Priprema hipovirulentnih izolata gljive Cryphonectria parasitica (Murrill) Barr za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena na području Lovrana

Matković, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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:181:688797

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski znanstveni studij biologije

Ivana Matković

Priprema hipovirulentnih izolata gljive *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena na području Lovrana

Diplomski rad

Osijek, 2012.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Priprema hipovirulentnih izolata gljive *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena na području Lovrana

Ivana Matković

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka
Mentor: Prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica
Komentor: Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin

Kratak sažetak diplomskog rada

Cryphonectria parasitica je askomicetna gljiva koja uzrokuje rak kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). Osnova za biološku kontrolu ove bolesti je širenje hipovirusa koji smanjuje virulentnost i sporulaciju gljive. Od ukupno 12 izolata gljive *C. parasitica* prikupljenih na području Lovrana, određeno je 6 tipova vegetativne kompatibilnosti (VC). Najzastupljeniji VC tipovi su EU-17, EU-1 i EU-15. Unatoč velikoj zastupljenosti hipovirulentnih izolata, pitomi kesten, a osobito cijepljeni kesten, lovranski marun i dalje propada. Stoga je pripremljena terapijska pasta od hipovirulentnih izolata L76CR23 (VC tipa 17) i CR23 (VC tipa 1) kojima će se tretirati bolesna stabla kestena. Očekuje se da bi nakon tretmana, virus mogao prijeći iz hipovirulentnog u virulentne izolate gljive istog VC tipa te zaustaviti rast raka i pomoći u oporavku zaraženih stabala kestena.

Broj stranica: 55
Broj slika: 39
Broj tablica: 10
Broj literaturnih navoda: 66
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biološka kontrola, *Cryphonectria parasitica*, hipovirus, rak kore pitomog kestena,vegetativna kompatibilnost

Datum obrane: 29.11.2012.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön
2. Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
3. Doc.dr.sc. Ivna Štolfa

Rad pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Preparation of hypovirulent *Cryphonectria parasitica* isolates for biological control of chestnut blight in the Lovran area

Ivana Matković

Thesis performed at Institute of Biochemistry and Plant Ecophysiology
Supervisor: Prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica
Co - supervisor: Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin

Short abstract

Cryphonectria parasitica is the filamentous, ascomycete fungus and the causal agent of chestnut blight. Biological control is based on the spreading of hypovirus that reduces fungal virulence and sporulation. Six vegetative compatibility (VC) types were identified among the 12 isolates sampled from the Lovran area. The most widespread VC types were EU-17, EU-1 and EU-15. Despite the high frequency of hypovirulent isolates, chestnut, especially grafted chestnut, Lovran marron decays. Therefore, the therapeutic paste was prepared from hypovirulent isolates L76CR23 (VC type 17) and CR23 (VC type 1). The paste will be used for treatment of diseased chestnut trees. It can be expected that after the treatment, virus would be transferred form hypovirulent to virulent strains of the fungus of the same VC type and stop the growth of canker, consequently inducing recovery of infected chestnut trees.

Number of pages: 55
Number of figures: 39
Number of tables: 10
Number of references: 66
Original in: Croatian

Key words: biological control, chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, hypovirus, vegetative compatibility

Date of the thesis defence: 29.11.2012.
Reviewers:

1. Prof. Elizabeta Has-Schön, Ph.D.
2. Assist.Prof. Ljiljana Krstin, Ph.D.
3. Assist.Prof. Ivna Štolfa, Ph.D.

Thesis deposited in Library of Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayar of Osijek

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perici što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Ljiljani Krstin na korisnim savjetima, pomoći i znanju koje mi je nesebično prenijela tijekom izrade diplomskog rada i studija.

Mojoj obitelji, sestri, baki i didi, veliko hvala na bezuvjetnoj podršci i vjeri kojom su me hrabrili na daljnje uspjehe. Uz vas mi je sve bilo puno lakše.

Mojem Mislavu hvala što je uvijek bio uz mene i što je slušao.

Ovaj rad posvećujem mami jer me podržavala i bila moj oslonac, ne samo kroz studij, već i kroz cijeli život. Njoj zahvaljujem na ovome što sam danas.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) 1

1.2. *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. - uzročnik raka kore pitomog kestena 4

1.2.1. Simptomi rakastih tvorevina 5

1.3. Viralna dsRNA – uzročnik hipovirulentnosti u gljive *C. parasitica* 7

1.3.1. Karakteristike hipovirusa 9

1.3.2. Načini prijenosa dsRNA molekule hipovirusa kroz populaciju gljive 10

1.3.3. *Cryphonectria hypovirus* – 1 i biološka kontrola 12

1.4. Razmnožavanje gljive *Cryphonectria parasitica* 14

1.5. Terapijska pasta za liječenje bolesnih stabala pitomog kestena 17

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 18

3. MATERIJALI I METODE **19**

3.1. Područje istraživanja 19

3.2. Uzorkovanje na terenu 21

3.3. Laboratorijska obrada uzoraka 22

3.3.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj kultura gljive *Cryphonectria parasitica* 22

3.3.2. Određivanje morfologije izolata gljive *Cryphonectria parasitica* 24

3.3.3. Test vegetativne kompatibilnosti (VC - test) 25

3.3.4. Pohrana i obnova svježe kulture gljive *C. parasitica* 28

3.3.5. Izrada terapijske paste 29

4. REZULTATI **34**

4.1. Morfologija izolata gljive *C. parasitica* na području Lovrana 34

4.2. Raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica* na području Lovrana 35

4.3. Zdravstveno stanje pitomog kestena na području Lovrana 42

4.4. Vrste kestenovih stabala 43

4.5. Terapijska pasta za inokulaciju bolesnih stabala kestena 44

5. RASPRAVA 45

6. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 49

7. LITERATURA 50

1. UVOD

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

Na području Mediterana pronađeni su fosili kestena čija se starost procjenjuje na oko 8 milijuna godina. Postoji jedan sačuvani primjerak pronađen u Francuskoj krajem 3. stoljeća i nalazi se u paleontološkom muzeju *Voulte*. Kesteni su se koristili kao hrana još u mezolitiku (prije 10 000 godina), no početak uzgoja kestena bilježi se tek nakon 6.stoljeća p.n.e.

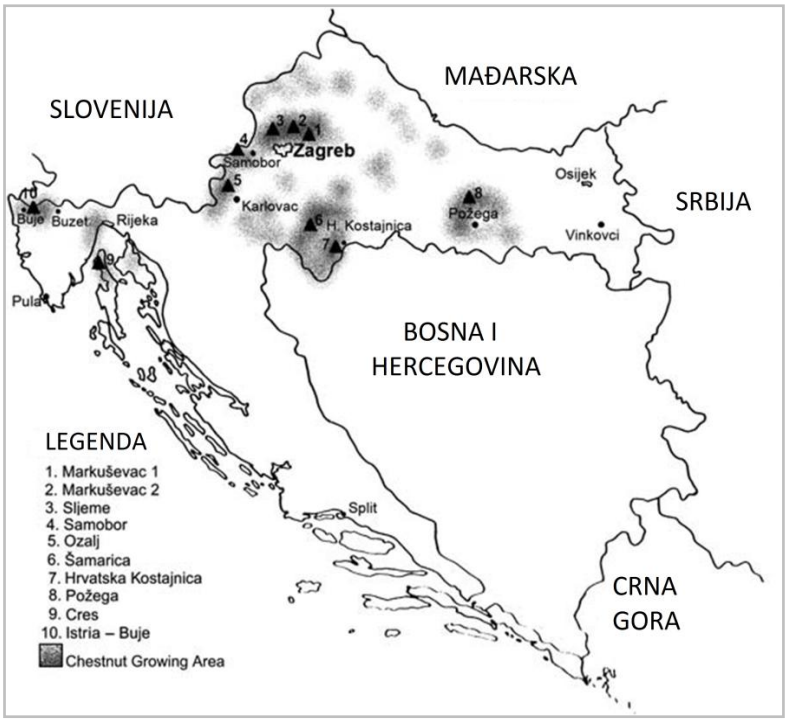
Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) je važna šumska vrsta drveća. Postoji oko desetak sorti kestena koje su raširene u blagim klimatskim područjima sjeverne hemisfere (jugoistočni dio Sjeverne Amerike, južna Europa, sjeverozapadna Afrika, te zapadna i istočna Azija). Pitomi kesten je listopadno drvo koje raste najviše u području južne Europe i Sredozemlja (Slika 1), a povjesničari kažu da se počeo širiti po Europi preko Grčke.



Slika 1. Prirodni areal pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) na području Europe (Maurer i Fernandez – Lopez, 2001)

U Hrvatskoj su kesteni najrašireniji na području obronaka Učke iznad Lovrana, Opatije i Mošćenićke Drage, u istočnoj Istri, te na otoku Krku (Slika 2). Prema podacima Hrvatskih šuma iz 1996. godine, sastojine pitomog kestena koje se nalaze na području uprava

šuma Sisak, Karlovac, Zagreb, Koprivnica, Požega, Buzet i Bjelovar zauzimaju ukupno 15.000,23 ha. Zdravstveno stanje kestenovih sastojina razlikuje se od područja do područja. Neke su sastojine u veoma dobrom stanju, dok su druge veoma loše kvalitete što ovisi o mnogim abiotičkim i biotičkim čimbenicima (Novak-Agbaba i sur., 2000).



Slika 2. Rasprostranjenost pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Republici Hrvatskoj (Modificirana izvorna slika iz rada Krstin i sur., 2008)

Europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) prema taksonomiji pripada redu *Fagales*, porodici *Fagaceae,* rodu *Castanea.* U srodstvu je s bukvom i hrastom, ali je jedini jestiv i sadrži visoke količine nutrijenata, o čemu svjedoči i povijesna priča kako je rimski car Cezar običavao spaljivati kestenove šume da bi uništio izvor hrane za domaće stanovništvo.

U sastojini pitomi kesten ima dugačko punodrvno deblo do 35 m visine i bujne je krošnje. Kora debla je u mladosti glatka, a sa starošću uzdužno raspucava. Lišće je duguljasto, eliptično i nazubljeno. Cvjetovi su jednodomni. Muški cvjetovi su u uspravnim resama, a ženski u donjem dijelu muških resa.

Plod je kesten i prirastao je za tobolac u kojem se većinom nalaze po tri ploda (Slika 3). Plod pitomog kestena se odlikuje smeđom bojom i sjajnom površinom. Težina ploda varira od 10 – 25 g za svaki pojedinačni plod. Ljuska kestena je tamno – smeđe boje i prekriva plod. Postoji mnogo vrsta kestena čiji se plodovi razlikuju po boji i obliku. Jedan od njih je i

"lovranski marun", koji je cijenjen zbog izuzetne kvalitete svojih plodova. Maruni su krupna, poboljšana sorta domaćeg kestena dobivena metodom kalemljenja.

Pitomi kesten ima specifične zahtjeve za stanište. Raste na području umjerene kontinentalne klime, na sunčanim, južnim i zapadnim ekspozicijama brdovitih predjela. Za uspijevanje mu je potrebno dugo vegetacijsko razdoblje (6 – 7 mjeseci) s prosječnom temperaturom većom od 10°C i oborinama od 800 – 1600 mm. Kesten je acidofilna vrsta. Raste na eruptivnim i silikatnim podlogama, te tlima pjeskovito glinasto – ilovaste strukture. Na vapnenačkim podlogama raste samo tamo gdje je došlo do dekalcifikacije dubljeg sloja tla kao što je slučaj s istarskom crvenicom. Vertikalno je rasprostranjen od 50 – 1000 m/nv.



Slika 3. Plod pitomog kestena (Web 1)

Kesten je gospodarski vrlo značajna vrsta. Zbog velikog sadržaja tanina se upotrebljava kao sirovina za ekstrakciju tanina. Koristi se kao građevno i stolarsko drvo zbog velike trajnosti i lake obrade. U drvnoj industriju se upotrebljava za proizvodnju parketa. U bačvarstvu se koristi za izradu visokokvalitetnih bačvi za čuvanje vina i piva. U poljoprivredi se upotrebljava za vinogradsko i hmeljarsko kolje. Zbog vrijednosti i kvalitete ploda se upotrebljava i u ishrani. U Istri se tek ponegdje (u privatnom gospodarenju) uzgaja kao voćkarica - marun (Novak-Agbaba i sur., 2000). Važna je i uloga kestena u hranidbi divljači u šumama gdje je on zastupljen. U pčelarstvu se upotrebljava kao medonosna biljka jer sadrži velike količine nektara, a poznat je i po ljekovitosti, s naglaskom na list koji se koristi u farmaceutskoj industriji i od velike je važnosti za zdravlje čovjeka.

1.2. *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. – uzročnik raka kore pitomog kestena

Cryphonectria parasitica je askomicetna, nitasta gljiva i glavni je patogeni uzročnik raka kore pitomog kestena odgovoran za propadanje kestenovih sastojina u Sjevernoj Americi i Europi (Krstin i sur., 2011). Slučajno je uvedena u Sjevernu Ameriku sa sadnicama kineskog i japanskog kestena iz Azije početkom 20. stoljeća, te je u narednih nekoliko desetljeća uništila gotovo sve sastojine američkog pitomog kestena (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh) (Anagnostakis, 2000). U Europi je prvi puta zabilježena 1938. godine na području sjeverne Italije u Genovi, odakle se proširila na gotovo sve europske sastojine kestena (Krstin i sur., 2008).

U Hrvatskoj je prvi slučaj bolesti zabilježen u okolici Opatije 1955. godine, a pretpostavlja se da se zaraza proširila iz Slovenije gdje je prvi slučaj zabilježen 1950. godine (Krstin i sur., 2008). Bolest je uzrokovala propadanje kestenovih sastojina u Hrvatskoj, a stanje u šumama je postalo sve lošije jer se čistom sječom zbog bolesti i zapuštanjem sastojina, staništa pitomog kestena sve više smanjuju (Novak – Agbaba i sur., 2000).

Pojavljivanje ove bolesti često ostaje nezapaženo sve dok propadanje grana drveća ne postane preočito. Širenje bolesti je prilično sporo jer u Srednjoj Europi nema kontinuiranih kestenovih sastojina, ali prijenos na velike udaljenosti i dalje ostaje nedovoljno jasan. Askospore i čestice micelija se mogu prenijeti vjetrom, pticama i kukcima. Također, ljudi predstavljaju značajan vektor u prijenosu biljaka kestena (Heiniger i Rigling, 1994).

Gljiva je vrlo agresivna i može zaraziti stabla bez obzira na njihovu vitalnost i dob, a nastali rak kore oštećuje stabla i uzrokuje sušenje koje može nastupiti vrlo brzo (Novak-Agbaba i sur., 2000). Širenje raka uzrokuje oštećenje kambija te prekidanje toka vode i hranjivih tvari. Ova patogena gljiva može zaraziti grane i stabljiku pitomog kestena uzrokujući da glatke grane postanu crvenkaste i upaljene (Robbins, 1997; Mohammed i sur., 2011). Gljiva raste u kambiju i tkivu kore tvoreći blijedosmeđi micelij. Piknide i peritecij probijaju koru, a bolest je lako vidljiva i na lišću koje postaje suho. Odgovor biljke na napad patogena je pojačano razmnožavanje stanica u namjeri da obraste i zatvori napadnuto mjesto, no kako stablu to ne uspijeva, dolazi do formiranja raka kore uslijed venuća i sušenja u distalnim dijelovima. Korijenov sustav jedini uspijeva preživjeti zarazu, pa izdanci mogu ponovno nicati (Heiniger i Rigling, 1994).

1.2.1. Simptomi rakastih tvorevina

U kestenovim sastojinama se mogu prepoznati tri grupe simptoma rakastih tvorevina:

1. Aktivni rak (AR)
2. Kalusirajući rak (KR)
3. Površinske nekroze (PN)

Kod aktivnog raka (AR) zaraza brzo napreduje do kambija. Na stablima kestena ga lako možemo prepoznati po uzdužno raspucaloj kori (Slika 4), otvorenim ranama, pojavom živića (izbojaka) ispod mjesta zaraze, brojnim žutosmeđim plodnim tijelima gljive, (Slika 5), te tamnožutom lepezastom miceliju ispod kore. Uzročnik aktivnog raka je virulentni soj gljive.



