USPOREDBA UČINKA JAKOG HRVATSKOG I FRANCUSKOG IZOLATA HIPOVIRUSA NA RAST I SPORULACIJU GLJIVE CRYPHONECTRIA PARASITICA (MURRILL) BARR

Spišić, Jelena

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:181:245712

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

Jelena Spišić

USPOREDBA UČINKA JAKOG HRVATSKOG I FRANCUSKOG IZOLATA HIPOVIRUSA NA RAST I SPORULACIJU GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) BARR

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

USPOREDBA UČINKA JAKOG HRVATSKOG I FRANCUSKOG IZOLATA HIPOVIRUSA NA RAST I SPORULACIJU GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) BARR

Jelena Spišić

Rad je izrađen: Laboratorij za molekularnu ekologiju, Odjel za biologiju
Mentor: Prof.dr.sc. Mirna Ćurković Perica
Komentor: Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin

Cryphonectria parasitica je patogena gljiva koja prvenstveno uzrokuje rak kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) i američkog kestena (*Castanea dentata* Marsh. Borkh.). Otkrićem hipovirusa koji smanjuje virulentnost i sporulaciju ove gljive se smanjila epidemija bolesti, a fenomen je nazvan hipovirulentnost. Cilj istraživanja bio je usporediti učinak hrvatskog i francuskog hipovirusa na rast i sporulaciju gljive *C. parasitica*. Razultati su pokazali da su oba virusa uzrokovala sporiji rast, manji broj spora te smanjenu narančastu pigmentaciju domaćina. Hrvatski hipovirus imao je, međutim, jači učinak na suzbijanje virulentnosti izolata gljive prikupljene u Hrvatskoj od hipovirusa iz Francuske.

Broj stranica: 49
Broj slika: 36
Broj tablica: 14
Broj literaturnih navoda: 61
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Cryphonectria parasitica*, biološka kontrola, hipovirus, rak kore, rast i sporulacija

Datum obrane: 28. rujna 2012.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc.dr.sc. Melita Mihaljević
2. Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
3. Prof.dr.sc. Janja Horvatić

Rad je pohranjen u:
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

COMPARISION BETWEEN EFFECT OF STRONG CROATIAN AND FRANCE ISOLATES OF HYPOVIRUS ON GROWTH AND SPORULATION OF FUNGUS *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) BARR

Jelena Spišić

Thesis performed at: Laboratory of Molecular Ecology, Department of Biology
Supervisor: Prof.dr.sc. Mirna Ćurković Perica
Co-Supervisor: Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin

Cryphonectria parasitica is a pathogenic fungus that mainly causes blight of chestnut *Castanea sativa* and American chestnut *Castanea dentata*. The discovery of hypovirus that decreases virulence and sporulation of the fungus reduced the epidemic of disease, a phenomenon called hipovirulence. The aim of this study was to compare the effect of the Croatian and French hypovirus on growth and sporulation of the fungus *C. parasitica*. The results have shown that both viruses have caused slower growth, smaller number spores and reduced orange pigmentation of host. However, Croatian hipovirus had a stronger effect on the suppression of virulence on isolates collected in Croatia than hypovirus from France.

Number of pages: 49
Number of figures: 36
Number of tables: 14
Number of references: 61
Original in: Croatian

Key words: Cryphonectria parasitica, chestnut blight, hypovirus, growth, sporulation, biological control

Date of the thesis defence: 28th September 2012

Reviewers:
1. Assist.Prof. Melita Mihaljević, Ph.D.
2. Assist.Prof. Ljiljana Krstin, Ph.D.
3. Prof. Janja Horvatić, Ph.D.

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

Zahvaljujem se mojoj mentorici prof.dr.sc. Mirni Ćurković Perica, a posebno komentorici doc.dr.sc. Ljiljani Krstin na pomoći i korisnim savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Neizmjerno hvala profesoru Václavu Hypši i njegovom timu na Institutu za parazitologiju u Češkim Budějovicama koji su mi svojom pomoći, savjetima i podrškom pomogli u statističkoj obradi podataka za vrijeme mog boravka na stručnoj praksi.

Hvala mojoj prijateljici Jani Kvičerovoj koja mi je bila velika potpora za vrijeme pisanja ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i mom dečku Marku Jovanoviću na izuzetnoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.

Hvala svima koji su neposredno ili posredno sudjelovali u ostvarivanju ovog rada.

SADRŽAJ

1.Uvod 1

1.1. Povijest širenje patogene gljive *Cryphonectria parasitica* 1

1.2. Otkriće hipovirusa i njegova primjena 2

1.3. Opće karakteristike skupine Askomycetes 3

1.4. Oblici raka kore uzrokovani patogenom gljivom 4

1.5. Opće karakteristike hipovirusa i načini njegovog širenja 6

1.6. Problemi prilikom prijenosa hipovirusa i različiti vc tipovi gljiva 7

1.7. Biološka kontrola raka kore kestena hipovirusom 9

1.8. Organizacija genom hipovirulentnog soja EP713 i njegovo djelovanje na virulentnost gljive..... 9

1.9. Cilj istraživanja 11

2. Materijali i metode 12

2.1. Priprema hranjive podloge za rast gljive 12

2.2. Nacjepljivanje i rast virulentnih izolata gljive 13

2.3. Brojanje spora virulentnih izolata gljive 14

2.4. Hipovirulentni izolati gljive EP713 i CR23 17

2.5. Izolati gljive zaraženi hipovirusima 17

2.6. Nacjepljivanje izolata gljive zaraženih hipovirusima na PDA podlogu i praćenje njihovog rasta 18

2.7. Određivanje sporulacije izolata gljive zaraženih hipovirusima 18

2.8. Rast i sporulacija izvornih bijelih gljiva s virusima 19

2.9. Statistička obrada podataka 19

3. Rezultati 21

3.1. Morfologija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* 21

3.2. Rast izolata gljive *Cryphonectria parasitica in vitro* 23

3.3. Sporulacija izolata gljive *Cryphonectria parasitica in vitro* 31

3.4. Statistička obrada podataka 33

4. Rasprava 40

5. Zaključak 45

6. Literatura 46

1. Uvod

1.1. Povijest širenje patogene gljive *Cryphonectria parasitica*

Cryphonectria parasitica (bivši naziv *Endothia parasitica*) je patogena gljiva koja prvenstveno uzrokuje rak kore pitomog kestena *Castanea sativa* (Slika 1) i američkog kestena *Castanea dentata*, ali može napasti i izazvati bolest drugih vrsta tvrdih stabala kao što su *C. mollissima, Alnus cordata, Ostrya carpinifolia, Carpinus betulus, Quercus pubescens, Q. petraea, Q. frainetto, i Q. ilex* (Dallavalle i Zambonelli, 1999). Gljiva je unesena iz Azije u Sjevernu Ameriku na prijelazu u 20. st. *C. parasitica* počela se širiti kroz prirodni areal američkog kestena uništavajući stotine milijuna stabala *Castanea dentata* (Anagnostakis, 1987). Zbog bolesti, drvo američkog kestena je gotovo nestao s tržišta. Korijen i korijenov sustav kestena su prilično otporni na gljivične infekcije, tako da velik broj mladih kestena još uvijek opstaju kao mladice. Međutim, izbojci su rijetko mogli rasti dovoljno za reprodukciju prije nego što ih bolest napadne (Treadwell, 1996). Nasuprot tome, stabla azijskih kestena su se prilagodila i postala otporna na zarazu kao rezultat njihove duge koevoluciji s patogenom (Huang i sur., 1998).

U Europi je bolest prvi put primijećena 1938. godine u sjevernoj Italiji te se brzo proširila diljem Italije i susjednim zemljama (Heiniger i Rigling, 1994). U Sloveniji, *C. parasitica* je prvi put zabilježena 1950. kod Nove Gorice, u blizini slovensko-talijanske granice (Krstić, 1950), a u Hrvatskoj u blizini Opatije 1955. (Kišpatić, 1956).

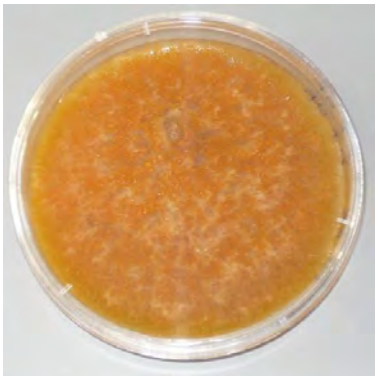


Slika 1. Rak kore pitomog kestena (web 1).

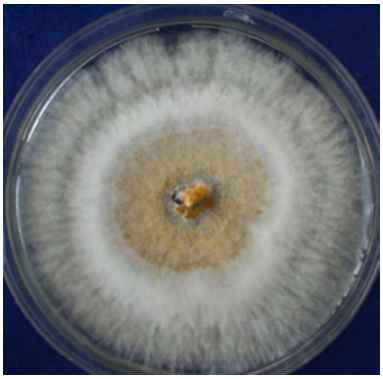
Patogena gljiva se proširila diljem Europe s većom raznolikošću u regijama blizu svog prvog uvođenja i manjom raznolikošću na širem rasponu u Europi. Postoji velika raznolikost gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji što je i eksperimentalno dokazano, Bayesovo grupiranje ukazuje na postojanje dva klastera, što upućuje na dva odvojena uvođenja *C. parasitica* u te regije. Prvi klaster je dominantan u zapadnim dijelovima Hrvatske i Slovenije, a drugi u istočnim i sjevernim krajevima. Podaci analiza pokazuju da je sjeverna Italija prvi izvor zaraze, a jugoistočna Europa drugi. Većina haplotipova je vjerojatno nastala spolnim rekombinacijama između tri osnovna haplotipa, od kojih su se dva vjerojatno proširila iz Italije, a jedan s jugoistoka Europe. Višestruko uvođenje i spolno razmnožavanje doprinijelo je stvaranju genetski različitih populacija *C. parasitica* (Ježić i sur., 2012).

1.2. Otkriće hipovirusa i njegova primjena

Otkriće virusa (hipovirus) koji smanjuje virulentnost i sporulaciju patogene gljive *C. parasitica* smanjilo je epidemiju bolesti kestena u Europi, a fenomen je nazvan hipovirulentnost. Izolati virulentnog soja gljive su narančaste boje, brzo rastu i obilato sporuliraju (Slika 2), dok su izolati zaražen hipovirusom bijele boje, sporo rastu, malo sporuliraju ili uopće ne sporuliraju (Slika 3) (Hillman i Suzuki, 2004).



Slika 2. Virulentni soj gljive *C. parasitica*.



Slika 3. Hipovirulentni soj gljive *C. parasitica.*

(Preuzeto iz nastavnih materijala doc. Ljiljane Krstin).

Kada se bolest pojavila u Francuskoj započeo je program intenzivne intervencije. Drveće koje je imalo rak kore bilo je tretirano virusom te je uspješno provedena biološka terapija bolesti. Nakon četiri ili pet godina liječenja, hipovirulentni sojevi kojima nedostaje sposobnost uništavanja stabala kestena su se počeli širiti među voćnjacima u Francuskoj i drveće se počelo oporavljati od raka kore (Anagnostakis, 2000)

Prirodno širenje i napori u biološkoj kontroli rezultirali su visokom učestalosti hipovirulence u mnogim područjima Europe (Heiniger i Rigling, 1994). Neuspjeh hipovirulence u Sjevernoj Americi, međutim, može biti rezultat ekoloških razlika, veće osjetljivosti američkih kestena, razlike u populacijskoj strukturi gljive, i / ili razlike u virulentnosti hipovirusa (MacDonald i Fulbright, 1991; Milgroom i Cortesi, 2004).

1.3. Opće karakteristike skupine Askomycetes

Cryphonectria parasitica pripada skupini askomiceta (Askomycetes) čiji naziv 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.

Askomicete se razmnožavaju spolno i nespolno. Kod većine askomiceta nespolno razmnožavanje odvija se formiranjem egzogenih konidija. Spore nespolnog načina razmnožavanja stvaraju se u haploidnom miceliju, na posebnim hifama nosačima, koje se izdižu iznad podloge i na svom vrhu stvaraju spore. To su egzospore ili konidije, a hifa nosač se naziva konidionoša ili konidiofor. Spolni način razmnožavanja je gametangiogamija (spajanje cijelih gametangija).

Cryphonectria parasitica stvara dvije vrste spora: askospore su suhe, diskoidalnog oblika, relativno velike i rasprostranjuju se vjetrom na velike udaljenosti (Guerin i sur., 2001), a druga vrsta su konidije koje su mnogo manje i ljepljive. Raspršuju se za vrijeme kiše na manje udaljenosti ili putem insekata, ptica i drugih životinja na veće udaljenosti (Treadwell, 1996), (Anagnostakis, 1987).

Cryphonectria parasitica se također može širiti prijevozom zaraženog biljnog materijala, što je, pretpostavlja se, način kako je gljiva unesena iz Azije u Sjevernu Ameriku i Europu (Anagnostakis, 1987; Dutech i sur., 2010).

1.4. Oblici raka kore uzrokovani patogenom gljivom

Rane omogućuju ulazak i rast patogene gljive ispod kore stabla. Prvi simptom je malo narančasto-smeđe područje na ispucanoj vanjskoj kori grančice ili grane koje se širi u žuto-narančastu do crveno-smeđu kvrgavu masu. Formirani, utonuli rak onda stvara micelij koji se širi ispod kore. Micelij s vremenom probija sve do kambija, zaustavlja prohodnost provodnih elemenata, što dovodi do odumiranja dijela stabla iznad zaraze.

Na zaraženoj kori će se izlučivati duge narančasto-žute vitice spora. Kako se hife šire proizvode nekoliko otrovnih spojeva, od kojih je najpoznatija oksalna kiselina. Kiselina smanjuje pH zaraženog tkiva sa normalnog 5,5 na 2,8, što je otrovno za biljne stanice. Rak kore dolazi u tri forme:

- aktivni rak
- kalusirajući rak
- površinski rak (površinska nekroza kore)

Kod aktivnog raka zaraza brzo napreduje do kambija. Prepoznaje se po uzdužno raspucanoj kori (Slika 4), otvorenim ranama, brojnim žutosmeđim plodnim tijelima gljive (Slika 5) te tamnožutom lepezastom miceliju ispod kore. Virulentan soj gljive *C. parasitica* uzrokuje ovaj tip raka.

Kalusirajući rak prepoznaje se po formiranom kalusnom staničju oko rane (Slika 6). Virulentni soj gljive može biti zaražen hipovirusom koji uzrokuje oporavak bolesnog stabla zatvaranjem rak rane, odnosno nastankom kalusa. Plodišta gljive su rijetka ili ih uopće nema.

Kod površinske nekroze zaraza vrlo 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., 2011).



Slika 4. Uzdužno raspucana kora pitomog kestena zaraženog gljivom *C. parasitica*.
(Preuzeto iz nastavnih materijala doc. Ljiljane Krstin).



Slika 5. Plodna tijela gljive na stablu kestena zaraženog gljivom *C. parasitica*.
(Preuzeto iz nastavnih materijala doc. Ljiljane Krstin).



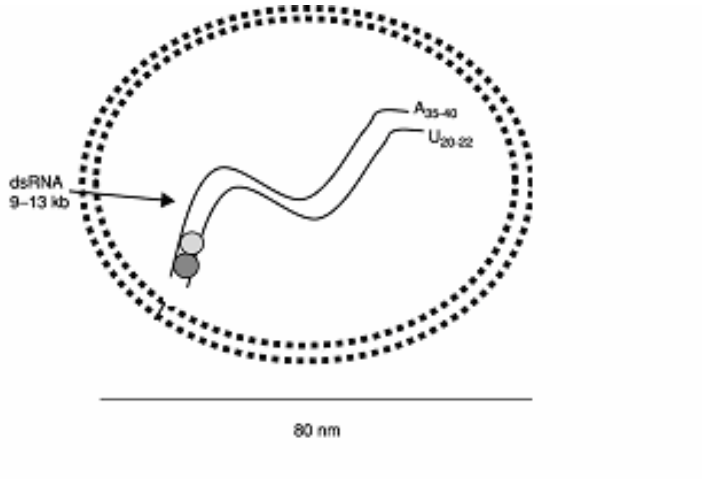
Slika 6. Kalusirajući rak kore kestena.



