Karakterizacija izolata gljive Cryphonectria parasitica Murrill Barr u aktivnim rakovima pitomog kestena (Castanea sativa Mill.)

Kobaš, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:477296

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Ana Kobaš

Karakterizacija izolata gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr u aktivnim rakovima pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

KARAKTERIZACIJA IZOLATA GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR U AKTIVNIM RAKOVIMA PITOMOG KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)

Ana Kobaš

Rad je izrađen: Laboratorij za molekularnu ekologiju, Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka
Mentor: Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin
Neposredni voditelj: Dr. sc. Zorana Katanić

Kratak sažetak diplomskog rada
Gljiva *Cryphonectria parasitica* uzročnik je raka kore europskog pitomog kestena. Osim na kestenu ovaj patogen čini štetu i na drugim vrstama iz porodice *Fagaceae*, ali u znatno manjoj mjeri. Srećom, u Europi je primijećen prirodni oporavak stabala kestena zahvaljujući pojavi hipovirusa koji smanjuje njezinu virulentnost i sposobnost sporulacije. Širenje hipovirusa u populaciji gljive dovodi do oporavka kestena te uspješne biološke kontrole. Međutim, prijenos virusa ograničen je vegetativnom nekompatibilnošću (*vic*) gljive, pri čemu se virus brzo širi između jedinki gljive istog VC tipa, a sporo ili se uopće ne širi između jedinki različitog VC tipa. Cilj ovog istraživanja bio je karakterizirati uzorke gljive *C. parasitica* na osnovi morfologije, tipa vegetativne kompatibilnosti (VC) i molekularnih analiza. Rezultati morfologije pokazali su prisutnost 77% žutih virulentnih sojeva i 23% bijelih sojeva gljive zaraženih hipovirusom. Najzastupljeniji VC tip gljive bio je EU 1 (69%) zatim EU 2 (23%) te EU 12 sa 8%. Hipovirulentnim sojevima gljive dokazana je prisutnost hipovirusa CHV1 izolacijom hipovirusne dsRNA i RT-PCR metodom, dok je analiza polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) potvrdila da CHV1 pripada talijanskom podtipu, CHV1 I.

Broj stranica: 38
Broj slika: 14
Broj tablica: 4
Broj literaturnih navoda: 68
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: aktivni rak kore, biološka kontrola, hipovirusna dsRNA, RT-PCR, vegetativna nekompatibilnost

Datum obrane: 25.10.2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac
2. Doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
3. Doc.dr.sc. Tanja Žuna Pfeiffer
4. Doc.dr.sc. Filip Stević

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

CHARACTERIZATION OF *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR ISOLATES IN ACTIVE CANKERS OF CHESTNUT BLIGHT

Ana Kobaš

Thesis performed at: Molecular Ecology Laboratory, Sub-Department of Plant Ecophysiology and Biochemistry
Supervisor: Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph. D.
Assistent in charge: Zorana Katanić, Ph. D.

Short abstract
Cryphonectria parasitica is the causal agent of chestnut blight. Besides to chestnut, this pathogen causes damage to other species of *Fagaceae* family, but to a much lesser extent. Fortunately, a natural recovery of chestnut trees has been observed due to appearance of hypovirus which infects fungus, and reduces its virulence, sexual reproduction and sporulation. Spreading of hypovirus in fungus population leads to chestnut recovery and successful biological control. However, transmission of the hypovirus is limited by the vegetative incompatibility (*vic*) system. Hypovirus spreads quickly between fungal individuals of the same VC type and slowly or it does not spread at all between the individuals with different VC types. Isolates of the fungus *C. parasitica* were characterized based on morphology, type of vegetative compatibility and RT-PCR/RFLP analysis. Morphology results showed 77% yellow and 23% white hypovirulent strains. Three VC types were identified, with the dominant VC type EU1 (69%) followed by the EU2 (23%) and EU12 (8%). The presence of hypovirus CHV1 in all tested hypovirulent strains was confirmed by dsRNA isolation and RT-PCR method, while the analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) confirmed that CHV1 isolates belong to Italian subtype, CHV1 I.