Slika 4. Aktivni rak kore kestena (Web 2)



Slika 5. Plodna tijela gljive pitomog kestena (Web 3)

Kalusirajući rak (KR) se prepoznaje po formiranom kalusnom staničju oko rane (Slika 6), a zaraza može prodrijeti do kambija. Hipovirulentni soj gljive *C. parasitica* je uzročnik površinske nekroze (PN), pri čemu zaraza sporo napreduje i ne prodire do kambija. Na deblu se uočava zadebljanje i ljuskava kora koja se jasno razlikuje od zdrave (Slika 7) (Novak-Agbaba i sur., 2000).



Slika 6. Kalusirajući rak kore kestena (Web 4)



Slika 7. Površinska nekroza kore kestena (Web 5)

Invazivne vrste patogena, kao što je *C. parasitica*, privlače posebnu pažnju znanstvenika zbog dramatičnih ekoloških utjecaja koje mogu imati na određeni ekosustav. Mogu promijeniti strukturu ekosustava i bioloških interakcija ili povećati osjetljivost na stres (Prospero i Rigling, 2012).

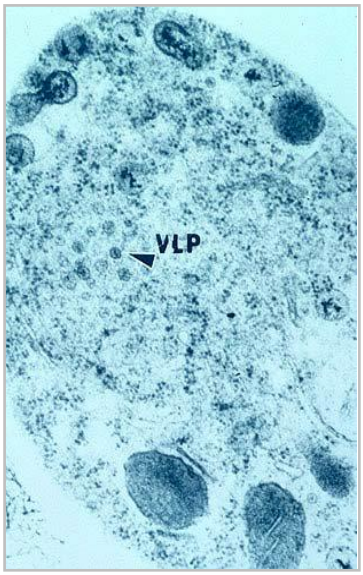
Za razliku od Sjeverne Amerike, gdje je rak kore uništio gotovo sva stabla pitomog kestena, u Europi su znanstvenici primijetili oporavak stabala od bolesti (Robin i Heiniger, 2001.) *C. parasitica* može biti zaražena hipovirusom koji smanjuje virulentnost gljive i formira blaže oblike rakastih tvorevina. Ozdravljenje stabala se zasniva na prenošenju svojstva hipovirulence na aktivni rak. Biološka zaštita pitomog kestena se sastoji od unošenja mješavine hipovirulentnih sojeva u sastojinu, čime je pospješeno kalusiranje, odnosno zacjeljivanje rana na stablima (Novak-Agbaba i sur., 2000).

Prirodno širenje hipovirusa s površinskih nekroza na aktivni rak dovodi do zacjeljivanja rak-rana i pojave kalusirajućih rakova. Ta pojava predstavlja osnovu za biološku kontrolu bolesti i zaustavljanje sušenja zaraženih stabala, a u Hrvatskoj se provodi od 1983. godine (Novak – Agbaba i sur., 2011).

1.3. Viralna dsRNA – uzročnik hipovirulentnosti u gljive *C. parasitica*

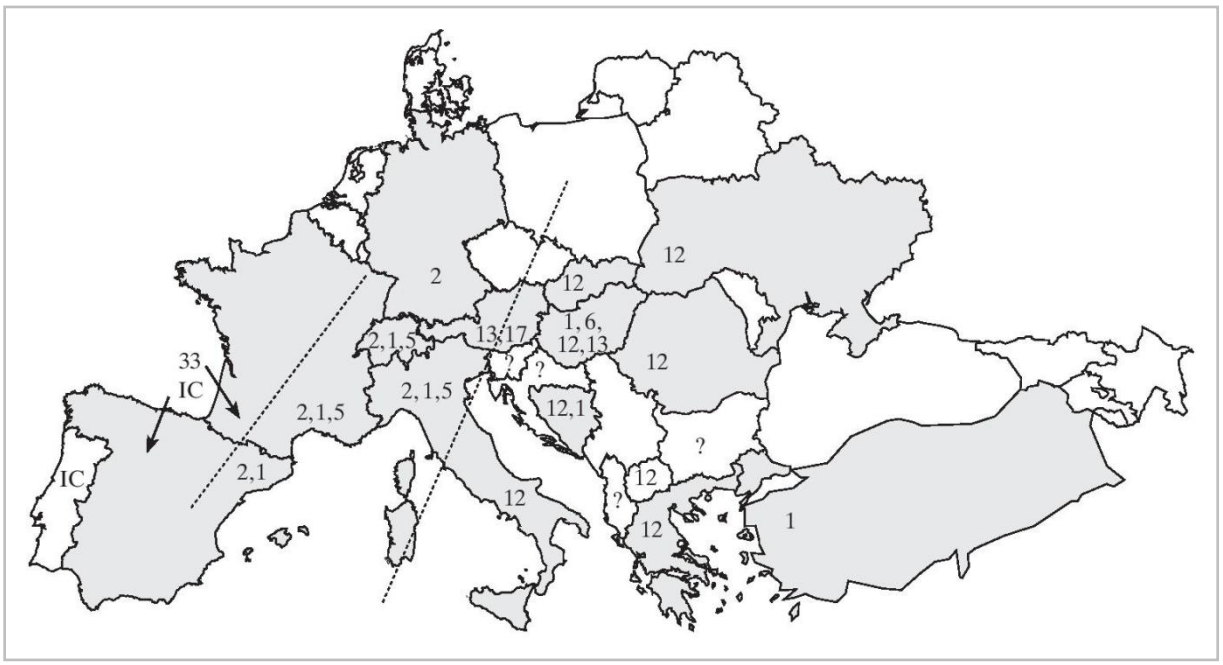
Fenomen oporavka kestenovih sastojina u Europi prvi je opazio Biraghi 1951. godine. Za razliku od kestenovih sastojina na području Sjeverne Amerike, koje je rak kore gotovo u potpunosti eliminirao, u europskih je sastojina primijećen oporavak. Istraživanja su pokazala da je uzročnik ozdravljenja stabala kestena hipovirulentni soj gljive *C. parasitica* kojeg karakterizira smanjena sporulacija, pigmentacija, te smanjeno nakupljanje oksalata i manja aktivnost lakaze i celulaze – enzima pronađenih u gljiva (Kazmierczak i sur., 1996; Larson i sur., 1992; Jacob – Wilk i sur., 2006). Također je zabilježena indukcija i akumulacija PR - proteina (engl. Pathogenesis related) kao što su *ß*-1,3 – glukanaze i hitinaze koji pokazuju antifungalnu aktivnost i potiču proizvodnju biljnih antitijela fitoaleksina (Schafleitner i Wilhelm, 1997; Vannini i sur., 1999).

Hipovirulentnost uzrokuje dvolančana RNA molekula (dsRNA) hipovirusa – *Cryphonectria hypovirus* (CHV) (Slika 8) (Heiniger i Rigling, 1994). Za hipovirulencu možemo reći da je oblik biološke kontrole, u kojoj *Cryphonectria hypovirus* smanjuje fitnes gljive i njezinu virulentnost prema stablu kestena (Sotirovski i sur., 2011; Deng i sur., 2007). Virus uzrokuje ženski sterilitet i smanjenje broja nastalih konidija koje u razmnožavanju predstavljaju muške gamete, a najbitniji učinak je zasigurno smanjenje rasta rakastih tvorevina (Sun i sur., 2009; Peever i sur., 2000).



Slika 8. Čestice nalik virusu unutar stanice gljive *Cryphonectria parasitica*
(*engl.* VLP = Virus – like particles)
(Prezentacija prof. dr. sc. Mirne Ćurković - Perice)

Ukupno su četiri virusne vrste iz porodice *Hypoviridae* dobro opisane. Taksonomski su povezane, ali se razlikuju po strukturi genoma (Turina i Rostagno, 2007). *Cryphonectria hypovirus – 1* (CHV - 1) je najbolje opisan i jedini do danas zabilježen na području Europe, a karakterizira ga velika raznolikost genotipova (Krstin i sur., 2011; Montenegro i sur., 2008) (Slika 9).



Slika 9. Dominantni vc tipovi gljive *C. parasitica* u pojedinim europskim zemljama (Robin i Heiniger, 2001)

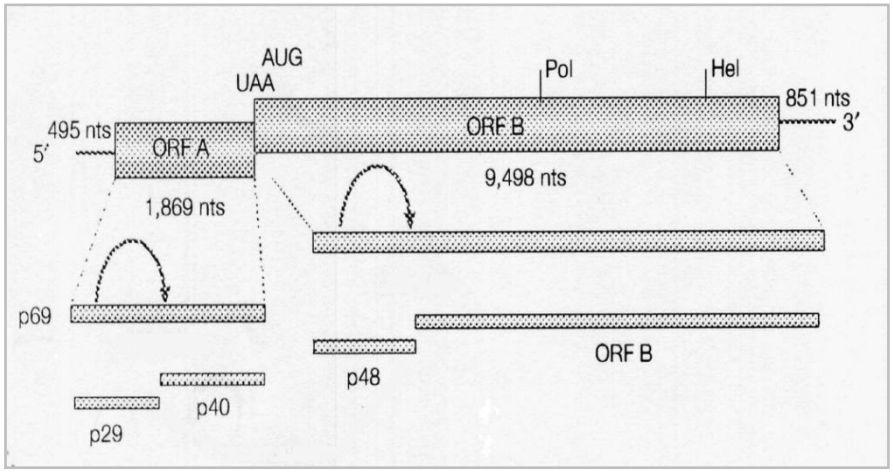
Budući da je otkriven 41 različit genotip CHV – 1, virus je svrstan u pet podtipova: jedan talijanski (CHV1 - I), jedan njemački (CHV1 - D), jedan španjolski (CHV1 - E) i dva francuska podtipa (CHV1 – F1, CHV1 – F2) (Montenegro i sur., 2008). Talijanski podtip (CHV1 - I) je najrasprostranjeniji na području zapadne i zapadno-istočne Europe, uključujući i Hrvatsku, pa su tako svi do sada analizirani izolati hipovirusa iz Hrvatske svrstani u ovaj podtip (Robin i sur., 2010). Na području Sjeverne Amerike su prisutne ostale tri virusne vrste (*Cryphonectria hypovirus* – 2, 3, 4), od kojih su najčešće CHV – 3 i CHV – 4 (Turina i Rostagno, 2007). Prisutnost CHV – 1 u Europi, Japanu i Kini, ali ne u Sjevernoj Americi upućuje na zaključak da je hipovirus unesen u Europu izravno iz Azije (Allemann i sur., 1999).

1.3.1. Karakteristike hipovirusa

Cryphonectria hypovirus pripada porodici *Hypoviridae*, koja se nalazi unutar velike skupine *Mycovirusa.* Možemo reći da su dobar primjer prilagodbe parazita na svog domaćina (McCabe i sur., 1999). Hipovirusi sadrže linearnu dvolančanu RNA (dsRNA) molekulu, a nalaze se u membranskim vezikulama (promjera 50 – 80 nm) u citoplazmi svog domaćina – gljive, kojega nikada ne napuštaju (Heiniger i Rigling, 1994; Gobbin i sur., 2003). Nemaju kapsidu, odnosno proteinski omotač, nemaju strukturnih proteina i ne stvaraju virione (zrele infektivne virusne čestice).

Genom CHV – 1 velik je 12 712 bp, ne računajući poliadenilatni rep kodirajućeg lanca i njemu komplementarni 5' poliuridilatni niz na nekodirajućem lancu (Nuss, 2005). Kod nekih CHV – 1 su uz RNA normalne duljine (L – dsRNA) prisutni i kraći oblici (M – dsRNA, veličine 8 – 10 kbp i S – dsRNA, 0.6 – 1.7 kpb) (Allemann i sur., 1999). Kodirajući lanac sadrži dva otvorena okvira čitanja (ORF A i ORF B) (Slika 10) odvojena pentanukleotidom 5'-UAAUG-3' (Guo i sur., 2009). Sekvenca 5'-UAA-3' predstavlja stop kodon za ORF A, a sekvenca 5'-AUG-3' start kodon za ORF B. Svaki ORF kodira poliprotein koji se autoproteolizom odvaja na dva samostalna proteina.

Definitivna potvrda uzročno – posljedične veze virusa i hipovirulence došla je kroz upotrebu molekularne tehnologije (Nuss, 2005). Iako su svi *Mycovirusi* unutar carstva *Fungi,* hipovirusi koji inficiraju gljivu *C. parasitica* su jedini u ovome carstvu za koje je razvijen infektivni cDNA klon što olakšava manipulaciju u laboratoriju, te omogućuje mijenjanje fenotipa gljive (Dawe i sur., 2009).

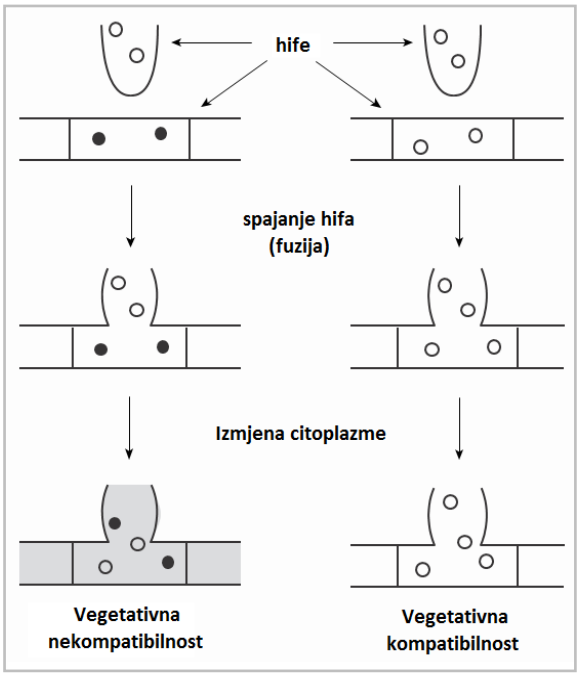


Slika 10. Shematski prikaz genetičke organizacije L-dsRNA hipovirusa CHV-1 (Nuss, 2005)

1.3.2. Načini prijenosa dsRNA molekule hipovirusa kroz populaciju gljive

Cryphonectria hypovirus je dobar model za proučavanje ne samo interakcije virus/domaćin, nego i uzajamne interakcije virus/virus zbog lake genetske manipulacije i virusa i njegova domaćina (Choi i sur., 2011; Sun i Suzuki, 2008). Za razliku od virusa biljaka i životinja, virusima gljiva nedostaje izvanstanična faza u razvojnom ciklusu (Gobbin i sur., 2003; Nuss i sur., 2011; Bryner i Rigling, 2011). Osim toga, virus sam po sebi nije infektivan u pravom smislu riječi, već su dva moguća načina prirodnog prijenosa ograničena na unutarstanične mehanizme (Ćurković – Perica i sur., 2009; Hoegger i sur., 2003).

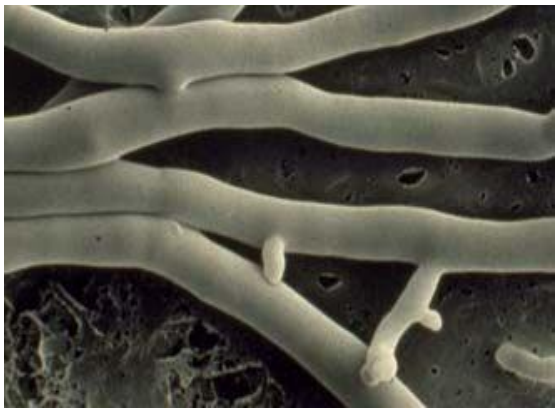
Horizontalni prijenos hipovirusa se odvija anastomozom (fuzija/spajanje) hifa (Slika 11). Ovaj način prijenosa predstavlja osnovu za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena, no ograničen je sustavom nazvanim heterokarion ili multipla vegetativna inkompatibilnost (*vic*) gljive (Cortesi i sur., 2001; Ding i sur., 2007). *Vic* sustav je u gljive *C. parasitica* kontroliran s najmanje šest genetskih lokusa, a na svakom lokusu su dva alela, što znači da su moguća 64 različita genotipa ($2^6 = 64$) (Adamčíková i sur., 2006; Nuss, 2011).