Slika 7. Površinska nekroza kore kestena.
(Preuzeto iz nastavnih materijala doc. Ljiljane Krstin).

1.5. Opće karakteristike hipovirusa i načini njegovog širenja

Cryphonectria hipovirus 1 (CHV-1) je dvolančana RNA (dsRNA) bez kapside, iz porodice *Hypoviridae*, veličine 9-13 kb. Virus se nalazi u citoplazmi gljive, unutar membranskih vezikula (Slika 8) (Hillman i sur., 2000; Gobbin i sur., 2003). Interes za ovaj virus potječe od njegove mogućnosti da se koristi kao biološko sredstvo za kontrolu bolesti raka kore kestena (Van Alfen i sur., 1975; Nuss, 1992). CHV-1 je pronađen u velikoj mjeri u Europi (Allemann i sur., 1999), pronađen je i u Japanu i Kini (Peever i sur., 1998; Liu i sur., 2003) te u novije vrijeme u Koreji (Lim, J., B. Cha i M.G. Milgroom, neobjavljena opažanja). CHV-1 je vjerojatno uveden u Europu s gljivom *C. parasitica*, koja je uvedena u Sjevernu Ameriku i Europu iz istočne Azije u ranim 1900-tim (Milgroom i sur., 1996).



Slika 8. Virusna dsRNA unutar membranske vezikule.
(Hillman i Suzuki, 2004).

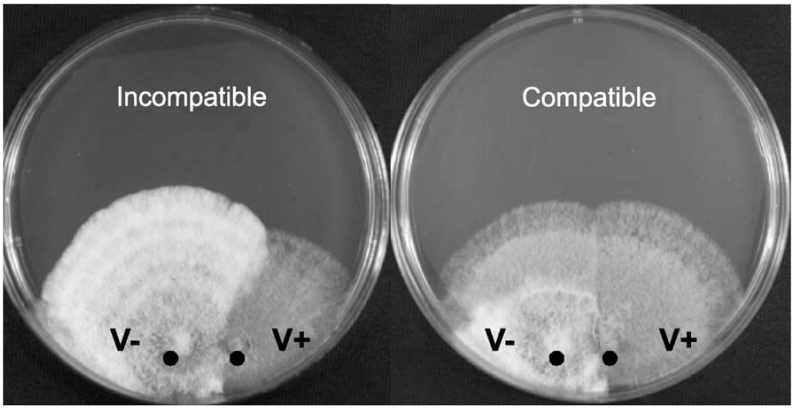
CHV-1 značajno smanjuje rast raka, snažno slabi nespolnu sporulaciju, a gotovo u potpunosti smanjuje spolnu reprodukciju svog gljivičnog domaćina (Elliston, 1985; Zhang i sur., 1998; Peever i sur., 2000). Virus se širi nespolnim sporama gljive (Prospero i sur., 2006), a njegov prijenos iz jedne gljive u drugu, spajanjem hifa (anastomoza), teoretski omogućuje širenje hipovirulence unutar populacije gljive (Milgroom i Cortesi, 2004).

Postoje dva načina širenja hipovirusa kroz populacije gljive:

1. prirodno širenje
2. širenje ljudskom aktivnošću (pokušaji biokontrole)

Prirodno širenje može biti vertikalno - kroz nespolne spore (konidije) i horizontalno - fuzijom hifa između vegetativno kompatibilnih jedinki gljive.

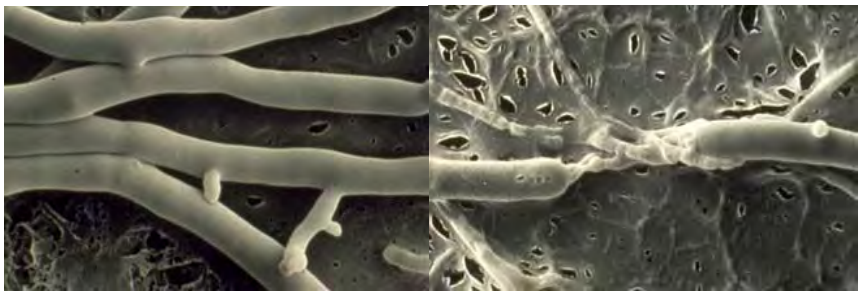
Horizontalni prijenos virusa CHV-1 je ključan parametar koji utječe na evoluciju virulencije gljive (Bull, 1994; Levin, 1996) kao i potencijal patogena da zarazi populaciju domaćina (Anderson i May, 1986). Postoje dostupne informacije o horizontalnom prijenosu RNA virusa u nekim sustavima domaćina, ali je relativno malo detalja poznato o horizontalnom prijenosu virusa u nitastih gljiva. Horizontalni prijenos virusa u nitastih gljiva nastaje kada se stanice različitih jedinki spoje, čime se omogućuje virusu da se prijeđe iz jedne citoplazme u drugu. Hipovirus se prenosi između kompatibilnih sojeva spajanjem hifa - anastomoza (Slika 9), (Hillman i Suzuki, 2004).



Slika 9. Vegetativna inkompatibilnost kao barijera za širenje virusa (lijevo). Anastomoza između kompatibilnih virusom zaraženih i virusom ne zaraženih izolata (desno).
(Hillman i Suzuki, 2004).

1.6. Problemi prijenosa hipovirusa među različitim vc tipovima gljive

Horizontalni prijenos je ograničen vegetativnom ili heterojezgrenom nekompatibilnošću (Cortesi i sur., 2001), genetski kontroliranim „self / non-self" sustavom prepoznavanja koji rezultira programiranom staničnom smrću (propadanjem hifa) između nespojivih genotipova (Slika 10), (Biella i sur., 2002; Glass i Kaneko, 2003). Stanična smrt povezana s vegetativnom nekompatibilnošću često, ali ne uvijek, smanjuje horizontalni prijenos virusa, plazmida ili drugih citoplazmatskih elemenata (Caten, 1972; Hartl i sur., 1975; Griffiths i sur., 1990; Cortesi i sur., 2001).



Slika 10. Spajanje hifa kompatibilnih sojeva (lijevo). Propadanje hifa uslijed vegetativne nekompatibilnosti (desno).
(Hillman i Suzuki, 2004).

Kod europskih izolata gljive *C. parasitica,* vegetativna neusklađenost je kontrolirana alelima na šest ili više vegetativno-nekompatibilnih (vic) lokusa. Multilokusni vic genotipovi nazivaju se vegetativnom kompatibilnošću (VC) vrste (Cortesi i Milgroom, 1998). Detaljna laboratorijska istraživanja su pokazala da svaki *vic* alel ima različite kvantitativne učinke na smanjenje vjerojatnosti prijenosa virusa (Cortesi i sur., 2001).

U Hrvatskoj je nađeno18 različitih vc tipova. EU-1 je najčešći, nakon čega slijedi EU-2 i EU-12 (Krstin i sur., 2008). U Sloveniji je zabilježeno 15 vc tipova pri čemu je EU-13 najzastupljeniji (Krstin i sur., 2011). EU-1 i EU-2 su također zabilježeni u Slovenija, dok je EU-12 rijedak vc tip. Pretpostavlja se da su EU-1 i EU-2 uvedeni u Sloveniju i Hrvatsku iz sjeverne Italije, gdje su ovi vc tipovi najzastupljeniji (Cortesi i sur., 1996). Porijeklo EU-12 i EU-13 manje je jasno, jer su oba tipa rijetki u sjevernoj Italiji. Raširena pojava EU-12 u jugoistočnoj Europi sugerira da je ovaj vc tip možda premješten s juga u Hrvatsku i Sloveniju (Krstin i sur., 2008).

Iako je moguće procijeniti prosječan prijenos između vic genotipova u laboratoriju, te procjene ne moraju nužno odražavati stvarni prijenos u prirodnim uvjetima. U prirodi, na prijenos može utjecati broj kontakata između jedinki, vrijeme kontakta, prostorne heterogenosti genotipova, itd.

Način razmnožavanja *C. parasitica* također utječe na širenje hipovirusa jer se virus prenosi samo unutar nespolnih spora, a ne spolnih (Carbone i sur., 2004; Prospero i sur., 2006). Osim toga, spolno razmnožavanje ostvaruje i održava raznolikost vc tipova kroz rekombinaciju polimorfnih vic lokusa (Cortesi i sur., 2001).

1.7. Biološka kontrola raka kore kestena hipovirusom

Mogućnost biokontrole hipovirusom ovisi o tipu vegetativne kompatibilnosti gljive, njezinom načinu razmnožavanja, te o tipu i izolatu hipovirusa. Stoga je za biološku kontrolu potrebno okarakterizirati 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.

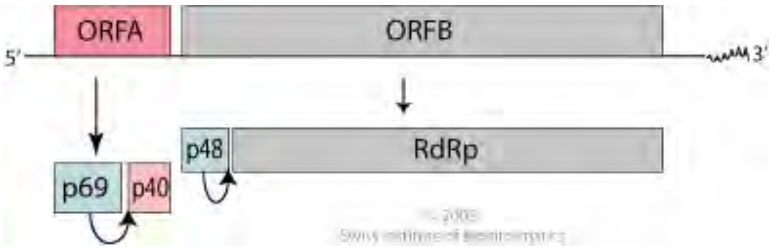
Među četiri opisane vrste virusa (CHV-1, CHV-2, CHV-3, CHV-4) najviše pozornosti je dano CHV-1 zbog njegove uloge u biološkoj kontroli raka kore kestena i njegove raširenosti u Europi (Hillman i Suzuki, 2004). Unutar CHV-1, četiri genetski različita podtipa su identificirana: talijanski podtip I, njemačko / španjolski podtip D i francuski podtipovi F1 i F2 (Gobbin i sur., 2003)

1.8. Organizacija genom hipovirulentnog soja EP713 i njegovo djelovanje na virulentnost gljive

EP713 pripada virusu CHV-1 i podtipu F1. Virus sadrži poliprotein p69 (ORF A poliprotein) koji se sastoji od dva lanca, p29 i p40 te ORF B koji sadrži p40 i RNA- ovisnu RNA polimerazu (RdRp) (Slika 17).

Cistein proteaza p29 sadrži najmanje tri funkcionalne domene i uzrokuje niz različitih učinaka na virus-domaćin interakciju. Funkcija proteaze p29 uključuje stabilnost virusa, autoproteolizu, smanjenje pigmentacije domaćina, smanjenje nespolne i spolne sporulacije te poboljšanje prijenos virusa putem konidija. Ukupno 72 nukleotida kodiraju sekvencu na 5´ kraju p29 koja je osnova za održavanje stabilnosti virusa, dok su ostale domene neobavezne za replikaciju virusa (Hillman i Suzuki, 2004). Susjedna regija N-terminalne osnovne domene, Gly^{25} preko Gln^{73}, je uključena u simptome ekspresije kao i u replikaciju virusa te njegov prijenos. C-terminalni kraj p29 sadrži katalitičke Cys^{162} i His^{215} ostatke potrebne za postranslacijsku modifikaciju iz prekursora poliproteina p69. Niz studija učinjen je kako bi se pokazalo da ekspresija p29 u cis ili trans dovodi do smanjenja sporulacije i pigmentacije te poboljšanja akumulacije virusne RNA i prijenos putem konidija. Takve studije dovele su do otkrića da se proteolitička obrada događa *in vivo* i da p29 sam potiskuje pigmentaciju i nespolnu sporulaciju čak i u odsutnosti aktivne virusne infekcije (Hillman i Suzuki, 2004). To pokazuje sposobnost p29 da modificira fenotip gljive. P40 nema funkciju u akumulaciji i prijenosu RNA nego djeluje na smanjenje narančastog pigmenta i sporulaciju domaćina (Hillman i Suzuki, 2004).

Iako ORF B CHV-1 zauzima više od 2/3 kodirane regije virusnog genoma, malo se zna o njegovoj ekspresiji i regulaciji. Poznato je da je proteaza p48 odgovoran za početak, ali ne i za održavanje, prijenos RNA virusa te doprinosi regulaciji akumulacije i vertikalnog prijenosa virusa (Deng i Nuss, 2008), dok RdRp enzim katalizira replikaciju RNA prema RNA kalupu. Hipovirus će zbog svega navedenog izazivati hipovirulencu u gljivi-domaćinu, a posljedica toga je slabljenje gljivične bolesti kestena koja u protivnom rezultira rakom kore.



Slika 17. Organizacija genoma virusa EP713 (web 2).

1.9. Cilj istraživanja

Ovo istraživanje vršeno je da bi se usporedio učinak jakog hrvatskog i francuskog izolata hipovirusa na patogene izolate gljive *Cryphonectria parasitica* kroz tri parametra: sporulaciju, pigmentaciju i rast. Sukladno prethodnim istraživanjima očekujemo da će hipovirusi supresivno djelovati na virulenciju gljive smanjujući sporulaciju. Za očekivati je i supresivno djelovanje virusa na narančasti pigment i usporavanje rasta gljiva. Dobiveni rezultati će omogućiti usporedbu jačine djelovanja dva različita virusa na smanjenje virulentnosti gljive i time pridonijeti mogućnostima uspješne biološke kontrole na našim prostorima.

2. Materijali i metode

Nitaste gljive dobro definiranih genetskih i molekularnih uvjeta i koje pokazuju karakteristike raznovrsnog rasta su najkorisnije za proučavanje virusa i njihovih procesa zaraze. Poželjne značajke uključuju:

- sposobnost brzog rasta u kulturi
- stabilnost rasta (neke gljive gube patogenost u kulturi)
- sposobnost razmnožavanja spolnim putem
- sposobnost nespolnog razmnožavanja putem spora

Niz drugih obilježja su također poželjna kod gljiva domaćina:
opsežno znanje genetike i genomike domaćina, razvojne i molekularne biologije, razumijevanje strukture populacije i evolucijske biologije domaćina te ekonomska važnost gljive domaćina (Hillman i Suzuki, 2004).

U ovom istraživanju korišteni su izolati patogene gljive *Cryphonectria parasitica* koja uzrokuje rak kore pitomog kestena. Izolati narančaste boje, koja ujedno označava i njihovu virulentnost, prikupljeni su u Lovranu (L14, L44, L45 i L76). Svaki od izolata pripada različitom vc tipu gljive (Tablica 1).

Tablica 1. Virulentni izolati gljive *C. parasitica* i njihovi pripadajući vc tipovi.

NARANČASTI IZOLATI GLJIVE	VC TIP GLJIVE
L14	EU- 1
L44	EU- 12
L45	EU- 2
L76	EU- 17

2.1. Priprema hranjive podloge za rast gljive

Za rast izolata gljive korištene su pojedinačne, sterilne Petrijeve zdjelice promjera 9 cm koje su sadržavale krumpirov agar (Biolife Potato Dextrose Agar) PDA, kao podlogu za rast i sporulaciju. Ukupno 42 g agara kuhano je 30 minuta u 1 litri destilirane vode uz stalno miješanje. Nakon kuhanja, agar je izliven u Shottove boce i autoklaviran 15 minuta na temperaturi 121°C u autoklavu. Nakon autoklaviranja PDA je izliven u 12 sterilnih Petrijevki. Izlijevanje je vršeno u laminaru, u sterilnim uvjetima kako bi se spriječila kontaminacija.

Svaki put prije izlijevanja u Petrijevu zdjelicu otvor boce provučen je kroz plamen na plameniku kako bi kontaminacija podloge bila svedena na minimum.