Number of pages: 38
Number of figures: 14
Number of tables: 4
Number of references: 68
Original in: Croatian

Key words: active canker, biological control, hypoviral dsRNA, RT-PCR, vegetative incompatibility

Date of the thesis defence: 25.10.2016.

Rewievers:

1. Assist. Prof. Ivna Štolfa, Ph. D.
2. Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph. D.
3. Assist. Prof. Tanja Žuna Pfeiffer, Ph. D.
4. Assist. Prof. Filip Stević, Ph. D.

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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Ljiljani Krstin na uloženom vremenu, trudu i korisnim savjetima kojima je uvelike olakšala izradu ovog diplomskog rada.

Također veliko hvala dr. sc. Zorani Katanić na prenesenom znanju, susretljivosti i pomoći u istraživačkom dijelu diplomskog rada.

Nikada neću moći dovoljno zahvaliti onima zbog kojih sam danas ovdje gdje jesam i koji su mi sve ovo omogućili, mojoj obitelji.. Od srca neizmjerno hvala mojoj majci na požrtvovnosti i mojim drugim roditeljima - baki i djedu!

Neizmjerno hvala mom dragom dečku koji je bio uz mene tijekom svih ovih godina, imao beskrajno mnogo strpljenja i vjerovao u mene čak i kada ja nisam.

Zahvaljujem se i svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada i bili uz mene tijekom ovog razdoblja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) 1
1.2. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr 5
1.2.1. Razmnožavanje gljive *C. parasitica* 5
1.3. Rak kore europskog pitomog kestena *Castanea sativa* 7
1.3.1. Tipovi raka kore kestena 8
1.4. *Cryphonectria hypovirus* - uzročnik hipovirulentnosti gljive 10
1.4.1. Načini prijenosa hipovirusne dsRNA 11
1.4.2. Biološka kontrola bolesti 12
1.5. Cilj istraživanja 13
2. MATERIJALI I METODE 14
2.1. Prikupljanje gljivičnih izolata i njihov uzgoj 14
2.2. Određivanje morfologije izolata gljive 16
2.3. Test vegetativne kompatibilnosti (VC test) 16
2.4. Molekularne analize 18
2.4.1. Izolacija hipovirusne dsRNA iz micelija *C. parasitica* 18
2.4.2. Reverzna transkripcija hipovirusne dsRNA 19
2.4.3. Lančana reakcija umnožavanja polimerazom 19
2.4.4. Polimorfizam duljine restrikcijskih odsječaka 20
2.4.5. Agarozna gel elektroforeza 20
2.5. Statistička obrada podataka 21
3. REZULTATI 22
3.1. Morfologija izolata gljive *C. parasitica* 22
3.2. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* 24
3.3. Hipovirusna dsRNA u izolatima gljive *C. parasitica* 25
3.4. Utvrđivanje podtipa hipovirusa 26
3.5. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti 27
4. RASPRAVA 28
5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 32
6. LITERATURA 33

1. UVOD

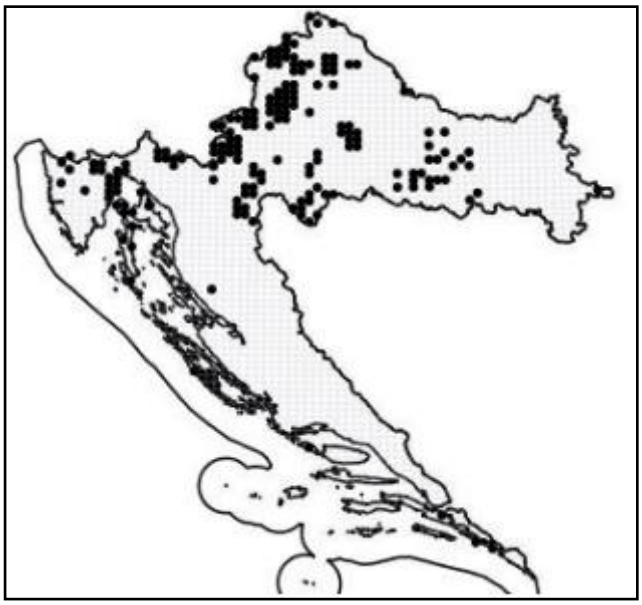
1.1. Europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.)