Slika 11. Shematski prikaz anastomoze (spajanja) hifa
(Modificirana izvorna slika iz rada McCabe i sur., 1999)

Hipovirus će se proširiti između dva soja gljive *C. parasitica* jedino ako pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (VC), odnosno ako sadrže identične alele na svim vic - lokusima (Montenegro i sur., 2008). Tada nastaje povoljna fuzija stanica. Sojevi gljive koji imaju različite alele na jednom ili više *vic* lokusa će međusobno biti nekompatibilni, što rezultira smrću stanice i nemogućnošću prijenosa virusa (Choi i sur., 2011; Anagnostakis 2001) (Slika 12 a i b).

Iz navedenog možemo reći da *vic* sustav predstavlja antivirusni obrambeni mehanizam na razini populacije (Nuss, 2011). Međutim, zabilježeni su i slučajevi prijenosa virusa između nekompatibilnih jedinki (VinC), što sustav vegetativne kompatibilnosti čini nesavršenom preprekom za prijenos virusa u gljiva (Cortesi i sur., 2001; Ding i sur., 2007).



a) Anastomoza (spajanje) hifa



b) Propadanje hifa uslijed nekompatibilnosti

Slika 12. Mikroskopski prikaz vegetativne kompatibilnosti i nekompatibilnosti hifa gljive *C. parasitica*
(Nastavni materijali doc. dr. sc. Ljiljane Krstin)

Vertikalni prijenos hipovirusa moguć je nespolnim sporama (konidije), ali ne i spolnim sporama (askospore) (Krstin i sur., 2008). Spolno razmnožavanje ima negativan utjecaj na širenje hipovirusa jer askospore ne sadrže dsRNA, što indirektno uzrokuje rekombinaciju polimorfnih *vic* gena i na taj način povećava raznolikost VC tipova (Krstin i sur., 2008; Prospero i sur., 2006).

1.3.3. *Cryphonectria hypovirus – 1* i biološka kontrola

Osim prirodnih načina prijenosa hipovirusa, širenje je moguće i ljudskom aktivnošću. Iako je biološka kontrola u Europi započela otkrićem znanstvenika Grentea još 1960 – ih godina, tek se u posljednje desetljeće stvorila jasnija slika o raznolikosti europske populacije gljive *C. parasitica*, koristeći VC tipove kao markere (Krstin i sur., 2008; Robin i sur., 2009).

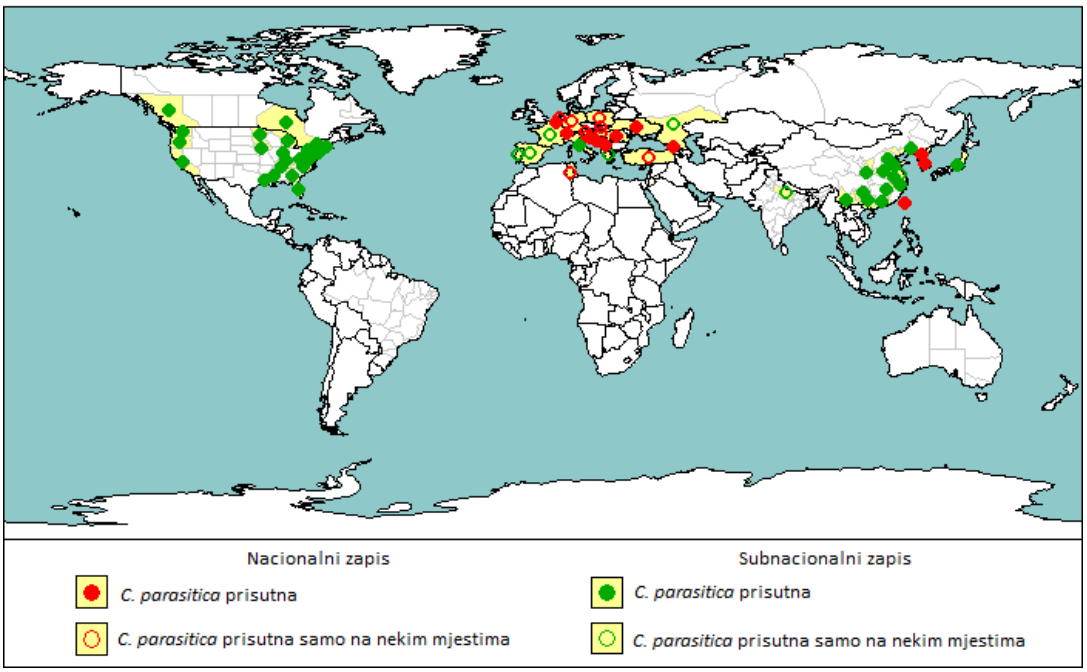
Vegetativna kompatibilnost (VC) je glavna prepreka u širenju hipovirusa. Na području Europe je zabilježen 31 VC tip (EU-1 do EU-31). Ovi tipovi su korišteni kao testeri za proučavanje genetske kontrole vegetativne kompatibilnosti u gljive *C. parasitica* (Cortesi i Milgroom, 1998). Križanjem već postojećeg 31 VC tipa dobiveni su novi VC tipovi koji čine set testera od EU-32 do EU-64. Za sva 64 tipa je bio određen Vic genotip, sa 6 vic gena od kojih svaki ima dva alela. U Francuskoj i Švicarskoj je 10 VC tipova bilo inkompatibilno s testerima iz seta EU-1 do EU-64 što je pokazalo da je potreban barem jedan dodatni vic gen ili dodatni alel kako bi se u potpunosti opisala raznolikost svih VC tipova. Stoga je potrebno u skladu s novim otkrićima povećavati setove sojeva EU testera (Robin i Heiniger, 2001).

Uspjeh u biološkoj kontroli se temelji na postotku tretiranih i netretiranih rakova kore pitomog kestena koji su se oporavili. Terapijski učinak horizontalnog prijenosa hipovirusa je vidljiv kao ozdravljenje tretiranog raka kore, dok ozdravljenje netretiranog raka zahtijeva širenje virusa unutar stabla. U Europi se biološko suzbijanje raka kore pitomog kestena smatra vrlo uspješnim s obzirom na veliki broj tretiranih stabala koja su oporavljena, zahvaljujući visokoj razini hipovirulentnosti u sastojinama kestena (Robin i sur., 2010).

Poznavanje učestalosti hipovirusa omogućuje dobru procjenu potencijala prirodnog prijenosa hipovirusa. Znanje o rasprostranjenosti i raznolikosti VC tipova i reprodukcijskih tipova je neprocjenjivo važno kako bi se primijenili odgovarajući hipovirulentni izolati za što uspješniju biološku kontrolu (Krstin i sur., 2008; Sun i sur., 2009). Vrlo je bitno kontinuirano istraživanje problematike zaštite kestenovih sastojina u Hrvatskoj u cilju održavanja i promoviranja pitomog kestena kao šumske vrste (Novak – Agbaba i sur., 2011). Zadnjih godina je prepoznat značaj zaštite, obnove i biološke raznolikosti pitomog kestena. Intenziviraju se istraživanja koja obuhvaćaju zaštitu pitomog kestena, fitocenološka istraživanja i istraživanja populacijske strukture gljive *C. parasitica*. Od posebnog je značaja proučavanje prisutnosti hipovirusa u gljivi koji umanjuje njezinu agresivnost.

Udruženje za svjetsku konzervaciju IUCN (International Union for Conservation of Nature) je svrstalo gljivu *C. parasitica* u popis sto svjetski najgorih invazivnih vrsta

organizama kao najveću prijetnju bioraznolikosti (Novak – Agbaba, 2006). Također, gljiva je u Europi proglašena karantenskim patogenom i uvrštena na EPPO A2 listu (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Prema nacionalnim i subnacionalnim zapisima, gljiva je trenutno prisutna na području središnje i južne Europe, istočne i zapadne obale Sjeverne Amerike, Istočne Azije, a u Africi tek ponegdje na području Tunisa (Slika 13) (Montenegro i sur., 2008).



Slika 13. Prisutnost gljive *Cryphonectria parasitica*

(Web 6)

Standardne metode suzbijanja bolesti stabala (sanitarne sječe, primjena kemikalija, oplemenjivanje vrsta) nisu riješile problem propadanja kestenovih šuma zbog velike gustoće i raširenosti zaraženih stabala. Drugi razlog neuspjeha je vrlo dobra prilagodba gljive na prijenos na velike udaljenosti.

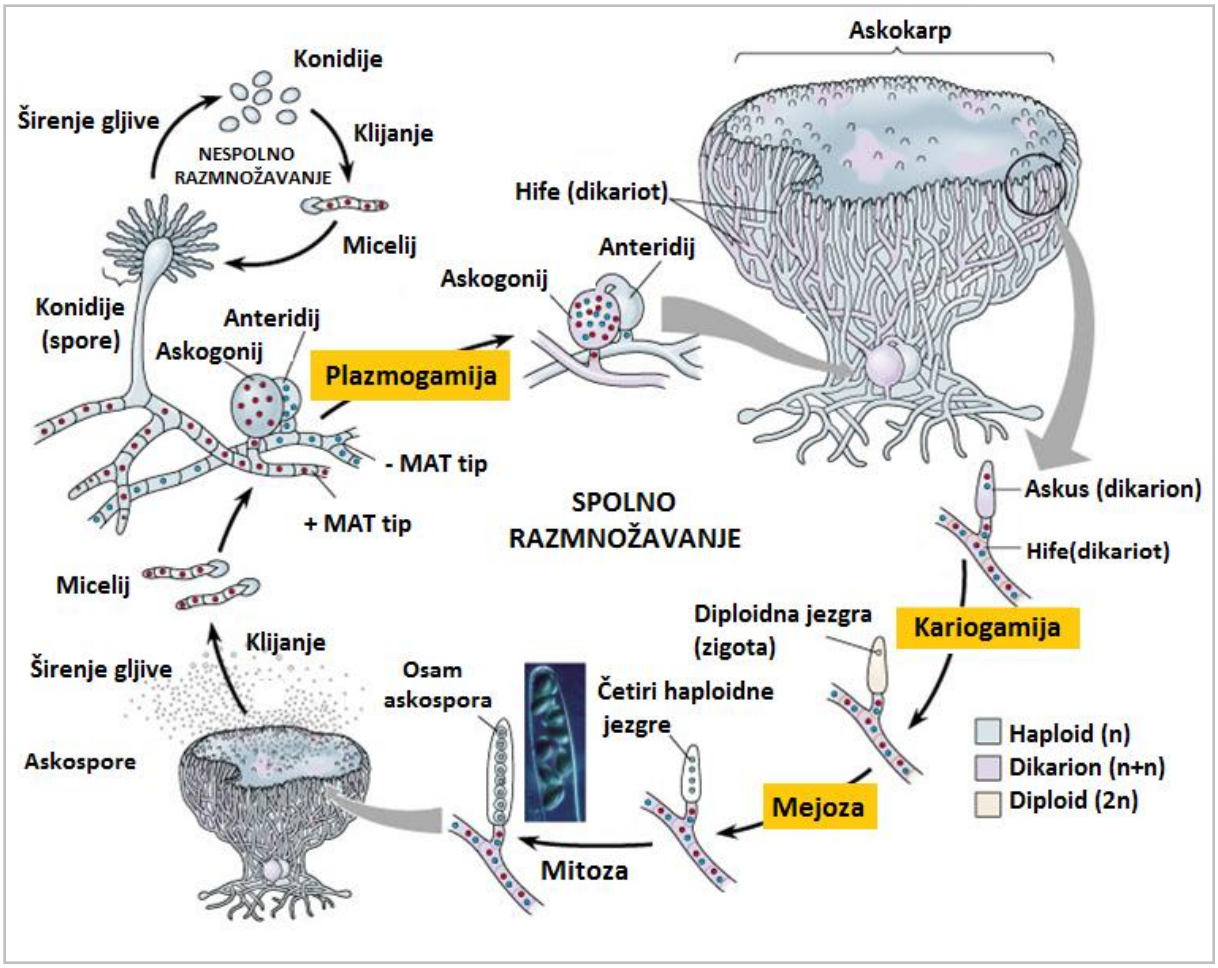
Ipak, EPPO preporučuje da bi biljke za sadnju trebale doći iz područja u kojima *C. parasitica* nije prisutna i gdje se bolest nije pojavila tijekom posljednje vegetacijske sezone. Na stablima kestena, iz zemalja u kojima je *C. parasitica* prisutna, trebalo bi odvojiti koru od drveta. Dezinfekcija u 5%-tnoj otopini 40%-tnog formaldehida i 5%-tnog natrijevog pentaklorfenolata tijekom pet minuta bi trebala uništiti gljivu ukoliko je prisutna na drvetu (OEPP/EPPO, 1990).

1.4. Razmnožavanje gljive *Cryphonectria parasitica*

Gljive su eukarioti koje ubrajamo u carstvo Fungi ili Mycota, a predstavljaju višestanične, heterotrofne organizme čije vegetativno tijelo čini splet hifa (micelij). Gljive iz razreda *Ascomycetes* (mješinarke) imaju dobro razvijen višestanični micelij, a u svakoj stanici se može nalaziti jedna ili više jezgara. Pomoću hifa iz okoline uzimaju hranu apsorpcijom ili osmozom. *C. parasitica* je invazivni biljni patogen (Ježić i sur., 2011) koji od domaćina uzima hranu za svoje životne potrebe, ne uzvraćajući nikakvu korist domaćinu.

Razmnožavanje askomiceta je spolno i nespolno (Slika 14). Nespolno razmnožavanje vrši se pomoću konidija i služi za širenje parazita tijekom vegetacije. Kod spolnog razmnožavanja, *C. parasitica* je dvodomna (heterotalična) gljiva kod koje se samooplodnja često događa u prirodnim populacijama. U laboratorijskim uvjetima rijetko dolazi do samooplodnje, a sama gljiva se ponaša kao da je takav oblik oplodnje nemoguć zbog spolne nekompatibilnosti gameta (Montenegro i sur., 2008). Spolna nekompatibilnost gameta se kontrolira uz pomoć jednog bialelnog reprodukcijskog lokusa MAT, na kojem mogu biti dva alela MAT-1-1 ili MAT-1-2 (Marra i Milgroom, 2001; Montenegro i sur., 2008). Razmnožavanje je uspješno samo između izolata gljive koji sadrže različite MAT alele (Montenegro i sur., 2008).

Za spolno razmnožavanje, ove gljive stvaraju spolne stanice: anteridij (muška) i askogonij (ženska). Svaka ova stanica je haploidna. Prilikom spajanja anteridija i askogonija prvo dolazi do **plazmogamije**, odnosno stapanja plazmi stanica bez spajanja jezgara. Rezultat plazmogamije je 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). Ova se diploidna jezgra odmah dijeli: prva dioba je mejoza (I i II mejotička dioba), čime nastanu 4 haploidne jezgre koje se zatim podijele mitozom (dvije mitotičke diobe). Konačno, 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. Kod različitih se gljiva askospore mogu razlikovati po veličini, boji, obliku, broju stanica i slično. Askospore su endogene spore (nastaju unutar askusa). Da bi se mogle širiti i izvršiti zarazu, moraju se osloboditi iz askusa.

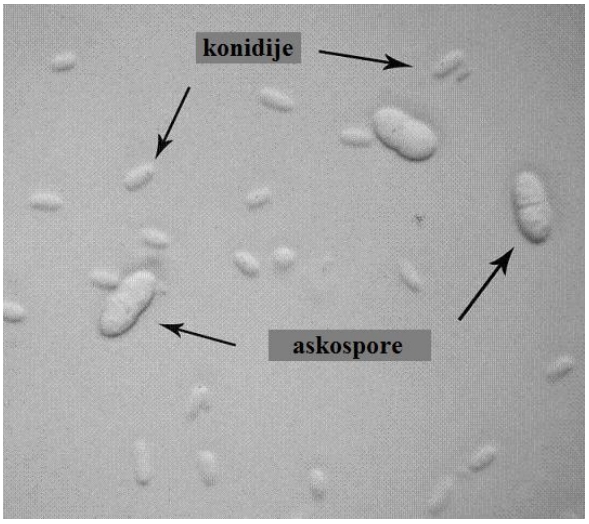


Slika 14. Razvojni ciklus razmnožavanja gljiva iz razreda *Ascomycetes*
(Modificirana slika, Web 7)

Oslobađanje askospora događa se na dva načina:

1. Kada su askospore fiziološki zrele, opna askusa upija vodu iz okolne sredine. Uslijed toga, na pojedinim mjestima dolazi do razgradnje opne koja se pretvara u želatinoznu masu. Tako na askusu nastaju otvori kroz koje istječe sadržaj askusa zajedno s askosporama. Na ovaj način oslobođene askospore (Slika 15) šire se vodom ili kukcima (Ježić i sur., 2011).
2. Plazma unutar askusa zove se epiplazma. Ona pored ostalih tvari sadrži glikogen. Kada su askospore zrele, vodu iz vanjske sredine upija epiplazma. Uslijed toga, dolazi do promjena u epiplazmi i do transformacije glikogena u saharozu. Tako se povećava osmotski tlak u askusu. Opna askusa rasteže se do određene mjere, a kada tlak u askusu postane veći nego što opna može izdržati, ona puca, obično u vršnom dijelu.