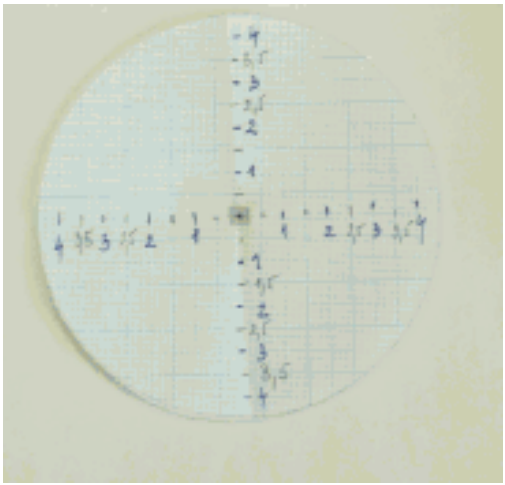
2.2. Nacjepljivanje i rast virulentnih izolata gljive

Kockica micelija gljive veličine 4x4x4 mm nacijepljena je u središte Petrijeve zdjelice s agarom. Kockice micelija uzete su s kulture stare 5 dana. Micelij je izrezan pomoću noževa steriliziranih u etanolu i plamenu. Precjepljivanje gljive provodi se u laminaru koji je prethodno očišćen etanolom kako bi se osigurali sterilni uvjeti rada te ne bi došlo do kontaminacije (Slika 11). Svaki od četiriju izolata nacijepljen je u tri replike. Petrijevke s nacijepljenim micelijima su označene nazivom izolata iz Lovrana (L14, L44, L45, L76) i brojem replike (1, 2, 3) te kružno zatvorene parafilmom. Gljive su rasle u komori osvijetljene svjetlošću od 2 500 luxa na sobnoj temperaturi (24°C). Intenzitet rasta svakog izolata određen je mjerenjem promjera svake kulture pod kutem od 90º, trećeg i petog dana nakon nasađivanja (Slika 12).



Slika 11. Laminar.

(Autorska fotografija)



Slika 12. Milimetarski papir za mjerenje rasta gljive *C. parasitica*.
(Autorska fotografija)

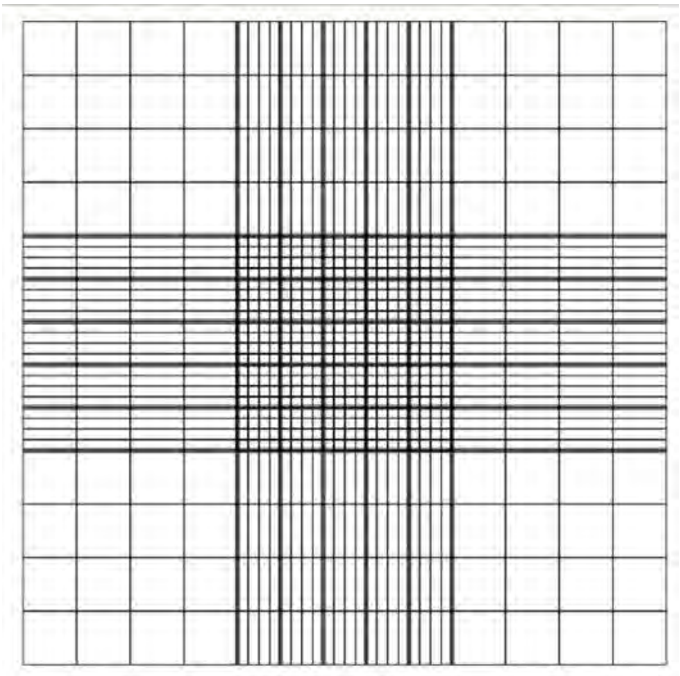
2.3. Brojanje spora virulentnih izolata gljive

Nakon 14 dana od inokulacije izbrojane su spore prorasle gljive. Nespolne spore, konidije, oslobođene su s micelija pomoću staklenog štapića u 10 ml 0,15% Tween- a 80 (Sigma- Aldrich). Otopina sa sporama profiltrirana je u kivete pomoću filter papira promjera 170 (Milchfilter Vlies). Spore su brojane u NeuBauer Improved komorici (Slika 13) pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 40 CFL Carl Zeiss). Broj spora brojan je u pet kvadrata. Površina pojedinog kvadrata je P= 1/ 25mm^2 tj. 0,04mm^2 , a dubina 0,1mm (Slika 14). Volumen predstavlja umnožak površine i dubine:

$$V\ (mm^3) = P\ (mm^2) * d\ (mm)$$
$$V = 0{,}04mm^2 * 0{,}1mm = 0{,}004mm^3$$
$$V = 0{,}004mm^3 * 5\ \text{kvadrata} = 0{,}02mm^3$$

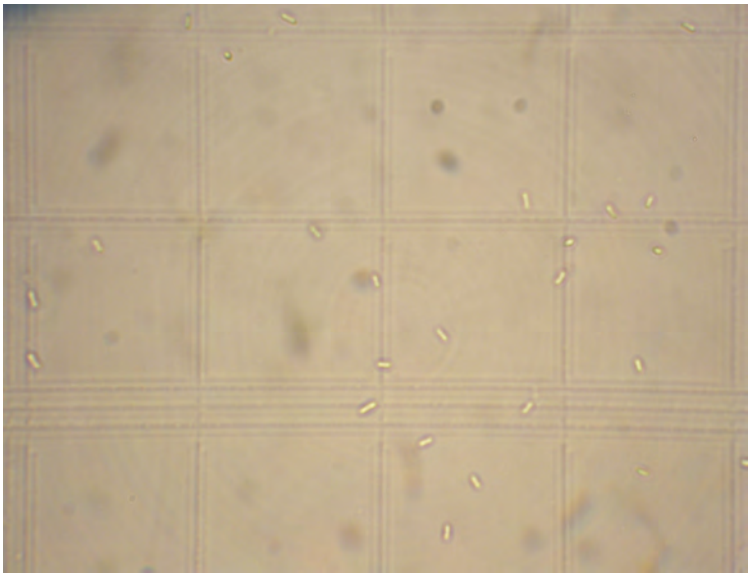


Slika 13. NeuBauer Improved komorica (web 3).



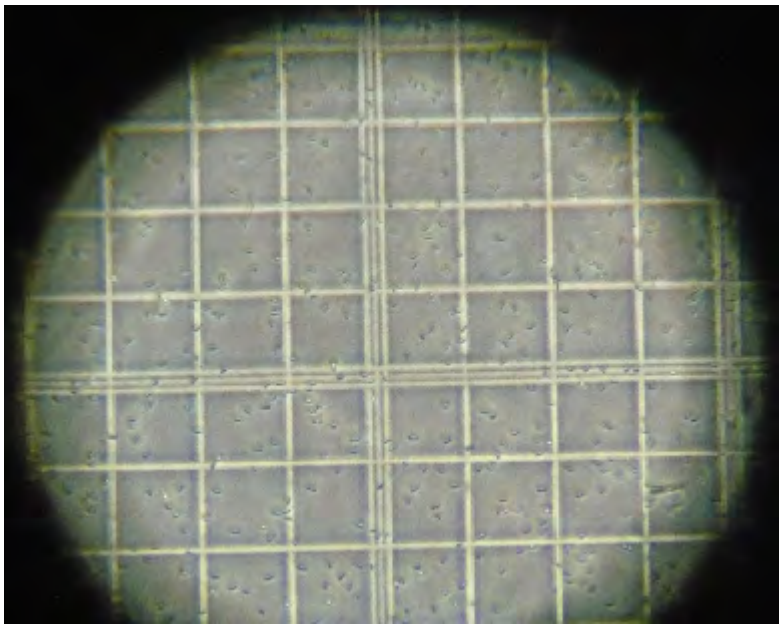
Slika 14. NeuBauer Improved komorica za brojanje spora gljive *C. parasitica*. (web 4).

Svaki kvadrat, unutar kojeg su brojane spore, sastoji se od 16 polja. One spore koje su većim dijelom ili u potpunosti bile izvan tih 16 polja nisu uvrštene u konačan broj. Spore koje su na granici s pripadajućim poljima se broje jedino ako su dio "L" područja koje je sam promatrač odabrao (Slika 15). Naime, to područje je dio kojeg tvore bilo koje dvije stranice kvadrata i u njemu je moguće uzeti u obzir spore koje su djelomično unutar kvadrata.



Slika 15. Spore gljive *C. parasitica*.
(Autorska fotografija)

Ukoliko je broj spora prevelik i nemoguće ih je prebrojati, tada se otopina spora mora razrijediti destiliranom vodom (Slika 16). Prilikom ovog eksperimenta korištena su razrjeđenja od 50x. Kada se pregledaju i prebroje spore u svih pet kvadrata možemo izračunati koliko je čestica spora u određenom volumenu.



Slika 16. Velik broj spora čiju je otopinu potrebno razrijediti zbog nemogućnosti prebrojavanja.
(Autorska fotografija)

Broj spora u volumenu se računa na slijedeći način:

broj čestica po µl volumena= izbrojane čestica / površina x dubina x 5 x R (faktor razrjeđenja)

npr.

ako je ukupno izbrojano 187 čestica spora, račun izgleda ovako:

broj čestica po mikrolitru (č / µl) = 187/ 0,04mm^2 x 0,1mm x 5 x R (ako postoji)

broj č / µl = 187 / 0,02mm^3

broj č /µl = 9 350

1µl = 1mm^3

1ml = 1cm^3

u ovom istraživanju mjerna jedinica za volumen bila ja mililitar pa u skladu s tim konačni rezultat je slijedeći:

broj č / ml = 9 350 x 1000 = 9,35x10^6

2.4. Hipovirulentni izolati gljive EP713 i CR23

Bijeli, hipovirulentni soj EP713 je napravljen u Connecticutu u Agrokulturnoj eksperimentalnoj postaji ranih 1970-ih, anastomozom francuskog hipovirulentnog soja sa sjevernoameričkim virus-oslobođenim sojem. Virus je nazvan CHV1/EP713 jer je francuskog podrijetla, dok je genska pozadina domaćina američka (Anagnostakis i Day, 1979). Organizacija genoma CHV1/EP713 je određena početkom 1990-ih (Shapira i sur., 1991) i nalikovala je pozitivnoj- strukturi RNA virusu.

Bijeli hipovirulentni izolat gljive CR23 pronađena je na Cresu te sadrži hipovirus kojim su zaraženi narančasti izolati iz Lovrana. Morfologija izolata navedene gljive bit će opisana kroz ovo istraživanje.

2.5. Izolati gljive zaraženi hipovirusima

Prethodno spomenuti narančasti izolati zaraženi su virusom iz bijele gljive s Cresa (CR23), odnosno virusom iz Francuske (EP713). Bijela boja znak je gubitka pigmentacije uslijed zaraze hipovirusom te smanjene sporulacije.

U narančaste, virulentne izolate gljive iz Lovrana unesen je hipovirus iz bijele gljive s Cresa (CR23), odnosno iz Francuske (EP713). Takvi zaraženi izolati korišteni su u ovom istraživanju kako bi se utvrdio utjecaj dvaju hipovirusa različitog porijekla na virulentne izolate gljive iz Lovrana i usporedila jačina djelovanja hipovirusa na smanjenje rasta,

sporulacije i narančastog pigmenta. Imena izolata definirana su kao sinteza imena virulentnog izolata gljive i imena gljive iz koje potječe hipovirus (Tablica 2).

Tablica 2. Izolati gljive zaraženi hipovirusima iz bijele gljive CR23, odnosno EP713.

IZOLATI ZARAŽENI VIRUSOM IZ GLJIVE CR23	IZOLATI ZARAŽENI VIRUSOM IZ GLJIVE EP713
L14 CR23	L14 EP713
L44 CR23	L44 EP713
L45 CR23	L45 EP713
L76 CR23	L76 EP713

2.6. Nacjepljivanje izolata gljive zaraženih hipovirusima na PDA podlogu i praćenje njihovog rasta

Kockice micelija zaraženih lovranskih izolata izrezane su u laminaru pomoću flambiranog nožića te stavljene na krumpirov agar u središte Petrijeve zdjelice. Petrijevke su bile promjera 9 cm, a podloga pripremljena je na isti način kao i za virulentne izolate. Svi izolati nacijepljeni su u tri replike isti dan. Petrijevke su označene nazivom uzorka i brojem replike (1, 2, 3) te zatvorene parafilmom. Gljive su rasle na sobnoj temperaturi (24°C) i osvijetljene svjetlošću od 2 500 luxa.. Intenzitet rasta svakog izolata određen je mjerenjem promjera svake kulture pod kutem od 90º, trećeg i petog dana nakon nasađivanja. Međutim, kod nekih izolata došlo je do zagađenja bakterijama, vjerojatno prilikom nacjepljivanja, ili do nepravilnog rasta. Izolati s nepravilnim rastom i oni sa zagađenjima su uklonjeni iz eksperimenta i cijeli postupak je ponovljen. Petrevijeke u kojima se i nakon ponovljenog nacjepljivanja pojavilo zagađenje, prilikom obrade rezultata u Microsoft Excel-u i programu Statistika, tretirani su kao oni koji «nedostaju».

2.7. Određivanje sporulacije izolata gljive zaraženih hipovirusima

Nakon četrnaestog dana rasta mjerena je sporulacija lovranskih izolata gljive zaraženih hipovirusima. Spore su s gljiva oslobođene pomoću 10ml 15%- tnog Tween-a 80 (Sigma- Aldrich) uz lagano prelaženje staklenog štapića preko površine gljive. Otopina sa sporama je profiltrirana te su spore izbrojane pomoću komorice za brojanje. Iz dobivenih podataka određena je srednja vrijednost broja spora po mililitru volumena svake gljivične kulture.

2.8. Rast i sporulacija izvornih bijelih gljiva s virusima

Izvorne, bijele hipovirulentne gljive koje sadrže virus CR23, odnosno EP713 nacijepljene su na PDA podlogu u 3 replike. Intenzitet rasta svakog izolata određen je trećeg i petog dana nakon nasađivanja, a sporulacija nakon 14. dana na isti način kao i u svih ostalih izolata gljive. Ove izvorne gljive služile su u svrhu kontrole rasta i sporulacije te mogućnosti kasnije usporedbe istih parametara s izolatima zaraženim navedenim virusima. Pigmentacija izolata gljiva utvrđena je 14. dana usporedbom boje izolata bez virusa i onih koji sadrže virus.

2.9. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih podataka korišteni su Microsoft Excel i program Statistika. Podaci su obrađeni analizom varijance (ANOVA). Prije analize svi podaci su logaritamski transformirani. Osnovna uloga transformacije podataka je prevođenje izvornih podataka u neku drugu skalu, pri čemu se može postići zadovoljavanje preduvjeta za primjenu analize varijance (preduvjet za analizu varijance je da svi podaci slijede normalnu distribuciju). Nakon transformacije, odnos i poredak za sve podatke, u odnosu na izvorne, ostaju nepromijenjeni.

Analizi varijance prethodi F-test ili grupni test za ispitivanje nulte hipoteze pokusa prema kojoj su aritmetičke sredine osnovnih skupova ili tretmana međusobno jednake. P *vrijednost* je razina značajnosti F - testa, odnosno pogreška kojom se tvrdi da je razlika varijanci statistički značajna. Statistički značajna razlika postoji ukoliko je $p < 0,05$ (značajno), $p < 0,01$ (vrlo značajno), $p < 0,001$ (posebno visoka značajnost), a ne postoji ukoliko je $p > 0,05$. Intercept je regresijska vrijednost zavisne varijable, degree of freedom je stupanj slobode u statističkoj analizi dok je error stupanj pogreške. F označava faktor, effect df je utjecaj stupnja slobode, a error df je pogreška stupnja slobode u statističkoj analizi.

Podaci za rast gljive statistički su obrađeni analizom varijance za ponavljana mjerenja (ANOVA, Repeated measures). U analizu su uključena četiri izolata (L14, L44, L45, L76) tretirana s dva različita virusa, CR23 i EP713 te isti izolati bez virusa. U analizi su korištene srednje vrijednosti pojedinih replika. Rezultati su prikazani i u obliku grafova pojedinačno za rast nakon 3. i nakon 5. dana u programu Excel.

Radi boljeg uočavanja razlike između nezaraženih i zaraženih izolata korišten je linijski graf, podaci korišteni u ovom slučaju dobiveni su računskom operacijom oduzimanja, vrijednost rasta nezaraženih izolata oduzet je od vrijednosti rasta izolata zaraženih virusom.

One-way ANOVA multivariate (veći broj zavisnih varijabli) korištena je za usporedbu rasta lovranskih zaraženih izolata i izvornih, bijelih gljiva budući da su analizu uključeni tretmani, ali i dani mjerenja. Za iste podatke napravljen je graf u Excelu.

Podaci za sporulaciju nezaraženih i zaraženih izolata obrađeni su analizom One-way ANOVA zbog usporedbe jačine sporulacije nezaraženih i zaraženih izolata u obliku srednjih vrijednosti replika izolata, a isto je učinjeno pri usporedbi sporulacije lovranskih zaraženih izolata i izvornih, bijelih gljiva.