Među trinaest vrsta koje pripadaju rodu *Castanea*, pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) smatra se jedinom vrstom porijeklom iz Europe. Njegovo evolucijsko pojavljivanje smatra se kompleksnom mješavinom visoke razine genetičkog protoka, prirodne i umjetne selekcije te lokalnih efekata izolacije uvjetovanih udaljenošću. Ta činjenica podrazumijeva da genetička raznolikost europskog pitomog kestena ovisi o geografskoj distribuciji, povijesnim događajima, okolišnim varijacijama i gospodarenju okolišem (Casaoli i sur., 2001).

Rod *Castanea* spada u porodicu *Fagaceae* zajedno sa rodovima *Quercus* i *Fagus*. Osim u Europi, danas su vrste iz roda *Castanea* rasprostranjene i na sjevernoameričkom i azijskom kontinentu, a rastu i u sjevernim i zapadnim dijelovima Afrike, u Maloj Aziji, na jugu Kavkaza i u Perziji. U Sjevernoj Americi pojavljuju se vrste *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh. i *Castanea pumila* (L.) Mill. U Aziji rastu *Castanea crenata* Sieb. et Zucc., *Castanea mollisima* Bl., *Castanea seguinii* Dode i *Castanea henryi* (Skan) Rehder and Wilson (Haltofová i Ankovský, 2003). Pitomi kesten je važna listopadna šumska vrsta koja raste najviše u području južne Europe i Sredozemlja (Slika 1), a povjesničari kažu da se po Europi počeo širiti preko Grčke.

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

U Hrvatskoj je pitomi kesten najrasprostranjeniji na području obronaka Učke iznad Lovrana, Opatije i Mošćenićke Drage, u istočnoj Istri te na otoku Krku (Slika 2). Pitomi kesten u Hrvatskoj zauzima oko 136.000 ha šumskih površina. 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 europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj (Nikolić, 2015)

Od klimatskih uvjeta bitan čimbenik za rast pitomog kestena je svjetlost, po čemu je ova vrsta heliofilna. Pitomi kesten ne podnosi ekstremne izmjene temperature te najbolje raste u područjima sa prosječnom godišnjom temperaturom od 13°C zimi i 26-37°C ljeti te prosječnim godišnjim oborinama od 800-1600 mm (Zavišić, 2014). Kesten raste u šumama na odgovarajućim staništima a zbog ugroženosti sve se više uzgaja u voćnjacima. Kao acidofilna vrsta, raste na dubokim kiselim tlima (pH 4-5), pjeskovite glinasto-ilovaste teksture te na silikatnim i eruptivnim podlogama i pješčenjacima.

Svojstvo kestena da stvara velik broj izdanaka, kojih može biti i preko 70 iz jednog panja, spontani je način održavanja vrste uspostavljanjem ravnoteže između korijena i stabla. Ovo svojstvo ima praktičnu vrijednost u razmnožavanju kestena, jer se izdanci mogu vaditi i presaditi na drugo mjesto.

Stablo pitomog kestena može narasti do 35 m visine. Kora debla u mladosti je glatka, a kako drvo stari kora se uzdužno raspucava (Šilić, 1973). Listovi su duguljasti, eliptični i nazubljeni. Pitomi kesten je jednodomna biljka, što znači da se na istom stablu nalaze odvojeno i muški i ženski cvjetovi. Muški cvjetovi su u uspravnim resama (Slika 3a), a ženski u donjem dijelu muških resa (Slika 3b). Cvjetovi se pojavljuju početkom lipnja kada su listovi potpuno razvijeni.

Plod je kesten i prirastao je za tobolac u kojem se većinom nalaze po tri ploda (Slika 4), a godišnje jedno stablo može dati i do 200 kg plodova. Smeđi polukuglasti plodovi su na površini sjajni i dozrijevaju početkom listopada (Domac, 1994). Pucanjem bodljikavog tobolca plodovi ispadaju van. Plod kestena je važan u proučavanju sorti i tipova pitomog kestena. Sorte i tipovi se razlikuju po broju plodova u kupuli, po krupnoći i obliku ploda, boji ljuske, maljavosti, izgledu vrha ploda, sjemenu sa sjemenjačom (epidermom) i ukusu.