Zbog naglog izjednačavanja tlaka u askusu s atmosferskim tlakom, askospore bivaju izbačene i šire se zrakom.



Slika 15. Konidije i askospore u gljive *C. parasitica*
(Web 8)

Askusi s askosporama mogu nastati pojedinačno ili više askusa koji čine himenij. Između pojedinih askusa u himeniju razvijaju se izdužene sterilne stanice - parafize. Smatra se da one pomažu razvoj askusa i askospora. Askusi se mogu razviti izravno na miceliju ili u posebnim plodonosnim tijelima. Plodonosna tijela razvijaju se istovremeno kada i askusi i rezultat su spolne oplodnje. Plodišta mogu nastati pojedinačno ili u grupama, mogu biti smještena u biljnom tkivu ili na njegovoj površini.

1.5. Terapijska pasta za liječenje bolesnih stabala pitomog kestena

Inokulacija je tehnika kojom se gljiva unosi u živi organizam, odnosno stablo pitomog kestena zaraženo rakom kore. Prije samog unosa terapijske paste pripremljene od hipovirulentnog izolata gljive *C. parasitica* bušilicom se naprave rupe u deblu. Visina na kojoj se buše rupe je otprilike 50 cm od tla. u otvore se pomoću špatule ili skalpela stavlja prethodno pripremljena terapijska pasta od hipovirulentnih izolata (Lee i sur., 1992; Heiniger i Rigling, 1994; Schalfleitner i Wilhelm, 1997; Robin i sur., 2010).

Površina se zatvara samoljepivom trakom ili voćarskim voskom kako bi se spriječilo brzo sušenje (Slika 16). U svrhu sprječavanja kontaminacije, stablo se prije bušenja naprska 90%-tnim etanolom, kao i bušilica i pribor kojim se terapijska pasta inokulirala (Sotirovski i sur., 2011).



Slika 16. Izgled stabla pitomog kestena nakon postupka inokulacije terapijskom pastom
(Slika doc. dr. sc. Ljiljana Krstin)

Kada se bočica jednom otvori, sadržaj treba potrošiti i ne koristiti istu terapijsku pastu prilikom slijedeće inokulacije. Nakon određenog vremenskog razdoblja se prati razvoj kalusnog tkiva koje znači oporavak zaraženog stabla kestena.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

- odrediti morfologiju izolata gljive *Cryphonectria parasitica* prikupljenih sa zaraženih stabala na području Lovranštine,
- odrediti tipove vegetativne kompatibilnosti (VC)
- procijeniti zastupljenost VC tipova i mogućnost povećanja broja VC tipova s obzirom na prethodno pronađene VC tipove na području Lovranštine,
- izraditi terapijsku pastu od hipovirulentnih izolata kojom će se inokulirati zaražena stabla pitomog kestena s ciljem oporavka od bolesti

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

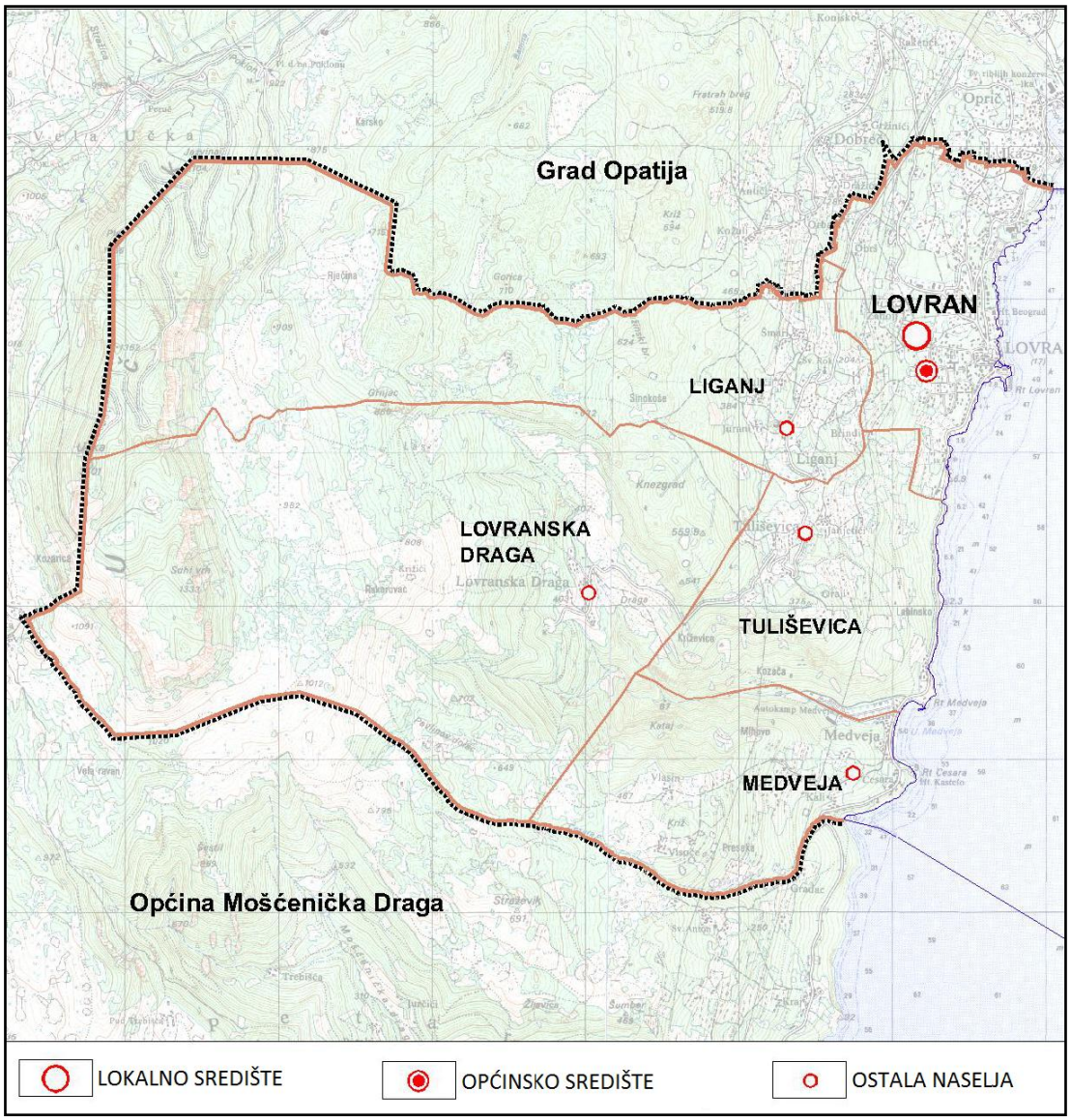
Općina Lovran se nalazi na istočnoj obali Istre u Kvarnerskom zaljevu. Susjedna područja čine: na sjeveru – Grad Opatija, na jugu – Općina Mošćenička Draga, zapadno se proteže prostor Istarske županije, a na istoku graniči sa područjem Grada Rijeke. Područje Općine Lovran zauzima površinu od 20,82 km^2 ili 2082,00 ha na kopnu, što čini oko 42% ukupne površine općine. Općina Lovran u svom sastavu ima 5 naselja - Lovran, Liganj, Lovranska Draga, Medveja i Tuliševica (Slika 17), u kojima prema popisu stanovništva iz 2011. godine živi 4056 stanovnika. Općinsko i lokalno središte je u najvećem i najpoznatijem naselju Lovran.

Samo naselje Lovran dobilo je naziv po lovoru (*Laurus nobilis* L.), kojega se može naći u obilju u samome mjestu i široj okolici. Očuvanost i bogatstvo prirodnih posebnosti Općine Lovran očituje se u očuvanim šumskim i livadnim zajednicama, planinskoj flori, flornim raritetima, djelomično bogatoj i različitoj fauni, te mnogobrojnim krškim pojavama. Biološka raznolikost, uz reljef i visinske razlike, uvjetovala je i krajobraznu raznolikost koja se u vertikalnom rasporedu izmjenjuje od obale mora sve do grebena Učke**.** Lovran je smješten na specifičnom mikroklimatskom području određenom istovremenom blizinom mora i planina.

Područje Lovranštine prostire se na relativno strmim padinama 1396 m visokog planinskog masiva Učke, najzelenije i vegetacijom najbogatije planine na Jadranu. Osim Parkom prirode Učka, Lovran je okružen planinama Snježnik (1605 m) i Risnjak (1528 m), a s morske strane otocima (Krk, Cres) te je položajem izvanredno zaštićen od vjetrova**.**

Lovran se nalazi na mjestu gdje Jadransko more zalazi najdublje u kopno Središnje Europe i gdje se susreću kontinentalna i mediteranska klima. Prosječna ljetna temperatura zraka od 21,7°C čini Lovran izuzetno ugodnim za ljetnih sparina, a srednja zimska temperatura zraka od 7°C donosi veoma blage zimske dane. Prosječna godišnja temperatura iznosi 14°C. Posebno je zanimljivo dnevno kretanje temperature na koje utječe vjetar koji se predvečer "spušta" s Učke i rashlađuje obalno područje. Strmo morsko dno i prilično velika dubina mora, kao i podvodni izvori imaju za posljedicu relativno nižu temperaturu mora, koja se kreće između 20,1°C i 26,5°C tijekom ljetne sezone, dok je u zimskim mjesecima zabilježena temperatura od minimalnih 9°C.

Lovran godišnje ima 2074 sunčanih sati, od toga u ljetnim mjesecima preko 1000 sati i prosječnu količinu padalina od 1723 mm. Unatoč relativno kraćoj insolaciji, prednost područja je zaštićenost od jačeg utjecaja vjetrova sjevernog kvadranta**.** Položaj na moru, s veoma visokim otokom Cresom u blizini, utječe na razvoj specifične klime sa visokim brojem sunčanih dana u godini i relativno malom količinom padalina. Vjetrovi karakteristični za ovaj kraj su bura koja donosi suho i sunčano vrijeme, jugo s kišovitim i vlažnim vremenom, te blagi maestral s mora zahvaljujući kojem su ljetni dani bez sparine i visoke vlage.



Slika 17. Karta općine Lovran

(Modificirana slika, Web 9)

Uski obalni pojas slabo je razveden što je odraz tektonskog djelovanja i mikroklimatskih uvjeta koji vladaju na tom području. Reljefna razgranjenost padina gorja uz visinske, klimatske i druge faktore pogodovala je i razvoju različitih šumskih zajednica. Neposredno u uskom obalnom pojasu s toplijom klimom zastupljena je autohtona zajednica hrasta crnike i crnog jasena koja se ovdje javlja u vidu pojedinačnih stabala.

Iznad obalnog pojasa mora (od 200 - 400 m/nv) pridolazi zajednica hrasta medunca i graba na koju se nadovezuje uski pojas šume pitomog kestena. Na visinama iznad 800 m rastu bukva, bor i crnika. Specifične mikroklimatske prilike omogućile su da bogato uspijeva sva mediteranska vegetacija i raslinje. Tako u izobilju uz samu obalu raste lovor, palma, magnolija, razne vrste zimzelenih grmova, hrast medunac, pinije i čempresi. Iznad Lovrana na terasasto položenim vrtovima odlično uspijevaju trešnje, vinova loza i masline, a na dubokim, ispranim i zakiseljenim tlima obilno rastu šume pitomih kestena, čuvenih lovranskih maruna.

Obilje vegetacije, te visoka koncentracija soli u moru, do 37,8 ‰, rezultiraju bogatim biljnim i morskim aerosolom, što već više od stotinu godine čini Lovran područjem privlačnim za odmor i liječenje. Danas je ovo područje potpuno orijentirano na turizam i prateće djelatnosti u funkciji turizma (ugostiteljstvo, trgovina, kultura, zanatstvo), ali i unapređenje tradicionalnih djelatnosti (poljodjelstvo, ribarstvo, stočarstvo).

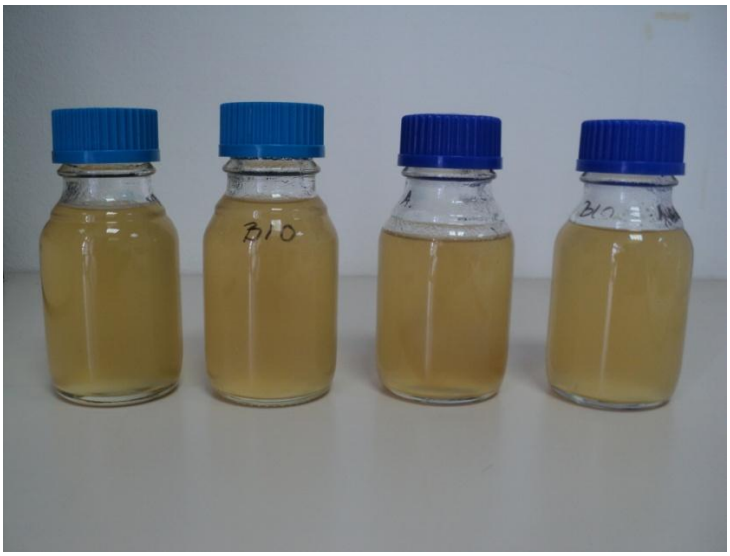
3.2. Uzorkovanje na terenu

Istraživanje je provedeno na području Lovranštine u sastojinama pitomog kestena zaraženog fitopatogenom gljivom *C. parasitica* (Murrill) Barr. Prikupljanje i izolaciju uzoraka je obavila prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica u suradnji s kolegama sa Šumarskog fakulteta u Zagrebu.

3.3. Laboratorijska obrada uzoraka

3.3.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj kultura gljive *Cryphonectria parasitica*

Izolirane kulture gljive *C. parasitica* su uzgajane na hranjivoj krumpirovoj podlozi (engl. PDA – *Potato Dextrose Agar*, Biolife) u Petrijevim posudicama. Agar je prethodno pripremljen prema uputama proizvođača na način da se 42 g PDA resuspendira u 1 L vode i kuha otprilike pola sata, odnosno do vrenja. Nakon kuhanja, agar izlijemo u staklene Schottove boce otporne na visoke temperature prilikom postupka sterilizacije koji potom slijedi (Slika 18).



Slika 18. Hranjiva PDA podloga raspoređena u staklene Schottove boce

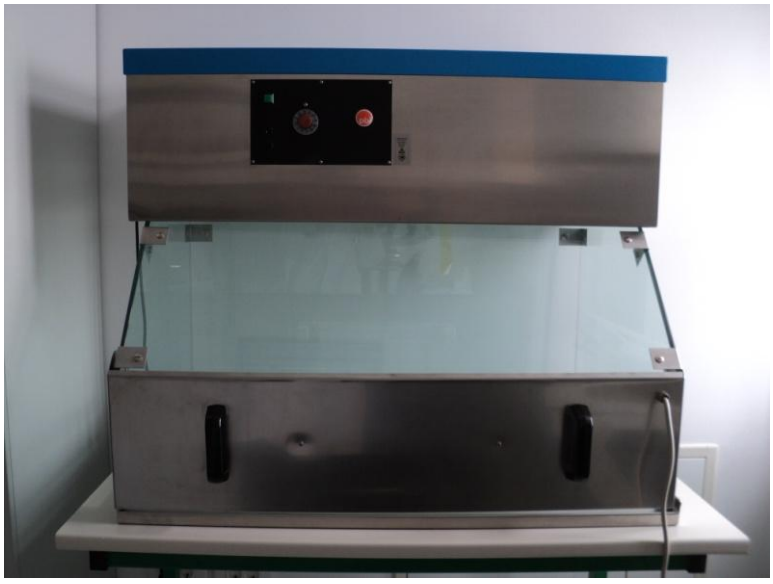
Sterilizacija agara je provedena u autoklavu (Sutjeska) na temperaturi 121°C, tlaku 1,5 atmosfere u trajanju 20 min. Autoklav je hermetički zatvoren uređaj, izrađen od čelika, a sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog plašta između kojih je prostor ispunjen parom pod tlakom. Sterilizacija vlažnom toplinom je najpogodniji način za materijale koji dobro podnose visoke temperature, a određena je temperaturom, tlakom vodene pare i vremenom. Na isti način je

provedena sterilizacija pribora i posuđa. 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.