3. Rezultati

3.1. Morfologija izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Svi izolati zaraženi virusom CR23 su bijelonarančaste boje što ukazuje na suzbijenu pigmentaciju tj. prisutnost hipovirusa. Razlika u rastu i jakosti gubitka narančastog pigmenta očigledna je unutar različitih replika istog izolata, ali i među različitim izolatima. U nekih replika uočeno je zagađenje (bilo bakterijsko ili druge vrste) koje je onemogućilo radijalno širenje gljive na podlozi ili je uzrokovalo nepravilan rast, npr. izolat L14 CR23 (3) te L45 CR23 (1 i 3). Zagađenje može nastati prilikom nacjepljivanja micelija na podlogu ili zbog nedovoljne sterilizacije korištenog pribora. Neki od izolata su i nakon ponovljenog nacjepljivanja sadržavali neku vrstu zagađenja koja je ponovila problem nepravilnog rasta kao što je to u slučaju 3. replike izolata L14 CR23 (Slika 18).



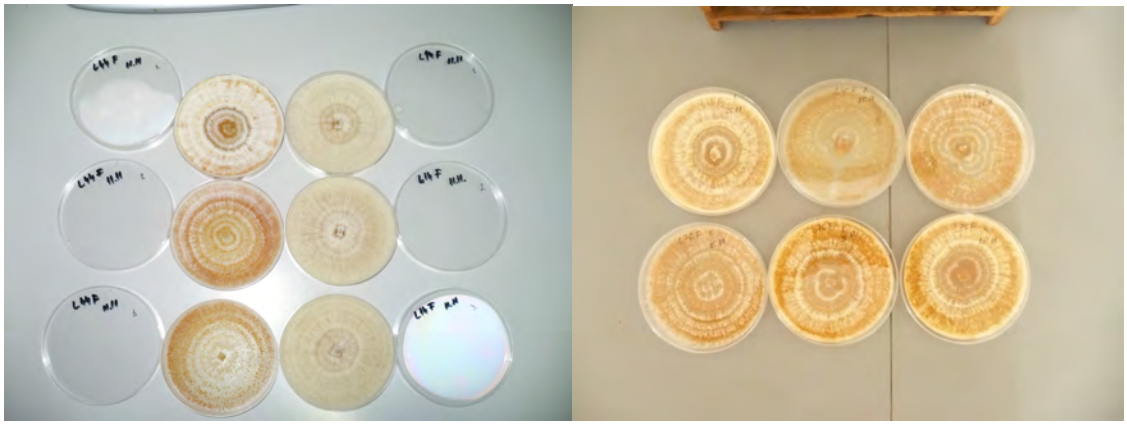
Slika 18. Razlike u rastu lovranskih izolata zaraženih virusom CR23.
(Autorska fotografija)

Izolati zaraženi virusom EP713 rasli su pravilno, radijalno osim dviju replika izolata L45 EP713 koje su imale nepravilan srcoliki rast rast već nakon 3. dana (Slika 19 lijevo). Za te izolate nacjepljivanje je ponovljeno nakon čega su svi izolati rasli pravilno (Slika 19 desno i Slika 20). U svih izolata gljive, došlo je do jakog suzbijanja

pigmentacije što je očigledan znak zaraženosti hipovirusom CHV1-EP713. Razlike u rastu i pigmentaciji među pojedinim replikama istog izolata vjerojatno su odraz slučajne fenotipske varijacije budući da svaka replika sadržava genetički identičan komadić micelija gljive.



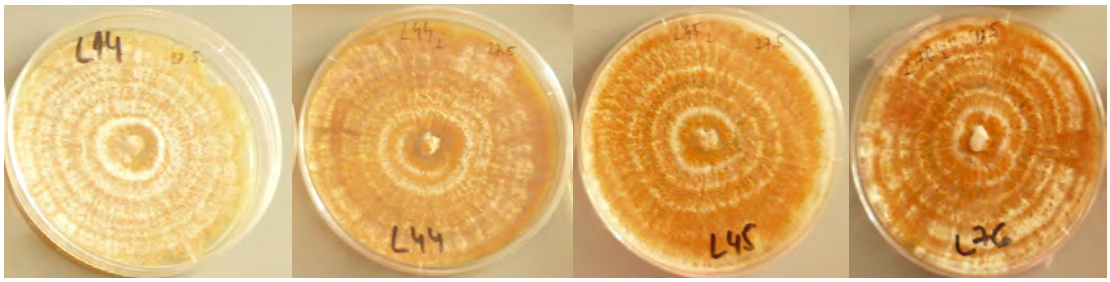
Slika 19. Nepravilan (srcolik) rast pojedinih izolata L45 EP713 (lijevo). Pravilan radijalni rast izolata L76 EP713 (desno).
(Autorska fotografija)



Slika 20. Pravilan rast izolata s francuskim virusom EP713 14. dana rasta. Razlike u pigmentacji među različitim izolatima i replikama.
(Autorska fotografija)

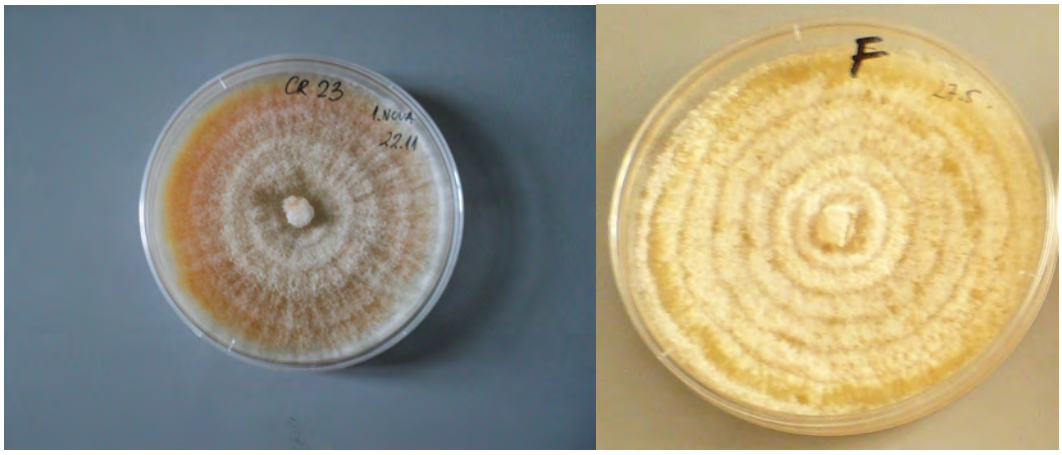
Nezaraženi lovranski izolati rasli su pravilno tijekom 14 dana te razvili izrazito narančasti pigment koji je znak virulentnosti i velikog broja spora (Slika 21).

Izvorne, hipovirulentne gljive, CR23 i EP713, rasle su radijalno 14 dana i poslužile su kao kontrola zaraženim izolatima (Slika 22).



Slika 21. Narančasti, virulentni lovranski izolati gljive.

(Autorska fotografija)



Slika 22. Rast izvornih, hipovirulentnih gljiva CR23 i EP713.

(Autorska fotografija)

3.2. Rast izolata gljive *Cryphonectria parasitica in vitro*

Nakon 3. dana rasta nezaraženi izolati L14, L45 i L76 su rasli brže nego isti izolati zaraženi virusima CR23, odnosno EP713, dok je izolat L44 sporije rastao od istog izolata zaraženog virusima. Nakon 5. dana izolat L44 također je sporije rastao od istog izolata zaraženog virusima. Ostali nezaraženi izolati L14, L45 i L76 su uglavnom rasli brže nego isti izolati zaraženi virusima (Tablica 3, Tablica 4, Slika 23 i Slika 24).

Tablica 3. Rast lovranskih izolata zaraženih hipovirusima 3. i 5. dana nakon inokulacije.

Legenda: SV- srednja vrijednost, Ø -znak izostanka rezultata

Izolat gljive	Broj replike	Rast nakon 3.dana inokulacije (cm)	SV	Rast nakon 5.dana inokulacije (cm)	SV
L14 CR23	1.	1,8 1,7 1,7 1,6	1,7	3,2 3,1 3,1 3	3,1
	2.	1,4 1,8 2 1,8	1,75	2,8 3,6 3,5 3,2	3,275
	3.	0,8 1 0,8 0,6	0,8	zagađenje	Ø
L44 CR23	1.	1,7 1,7 1,7 1,8	1,725	3,1 3 3,1 3,4	3,15
	2.	1,5 1,8 2 1,5	1,7	3 2,9 3 3,4	3,075
	3.	1,7 1,8 1,8 1,9	1,8	3 3,1 3,5 3	3,15
L45 CR23	1.	1,5 1,4 1,5 1,5	1,475	2,6 2,5 2,7 2,7	2,625
	2.	1,5 1,8 1,5 1,4	1,55	2,6 2,6 2,7 2,7	2,65
	3.	1,5 1,5 1,5 1,5	1,5	zagađenje	Ø
L76 CR23	1.	1,8 2 1,7 1,5	1,75	3,6 3 3,2 3,7	3,375
	2.	1,5 1,8 1,6 1,5	1,6	3,5 3,6 3,5 3,2	3,45
	3.	1,8 1,8 1,8 1,8	1,8	3,5 3,1 3,3 3,7	3,4

L14 EP713	1.	1,9 1,9 1,6 1,6	1,75	3,3 3,3 3 2,9	3,125
	2.	1,6 1,8 1,6 1,8	1,7	3 3 3 3,1	3,025
	3.	1,7 1,9 1,6 1,8	1,75	3,1 3,1 3 3,1	3,075
L44 EP713	1.	2 1,7 1,8 1,9	1,85	3,5 3,2 3,4 3,5	3,4
	2.	1,7 1,9 2 1,9	1,875	3,1 3,3 3,5 3,3	3,3
	3.	2 2 2 1,9	1,975	3,5 3,5 3,5 3,4	3,475
L45 EP713	1.	1,5 1,5 1,5 1,3	1,45	3,8 3,4 3,3 3,2	3,425
	2.	1,8 1,6 1,6 1,7	1,675	4 3,2 0 3	2,55
	3.	1,5 1,7 1,5 1,7	1,6	2,8 2,5 2,5 3	2,7
L76 EP713	1.	1,9 2 1,7 1,5	1,775	3,4 3,7 3,4 3,3	3,45
	2.	1,4 1,5 1,8 1,8	1,625	3,3 3,3 3,9 3,7	3,55
	3.	1,5 1,5 1,7 1,6	1,575	3,8 3,4 3,3 3,4	3,475

Tablica 4. Rast nezaraženih lovranskih izolata 3. i 5. dana nakon inokulacije.

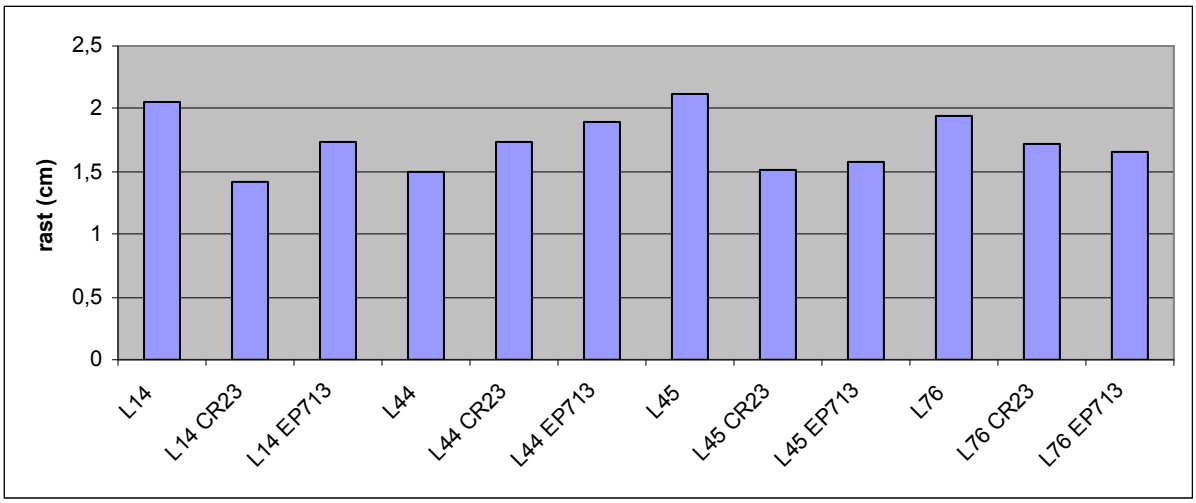
Izolat gljive	Broj replike	Rast nakon 3.dana inokulacije (cm)	SV	Rast nakon 5.dana inokulacije (cm)	SV
L14	1.	1,9 2,3 2,2 1,7	2,025	3,3 3,7 3,5 3	3,375
	2.	1,9 2 2,2 2	2,025	3 3,3 3,5 3,3	3,275
	3.	2,2 2,4 2 1,8	2,1	3,5 3,7 3,5 3,1	3,45
L44	1.	0,8 1,5 1,5 1,8	1,4	2 3 2,9 3	2,725
	2.	1,3 1,8 2,1 1,8	1,75	3 3 3,3 3,1	3,1
	3.	0,8 1,3 1,5 1,7	1,325	2,3 2,5 2,9 3	2,675
L45	1.	2,2 2,3 2,2 2	2,175	3,5 3,8 3,5 3	3,45
	2.	2,2 2 2,2 2,2	2,15	4 4 4 3,9	3,975
	3.	2,2 2,3 1,9 1,7	2,025	3,4 3,7 3,6 3,5	3,55
L76	1.	2 2 1,6 1,6	1,8	3,3 3,4 3,1 3	3,2
	2.	2,1 2,1 1,8 2	2	3,5 3,5 3 3,4	3,35
	3.	2 2,3 2 1,8	2,025	3,6 3,8 3,3 3,3	3,5

Najmanju vrijednost rasta gljive nakon 3. i 5. dana imao je hipovirulentni izolat CR23 i francuski EP713 (Tablica 5).

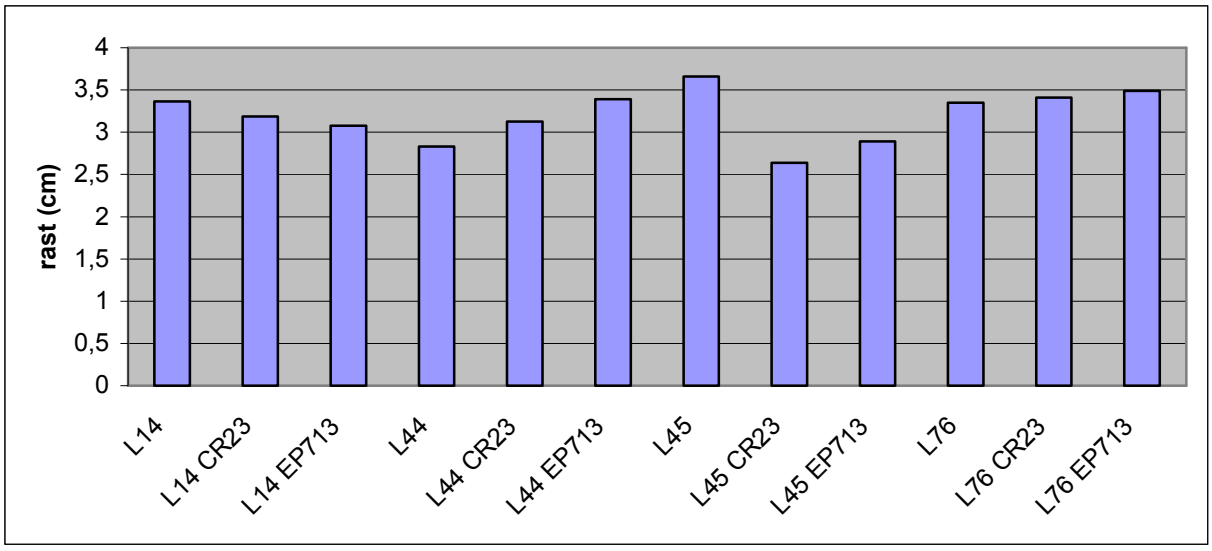
Tablica 5. Rast izvornih, bijelih, hipovirulentnih izolata.