Slika 3. Cvjetovi europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.):
muški (lijevo), ženski (desno)
(Web 1, Web 2)

Slika 4. Plod europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
(Web 3)

Postoji mnogo vrsta kestena, a jedna od najpoznatijih svakako je lovranski marun (maron), oplemenjena sorta pitomog kestena nastala cijepljenjem plemkama kestena dubenca. Maruni (maroni) su se izvozili još u 17. stoljeću te su uz masline, vino i trešnje predstavljali glavne kulture od kojih je stanovništvo Istre i Cresa tada živjelo. Vrhunac izvoza maruna dogodio se u 19. stoljeću, a nakon toga je uslijedila stagnacija i zapuštanje nasada što je rezultiralo slabim daljnjim uzgojem. U usporedbi s običnim kestenom, marun je slađi, ima krupniji plod i svjetliju ljusku koja se lako odvaja. U čast marunu se u listopadu svake godine u Lovranu održava poznata Marunada (Idžojtić i sur., 2012).

Pitomi kesten je jedna od najznačajnijih i najkorisnijih šumskih vrsta jer su svi njegovi dijelovi iskoristivi. Ima važnu gospodarsku i ekonomsku ulogu. Plodovi pitomog kestena su značajni u prehrani jer sadrže visok udio škroba (oko 43%) i šećera te mali udio ulja (3%). Osim toga, bogati su taninima i dobar su izvor vlakana, esencijalnih masnih kiselina te vitamina i minerala kao što su kalcij, fosfor i magnezij (Borges i sur., 2008). Budući da su plodovi kestena bogat izvor antioksidanasa, mogući su i djelotvorni učinci na zdravlje. Mogu spriječiti ili usporiti oksidativnu štetu u tijelu smanjujući na taj način rizik od nastanka raka, pomažu u suzbijanju razvoja tumora te štite srce i krvne žile (Blomhoff i sur., 2006).

Kesten je izuzetno cijenjen i kao kvalitetno drvo, a njegov list se koristi u farmaceutskoj industriji u brojnim preparatima. Zbog svoje velike trajnosti i lake obrade, deblo kestena koristi se kao građevno (izrada različitih drvenih konstrukcija) i stolarsko drvo (izrada namještaja). U pčelarstvu se upotrebljava kao medonosna biljka jer sadrži velike količine nektara. Zbog lijepog habitusa, cvijeta i ploda, stablo pitomoga kestena se često korist kao dekorativna, hortikulturna vrsta.

Intenzivno korištenje stabala kestena ostavilo je trajne posljedice na fizionomiju kestenovih šuma, dovelo je do degradiranosti staništa, utjecalo na stabilnost ekosustava i smanjenu biološku raznolikost. Najveći krivac propadanja kestenovih stabala svakako je fitopatogena gljiva, uzročnik raka kore pitomog kestena *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr zbog koje kesten postupno nestaje iz naših šuma.

1.2. Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr

Zajednička koevolucija biljnih patogena i domaćina dovodi do neznatnih šteta u populacijama biljnih vrsta koje patogeni zaražavaju. Međutim, isti ti patogeni mogu imati snažan utjecaj na alohtone kao i na autohtone vrste gdje je taj patogen naknadno unesen.
Pravi primjer biološkog napada je upravo *Cryphonectria parasitica*, uzročnik raka kore europskog pitomog kestena (Robin i sur., 2009).