Sterilizirani agar se izlijeva u sterilne plastične Petrijeve posudice (Medicplast; promjer 6 ili 9 cm) do visine od otprilike 5 mm. Vrlo je bitno da se podloga ohladi i stvrdne kako bi se mogli nasaditi izolati gljive, te je stoga najbolje ostaviti posudice preko noći kako bi se podloga stvrdnula i koristiti ih tek slijedeći dan.

Nasađivanje se odvijalo unutar laminara (PB International; volt 220~Hz 50/60) koji je prethodno dezinficiran sa 70%-tnim etanolom. Laminar je uređaj s protokom čistog zraka koji se koristi za zaštitu od kontaminacije pri rukovanju s kulturama stanica (Slika 19).

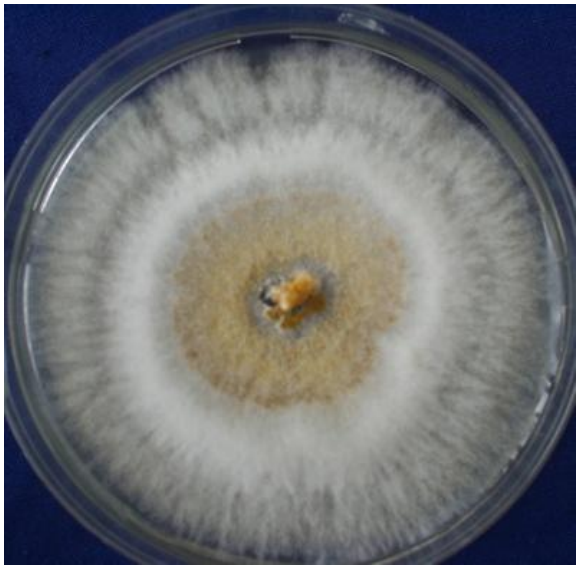
Unutar laminara su izolati gljive izrezivani pomoću skalpela na komadiće dimenzije 0,5×0,5×0,5 cm i nasađivani na hranjivu podlogu. Skalpel je prije svake upotrebe potrebno dezinficirati u 70%-tnom etanolu i flambirati nekoliko sekundi na špiritnoj lampi. Izrezani uzorak se postavlja tako da je micelij gljive u dodiru s podlogom kako bi gljiva brže prorasla. Izolati se nakon toga inkubiraju sedam dana u mraku, na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do rasta micelija. Kada je micelij prorastao, uzorci se izlažu dodatnih sedam dana na danje svjetlo kako bi došlo do sporulacije.



Slika 19. Laminar PB International

3.3.2. Određivanje morfologije izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Nakon što su izolati inkubirani sedam dana na svjetlu i sobnoj temperaturi, određuje se morfologija. Uslijed zaraze gljive *C. parasitica* hipovirusom dolazi do smanjenja patogenog učinka na biljnu populaciju, pri čemu su uočene i promjene morfologije gljive. Micelij hipovirulentnih sojeva je najčešće bijele boje, a može biti i blijedo žućkast do blijedo narančast zbog smanjene produkcije pigmenata (Slika 20). Takvi izolati su zaraženi europskim hipovirusom (CHV – 1) i imaju vrlo malo piknida. Virulentni sojevi imaju izrazito žut ili narančast micelij zbog sporulacije (Slika 21).



Slika 20. Hipovirulentni izolat

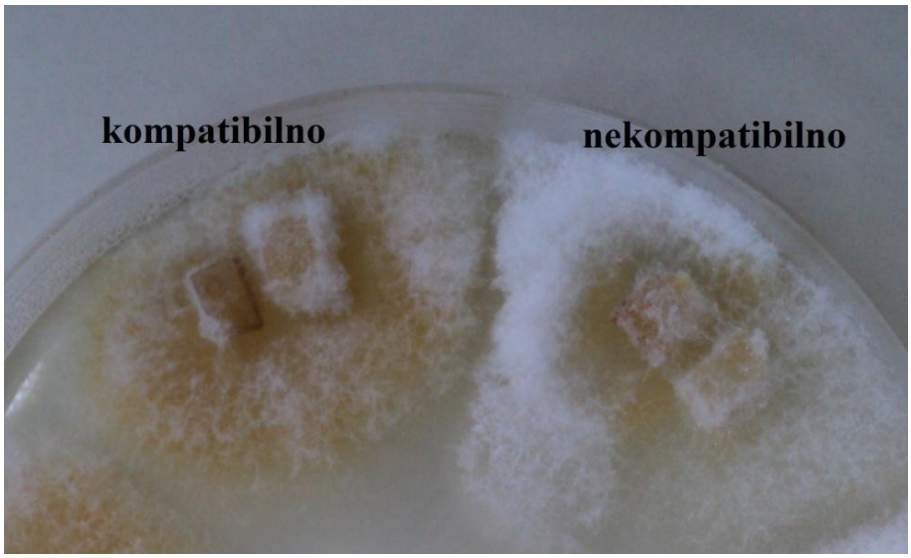


Slika 21. Virulentni izolat

(Nastavni materijali doc. dr. sc. Ljiljane Krstin)

3.3.3. Test vegetativne kompatibilnosti (VC - test)

U razdoblju od travnja 2011. godine do veljače 2012. godine su provedeni testovi određivanja vegetativne kompatibilnosti (VC). VC-test se temelji na praćenju pojave anastomoze hifa između dva kompatibilna uzorka , što znači da oba uzorka imaju identične alele na svih šest vegetativno inkompatibilnih (vic) lokusa pri čemu je moguć prijenos hipovirusne dsRNA. Baražna linija (linija odvajanja) i/ili linije piknida se pojavljuje kod dva međusobno nekompatibilna uzorka, pri čemu je prijenos dsRNA moguć, ali vrlo rijetko (Slika 22).

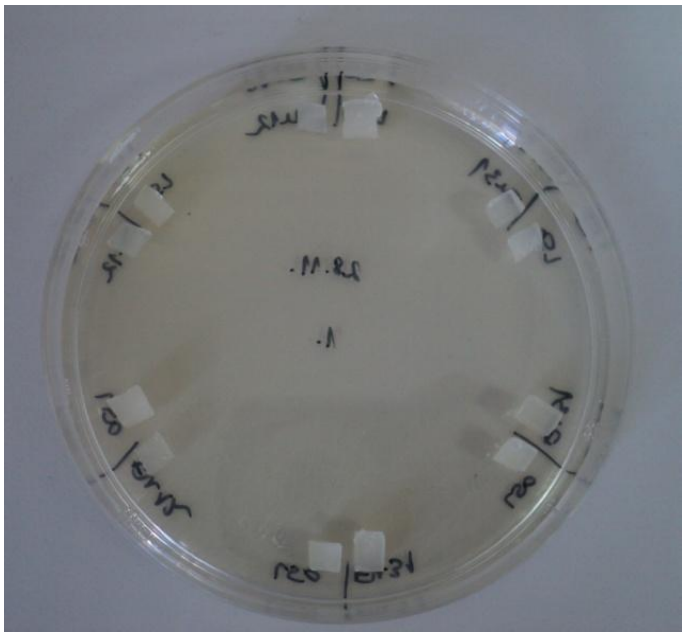


Slika 22. Primjer kompatibilnosti i nekompatibilnosti između dva uzorka gljive

Izolati gljive su testirani međusobno, a nakon toga sa standardnim europskim VC tipovima iz setova EU-1 do EU-31, te EU-32 do EU-64. Nakon što je između dva uzorka potvrđena kompatibilnost, testiranje se ponavlja u triplikatu kako bi se utvrdila točnost rezultata. Sva testiranja su rađena u laminaru koji je prethodno dezinficiran 70%-tnim etanolom. Uzorci koji se testiraju se postavljaju na hranjivu krumpirovu podlogu

Za VC-test su korištene dvije različite metode:

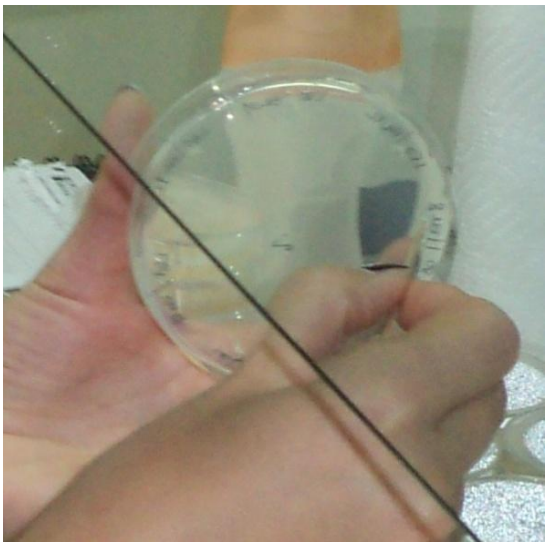
1. U prvom postupku je korišten skalpel kojim se svježi micelij reže na komadiće dimenzije 0,5×0,5×0,5 cm. Prije svake upotrebe, skalpel je dezinficiran u 70% - tnom etanolu i flambiran na špiritnoj lampi. Ukoliko se više puta izrezuje isti uzorak, skalpel nije potrebno dezinficirati. Uzorak se postavlja na način da je micelij gljive u dodiru s hranjivom podlogom i udaljen od ruba Petrijeve posudice 3 – 5 mm. Dva uzorka su međusobno udaljena 2 – 3 mm. U Petrijevoj posudici promjera 9 cm se može testirati 6 parova uzoraka (Slika 23), a u malim posudicama promjera 6 cm se mogu testirati 3 para. Radi lakšeg praćenja uzoraka, na posudicu se napišu oznake uzoraka i datum testiranja. Po završetku nanošenja uzoraka na podlogu, Petrijeva posudica se ovije parafilmom („M" parafilm), da bi se spriječila moguća kontaminacija. Prilikom testiranja većeg broja uzoraka, dobro je Petrijeve posudice numerirati radi lakšeg snalaženja pri očitavanju rezultata.



Slika 23. Izgled Petrijeve posudice prilikom VC testa
(metoda izrezivanja micelija skalpelom)

2. U drugom postupku se koriste čačkalice koje su prethodno sterilizirane u autoklavu (Sutjeska) na temperaturi 121°C, tlaku 1,5 atmosfere u trajanju 20 min. Vrhom čačkalice se zagrebe površina micelija, te se lagano zabode u podlogu kako bi se prenijele spore (Slika 24). Udaljenost od ruba treba biti 3 – 5 mm, a međusobna

udaljenost dva uzorka 2-3 mm. Nakon nanošenja uzorka, čačkalica se odlaže u posudu predviđenu za to i više ne koristi. Isti uzorak se nanosi jednom čačkalicom. Kao i u prvom postupku, na Petrijevu posudicu se napišu oznake uzoraka i datum, te se zatvori parafilmom.



Slika 24. Izvođenje VC-testa uporabom sterilnih čačkalica

Uzorci se inkubiraju sedam dana u tami na sobnoj temperaturi, a nakon toga se sedam dana izlažu danjem svjetlu. Rezultati se očitavaju golim okom. Dužim stajanjem na zraku, izolati su bili izloženi kontaminaciji mikroorganizmima kao što su plijesni i bakterije (Slika 25), što uvelike otežava očitavanje rezultata. Rezultate je najbolje očitati dva puta, nakon 7. i 12. dana od početka VC – testa.



Slika 25. Kontaminacija izolata

3.3.4. Pohrana i obnova svježe kulture gljive *C. parasitica*

Izolate gljive *C. parasitica* moguće je sačuvati duži vremenski period. Od postojećeg micelija se režu 3 – 4 komadića agara dimenzija 0,5×0,5 cm. Micelij se stavlja u Eppendorf epruvete (1,5 i 0,5 mL) prethodno napunjene 22% - tnim sterilnim glicerolom i pohranjuje u hladnjak na temperaturu - 20°C (Slika 26).

Ukoliko želimo ponovno uzgojiti određeni uzorak gljive, dovoljno je uz pomoć sterilnog skalpela izvaditi komadić micelija iz glicerola i nasaditi ga na hranjivu krumpirovu podlogu.



Slika 26. Eppendorf epruvete sa svježim micelijem i glicerolom pripremljene za pohranjivanje na -20°C

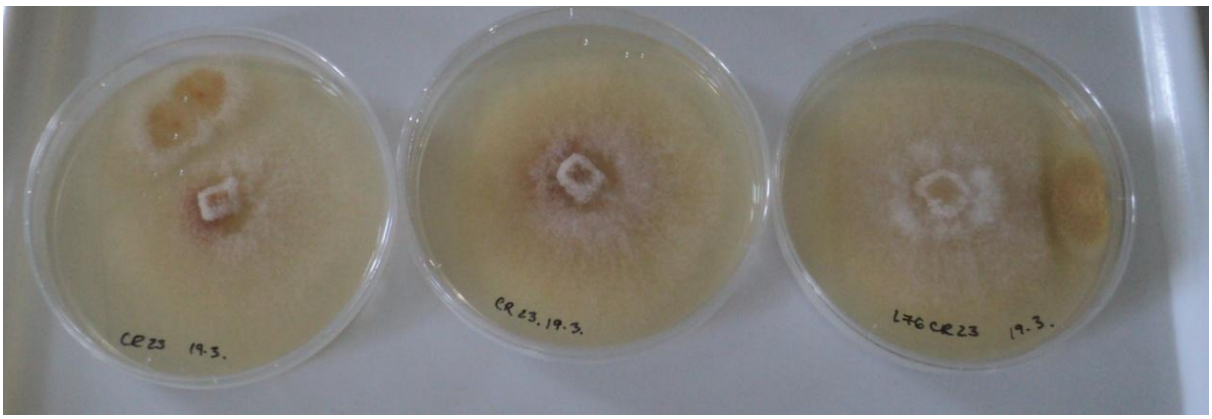
3.3.5. Izrada terapijske paste

Za što uspješniju biološku kontrolu je potrebno unijeti CHV-1 u različite tipove gljiva, odnosno inokulirati oboljela stabla pitomog kestena na kojima je zapažen rak kore.

Postupak pripreme terapijske paste

1. **Dan : Priprema hipovirulentnih uzoraka**

Hipovirulentni uzorak bijele morfologije, kojemu je prethodno određen VC-tip, precijepi se na PDA hranjivu podlogu u tri Petrijeve posudice promjera 6 cm. Izolati rastu pet dana u tami na sobnoj temperaturi (Slika 27).



Slika 27. Hipovirulentni izolati za pripremu terapijske paste

4. Dan: Priprema KYG – otopine

Pripremi KYG – otopine prethodi priprema Knopove otopinu. Soli navedene u tablici 1. je potrebno izvagati i otopiti u 2 L destilirane vode, te promiješati 15 minuta na magnetskoj mješalici.

Tablica 1. Kemikalije potrebne za pripremu 2 L Knopove otopine

Naziv kemikalije i formula	Masa (g)
Kalcijev nitrat, $Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	16,11
Kalijev nitrat, KNO_3	4,04
Magnezijev sulfat, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	4,02
Kalijev fosfat, KH_2PO_4	4,03

Za jedan hipovirulentni uzorak potrebno je pripremiti dvije tikvice volumena 2 L. U jednu tikvicu se odvaže 16 g D – glukoze (D+ glucosa monohidrate, Fluka) i 4 g ekstrakta kvasca (yeast extract bacto, Difco). Nakon toga, u tikvicu se ulije 80 mL Knopove otopine koja je prethodno pripremljena i čuvana do upotrebe u mraku na sobnoj temperaturi.