Legenda: SV- srednja vrijednost, CR23*, EP713*- izvorni izolat

Izolat gljive	**Broj replike**	**Rast nakon 3.dana inokulacije (cm)**	**SV**	**Rast nakon 5.dana inokulacije (cm)**	**SV**
CR23*	1.	1,7	1,45	2,8	2,575
		1,4		2,6	
		1,3		2,4	
		1,4		2,5	
	2.	1,3	1,35	2,1	2,375
		1,5		2,5	
		1,2		2,2	
		1,4		2,7	
	3.	1,6	1,525	2,6	2,5
		1,1		2,2	
		1,6		2,5	
		1,8		2,7	
EP713*	1.	1,6	1,5	2,8	2,7
		1,6		2,8	
		1,3		2,5	
		1,5		2,7	
	2.	1,3	1,45	2,4	2,575
		1,5		2,6	
		1,5		2,8	
		1,5		2,5	
	3.	1,5	1,375	2,5	2,475
		1,4		2,5	
		1,3		2,4	
		1,3		2,5	



Slika 23. Rast zaraženih i nezaraženih izolata gljive nakon 3. dana inokulacije.



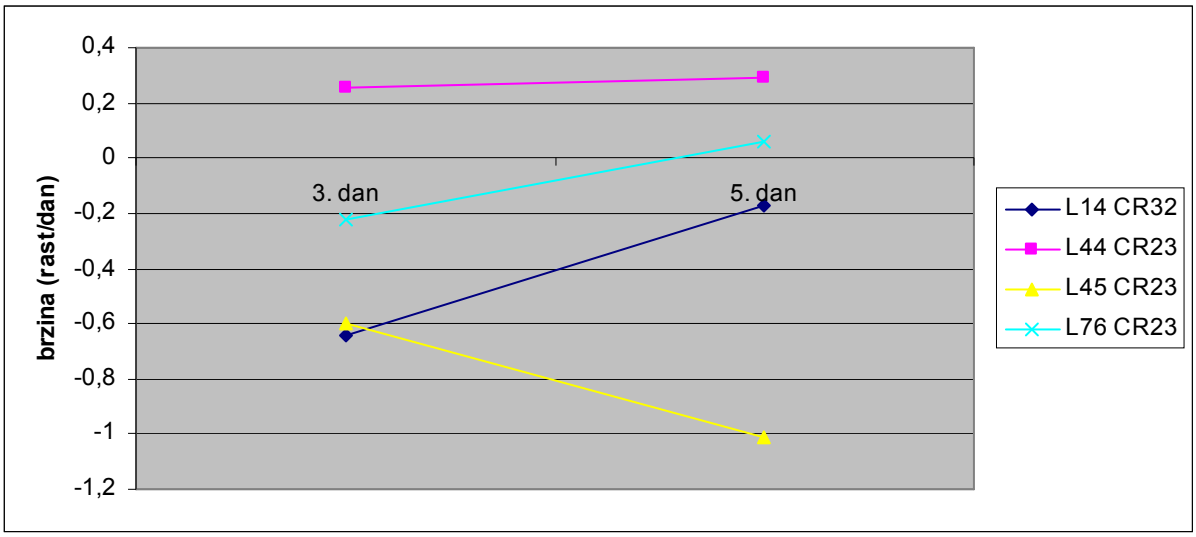
Slika 24. Rast zaraženih i nezaraženih izolata gljive 5. dana nakon inokulacije.

S ciljem utvrđivanja razlike između brzine rasta zaraženih i nezaraženih sojeva napravljen je linijski graf u Excel-u čije su vrijednosti dobivene kao rezultat oduzimanja srednje vrijednosti rasta svih replika istog nezaraženog izolata od srednje vrijednosti rasta svih replika istog zaraženog izolata. Pozitivne vrijednosti označavaju brži rast, a negativne sporiji rast izolata gljiva. Nula je vrijednost istog rasta oba izolata (zaraženog i nezaraženog). Početna i završna točka su 3. i 5. dan. Grafovi su napravljeni pojedinačno za dva različita virusa CR23 i EP713 (Slika 25 i Slika 26).

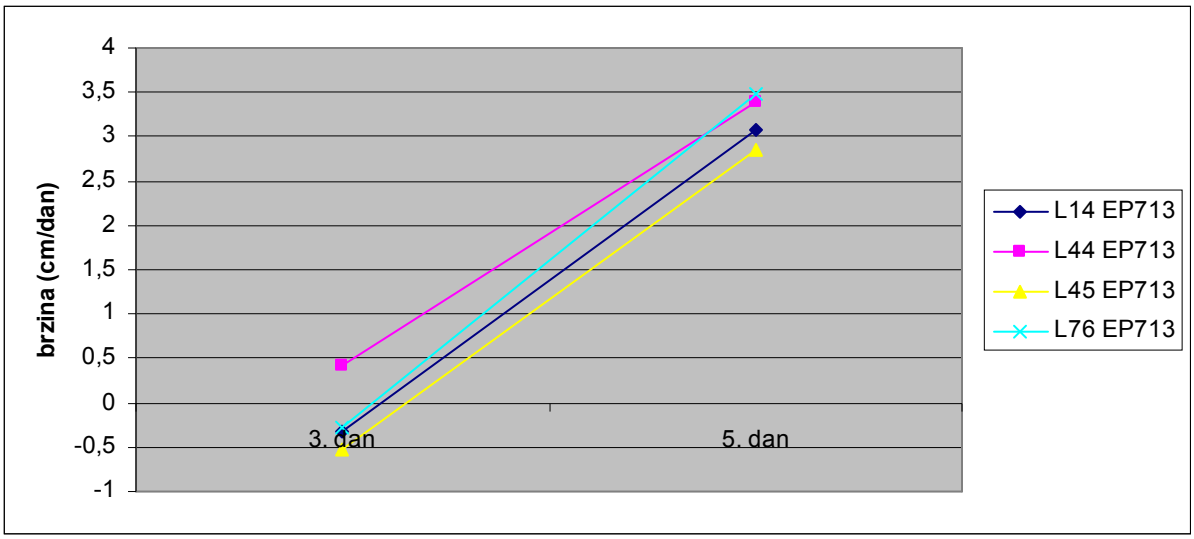
U slučaju razlike u brzini rasta nezaraženih izolata i onih zaraženim virusom CR23 možemo zaključiti da je zaraženi izolat L14 CR23, kroz svih 5 dana, rastao sporije u odnosu na nezaraženi L14. L44 CR23 rastao je i 3. i 5. dana brže od nezaraženog L44 dok je L76

CR23 3. dana imao sporiji rast, a nakon 5. dana malo brži rast od nezaraženog L76. Najsporije je rastao izolat L45 CR23 koji je nakon 5. dana rastao još sporije nego u prva 3. dana u odnosu na nezaraženi L45 (Slika 25).

Kada se radi o usporedbi razlike u brzini rasta nezaraženih izolata i izolatima zaraženih francuskim EP713 virusom situacija je drugačija. Izolat L14 EP713 u početku raste sporije, a kasnije brže od nezaraženog izolata L14. Isto vrijedi i za L45 EP713 i L76 EP713 u usporedbi sa L45 i L76. L44 EP713 od samog početka raste brže nego nezaraženi L44 izolat (Slika 26).

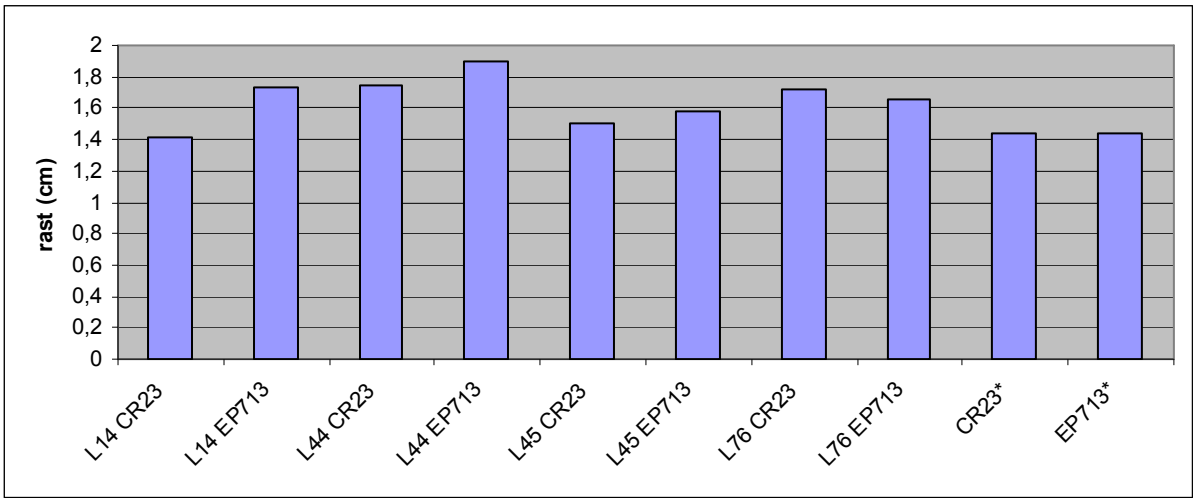


Slika 25. Prikaz razlike u brzini rasta izolata zaraženih virusom i nezaraženih izolata. 0 je vrijednost gdje nema razlike u brzini rasta izolata, pozitivne vrijednosti označavaju brži, a negativne sporiji rast.

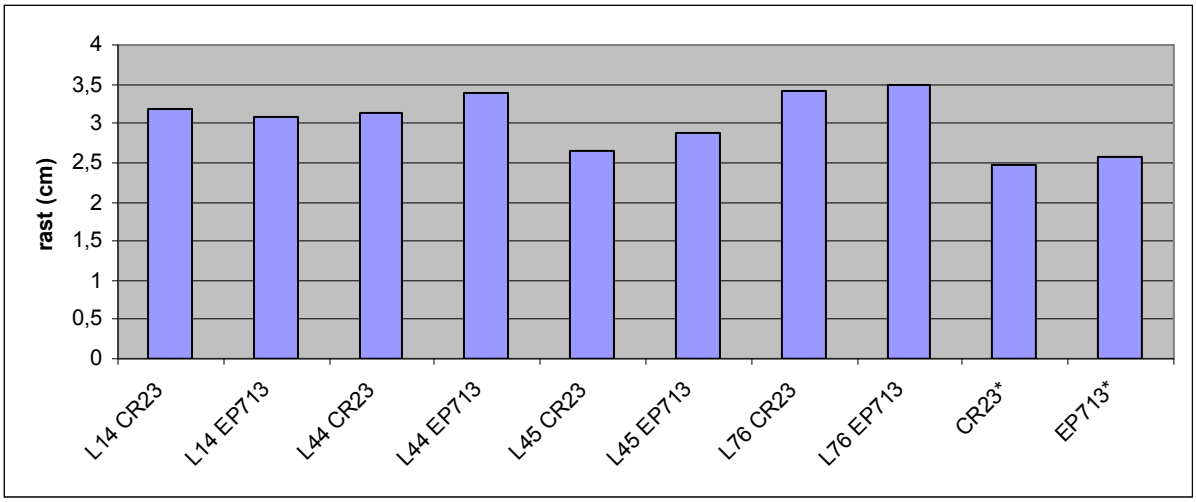


Slika 26. Prikaz razlike u brzini rasta izolata zaraženih virusom i nezaraženih izolata izražena u centimetrima po danu. 0 je vrijednost gdje nema razlike u brzini rasta izolata, pozitivne vrijednosti označavaju brži, a negativne sporiji rast.

Stupčani grafovi (Slika 27 i Slika 28) uspoređuju rast svih zaraženih izolata i izvornih gljiva koje su označene kao CR23* i EP713*. Nakon 3. dana izvorne, hipovirulentne gljive rasle su sporije u odnosu na izolate zaražene virusima iz tih gljiva. Rast zaraženih izolata nakon 5. dana brži je u odnosu na izvorne gljive koje sadrže isti virus (Slika 27 i Slika 28).



Slika 27. Rast izolata zaraženih virusima i izvornih, hipovirulentnih gljiva nakon 3. dana. Legenda: CR23*, EP713*- izvorni izolat.



Slika 28. Rast izolata zaraženih virusima i izvornih, hipovirulentnih gljiva nakon 5. dana.
Legenda: CR23*, EP713*- izvorni izolat.

3.3. Sporulacija izolata gljive *Cryphonectria parasitica in vitro*

Svi zaraženi izolati gljive imaju manji broj spora u odnosu na nezaražene izolate. Izolati zaraženi virusom CR23 imaju najmanji broj spora u odnosu na izolate zaražene virusom EP713 i one nezaražene. Izolati s virusom EP713 imaju manji broj spora od izolata bez virusa. Izolat L14 EP713 nije imao niti jednu sporu. Od nezaraženih izolata najmanji broj spora imao je izolat L44 (Tablica 6, 7 i 8, Slika 29).

Tablica 6. Srednja vrijednost broja spora zaraženih izolata gljive *C. parasitica* u mililitru otopine.
Legenda: SV- srednja vrijednost

Izolat gljive	**Broj spora / ml SV**
L14 CR23	$4{,}35 \times 10^{6}$
L44 CR23	$1{,}3675 \times 10^{7}$
L45 CR23	$9{,}15 \times 10^{6}$
L76 CR23	$6{,}116 \times 10^{6}$
L14 EP713	0
L44 EP713	$1{,}1083 \times 10^{8}$
L45 EP713	$1{,}0595 \times 10^{8}$
L76 EP713	$8{,}833 \times 10^{7}$

Tablica 7. Srednja vrijednost broja spora nezaraženih lovranskih izolata gljive *C. parasitica* u mililitru otopine.

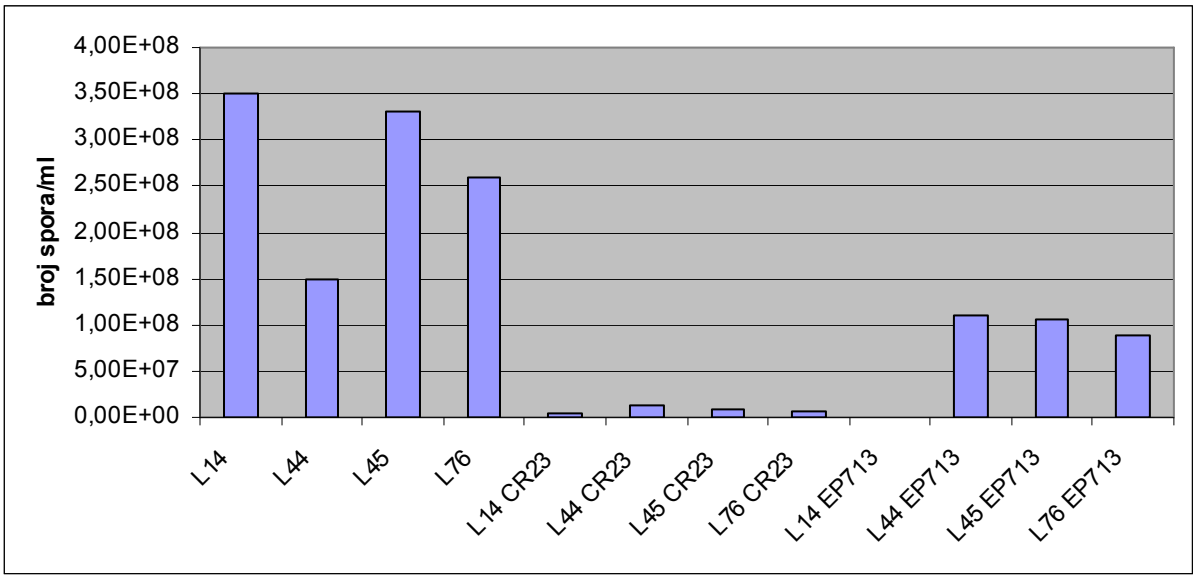
Legenda: SV- srednja vrijednost

Izolat gljive	Broj spora / ml SV
L14	$3,475x10^8$
L44	$1,475x10^8$
L45	$3,3x10^8$
L76	$2,6x10^8$

Tablica 8. Srednja vrijednost broja spora izvornih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* u mililitru otopine.