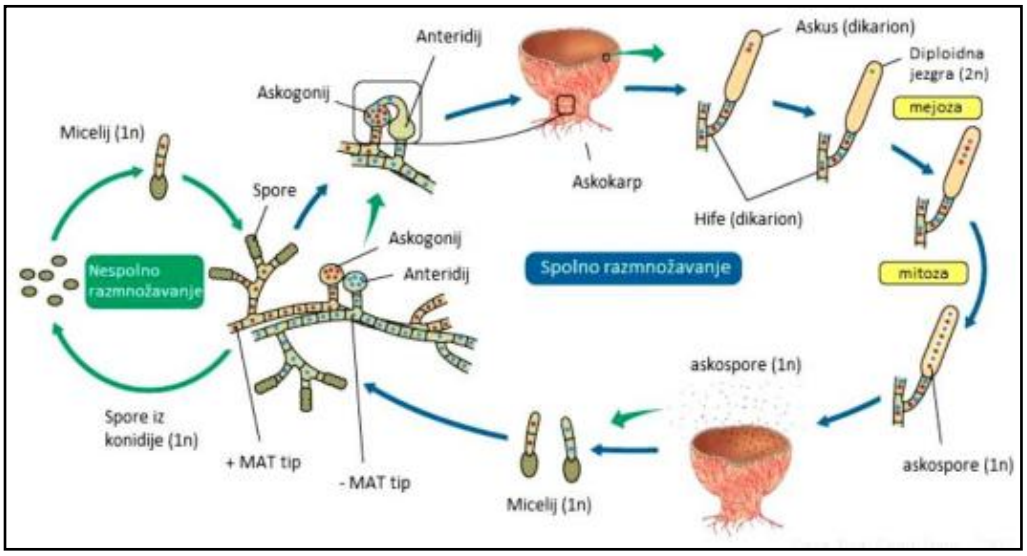
Gljiva *C. parasitica* je nitasta, askomicetna, fitopatogena gljiva koja pripada razredu *Sordariomycetes*, redu *Diaporthales* i porodici *Cryphonectriaceae* (Rossman i sur., 2007). Gljiva je vrlo agresivna i može zaraziti stabla bez obzira na njihovu dob i vitalnost. Zbog oštećenja dolazi do sušenja i propadanja stabala (Novak-Agbaba i sur., 2000). Osim što je patogen na kestenima (*Castanea spp*.), gljiva zaražava i stabla drugih rodova i vrsta, naročito vrste roda *Quercus* (OEPP/EPPO, 2005).

Zbog svoje iznimne agresivnosti i patogenosti *C. parasitica* je uvrštena na IUCN-ov popis (International Union for Conservation of Nature) sto svjetski najopasnijih invazivnih vrsta koje su najveća prijetnja biološkoj raznolikosti (Novak-Agbaba, 2006). U Europi je proglašena karantenskim patogenom i uvrštena je na EPPO A2 listu (European and Mediterranean Plant Protection Organization).

1.2.1. Razmnožavanje gljive *C. parasitica*

Gljiva se može razmnožavati na dva načina: nespolno (vegetativno) konidijama ili fragmentacijom micelija te spolno askosporama (Slika 5) (Marra i Milgroom, 2001). Konidiospore (konidije) nastaju mitozom i genetički su identične miceliju. To su male, jednostanične spore koje se razvijaju u konidioforima, specijaliziranim hifama koje ih nose. Budući da su konidije genetički identične miceliju, ne pridonose raznolikosti populacije gljive *C. parasitica*. Askospore i konidiospore (konidije) prenose se vjetrom, kišom, pticama, kukcima ali i ljudskom nepažnjom (Russin i sur., 1984). Spajanjem hifa između dva različita izolata gljive dolazi do stapanja citoplazmi i stvaranja višejezgrenih stanica koje mogu opstati ako su sojevi genetički kompatibilni (Montenegro i sur., 2008). Ta pojava se naziva vegetativna nekompatibilnost i kontrolira se pomoću šest neovisnih vegetativno nekompatibilnih (*vic*) lokusa (Milgroom i Cortesi, 1999).

Spolno razmnožavanje se odvija askosporama koje nastaju u osnovnom sporonosnom organu - askusu. Nastanak askospora je važan za spolno razmnožavanje koje se odvija na različite načine. Pri spolnom razmnožavanju razvija se askogonij, koji predstavlja žensku rasplodnu strukturu te dolazi do spajanja s mikrokonidijom ili hifom, koji predstavlja mušku spolnu strukturu (Ježić, 2013). Stanice se stapaju bez spajanja jezgara a taj proces se naziva plazmogamija. Spajanjem dolazi do rasta tzv. askogenih hifa u kojima one nastavljaju egzistirati neovisno u dikarionskom stadiju (Read i Beckett, 1996; Webster i Weber, 2007). U askogenim hifama nastaju askusi s askosporama. U završnom stadiju formira se petlja u kojoj dolazi do spajanja roditeljskih jezgara, mejoze i formiranja spolnih spora (Ježić, 2013).
Odabir načina razmnožavanja ovisi o okolišnim čimbenicima kao što su temperatura i svjetlost te dostupnost nutrijenata.