Osim Knopove otopine, u tikvicu se doda 8 kapi 1%- tnog $FeCl_3$ i 800 mL vode, te se stavi na magnetsku mješalicu 15 minuta. Nakon toga, tikvica s pripremljenom KYG – otopinom se zatvori s vatenim čepom preko kojega se stavi aluminijska folija i sterilizira u autoklavu. Za svaki izolat se autoklaviraju posuda volumena 1L i graduirana čaša volumena 200 mL, prekriveni aluminijskom folijom, te jedna Schott – ova boca volumena 250 mL s poklopcem u koju se prethodno ulije 200 mL destilirane vode. Postupak autoklaviranja je isti kao i za ostali pribor i posuđe – 20 minuta na temperaturi 120°C i tlaku 1,2 bara.

5. Dan: Priprema inokuluma

Nakon što su tri hipovirulentna uzorka gljive prorasla na hranjivoj podlozi u mraku, petog dana se uzima svježi micelij i reže pomoću skalpela na sitne komade (Slika 28).



Slika 28. Izrezivanje hipovirulentnog izolata pomoću skalpela

Kockice izrezanog micelija stavimo u prethodno autoklaviranu posudu volumena 1 L. Bitno je napomenuti da staru kockicu micelija ne stavljamo u posudu, već samo svježi micelij.

Iz autoklavirane Schottove boce se ulije 100 mL destilirane vode i sve zajedno homogenizira pomoću štapnog miksera dva puta po petnaest sekundi (Slika 29).



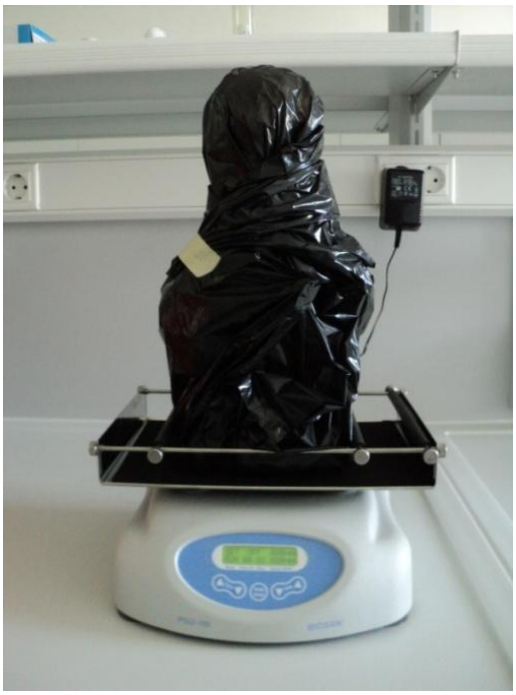
Slika 29. Homogenizacija hipovirulentnog micelija i destilirane vode

U praznu autoklaviranu čašu volumena 200 mL se iz posude izlije 100 mL homogenizirane smjese i ulije u tikvicu u kojoj se nalazi prethodno pripremljena KYG – otopina (Slika 30).



Slika 30. KYG otopina karakteristične žuto – smeđe boje

Drugih 100 mL se izlije u drugu tikvicu s KYG – otopinom. Tikvice s kulturom se zatvore vatenim čepom i aluminijskom folijom, te se prekriju crnom folijom i inkubiraju u tami pet dana pri temperaturi 25°C na mješalici pri 80 rpm (Slika 31).



Slika 31. Inkubacija kulture u tami na mješalici

10. Dan: Filtriranje tekuće kulture

Tikvice s izraslim tekućim kulturama se stavljaju u digestor, te se kulture pojedinačno filtriraju pomoću vakuuma. Korišten je cilindrični, porculanski Büchnerov lijevak s perforiranim dnom na koje se postavlja filter papir promjera 5 cm (Slika 32). Kultura se izlijeva iz tikvice u lijevak, pri čemu nije potrebno strugati osušeni dio kulture sa stijenki tikvice.



Slika 32. Pribor za filtriranje tekuće kulture

Nakon što je tekući dio kulture iscurio, talog zaostao na filter papiru uzimamo pomoću špatule i stavljamo u autoklaviranu Schottovu bocu ili neku drugu bocu predviđenu za to (Slika 33). Terapijsku pastu je najbolje čuvati na temperaturi 4°C, ne duže od 2 mjeseca.

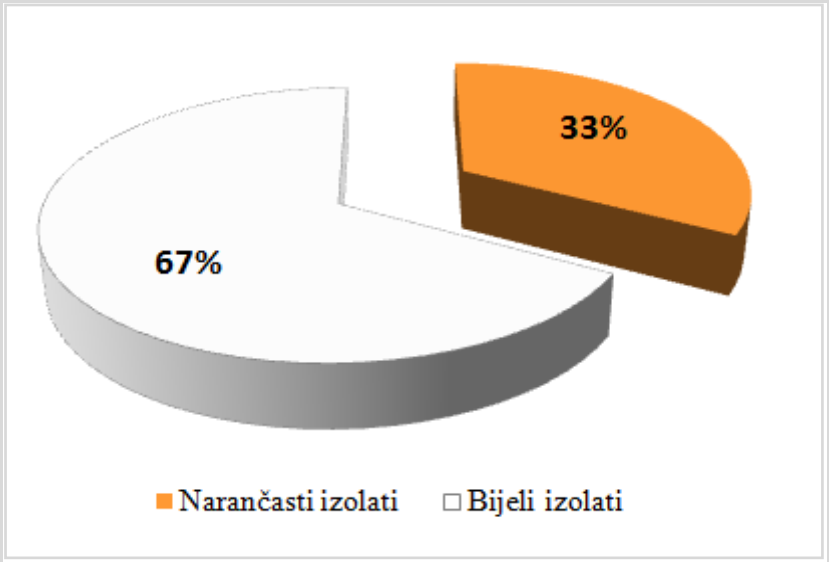


Slika 33. Odvajanje terapijske paste i pohrana u Schottovu bocu

4. REZULTATI

4.1. Morfologija izolata gljive *C. parasitica* na području Lovrana

Analizom morfoloških karakteristika dvanaest izolata gljive *Cryphonectria parasitica*, prikupljenih u sastojinama pitomog kestena na području Lovrana određeno je osam bijelih i četiri narančasta izolata. Karakteristična bijela boja micelija označava hipovirulentni izolat, a ukupna zastupljenost bijelih izolata na području Lovrana iznosi 67%. Smanjena produkcija narančastog pigmenta kod zaraze sa CHV – 1 koristan je marker pri identifikaciji zaraženih izolata gljive *Cryphonectria parasitica.* Virulentni izolati su žute do narančaste boje i karakterizira ih jaka sporulacija. Ukupno ih je 33 % na području Lovrana (Slika 34). Izolati prijazne morfologije nisu utvrđeni.



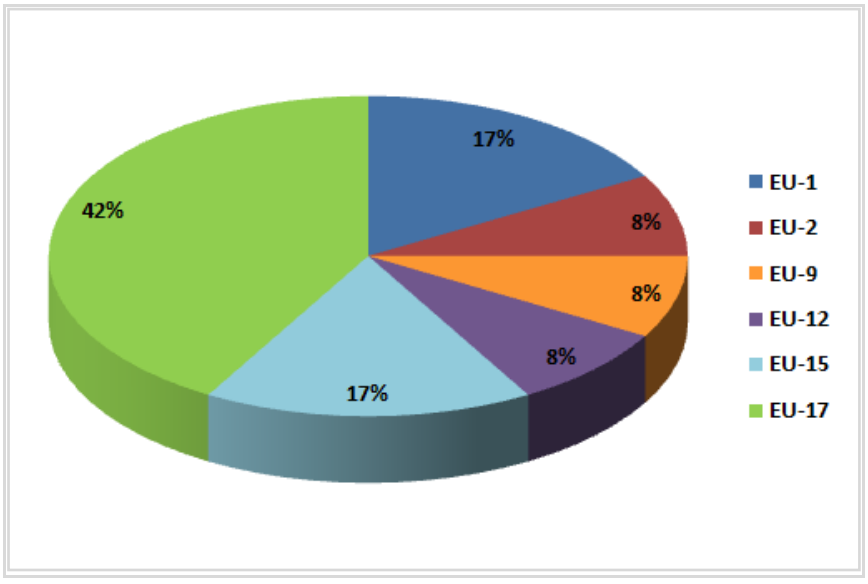
Slika 34. Udio bijelih i narančastih izolata gljive *C. parasitica* na području Lovrana.

4.2. Raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica* na području Lovrana

Raznolikost VC tipova 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. Stoga je bilo teško razlučiti tipove vegetativne kompatibilnosti koji se javljaju na području Lovrana. Rezultati su u nekim slučajevima bili proturječni. Događalo se da je uzorak A kompatibilan s uzorkom B, a uzorak B kompatibilan s uzorkom C, no uzorci A i C su međusobno bili nekompatibilni. Takvi uzorci nisu uzimani u statistiku podataka. Nakon što je između dva uzorka potvrđena kompatibilnost, testiranje se ponavlja u triplikatu kako bi se utvrdila točnost rezultata. Izolati su smatrani kompatibilni kada bi im se miceliji spojili, odnosno prorasle hife. Kod nekompatibilnih izolata se pojavila baražna linija i/ili linija piknida. Dodatan čimbenik koji je od pomoći prilikom potvrde nekompatibilnosti je pojava tamne crte na granici dva izolata kada je Petrijeva posudica okrenuta naopako.

Od ukupno 12 izolata gljive *C. parasitica* prikupljenih na području Lovrana, testovima vegetativne kompatibilnosti je određeno 6 različitih VC tipova (Slika 35). Najzastupljeniji VC tip na istraživanom području je EU - 17 (41,67%). Drugi po učestalosti su VC tipovi EU - 1 i EU - 15 (oba 16,67%), te s najmanjim udjelom VC tipovi EU - 2, EU - 9 i EU - 12 (svi 8,33%).



Slika 35. Zastupljenost VC tipova na području Lovrana

Tablica 2. Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za 31 europski VC tip (prema Cortesi i Milgroom 1998). Plavo označeni VC tipovi su pronađeni u sastojinama pitomog kestena na području Lovranštine.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic* *1***	**Alel na lokusu *vic* *2***	**Alel na lokusu *vic* *3***	**Alel na lokusu *vic* *4***	**Alel na lokusu *vic* *6***	**Alel na lokusu *vic* *7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-4	1	1	1	2	2	2
EU-5	2	2	1	1	2	2
EU-6	2	1	1	1	2	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-8	1	1	1	2	2	1
EU-9	2	1	1	1	1	1
EU-10	2	1	2	2	1	1
EU-11	1	2	1	2	1	1
EU-12	1	1	1	2	1	1
EU-13	1	2	1	1	1	1
EU-14	2	1	1	2	1	2
EU-15	2	2	1	1	1	1
EU-16	2	1	1	1	2	1
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-18	2	2	1	1	2	1
EU-19	1	2	1	1	2	1
EU-20	1	1	1	1	2	2
EU-21	2	2	1	1	1	2
EU-22	2	1	1	2	2	1
EU-23	2	1	1	1	1	2
EU-24	1	2	1	1	1	2
EU-25	1	2	1	2	2	1
EU-26	1	2	1	2	2	2
EU-27	1	1	1	1	1	2
EU-28	2	2	1	2	1	1
EU-29	1	1	1	2	1	2
EU-30	1	2	1	2	1	2
EU-31	1	2	1	1	2	2

Svi uzorkovani izolati gljive *C. parasitica* pripadaju standardnim europskim VC tipovima unutar seta EU - 1 do EU - 31. Za njih su poznati aleli na svih šest *vic* lokusa što omogućuje praćenje mogućih križanja između različitih kompatibilnih izolata (Tablica 2).
S obzirom da je u populacijama Antići i Liganj utvrđen samo po jedan VC tip za svaku populaciju, ne možemo znati koji VC tipovi mogu nastati, ali je pretpostavka da bi se daljnjim istraživanjem utvrdilo još VC tipova jer je prethodno zabilježena velika raznolikost VC tipova na tom području.

Unutar populacije Ivulići su zabilježena tri europska VC tipa: EU - 1, EU - 15 i EU - 17. Aleli im se razlikuju na četiri *vic* lokusa (*vic 2, vic 4, vic 6* i *vic 7*) (Tablica 3). Međusobnim križanjem ovih VC tipova mogu nastati novi VC tipovi. Križanjem VC tipova EU-1 i EU-15 može nastati čak šest novih VC tipova s obzirom da im se razlikuju aleli na tri *vic* lokusa (Tablica 4). U Tablici 5 su prikazani VC tipovi koji mogu nastati križanjem EU-1 i EU-17. VC tipovi EU-15 i EU-17 imaju različite alele na samo dva *vic* lokusa, što smanjuje raznolikost nastanka novih VC tipova. Njihovim križanjem mogu nastati samo EU-9 i EU-28 (Tablica 6).

Tablica 3. Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za VC tipove pronađene u populaciji Ivulići. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic 1***	**Alel na lokusu *vic 2***	**Alel na lokusu *vic 3***	**Alel na lokusu *vic 4***	**Alel na lokusu *vic 6***	**Alel na lokusu *vic 7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-15	2	2	1	1	1	1
EU-17	2	1	1	2	1	1

Tablica 4. Križanjem VC tipova EU-1 i EU-15 u populaciji Ivulići mogu nastati novi VC tipovi prikazani u tablici. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic* *1***	**Alel na lokusu *vic* *2***	**Alel na lokusu *vic* *3***	**Alel na lokusu *vic* *4***	**Alel na lokusu *vic* *6***	**Alel na lokusu *vic* *7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-15	2	2	1	1	1	1
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-5	2	2	1	1	2	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-18	2	2	1	1	2	1
EU-21	2	2	1	1	1	2
EU-28	2	2	1	2	1	1

Tablica 5. Križanjem VC tipova EU-1 i EU-17 u populaciji Ivulići mogu nastati novi VC tipovi prikazani u tablici. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic* *1***	**Alel na lokusu *vic* *2***	**Alel na lokusu *vic* *3***	**Alel na lokusu *vic* *4***	**Alel na lokusu *vic* *6***	**Alel na lokusu *vic* *7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-14	2	1	1	2	1	2
EU-22	2	1	1	2	2	1
EU-28	2	2	1	2	1	1

Tablica 6. Križanjem VC tipova EU-15 i EU-17 u populaciji Ivulići mogu nastati novi VC tipovi prikazani u tablici. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic* *1***	**Alel na lokusu *vic* *2***	**Alel na lokusu *vic* *3***	**Alel na lokusu *vic* *4***	**Alel na lokusu *vic* *6***	**Alel na lokusu *vic* *7***
EU-15	2	2	1	1	1	1
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-9	2	1	1	1	1	1
EU-28	2	2	1	2	1	1

U populaciji Dobreć su zabilježena tri europska VC tipa: EU-1, EU-2 i EU-12 (Tablica 7). Međusobnim križanjem VC tipova EU-1 i EU-2 neće nastati novi VC tipovi s obzirom da se njihovi aleli razlikuju samo na lokusu *vic 2* (Tablica 8). Međutim, ako uzmemo u obzir sva četiri polimorfna bialelna lokusa, onda uz pretpostavku rekombinacije na svim lokusima (vic 1, vic 2, vic 6 i vic 7) možemo očekivati 2^4=16 VC tipova.

Aleli VC tipova EU-1 i EU-12 se razlikuju na četiri *vic* lokusa što križanjem omogućuje nastanak čak četrnaest novih VC tipova (Tablica 9). Križanjem VC tipova EU-2 i EU-12 mogu nastati novi VC tipovi prikazani u Tablici 10.