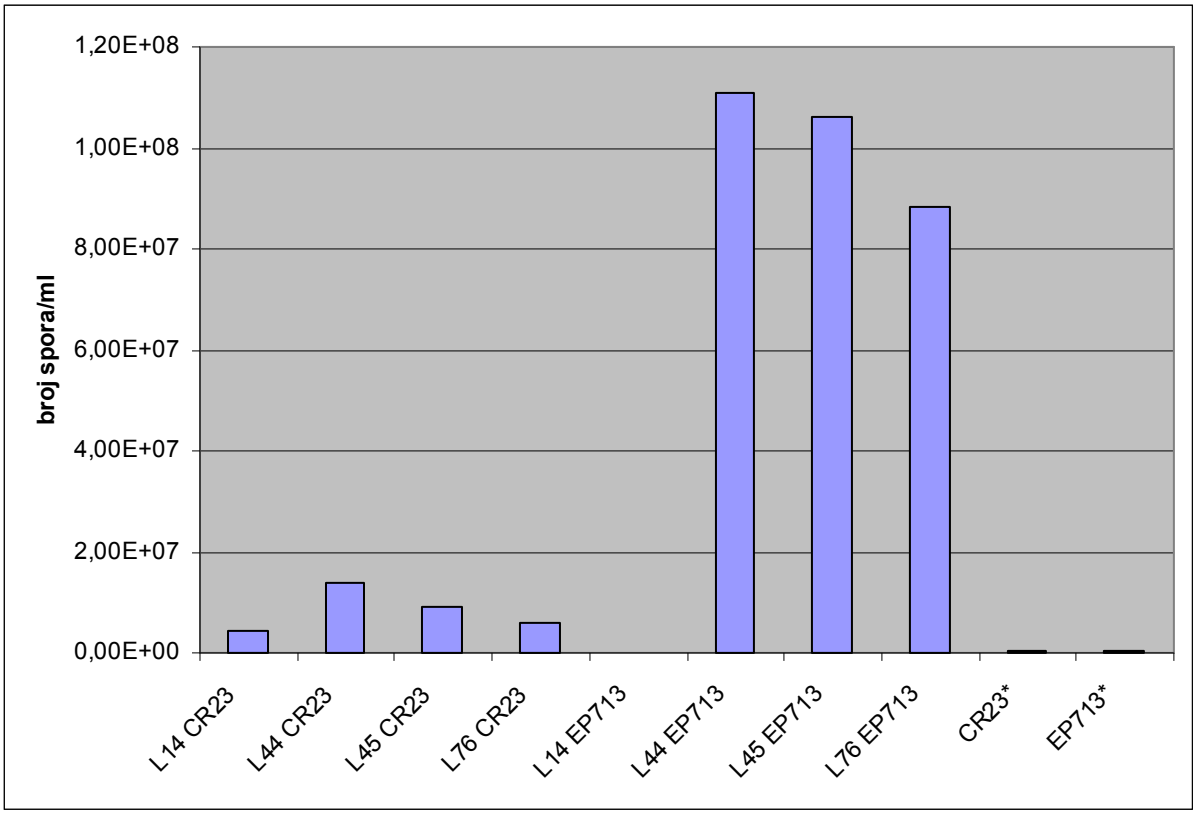
Legenda: SV- srednja vrijednost, CR23*, EP713*- izvorni izolat

Izolat gljive	Broj spora/ml SV
CR23*	$2,91x10^6$
EP713*	$3,33x10^5$



Slika 29. Srednja vrijednost broja spora virusom zaraženih i nezaraženih izolata gljive u 1 mililitru otopine.

Najmanje spora/ml imaju izvorne, hipovirulentne gljive, a ako usporedimo djelovanje dvaju virusa možemo tvrditi da je creski virus CR23 jače djelovao na smanjenje sporulacije izolata nego francuski EP713 (Slika 30).

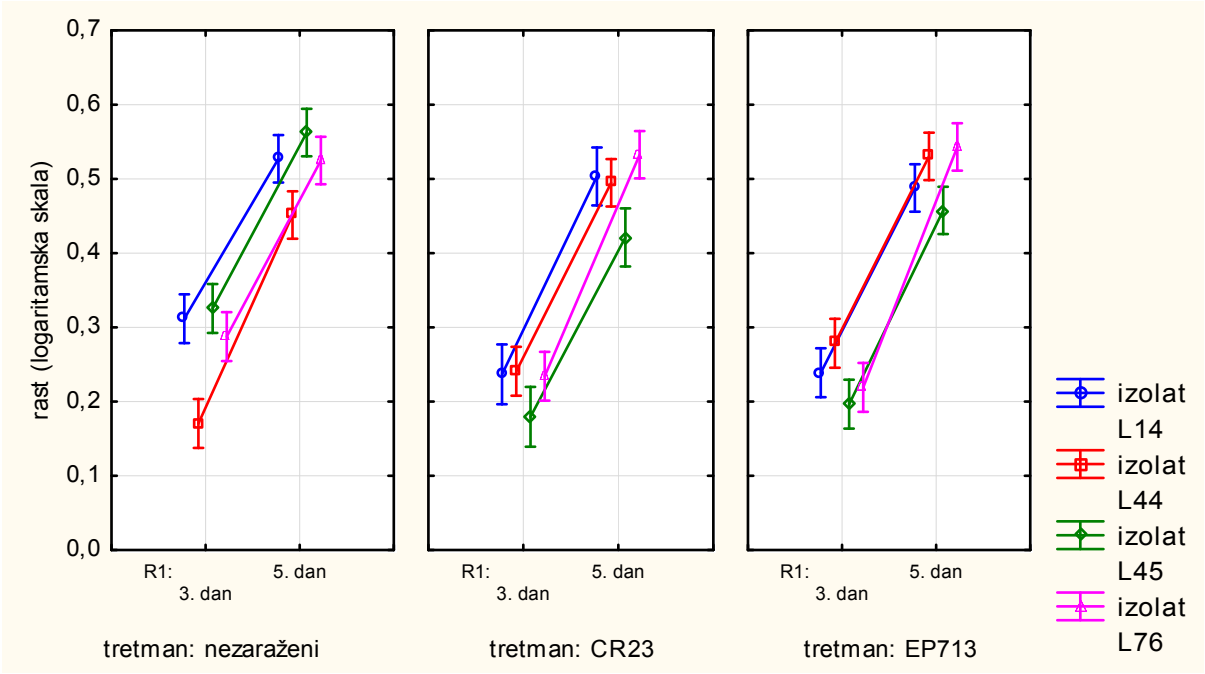


Slika 30. Srednja vrijednost broja spora virusom zaraženih izolata i izvornih, hipovirulentnih gljive u 1 mililitru otopine.

Legenda: CR23*, EP713*- izvorni izolat

3.4. Statistička obrada podataka

Primjenom analize varijance za ponavljana mjerenja (Repeated measure ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika $p < 0,001$ u rastu različitih izolata tretiranih virusima u odnosu na nezaražene izolate (Slika 31). U tablici 9 je, međutim, vidljivo kako statistički značajna razlika nestaje uključivanjem vremena (R1) u analizu. Drugim riječima, izolati različitih tretmana nisu promijenili brzinu rasta u ovisnosti o vremenu. U analizi su korištene srednje vrijednosti pojedinih replika svih izolata.

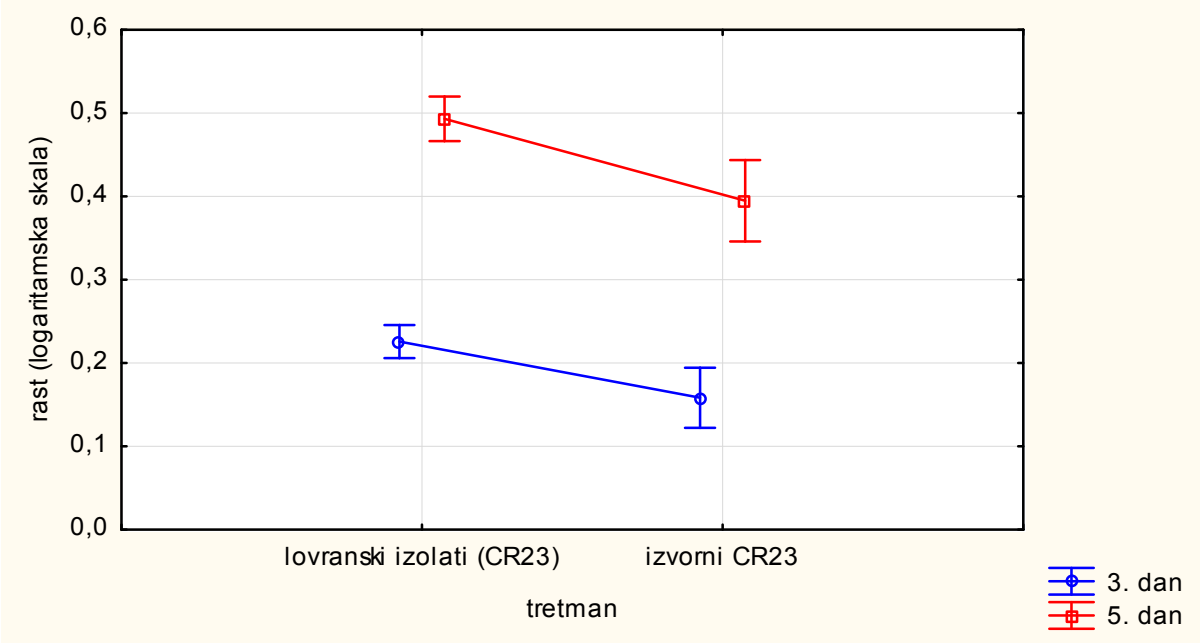


Slika 31. Rast lovranskih izolata primjenom različitih tretmana u ovisnosti o vremenu u analizi Repeated measure ANOVA. Rast je izražen logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka u centimetrima. Legenda: R1- vrijeme izraženo u danima

Tablica 9. Prikaz rezultata analize Repeated measure ANOVA za podatke rasta lovranskih zaraženih i nezaraženih izolata.

	Stupanj slobode	**F**	**p**
Regresijska vrijednost zavisne varijable	1	11391,51	0,000000
izolat	3	5,63	0,005095
tretman	2	11,04	0,000478
izolat*tretman	6	17,85	0,000000
Stupanj pogreške	22		
R1	1	1713,41	0,000000
R1*izolat	3	2,49	0,086489
R1*tretman	2	2,07	0,149834
R1*izolat*tretman	6	1,60	0,194579
Stupanj pogreške	22		

Analizom One-way ANOVA utvrđeno je kako postoji statistički značajna razlika (p=0,010400) u rastu, trećeg i petog dana, između lovranskih izolata zaraženih creskim virusom i izvorne, gljive koja sadrži isti virus (Slika 32). Lovranski zaraženi izolati gljive su u oba mjerenja rasli brže nego izvorna, bijela gljiva. U analizi su korištene srednje vrijednosti pojedine replike.



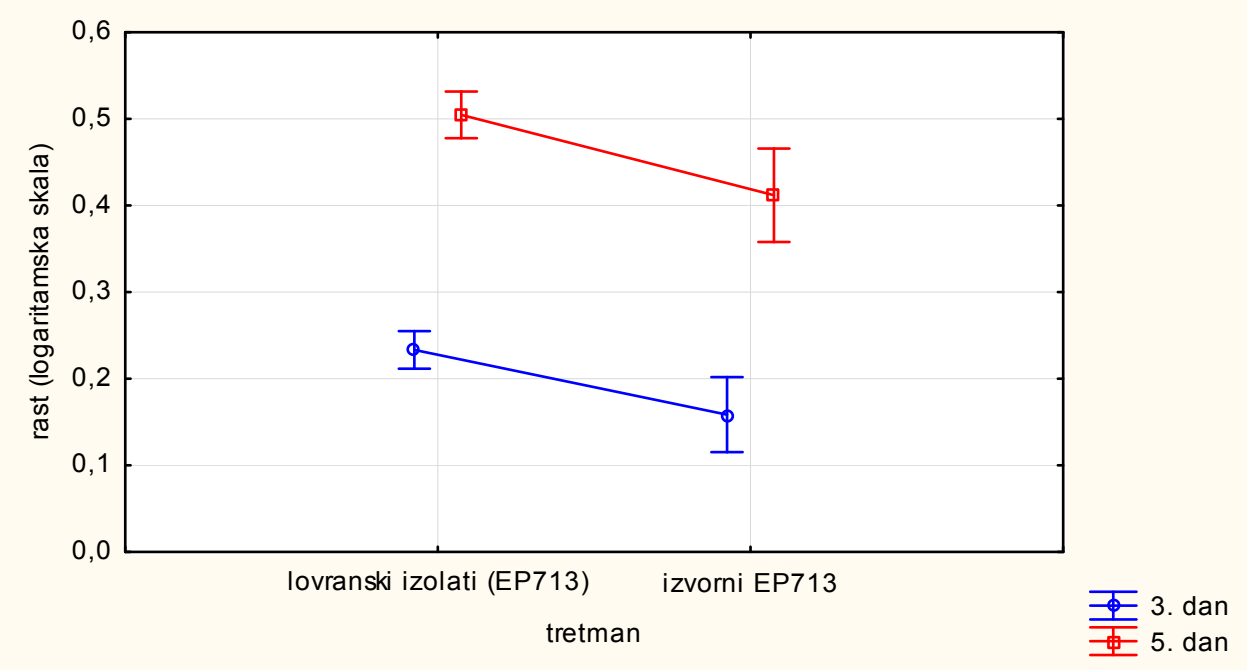
Slika 32. Rezultati rasta izolata zaraženih virusom CR23 u analizi One-way ANOVA. Rast je izražen logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka za rast u centimetrima.

Tablica 10. Prikaz rezultata rasta u One-way ANOVA za izolate zaražene virusom CR23 i izvornu cresku gljivu.

Utjecaj	F	Utjecaj stupnja slobode	Utjecaj stupanja pogreške	p
Regresijska vrijednost zavisne varijable	581,1765	2	10	0,000000
tretman	7,4613	2	10	0,010400

Statistički značajna razlika (p=0,004566) u rastu utvrđena je između lovranskih izolata zaraženih virusom EP713 i izvorne francuske gljive (Slika 33). Naime lovranski izolati rasli su, trećeg i petog dana, brže u odnosu na izvornu, bijelu gljivu koja je u sebi sadržavala isti

virus. Podaci su obrađeni statističkom analizom One-way ANOVA, a korištene su srednje vrijednosti pojedinih replika.

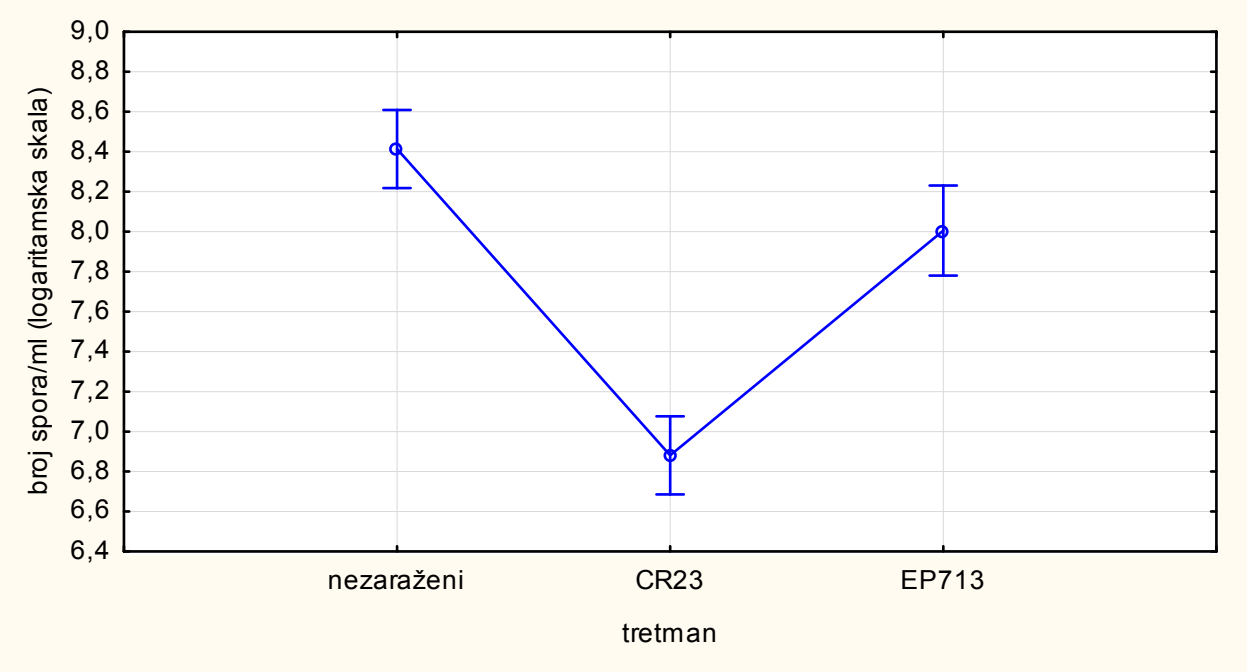


Slika 33. Usporedba rasta izolata zaraženih francuskim virusom EP713 nakon 3. i 5. dana analizom One-way ANOVA. Rast je izražen logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka za rast u centimetrima.