Slika 5. Razmnožavanje gljiva mješinarki

(Web 4)

Spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica* je pod kontrolom MAT lokusa na kojem mogu biti dva alela, MAT1-1 ili MAT1-2. Taj lokus kontrolira proces oplodnje, određene korake sparivanja i MAT - specifične ferohormone i receptore (Kües i Casselton, 1992; Marra i Milgroom, 2001). Sparivanje je moguće samo između jedinki koje imaju suprotne MAT alele (idiomorfe), MAT-1 ili MAT-2. *C. parasitica* je dvodomna gljiva kod koje često u prirodi dolazi do samooplodnje. U laboratorijskim uvjetima samooplodnja je rijetkost zbog spolne nekompatibilnosti gameta (Marra i Milgroom, 2001; Montenegro i sur., 2008).

1.3. Rak kore europskog pitomog kestena *Castanea sativa*

Gljiva *C. parasitica*, uzročnik raka kore europskog pitomog kestena, je sasvim slučajno unesena u Sjevernu Ameriku iz Azije sa sadnicama kineskog (*Castanea mollissima*) i japanskog kestena (*C. crenata*) početkom 20. stoljeća. U narednih nekoliko desetljeća *C. parasitica* je uništila gotovo sve sastojine američkog pitomog kestena (*C. dentata*) (Anagnostakis, 2000). U Europi se prvi put pojavila 1938. godine na području sjeverne Italije u Genovi te se odatle proširila na gotovo sve europske sastojine kestena. U Hrvatskoj je prvi slučaj bolesti zabilježen 1955. godine u okolici Opatije, a pretpostavlja se da se zaraza proširila iz Slovenije gdje je prvi slučaj zabilježen 1950. godine (Krstin i sur., 2008).

Pojavljivanje raka kore kestena često ostaje nezapaženo sve dok propadanje grana stabala ne postane preočito. Kroz otvorene rane na površini stabla spore gljive prodiru ispod kore i kliju. U unutrašnjosti tvore svijetlosmeđi micelij koji se može vidjeti ukoliko se odstrani vanjski dio kore. Micelij može preživjeti više od 10 mjeseci u suhoj kori (Hepting, 1974). Širenje raka uzrokuje oštećenje kambija te dolazi do prekidanja toka vode i hranjivih tvari. U namjeri da se zaštiti od napada patogena i da zatvori napadnuto mjesto, stablo kestena odgovara pojačanom diobom stanica. Budući da se ne uspijeva zaštititi, dolazi do sušenja, nekroze i odumiranja dijelova biljke iznad zaraženog mjesta. Zaraza ne zahvaća korijen zbog čega izdanci mogu iznova rasti (Heiniger i Rigling, 1994).
Simptomi su vidljivi na granama i lišću koje se suši. Plodovi kestena ne podliježu zarazi pa infekcija ne utječe na klijanje i rast sjemenke, dok se gljiva povezuje samo s bodljikavom ljuskom kestena (Jaynes i DePalma, 1984).

Pitomi kesten zaražen gljivom *C. parasitica* daje plodove mnogo ranije od zdravih stabala, već u petoj godini, a živi najviše 25 godina, dok zdrava stabla žive mnogo dulje. Zbog bolesti slabi sposobnost vegetativne obnove sastojine i pogoršava se njezina kakvoća, što smanjuje njezinu gospodarsku i ekološku vrijednost. Osim kestena, bolest može zahvatiti i neke druge listopadne vrste ali na njima ne pokazuje takvu agresivnost (Pagliarini, 2011).