Tablica 7. Sastav alela na 6 bialelnih *vic* lokusa za VC tipove pronađene u populaciji Dobreć. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni vic lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic* *1***	**Alel na lokusu *vic* *2***	**Alel na lokusu *vic* *3***	**Alel na lokusu *vic* *4***	**Alel na lokusu *vic* *6***	**Alel na lokusu *vic* *7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-12	1	1	1	2	1	1

Tablica 8. Križanjem VC tipova EU-1 i EU-2 u populaciji Dobreć ne mogu nastati novi VC tipovi. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic 1***	**Alel na lokusu *vic 2***	**Alel na lokusu *vic 3***	**Alel na lokusu *vic 4***	**Alel na lokusu *vic 6***	**Alel na lokusu *vic 7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-2	2	1	1	2	2	2

Tablica 9. Križanjem VC tipova EU-1 i EU-12 u populaciji Dobreć mogu nastati novi VC tipovi prikazani u tablici. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

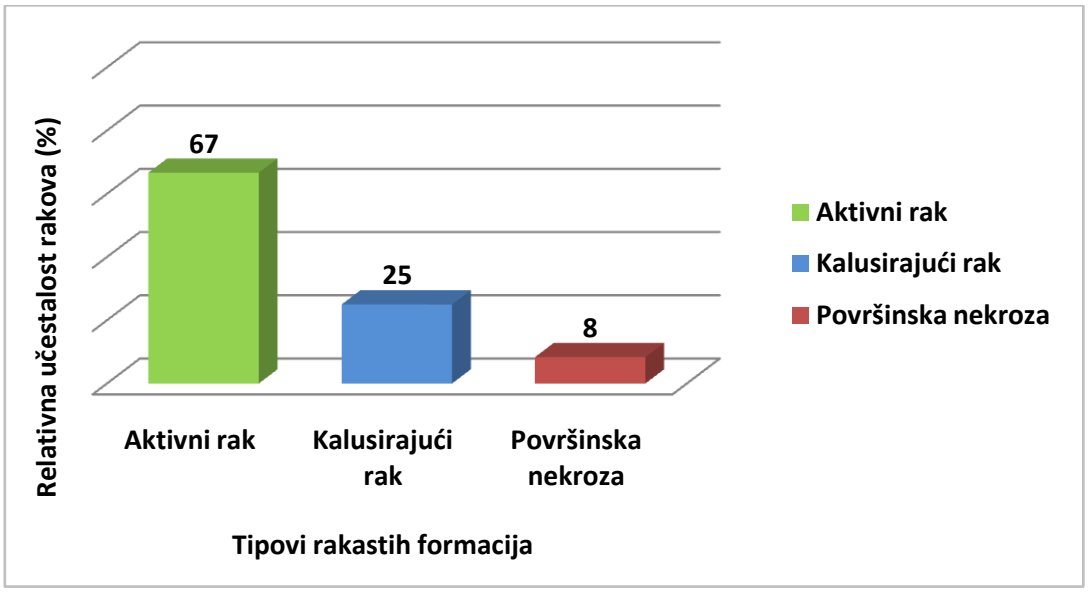
Vc tip	**Alel na lokusu *vic 1***	**Alel na lokusu *vic 2***	**Alel na lokusu *vic 3***	**Alel na lokusu *vic 4***	**Alel na lokusu *vic 6***	**Alel na lokusu *vic 7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-12	1	1	1	2	1	1
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-4	1	1	1	2	2	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-8	1	1	1	2	2	1
EU-11	1	2	1	2	1	1
EU-14	2	1	1	2	1	2
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-22	2	1	1	2	2	1
EU-25	1	2	1	2	2	1
EU-26	1	2	1	2	2	2
EU-28	2	2	1	2	1	1
EU-29	1	1	1	2	1	2
EU-30	1	2	1	2	1	2

Tablica 10. Križanjem VC tipova EU-2 i EU-12 u populaciji Dobreć mogu nastati novi VC tipovi prikazani u tablici. Plavom bojom su označeni jednaki aleli za određeni *vic* lokus, a različiti aleli žutom bojom.

Vc tip	**Alel na lokusu *vic 1***	**Alel na lokusu *vic 2***	**Alel na lokusu *vic 3***	**Alel na lokusu *vic 4***	**Alel na lokusu *vic 6***	**Alel na lokusu *vic 7***
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-12	1	1	1	2	1	1
EU-4	1	1	1	2	2	2
EU-8	1	1	1	2	2	1
EU-14	2	1	1	2	1	2
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-22	2	1	1	2	2	1
EU-29	1	1	1	2	1	2

4.3. Zdravstveno stanje pitomog kestena na području Lovrana

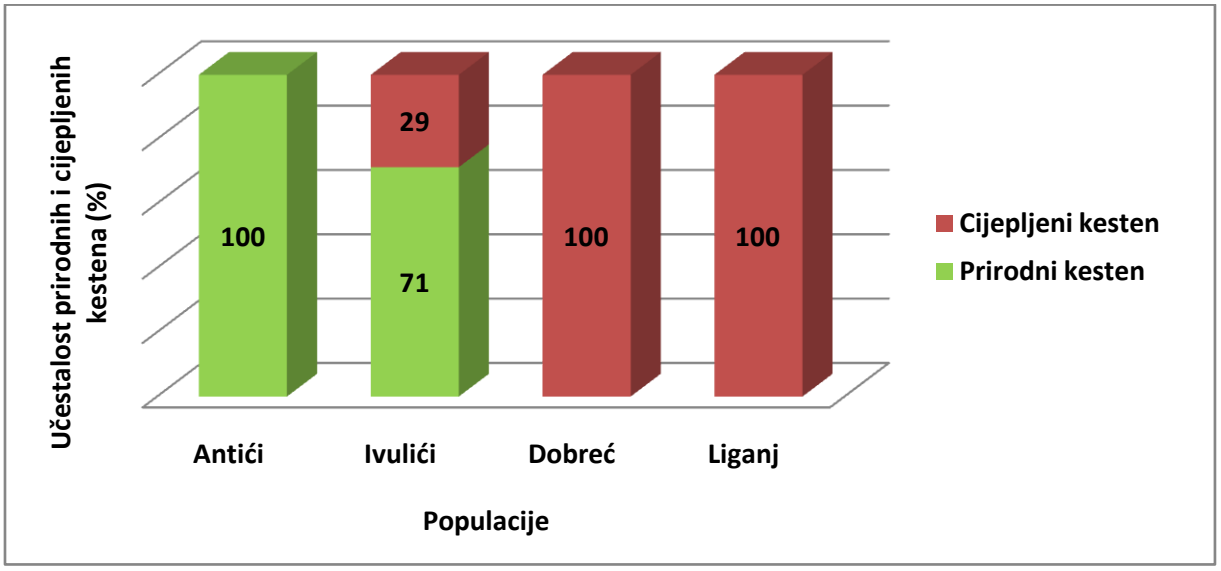
Na istraživanom području je zabilježena prisutnost rakastih tvorevina na stablima pitomog kestena. U populacijama su opaženi simptomi koji opisuju aktivni rak (AR), kalusirajući rak (KR) i površinsku nekrozu (PN). Prema ustupljenim podatcima prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice, zastupljenost aktivnog raka iznosi 67%, kalusirajućeg raka 17% i površinskih nekroza svega 8% (Slika 36).



Slika 36. Zastupljenost triju tipova rakastih formacija (AR-aktivni, KR-kalusirajući rak i PN-površinska nekroza) na području Lovrana

4.4. Vrste kestenovih stabala

Od ukupno 12 izolata gljive *C. parasitica*, polovina je prikupljena s prirodnih stabala pitomog kestena, a druga polovina s cijepljenih stabala kestena – maruna. Ukoliko promatramo četiri istraživane populacije, u populaciji Antići su svi uzorci uzeti sa stabala prirodnog kestena, dok su u populacijama Dobreć i Liganj svi uzorci uzeti sa cijepljenih stabala kestena. U populaciji Ivulići je 71% uzoraka prekupljeno sa stabala prirodnog kestena, a 29% sa cijepljenih stabala (Slika 37).

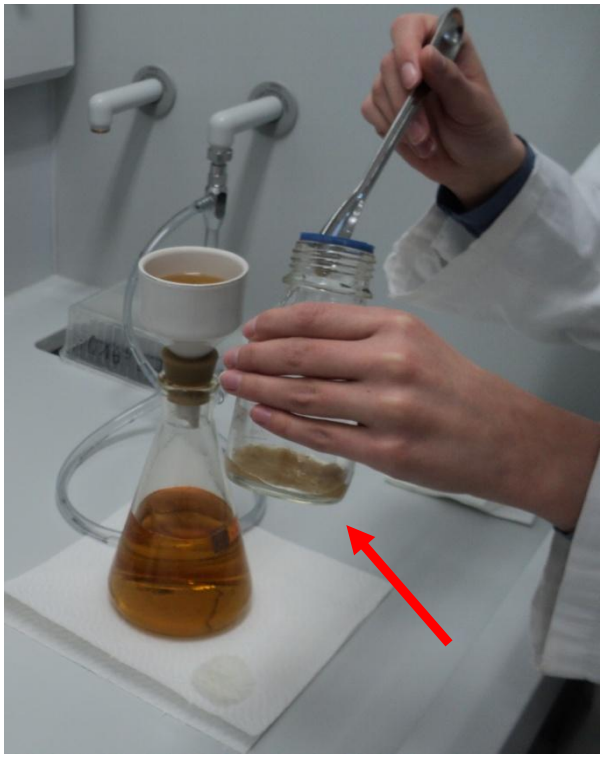


Slika 37. Učestalost prirodnih (zeleno) i cijepljenih (crveno) kestena u populacijama Antići, Ivulići, Dobreć i Liganj

Karakteristike prema kojima možemo razlikovati marun od pitomog kestena u prirodnim sastojinama su oblik, veličina i kvaliteta ploda. Plod maruna je svijetlo – smeđe boje i prošaran usko razmaknutim prugama. Plod se nikada ne dijeli na više od jednog kotiledona i smješten je u velikom ježolikom tobolcu četvrtastog oblika. Krupniji su i teži od plodova pitomog kestena i bolje kvalitete.

4.5. Terapijska pasta za inokulaciju bolesnih stabala kestena

Terapijska pasta pripremljena je od hipovirulentnog, bijelog izolata L76CR23 (EU – 17) i CR23 (EU – 1). Sam proces pripremanja terapijske paste trajao je ukupno deset dana. Kroz niz postupaka koji su opisani u materijalima i metodama, od hipovirulentnog izolata se dobije mekana pasta (Slika 38) koja se pohranjuje u Schott – ovu bočicu ili drugu posudicu predviđenu za pohranu.



Slika 38. Crvena strelica pokazuje terapijsku pastu

Kako bi se provjerio rast hipovirulentnog uzorka, na PDA - agar se pomoću čačkalice stavi dio paste. Pasta bi trebala mirisati “zdravo” i svježe. Ukoliko se zagadi, ima neugodan miris. Pastu je najbolje čuvati u tami i na 4°C, te upotrijebiti u roku dva mjeseca.

5. RASPRAVA

Na istraživanom području Lovranštine određeno je ukupno 6 različitih VC tipova gljive *C. parasitica*, što predstavlja izrazito veliku raznolikost s obzirom na 12 prikupljenih izolata. Prilikom prethodnih istraživanja na području Hrvatske je određeno 18 VC tipova unutar 338 prikupljenih izolata (Krstin i sur., 2008). U susjednoj Sloveniji je određeno ukupno 15 VC tipova unutar 254 prikupljena izolata (Ježić i sur., 2011; Krstin i sur., 2011), a u Bosni i Hercegovini 25 VC tipova unutar čak 920 izolata (Trestić i sur., 2001). Italija bilježi 8 različitih VC tipova unutar 194 prikupljena izolata (Milgroom i Cortesi, 1999). Na području sjeverozapadne Španjolske je zabilježeno 6 VC tipova od ukupno 539 prikupljenih izolata (Montenegro i sur., 2008), dok Portugal bilježi 9 VC tipova unutar 617 izolata (Bragança i sur., 2007).

Velika raznolikost VC tipova je zabilježena na područjima gdje je bolest prisutna već duže vremensko razdoblje, kao što je slučaj u Francuskoj (Dordogne), Italiji i južnoj Švicarskoj. Ne treba izostaviti primjer dalekih zemalja poput Japana i Kine gdje je unutar 79 prikupljenih izolata određen čak 71 VC tip (Liu i Milgroom, 2007). Raznolikost VC tipova u prirodnom, autohtonom području Azije je veća u odnosu na nedavno formirane populacije u Europi i Sjevernoj Americi (Ježić i sur., 2011). Raznolikosti VC tipova doprinosi i spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica*. Međutim, vrlo malu raznolikost VC tipova bilježe zemlje poput Mađarske, Slovačke, sjeverne Švicarske (Hoegger i sur., 2000), Njemačke (Seemann i sur., 2001), Turske (Gurer i sur., 2001), Makedonije (Sotirovski i sur., 2004), Portugala (Bragança i sur., 2007) i sjeverozapadne Španjolske (Montenegro i sur., 2008), gdje je *C. parasitica* prisutna tek kraće vrijeme (Krstin i sur., 2008).

Velika raznolikost VC tipova na području Lovrana je bila očekivana, budući da je rak kore prisutan na području Lovranštine od 1955. godine. Iako je diljem Europe određeno više od 70 različitih VC tipova, raznolikost je na lokalnoj i regionalnoj ljestvici gotovo uvijek manja, a obično obuhvaća jedan ili više dominantnih VC tipova (Robin i sur., 2009; Robin i Heiniger, 2001).

Najzastupljeniji VC tip na istraživanom području Lovrana je EU - 17 (41,67%). Drugi po učestalosti su VC tipovi EU - 1 i EU - 15 (oba 16,67%), te s najmanjim udjelom VC tipovi EU - 2, EU - 9 i EU - 12 (svi 8,33%). Svi izolati su VC testom križani međusobno kao i s dva seta europskih testera (EU – 1 do EU – 31 i EU – 32 do EU – 64) (Cortesi i Milgroom, 1998).

VC tip koji je u ovom istraživanju najzastupljeniji na području Lovrana je EU – 17. Međutim, taj je tip slabije zastupljen u ostalim populacijama u Hrvatskoj (Krstin i sur., 2008). Moguće je da se VC tip EU – 17 na područje Lovrana proširio iz Slovenije ili Bosne i Hercegovine. Mogao je nastati i rekombinacijom VC tipova EU – 1/EU – 2 i EU – 12 ili EU – 2 i EU – 15. Ovaj tip je vrlo slabo zastupljen i u ostalim europskim zemljama. U Sloveniji je također vrlo rijedak, s učestalošću od svega 5,1% (Krstin i sur., 2011). VC tip EU – 17 dominantan je u Austriji, a nekoliko uzoraka tog VC tipa je zabilježeno i u populacijama Bosne i Hercegovine (Trestić i sur., 2001).

VC tip EU – 15 je pronađen u populacijama Bosne i Hercegovine, ali u vrlo malom broju uzoraka (Trestić i sur., 2001). Također, ovaj VC tip je pronađen i u Sloveniji (3,9%) (Krstin i sur., 2011). U Hrvatskoj nije pronađen nigdje drugdje osim na području Lovrana. VC tip EU – 9 je vrlo dobro zastupljen u Mađarskoj (Tarcali, 2007), a zabilježen je i na području Bosne i Hercegovine (Trestić i sur., 2001). S tih područja je vjerojatno migrirao na područje Lovranštine.

U prethodnim istraživanjima u Hrvatskoj je utvrđeno 18 različitih VC tipova, gdje je EU – 1 bio najzastupljeniji, a slijedili su EU – 2 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., 2011), 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 u zapadnoj Francuskoj, zapadnoj Španjolskoj i Portugalu (Robin i sur., 2000; Bragança i sur., 2007). Porijeklo VC tipa EU – 12 je nejasno jer je vrlo rijedak na području sjeverne Italije (Ježić i sur., 2011). VC tip EU – 12 je dominantan na području južne i istočne Europe, u Italiji, Grčkoj i Makedoniji (Sotirovski i sur., 2004; Bragança i sur., 2007). Pretpostavlja se da je migrirao u Hrvatsku iz južnih područja Europe, preko Bosne i Hercegovine (Krstin i sur., 2008). Tri najzastupljenija VC tipa (EU – 1, EU – 2, EU – 12) s područja Hrvatske su vrlo dobro zastupljena na sjeverozapadnom području Bosne i Hercegovine koja graniči s Hrvatskom (Trestić i sur., 2001). Raznolikost VC tipova u Bosni i Hercegovini je velika u sjeverozapadnom području, ali niska u istočnom, srednjem i jugozapadnom području (Trestić i sur., 2001). Na temelju genotipa svih VC tipova na području Lovrana možemo pretpostaviti koji bi novi VC tipovi mogli nastati procesom rekombinacije već prisutnih.