Tablica 11. Prikaz rezultata rasta u One-way ANOVA za izolate zaražene virusom EP713 i izvornu francusku gljivu.

Utjecaj	F	Utjecaj stupnja slobode	Utjecaj stupnja pogreške	p
Regresijska vrijednost zavisne varijable	565,1101	2	12	0,000000
tretman	8,7308	2	12	0,004566

Primjenom One-way ANOVA statističke analize utvrđena je visoka razina statističke značajnosti $p < 0,001$ u sporulaciji nezaraženih i zaraženih izolata (Slika 34). Nezaraženi izolati imali su daleko veći broj spora po mililitru u odnosu na zaražene izolate. Važno je napomenuti da su izolati zaraženi virusom CR23 imali su manji broj spora od onih zaraženih francuskim EP713 virusom.

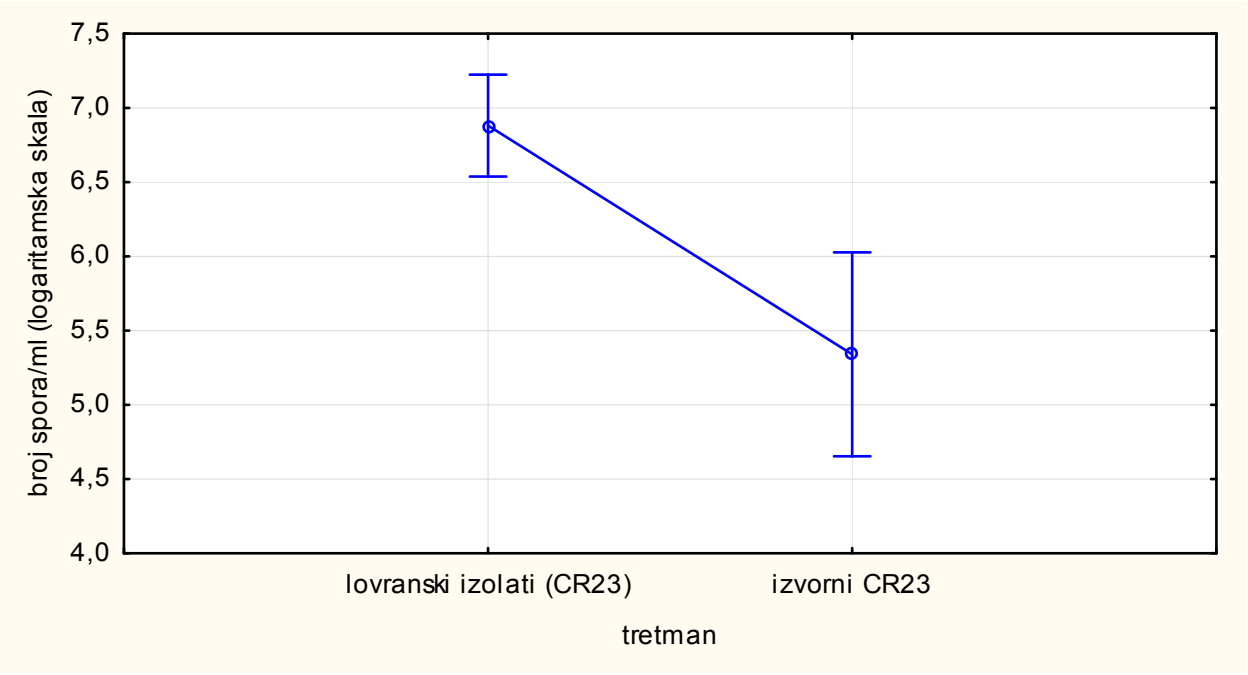


Slika 34. Sporulacija nezaraženih izolata i sporulacija istih nakon tretmana s dva različita virusa. Sporulacija je izražena logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka broja spora po mililitru.

Tablica 12. Prikaz rezultata sporulacije u One-way ANOVA za nezaražene i zaražene izolate gljive.

Utjecaj	Stupanj slobode	F	p
Regresijska vrijednost zavisne varijable	1	22706,85	0,000000
tretman	2	86,75	0,000004
Stupanj pogreške	8		

Lovranski izolati zaraženi virusom CR23 imali su veći broj spora nego izvorni izolat bijele gljive s Cresa. Statistički značajna razlika (p=0,007768) utvrđena je analizom One-way ANOVA pri čemu su korištene srednje vrijednost broja spora/ml tri replike istog izolata. (Slika 35).

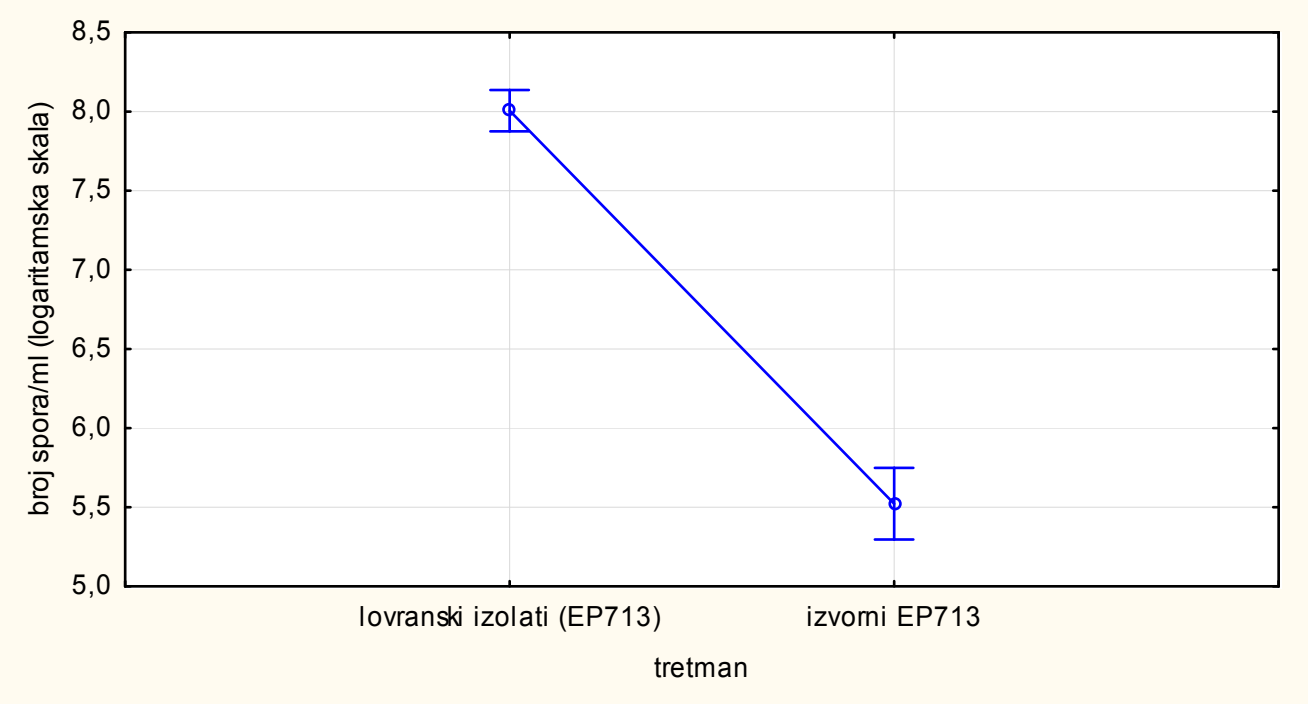


Slika 35. Razlika u sporulaciji lovranskih izolata s virusom CR23 i izvorne gljive s Cresa u analizi One-way ANOVA. Sporulacija je izražena logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka broja spora po mililitru.

Tablica 13. Prikaz rezultata sporulacije u One-way ANOVA za izolate zaražene CR23 virusom i izvornu cresku gljivu.

Utjecaj	Stupanj slobode	F	p
Regresijska vrijednost zavisne varijable	1	2568,625	0,000017
tretman	1	40,807	0,007768
Stupanj pogreške	3		

Statističkom analizom utvrđena je velika razlika u sporulaciji $p < 0,001$ između izolata zaraženih francuskim virusom EP713 i izvorne, francuske gljive (Slika 36). Lovranski izolati s virusom imali su puno veći broj spora po mililitru nego gljiva iz francuske zaražena istim virusom. U analizi su korištene srednje vrijednosti tri replike pojedinog izolata.



Slika 36. Razlika u sporulaciji zaraženih lovranskih izolata i izvornog izolata francuske gljive u analizi One-way ANOVA. . Sporulacija je izražena logaritmom nastalim transformacijom izvornih podataka broja spora po mililitru.

Tablica 14. Prikaz rezultata sporulacije izolata zaraženih EP713 virusom i izvorne francuske gljive.

Utjecaj	**Stupanj slobode**	**F**	**p**
Regresijska vrijednost zavisne varijable	1	49702,30	0,000020
tretman	1	1674,54	0,000597
Stupanj pogreške	2		

4. Rasprava

Istraživanjem je utvrđeno da oba virusa CR23 i EP713 imaju značajan, negativan učinak na patogenu gljivu *Cryphonectria parasitica*. Iako ovaj učinak nije manifestiran na isti način za korištene parametre (sporulacija, pigmentacija i rast) generalna slika pokazuje da oba virusa mogu biti važni posrednici u biološkoj kontroli.

U slučaju glavne mjere, odnosno broj spora, svi eksperimenti dosljedno su dali rezultate i pokazali značajnu inhibiciju reprodukcije domaćina zbog virusne infekcije.
Ovaj nalaz je izuzetno važan jer je reprodukcija usko vezana za dva biološka aspekta, fitnes i virulentnost, koji su presudni za biološku interpretaciju ovog istraživanja. Prethodno je od strane MacDonalda i Fulbrighta objašnjeno da uspješna hipovirulenca kao posrednik u biološkoj kontroli vjerojatno zahtijeva ravnotežu između ekološkog fitnesa i virulencija prigušenja.

Fitnes je sinonim za uspješnost reprodukcije organizma i pokazuje stupanj adaptacije na uvjete u ekosistemu, odnosno njegov glavni potpis prilagodbe na vanjske uvjete. Smanjenje ove mjere tako jasno odražavaju štetan utjecaj virusa i mogu predvidjeti njegovu uspješnu primjenu u biološkoj kontroli. U epidemiološkom okviru reprodukcija se često smatra odrednicom virulentnosti (tj. stupanj patogenosti) i ona je važan pokazatelj stupnja oštećenja uzrokovanog na drugom organizmu. Pojam patogenosti označava sposobnost organizma da izazove oštećenje, infekciju ili bolest. Patogenost i virulentnost su usko povezani. Moguće je reći da je virulentnost kapacitet parazita da oštećuje domaćina prikazan kao funkcija brzine reprodukcije. Ovaj koncept je dobro utvrđen u području epidemiologije i parazitologiju te je za različite patogene i parazite pokazano da što brže paraziti reproduciraju to je veća šteta koju uzrokuju na domaćinu.

Ovo istraživanje odgovara činjenici da je sve više dokaza kako paraziti igraju važnu ulogu u posredovanju ekoloških interakcija unutar zajednice (Holt i Hochberg, 1998; Poulin, 1999; Morozov i sur., 2007), a veza između ekologije zajednice i parazitologije sada je aktivno područje istraživanja. Čak i ako dokaz o tome nije potpun i zaslužuju više istraživanja, pretpostavlja se da udruženja između domaćina i parazita, prije nego slobodne živuće vrsta, djeluju kao građevni blokovi trofičkih mreža (Price i sur., 1986; Lafferty i sur., 2006; Morozov i sur., 2007). Paraziti igraju važnu ulogu u sukcesiji vegetacije (Gilbert, 2002) i imaju utjecaj na otpornost zajednice od napada egzotičnih vrsta.

Kada parazit odgovoran za nastajanje bolesti napadne zajednicu, posredovanje između napadača i zaposjele vrste mogu biti odigrane od strane hiperparazita. Iako interes za

te sustave raste u kontekstu biološke kontrole (Rosenheim i sur., 1995), samo nekoliko studija bavi se ulogom hiperparazita u uspjehu ili neuspjehu parazitske invazije. Po analogiji potencijala invazije jedne vrste, koji se iskazuje se kao ovisna o genetskim, demografskim i ekološkim faktorima (Kolar i Lodge, 2001), možemo pretpostaviti da uspjeh hiperparazita u uspostavi i ustrajanju u populaciji svog domaćina ovisi o njihovoj genetskoj i ekološkoj posebnosti (Morozov i sur., 2007).

U ovom istraživanju hiperparaziti su hipovirusi koji smanjuju stopu sporulacije i širenje gljive *Cryphonectria parasitica* uzrokujući snažno prigušenje njene virulencije, omogućujući opstanak zaraženih stabala.

Jasno vidljiva smanjena narančasta pigmentacija koja je utvrđena u svih izolata zaraženih virusima CR23 i EP713 odgovara prethodnim istraživanjima u kojima je dokazano da hipovirus CHV1-EP713 ozbiljno potiskuje pigmentacija domaćina (Faruk i sur., 2007).

Rezultati sporulacije pokazali su da lovranski izolati bez virusa (nezaraženi) produciraju puno veći broj spora nego isti izolati zaraženi virusima CR23 i EP713. Budući da je razlika u broju spora među njima visokog stupnja značajnosti sa sigurnošću možemo tvrditi da je unosom virusa došlo do snažne inhibicije nespolnog razmnožavanja gljive. Iako je smanjena reprodukcije domaćina zabilježena nakon infekcije s bilo kojim od virusnih sojeva, dva virusa se razlikuju u jačini njihova učinka. Izolati u kojima je bio prisutan francuski virus, EP713, obilnije su sporulirali od izolata sa creskim virusom. Dok naši podaci ne dopuštaju jednoznačno objašnjenja tih fenomena, treba naglasiti, da ukupni rezultat odgovara ishodu očekivanom prema simpatrija-alopatrija gledištu. Kako su u istraživanje bili uključeni izolati gljive *C. parasitica* sakupljeni na hrvatskoj obali u mjestu Lovranu i ista gljiva zaražena virusom CR23 koja je pronađena na otoku Cresu moguće objašnjenje leži u prostornom rasporedu populacija (vrsta). Tu se radi o simpatriji gdje populacije (vrste) naseljavaju isti prostor ili se preklapaju te postoji određeni protok gena među njima. S druge strane lovranski izolati gljive bili su zaraženi i francuskim virusom EP713 iz gljive prikupljene u Francuskoj te među njima postoji određena prostorna razdvojenost pa govorimo o alopatriji. Moguće je da zbog blizine mjesta pronalaska gljiva u Hrvatskoj postoji bolja prilagođenost hrvatskog hipovirusa gljivi, jer njegova prisutnost u populaciji gljive, između ostalog, ovisi kako u genskoj tako i o ekološkoj posebnosti. Istaknimo kako ovaj model odgovara onome što je pronađeno u drugih parazita gdje se infekcija simpatričkog domaćina pokazala efikasnijom nego ona alopatrijskog domaćina (Osnas i Lively, 2005). Isti rezultat imamo pri usporedbi sporulacije lovranskih izolata s virusom EP713 i izvornog, hipovirulentnog izolata gljive pronađene u Francuskoj. Prisjetimo se, među tim izolatima statistički značajna razlika bila je

visoke razine $p < 0,001$ što nije zanemarivo, ako imamo na umu da se radi o zaraženosti istim virusom. Lovranski izolati zaraženi virusom CR23 također su se značajno razlikovali u broju spora od izvorne gljive s istim virusom. Za očekivati je bilo da će navedeni izolati sporulirati podjednako jer su zaraženi istim virusom, ali to se nije dogodilo. Izvorne gljive su služile kao kontrola pomoću koje je moguće uvidjeti razliku, ali zašto je došlo do tolikog odstupanja nije poznato.

