: 25–49.

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

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

Kubisiak TL, Dutech C, Milgroom MG. 2007. Fifty-three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology Notes* 7: 428 – 432.

Lang P, Dane F, Kubisiak TL. 2006. Phylogeny of Castanea (Fagaceae) based on chloroplast trnT-L-F sequence data. *Tree Genetic Genom* 2 (3): 132–139.

Medak J. 2009. Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj, Disertacija, Šumarski fakultet Zagreb.

Milgroom MG, 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 MG, Sotirovski K, Spica D, Davis JE, Brewer MT, Milev M, Cortesi P. 2008. Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 17: 4446 – 4458.

Novak Agbaba S, Ćelepirović N, Ćurković Perica M. 2011. Zaštita šuma pitomog kestena. *Šumarski list* – Posebni broj 202-210.

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 35 (1): 91–110.

Nuss DL. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal – plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3: 632 – 642.

Peever TL, Liu YC, Milgroom MG. 1997. Diversity of Hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* 87: 1026-1033.

Peters FS, Holweg CL, Rigling D, Metzler B. 2012. Chestnut blight in south-western Germany: multiple introductions of *Cryphonectria parasitica* and slow hypovirus spread. *Forest Pathology* 42(5): 397-404.

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, Martin M, Capdeville X, Travers C, Colinas C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58: 527 – 535.

Sotirovski K, Milgroom MG, Rigling D, Heiniger U. 2006. Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blightfungus in Macedonia. *Forest Pathology* 36: 136-143.

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

Trestić T, Ušćuplić 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: 391-3966.

Wang Y, Kang M, Huang H. 2008. Microsatellite Loci Transf erability in Chestnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133 (5): 692–700.

INTERNETSKE STRANICE:

1. https://sandrakomerc.wordpress.com/2015/01/29/pitomi-kesten/
2. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pitomi_kesten_list.jpg
3. https://commons.wikimedia.org/wiki/Valued_image_set:_Castanea_sativa_(Sweet_Chestnut)
4. https://hr.wikipedia.org/wiki/Pitomi_kesten
5. https://online.science.psu.edu/biol110_sandbox_8862/node/8972
6. http://www.cabi.org/isc/datasheet/21108
7. http://www.wsl.ch/forest/wus/phytopath/reschestnut/reschest-en.ehtml