Iako je u Hrvatskoj utvrđena relativno velika raznolikost VC tipova, hipovirus je dobro raširen u populacijama gljive *C. parasitica*. Bijeli izolati su na području Lovrana zastupljeni sa 67%. Međutim, postotak bijelih izolata ne mora uvijek prikazivati trenutnu učestalost CHV – 1, jer se hipovirus može naći i u izolatima prijelazne morfologije. Kako bi bili sigurni u prisutnost CHV – 1 u pojedinim populacijama, potrebno je dodatno testirati bijele i prijelazne izolate na prisutnost hipovirusne dsRNA. Ostali faktori, kao što su razlike između raširenosti VC tipova unutar različitih populacija ili privremena introdukcija CHV – 1, mogu objasniti paradoks istovremene velike raznolikosti VC – tipa i velike učestalosti bijelih izolata na određenom području. Kao što je prethodno navedeno, velika raznolikost VC tipova je zabilježena na područjima gdje je bolest prisutna već duže vremensko razdoblje, no ne treba čuditi da su to upravo i područja gdje je prisutan hipovirus. Smatra se da je na tim područjima hipovirulenca uspostavljena prirodno, što na kraju rezultira oporavkom kestenovih sastojina (Heiniger i Rigling, 1994).

Svi izolati s područja Lovrana vjerojatno pripadaju talijanskom podtipu CHV – 1 koji je najrasprostranjeniji na području južne i jugoistočne Europe, a ujedno i jedini dosada zabilježeni podtip u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Grčkoj i Italiji (Krstin i sur., 2008). Vrlo je malena mogućnost da neki drugi podtip hipovirusa bude prisutan na istraživanom području, što se ovim istraživanjem djelomično i potvrdilo jer niti jedan testirani izolat nije bio kompatibilan s testerima iz skupine EU – 32 do EU – 64.

Ukupna zastupljenost aktivnog raka (AR) na području Lovrana je 67%, kalusirajućeg raka (KR) 25% i površinskih nekroza (PN) 8 %. Mali postotak površinske nekroze (PN) upućuje na sporo širenje hipovirusa i slabu biološku kontrolu raka kore kestena na području Lovrana. Prethodnim istraživanjem na području Uprave šume Buzet u Istri je također zabilježen mali udio kalusirajućeg raka (6,79%) i površinske nekroze (13,58%) (Novak – Agbaba i sur., 2000). Najveći udio kalusirajućeg raka (20%) je zabilježen na području Uprave šume Sisak. Na području Uprave šuma Šamarica i Hrvatska Kostajnica su zabilježeni visoki udjeli (50 i 66%) bijelih izolata gljive *C. parasitica* što ukazuje na dobru prirodnu rasprostranjenost hipovirusa. Prisutnost hipovirulence, odnosno najveći postotni udio bijelih izolata je zabilježen na područjima gdje je rak kore prisutan duže vremensko razdoblje i gdje je mala raznolikost VC tipova (Krstin i sur., 2008). Na području jugoistočne Francuske je zabilježen udio bijelih izolata od 70% (Robin i sur., 2010). U Makedoniji je prisutnost CHV – 1 bila izrazito varijabilna, od 40 – 60% u nekim populacijama, dok u nekima hipovirulentni izolati nisu uopće pronađeni. Slično je i u Španjolskoj gdje je od ukupno 539 prikupljenih izolata, samo njih 15 bilo bijele morfologije (Montenegro i sur., 2008). U Portugalu je od 617

prikupljenih izolata gljive *C. parasitica* pronađen samo jedan bijeli izolat (Bragança i sur., 2007). Iako je raširenost hipovirusa u Portugalu vrlo malena, biološka kontrola je moguća jer je prisutno svega 9 različitih VC tipova kroz koje bi se virus mogao širiti. Na području Francuske je hipovirus jako raširen, pa je dsRNA pronađena u 138 od ukupno 171 prikupljenog izolata. U susjednoj Sloveniji je od 254 prikupljena uzorka njih 110 bijele morfologije što je 43,3%, a najveći udio u jednoj od istraživanih populacija je iznosio čak 72,2% - pozitivno je što je upravo ta populacija u blizini hrvatske granice. U jednoj od istraživanih populaciji na granici s Austrijom je udio bijelih izolata iznosio svega 11%.

Negativan utjecaj na biološku kontrolu bi moglo imati spolno razmnožavanje i rekombinacija gena jer mogu utjecati na povećanje broja VC tipova na području Lovrana (Krstin i sur., 2008). Međutim, danas znamo da VC raznolikost ne predstavlja tako značajnu prepreku u širenju hipovirusa kao što se ranije pretpostavljalo. Sustav vegetativne kompatibilnosti smatran je "neprobojnom" barijerom, no ipak su zabilježeni slučajevi prijenosa hipovirusa između vegetativno nekompatibilnih jedinki (Ding i sur., 2006), što pozitivno utječe na biološku kontrolu bolesti.

Velika raširenost hipovirusa bi, unatoč velikom broju VC tipova na području Lovrana, mogla imati pozitivan utjecaj na prirodnu biološku kontrolu raka kore i oporavak zaraženih stabala pitomog kestena. Također, kako bi se spriječilo širenje bolesti i degradacija šuma pitomog kestena, potrebno je kontinuirano praćenje raznolikosti VC tipova i rasprostranjenosti hipovirusa (Novak – Agbaba i sur., 2000). Kako bi se proširio hipovirus koji smanjuje virulentnost gljive *C. parasitica*, dobro je prirodnom procesu prijenosa hipovirusa pomoći ljudskim djelovanjem, odnosno inokulacijom zaraženih stabala pitomog kestena u cilju njihova ozdravljenja.

6. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

- Od ukupno dvanaest izolata gljive *Cryphonectria parasitica* na području Lovrana utvrđeno je šest VC tipova što predstavlja relativno veliku raznolikost VC tipova na istraživanom području.
- Najzastupljeniji VC tip na istraživanom području je EU - 17 (41,67%). Drugi po učestalosti su VC tipovi EU - 1 i EU - 15 (oba 16,67%), dok su s najmanjim udjelom VC tipovi EU - 2, EU - 9 i EU - 12 (svi 8,33%).
- Populacija gljive na području Lovrana pokazuje potencijal za povećanje broja VC tipova, bilo da se radi o imigraciji iz susjednih područja s velikom VC raznolikošću ili rekombinacijom. Rekombinacijom *vic* lokusa postojećih VC tipova u populacijama Lovrana bi se moglo pojaviti jedanaest novih uz šest postojećih VC tipova.
- Hipovirus je vrlo raširen u populaciji gljive *C. parasitica* na području Lovrana. Čak 67 % izolata gljive s tog područja pokazuje prisutnost europskog hipovirusa (CHV – 1).
- Analizom morfoloških karakteristika izolata utvrđena je i zastupljenost virulentnih izolata (33 %) na području Lovrana, dok izolati prijazne morfologije nisu utvrđeni.
- Velika zastupljenost hipovirulentnih izolata na području Lovrana kao i primjena terapijske paste mogla bi imati pozitivan učinak na biološku kontrolu raka kore i oporavak zaraženih sastojina pitomog kestena/maruna (*Castanea sativa* Mill.).

7. LITERATURA

- Adamčikova K, Juhasova G, Kobza M. 2006. Genetic Diversity of *Cryphonectria parasitica* Population in the Štiavnicko – Krupinska Subpopulation in Slovakia. *Plant Protection Sci*ence 42:119–124.
- Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D. 1999. Genetic variation of Cryphonectria hypoviruses (CHV 1) in Europe assessed using restriction fragmant length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8:843 – 854.
- Anagnostakis SL, 2000. American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut – blight fungus population. *Forest Ecology and Management* 152:225 – 233.
- Bragancça 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.
- Bryner SF, Rigling D. 2011. Temperature - Dependent Genotype – by - Genotype Interaction between a Pathogenic Fungus and Its Hyperparasitic Virus. *American Naturalist* 177:65-74.
- Choi GH, Dawe AL, Churbanov A, Smith ML, Milgroom MG, Nuss DL. 2011. Molecular Characterization of Vegetative Incompatibility Genes That Restrict Hypovirus Transmission in the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica. Genetics* 190:113 – 127.
- Cortesi P, McCulloch, Song H, Lin H, Milgroom MG. 2001. Genetic Control of Horizontal Virus Transmission in the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica. Genetics* 159:107–118.
- Cortesi P, Milgroom MG. 1998. Genetics of Vegetative Incompatibility in Cryphonectria parasitica. *Applied and Environmental Microbiology* 8:2988 – 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.
- Dawe AL, Van Voorhies WA, Lau TA, Ulanov AV, Li Z. 2009. Major impacts on the primary metabolism of the plant pathogen *Cryphonectria parasitica* by the virulence – attenuating virus CHV1 – EP713. *Microbiology* 155:3913 – 3921.

- Deng F, Allen TD, Hillman BI, Nuss DL. 2007. Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections of the chestnut blight fungus *Chryphonectria parasitica. Eucaryotic cell* 6:1286 – 1298.
- Ding P, Liu F, Xu C, Wang K. 2007. Transmission of Cryphonectria hypovirus to protect chestnut trees from chestnut blight disease. *Biological control* 40:9 – 14.
- Gobbin D, Hoegger PJ, Heiniger U, Rigling D. 2003. Sequence variation and evolution of Cryphonectria hypovirus 1 (CHV - 1) in Europe. *Virus research* 97:39 – 46.
- Guo LH, Sun L, Chiba S, Araki H, Suzuki N. 2009. Coupled termination/reinitation for translation of the downstream open reading frame B of the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *Nucleid Acids Research* 11:3645 – 3659.
- Gurer M, Ottaviani M, Cortesi P. 2001. Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut - growing regions in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research* 76:383-386.
- Heiniger U, Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32:581–599.
- Hoegger PJ, Heiniger U, Holdenrieder O, Rigling D. 2003. Differential Transfer and Dissemination of Hypovirus and Nuclear and Mitochondrial Genomes of a Hypovirus – Infected *Cryphonectria parasitica* Strain after Introduction into a Natural Population. *Applied and Environmental Microbiology* 7:3767 – 3771.
- Hoegger PJ, Rigling D, Holdenrieder O, Heiniger U. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycological Research* 104:1108-1116.
- Jacob – Wilk D, Turina M, Van Alfen NK. 2006. Mycovirus Cryphonectria Hypovirus 1 Elements Cofractionate with *trans*- Golgi Network Membranes of the Fungal Host *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 13:6588-6596.
- 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.
- Kazmierczak P, Pfeiffer P, Zhang L, Van Alfen NK. 1996. Transcriptional Repression of Specific Host Genes by the Mycovirus *Cryohonectria* Hypovirus 1. *Journal of Virology* 2:1137 – 1142.

- Krstin L, Novak-Agbaba S, Rigling D, Ćurković Perica M. 2011. Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* 60:752 – 761.
- Krstin L, 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.
- Larson TG, Choi GH, Nuss DL. 1992. Regulatory pathways governing modulation of fungal gene expression by a virulence – attenuating mycovirus. *The EMBO Journal* 12:4539 – 4548.
- Lee JK, Tattar TA, Berman PM, Mount MS. 1992. A Rapid Method for Testing the Virulence of *Cryphonectria parasitica* using Excised Bark and Wood of American Chestnut. *Phytopathology* 82:1454-1456.
- Liu YC, Milgroom MG. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia* 99:279 – 284.
- Marra RE, Milgroom MG. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and selfincompatibility. *Heredity* 86:134 - 143.
- Maurer WD, Fernández – López J. 2001. Establishing an international sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) provenance test: preliminary steps. *For. Snow Landsc. Res*. 3:482-486.
- McCabe, P.M., P. Pfeiffer and N. K. Van Alfen. 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology* 7:377-381.
- 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, USA* 96:10518-10523.
- Mohammed C, Cunnington J, Robin C. 2011. National diagnostic protocol for chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica*. (http://www.padil.gov.au/Sphds)
- Montenegro D, Aguin O, Sainz MJ, Hermida M, Mansilla JP. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecology and Management* 256:973-980.

- Novak – Agbaba S, 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* 35:91-110.
- Novak-Agbaba S. 2006. Monitoring raka kore pitomog kestena na trajnim plohama. *Radovi. Izvanredno izdanje* 9:199 – 211.
- Nuss DL, 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal – plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3:632 – 642.
- Nuss DL. 2011. Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. *Advances in Virus Research* 80:25 – 48.
- OEPP/EPPO. 1990. Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008. Russin, J.S.; Shain, L.; Nordin, G.L. (1984) Insects as carriers of virulent and cytoplasmatic hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus. *Journal of Economic Entomology* 77:838-846.
- Peever TL, Liu YC, Cortesi P, Milgroom MG. 2000. Variation in Tolerance and Virulence in the Chestnut Blight Fungus – Hypovirus Interaction. *Applied and Environmental Microbiology* 11:4863 – 4869.
- Prospero S, Conedera M, Heiniger U, Rigling D. 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96:1337-1344.
- Prospero S, Rigling D. 2012. Invasion Genetics of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria Parasitica* in Switzerland. *Phytopathology* 1:73 – 82.
- Robbins NE. 1997. Spread of white hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* among American chestnut trees at the Lesene State Forest. (Magistarski rad)
- 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* 90:730–7.
- Robin C, Capdevielle X, Martin M, Traver C, Colinas C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south – westwrn 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 3*:361-367.
- Robin C, Lanz S, Soutrenon A, Rigling D. 2010. Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. *Biological Control* 53:55-61.
- Schafleitner R, Wilhelm E. 1997. Effect of virulent and hypovirulent *Chryphonectria parasitica* (Murr.) Barr on the intracellular pathogen related proteins and on total protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Physiological and Molecular Plant Pathology 51*:323 – 332.
- Seemann D, Bouffier V, Kehr R, Schroder T, Unger J. 2001. Die Esskastanie (*Castanea sativa* Mill.) in Deutschland und ihre Gefahrdung durch den Kastanienrindenkrebs (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 53:49-60.
- Sotirovski K, Papazova-Anakieva I, Grünwald NJ, Milgroom MG. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology* 53:325-33.
- Sotirovski K, Rigling D, Heiniger U, Milgroom MG. 2011. Variation in virulence of *Cryphonectria hypovirus* 1 in Macedonia. *Forest Pathology* 41:9 – 65.
- Sun L, Suzuki N. 2008. Intragenic rearrangements of a mycoreovirus induced by the multifunctional protein p29 encoded by the prototypic hypovirus CHV – EP713. *RNA* 14:2557 – 2571.
- Sun Q, Choi GH, Nuss DL. 2009. Hypovirus-Responsive Transcription Factor Gene *pro1* of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* Is Required for Female Fertility, Asexual Spore Development, and Stable Maintenance of Hypovirus Infection. *Eukaryotic cell* 3:262 – 270.
- Tarcali G. 2007. Examination of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr in the Carpathian – Basin. Debrecen University; Faculty of Agronomy (Doctoral thesis).
- 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.

- Turina M, Rostagno L. 2007. Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. *Plant Pathology* 89:165-178.
- Vannini A, Caruso C, Leonardi L, Rugini E, Chiarot E, Caporale C, Buonocore V. 1999. Antifungal properties of chitinases from *Castanea sativa* against hypovirulent and virulent strains of the chestnut blight fungus *Chryphonectria parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:29 – 35.
- Vrandečić K, Jurković D, Ćosić J. Fitopatologija II, Tematska cjelina: Sistematika gljiva. Poljoprivredni fakultet Osijek (Nastavni materijal)

Adrese na Internetu

1. http://www.redorbit.com, 21.5.2012.
2. http://www.padil.gov.au/pbt, 21.5.2012.
3. http://www.missouribotanicalgarden.org, 30.5.2012
4. http://www.padil.gov.au/pbt, 21.5.2012.
5. http://www.pmf.unizg.hr, 21.5.2012.
6. http://www.eppo.org, 21.05.2011.
7. http://period5-organisms.wikispaces.com/5.+Sac+Fungi, 27.05.2012.
8. http://vatacf.org/TheBlight.shtml, 15.10.2012.
9. www.opcinalovran.hr, 21.5.2012.