Rezultati rasta manje su jasni nego u slučaju sporulacije. Statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između rasta zaraženih (CR23 i EP713) i nezaraženih lovranskih izolata utvrđena je analizom Repeated measure ANOVA. Do gubitka značajnosti dolazi kada se u analizu uvede vrijeme (R1) iz čega je moguće zaključiti da su zaraženi i nezaraženi izolati rasli značajno različito i njihova brzina rasta nije se mijenjala u ovisnosti o vremenu (treći i peti dan). Ako pogledamo rezultate linijskog grafa u Excelu (slika 25 i slika 26) možemo jasno vidjeti kako su se različiti lovranski izolati (L14, L44, L45 i L76) ponašali različito prilikom rasta, odnosno put rasta nije jednako usmjeren za sve izolate. Neki zaraženi izolati rasli su sporije, a neki brže u usporedbi s istim nezaraženim izolatima. U slučaju kada su lovranski izolati bili zaraženi creskim virusom, izolati L14 CR23 i L45 CR23 rasli su sporije 3. i 5. dana u usporedbi s L14 i L45. Istaknimo da je samo L45 CR23 izolat nakon trećeg dana još dodatno usporio svoj rast što je moguće protumačiti na način da je CR23 virus djelovao supresivno na rast ovog izolata. Isto ne vrijedi za izolate L76 CR23 i L44 CR23. Naime, izolat L44 CR23 rastao je i trećeg i petog dana mjerenja brže u odnosu na nezaraženi L44, dok je L76 CR23 u početku rastao sporije, a kasnije brže od L76. U slučaju zaraženosti izolata francuskim (EP713) virusom, izolati, L14 EP173, L45 EP713 i L76 EP713 rastu sporije trećeg dana, ali do petog dana rastu brže i prestižu rast nezaraženih izolata. Kao i u slučaju zaraženosti creskim virusom L44 EP713 u oba mjerenja raste brže nego L44. Ovakve rezultate teško je objasniti budući da nije bilo za očekivati da će zaraženi izolati gljive, u nekim slučajevima, rasti brže nego nezaraženi izolati gljive. Promjene u ponašanju domaćina koje prate parazitsku infekciju su često takve kakve očekujemo vidjeti ako je domaćin počeo djelovati u smjeru koji pogoduje parazitu (Poulin, 2007). Poznato je i dosad viđeno da paraziti mogu uzrokovati brži rast domaćina radi boljitka u svojoj reprodukciji, taj fenomen se naziva adaptivna manipulacija domaćina. Najbolji dokazi manipulacije domaćinom potječu od biljnih parazita, osobito gljiva. Veći rast i preživljavanje domaćina može dovesti do većeg rasta i preživljavanja parazita (Pan i Clay, 2003.) Međutim, bilo bi spekulativno predložiti takvo objašnjenje za podatke prikazane ovdje pa umjesto toga predlažemo metodologiju istraživanja radije nego biološke karakteristike organizma kao jedan od mogućih uzroka za

dobivanje ovakvih rezultate rasta. U svakom slučaju ovaj fenomen svejedno treba više istražiti.

Izolati zaraženi virusom EP713 rasli su pravilno, radijalno osim dviju replika izolata L45 EP713 koje su imale nepravilan srcoliki rast rast već nakon 3. dana. Slično je uočeno u istraživanju Van Heerdena i suradnika gdje su izolati gljive *Cryphonectria cubensis* (uzročnik raka na stablima *Eucalyptus* spp. u tropskim i sutropskim krajevima) zaraženi C. parasitica hipovirusom (CHV1-EP713). Morfološke promjene su uključivale svijetlo žutonarančasti pigment, smanjen radijalni rast i nepravilne margine kolonije s hifama s dubokim prodorom u medij na kojem su gljive rasle.

Iako je eksperiment postavljen u skladu s prethodnim saznanjima i istraživanjima ljudske pogreške mogu biti jedan od uzroka neobjašnjivih rezultata. Uz to postoje neki dijelovi unutar eksperimenta koje su izvan naše mogućnosti kontroliranja. Tako su, u nekim slučajevima, različite replike istog izolata rasle međusobno drugačijom brzinom što je uzrok slučajne fenotipske varijacije, uzrokovane malim nepravilnostima prilikom eksperimenta (npr. lokalna temperatura, razlike u osvjetljenju, vrijeme otvorenosti Petrijeve zdjelice), budući je svaka od replika sadržavala genetički isti materijal. Ta razlika bi vjerojatno, unutar analiza, bila izgubljena kada bi svaki izolat imao 10 ili više replika. Uz to, nezaraženi lovranski izolati nisu rasli paralelno sa zaraženim izolatima pa postoji određeni vremenski raskorak od dva tjedna među njima što je moglo pridonijeti tome da neki od zaraženih izolata rasli brže od nezaraženih. Svi izolati rasli su 14 dana osvijetljeni svjetlošću od 2 500 luxa na sobnoj temperaturi (15-24°C). Kako je eksperiment rađen u zimskom razdoblju postoji mogućnost da je u toku rasla došlo do temperaturnog odstupanja od navedenog intervala. Ukoliko je tijekom eksperimenta došlo do kolebanja temperature to se moglo odraziti na pojačan rast nekih izolata zaraženih gljiva. Istraženo je kako ishod primjene hipovirusa na različite populacije gljive i pod različitim klimatskim uvjetima može biti nepredvidljiv, s obzirom na gljiva-virus-temperatura interakciju. Prikladnost određenog podtipa hipovirusa za biološku kontrolu ovisi o temperaturi i genotipu gljive. Prema tome, različita strategija upravljanja mora biti dizajnirana za različite regije, a najprikladnija biološka kontrola mora se ocjenjivati za svaki slučaj pojedinačno (Bryner i Rigling, 2011).

Budući da povišene temperature (24 i 30°C) mogu izazvati povećani rast i sporulaciju hipovirulentne gljive *C. parasitica*, ishod bilo koje gljiva-virus interakcije se može promijeniti kada se temperatura povisi, tako ekstremni ljetni događaj topline može pretvoriti bivšu hipovirulentnu gljivu u virulentnu (Bryner i Rigling, 2011).

Još jedna metodološka barijera je nedostatak informacija o biološkim parametrima nezaraženih izvornih gljiva, što bi značilo creske gljive bez virusa i francuske gljive bez virusa. Kako zaražene izvorne gljive i zaraženi lovranski izolati rastu drugačije teško je reći jesu li te razlike uzrokovane rezultatom interakcije između virusa i gljive ili su rezultat njihovih različitih karakteristika ili su rezultati pak oblikovani uvjetima u kojima su gljive rasle.

5. Zaključak

Creski hipovirus CR23 i francuski hipovirus EP713 pokazali su se kao supresori virulentnosti gljive *Cryphonectria parasitica*. Njihov negativan učinak na gljivu dokazan je kroz tri biološka parametra: sporulaciju, pigmentaciju i rast gljive.

Narančasti pigment gljive suzbijen je inokuliranjem hipovirusa u lovranske izolate što je dokaz prisutnosti virusa CR23 i EP713 u samim izolatima.

Oba virusa značajno su smanjili broj spora u zaraženim izolatima gljive u uvjetima *in vitro* što direktno utječe na fitnes i virulentnost gljive *C. parasitica*. Virusom zaraženi izolati će se vjerojatno, za razliku od nezaraženih izolata, sporije ili pak neuspješno širiti kroz populaciju pitomog kestena što će za posljedicu imati oporavak stabla kestena od bolesti raka kore, a time i zaustavljanje širenja bolesti.

Primjenom hipovirusa došlo je i do sporijeg rasta pojedinih izolata gljive u uvjetima *in vitro*. Ubrzani rast nekih zaraženih izolata vjerojatno je posljedica utjecaja hipovirusa na ponašanje svog domaćina ili rezultat metodoloških propusta. Međutim, gljiva može imati brži rast, ali ukoliko je njena sporulacija smanjena, širenje bolesti bi se moglo zaustaviti.

Usporedbom jačine djelovanja hipovirusa utvrđeno je da creski virus CR23 ima jači učinak na sporulaciju i rast gljive *C. parasitica* od poznatog agensa biološke kontrole-francuskog EP713 hipovirusa. Stoga bi virus CR23 mogao poslužiti u biološkoj kontroli bolesti raka kore pitomog kestena u hrvatskim voćnjacima.

6. Literatura

Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D. 1999. Genetic variation of Cryphonectria hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8:843-854.

Anagnostakis SL. 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79:23–37.

Anagnostakis SL. 2000. American cestnut sprout survival with biological control of the chestnut- blight fungus population. *Forest Ecology and Management* 152:225-233.

Anagnostakis SL, Day PR. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica Phytopathology* 69:1226–1229.

Anderson RM, May RM. 1986. The invasion, persistence and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B:Biological Sciences* 314:533–570.

Biella SM, Smith L, Aist JR, Cortesi P, Milgroom MG. 2002. Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society* 269:2269–2276.

Bull JJ. 1994. Virulence. Evolution, *International Journal of Organic Evolution* 48:1423–1437.

Bryner SF, Rigling D. 2011. Temperature-Dependent Genotype-by-Genotype Interaction between a Pathogenic Fungus and Its Hyperparasitic Virus. *The American Naturalist* 177:65-74.

Carbone I, Liu Y-C, Hillman BI, Milgroom MG. 2004. Recombination and migration of *Cryphonectria* hypovirus 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics* 166:1611–1629.

Cortesi P, McCulloch CE, Song H, Lin H, Milgroom MG. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159:107–118.

Dallavalle E, Zambonelli A. 1999. Epidemiological role of strains of Cryphonectria parasitica isolated from hosts other than chestnut. *European Journal of Forest Pathology* 29:97-102.

Deng F, Nuss DL. 2008. Hypovirus Papain-Like Protase p48 Is Required for Initiation but Not for Maintenance of Virus RNA Propagation in Chestnut Blight Fungus *Chryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 82:6369-6378.

Kolar CS, Lodge DM. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trend sin Ecology & Evolution* 16:199-204.

Dutech C, Fabreguettes O, Capdevielle X, Robin C. 2010. Multiple introductions of divergent genetic lineages in an invasive fungal pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in France. *Heredity* 105:220–228.

Elliston JE. 1985. Characteristics of dsRNA-Free and dsRNA-Containing Strains of *Endothia parasitica* in Relation to Hypovirulence. *Phytophatology* 75:151-158.

Faruk MI, Eusebio-Cope A, Suzuki N. 2008. A Host Factor Involved in Hypovirus Simptom Expression in the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 82:740-754.

Frank SA. 1996. Models of Parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71.

Glass NL, Kaneko I. 2003. Fatal attraction: nonself recognation and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryot Cell* 2:1-8, No. 1.

Gilbert GS. 2002. Evolutionary ecology of plant disease in natural ekosystems. Annual review. *Phytophatology* 40:13-43.

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.

Guerin, L, Froidefond G, Xu X.-M. 2001. Seasonal patterns of dispersal of ascospore of *Cryphonectria parasitica* (chestnut blight). *Plant Pathology* 50:717–724.

Heiniger, U, Rigling D. 1994. Biological Control of Chestnut Blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32:581-599.

Hillman, BI, Halpen BT, Brown MP. 1994. A Viral dsRNA Element of the Chestnut Blight Fungus with a Distinct Genetic Organization. *Virology* 201:241-250.

Hillman, BI, Suzuki N. 2004. Viruses of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in Virus Research* 63:423-472.

Hillman, BI, Tian Y, Bedker PJ, Brown MP. 1992. A North America hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate- related dsRNA. *Jurnal of General Virology* 73:681-686.

Holt RD, Hochberg ME. 1998. Coexistence of competing parasites. II. Hyperparasitisam and food chain dynamics. *Journal of Theoretical Biology* 139:485-495.

Huang H, Dane F, Kubisiak TL. 1988. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild population of the American chestnut (*Fagaceae*). *American Journal of Botany* 85:1013-1021.

Jacob-Wilk D, Turina M, Van Alfen NK. 2006. Mycrovirus Cryphonectria Hypovirus 1 Elements Cofractionate with *trans*-Golgi Network Membranes of the Fungal Host *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 80:6588-6596.

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

Krstić M. 1950. *Edonthia parasitica* u našoj zemlji. *Zaštita bilja* 2:113-116.

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

Kršpatić J. 1956. Rak kestenove kore (*Edonthia parasitica* Anders). Zavod za zaštitu bilja, Uputstva iz zaštite bilja 19:1-12.

Lafferty KD, Dobson AP, Kuris AM. 2006. Parasites dominate food web links. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:11211-11216.

Levin BR. 1996 The evolution and maintenance of virulence in number of recombination events, pp. 287–302 in Algorithms in microparasites. *Emerging Infectious Diseases* 2:93–102.

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

MacDonald WL, Fulbright DW. 1991. Biological Control of Chestnut Blight: Use and Limitations of Transmissible Hypovirulence. *Plant disease* 75:656-661.

Milgroom MG, Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: Acritical analysis. *Annual Review of Phytophatology* 42:311-338.

Morozov AY, Robin C, Franc A. 2007. A simple model for dynamic of a host-parasite-hyperparasite interaction. *Jurnal of Theoretical Biology* 249:246-253.

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

Osnas EE, Lively CM. 2005. Immune response to sympatric and allopatric parasites in a snail-trematode interaction. *Frontiers in Zoology*, 2:8.

Pan JJ, Clay K. 2003. Infection by the sistemic fungus *Epichloë glyceriae* alters clonal growth of its grass host , *Glyceria striata. The Royal Society* 270:1585-1591.

Peever TL, Liu YC, Cortesi P, Milgroom MG. 2000. Interaction Chestnut Blight Fungus-HypovirusVariation in Tolerance and Virulence. *Applied and Enviromental Microbiology* 66:4863-4869.

Poulin R. 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many lavels? *International Journal for Parasitology* 29:903-914.

Poulin R. 2007. Evolutionary Ecology of Parasites, second edition. Published by Princeton University Press, New Jersey 08540.

Price PW, Westoby M, Rice B, Fritz RS, Thomson JN, Mobley K. 1986. Parasite mediation in ekology interactions. *Annual Review of Ecology and Sistematic* 17:487-505.

Prospero S, Rigling D. 2011. Invasion Genetics of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. *Phytophatology* 102:73-82.

Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ, Jaffee BA, 1995. Intraguild predating among biological-control agents: theory and evidence. Biological Control 5:303-335.

Shapira, R, Nuss, DL. (1991). Gene expression by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus involves two papain-like protease activities. *The Journal of Biological Chemistry* 266:19419–19425.

Van Heerden SV, Geletka LM, Preisig O, Nuss DL, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2001. Characterization of South African Cryphonectria cubensis Isolates Infected with a C. parasitica Hypovirus. *Phytopathology* 91:628-632.

Zhang L, Baasiri R, Van Alfen NK. 1988. Viral Repression of Fungal Pheromone Precursor Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 18:953-959.

Web stranice:

1. http://zkahlina.ca/cro/?p=11794 (20.02.2012)

2. http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/594.html (20.02.2012)

3. http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/ (10.03.1012)

4. http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/ (10.03.2012)

5. http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/ChestnutBlightDisease.aspx (13.02.2012)

6. http://www.appalachianwoods.com/appalachianwoods/history_of_the_american_chestnut.htm (13.02.2012)

7. http://genomeportal.jgi-psf.org/Crypa2/Crypa2.home.html (14.02.2012)

8. http://www.unidu.hr/molekularna/prezentacije/CurkovicPericaMol%20bioznan.pdf (16.02.2012)

9. http://www.uniprot.org/uniprot/P10941 (20.02.2012)

10. http://www.pfos.hr/~bioinfo/Biometrika/L7.pdf (9.05.2012)

11. http://www.erf.unizg.hr/Dokumenti/Dokumenti/KM-prirucnik-vid.pdf (11.05.2012)