1.3.1. Tipovi raka kore kestena

Rak kore opasno ugrožava stabla kestena i uzrokuje njihovu fiziološku slabost. Bolest je vrlo agresivna jer napada i zdrava stabla (Pagliarini, 2011). Simptomi bolesti na kori kestena su varijabilni, a raspon boje kore kreće se od svijetlosmeđe, žućkastosmeđe ili narančaste do crvenosmeđe (OEPP/EPPO, 2005).

Postoje tri glavna tipa raka kore kestena:

1. Aktivni rak
2. Kalusirajući rak
3. Površinske nekroze

Svakako najopasniji tip raka kore je aktivni rak kojeg uzrokuje virulentni soj gljive *C. parasitica* (Slika 6a). Zaraza brzo napreduje do kambija te dolazi do uzdužnog pucanja kore. Stvaraju se otvorene rane unutar kojih je vidljiv tamnožuti lepezasti micelij. Na zaraženom dijelu nalaze se i brojna žutosmeđa plodna tijela gljive (Novak-Agbaba i sur., 2000). Simptomi aktivnog raka također uključuju žućenje i gubitak listova, pojavu različitih nekroza, hipertrofiju, rak rane na granama i suhe listove koji ostaju preko zime (Halambek, 1988; Glavaš, 1999).

Slika 6a. Aktivni rak kore kestena

(Web 5)

Kalusirajući rak prepoznaje se po formiranom kalusnom staničju oko rane. Infekcija prodire do kambija, a plodišta gljive su rijetka ili ih uopće nema (Slika 6b).

Površinske nekroze, kao što i sam naziv govori, izazivaju infekciju površinskog sloja te zaraza vrlo sporo napreduje i ne dopire do kambija. Na deblu se može uočiti zadebljanje i ljuskava kora koja se jasno razlikuje od zdrave (Slika 6c) (Novak-Agbaba i sur., 2011).
Površinske nekroze uzrokuje hipovirulentni soj gljive. Ovaj neagresivni soj gljive je posebno zanimljiv jer svoja svojstva hipovirulencije može prenijeti na aktivni rak, zahvaljujući hipovirusu (*Cryphonectria hypovirus* - CHV) pri čemu dolazi do zatvaranja rak rane, odnosno nastanka kalusa što u konačnici uzrokuje ozdravljenje stabala kestena (Slika 6d). Prirodno širenje hipovirusa s površinskih nekroza na aktivni rak predstavlja osnovu za biološku kontrolu bolesti i zaustavljanje sušenja zaraženih stabala, a u Hrvatskoj se provodi od 1983. godine (Novak-Agbaba i sur., 2011).

Slika 6b. Kalusirajući rak

(Web 6)

Slika 6c. Površinska nekroza

(Web 7)

Slika 6d. Zarasli rak – kalus

(Web 5)

1.4. *Cryphonectria hypovirus* - uzročnik hipovirulentnosti gljive

Fenomen oporavka kestenovih stabala u Europi prvi put je opažen 1951. godine. Za razliku od kestenovih sastojina na području Sjeverne Amerike, koje je rak kore gotovo u potpunosti uništio, kod europskih je sastojina primijećen oporavak. Istraživanja su pokazala da je uzročnik oporavka stabala kestena hipovirulentni soj gljive *C. parasitica*.

Hipovirulentnost gljive *C. parasitica* uzrokuje prisutnost dvolančane RNA (dsRNA) virusa *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1). Hipovirulentni soj gljive karakterizira smanjena sporulacija, pigmentacija te smanjeno nakupljanje oksalata i manja aktivnost laktaze i celulaze - enzima pronađenih kod gljiva. Micelij hipovirulentnih sojeva zaraženih hipovirusom je bijeli, blijedožućkasti do blijedonarančasti dok je micelij virulentnih sojeva bez virusa izrazito žut ili narančast. (Kazmierczak i sur., 1996; Larson i sur., 1992; Jacob-Wilk i sur., 2006; Novak-Agbaba i sur., 2000).

Hipovirusi sadrže linearnu dvolančanu RNA (dsRNA) molekulu. 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 proteinski omotač odnosno kapsidu, nemaju strukturnih proteina i ne stvaraju virione (zrele infektivne virusne čestice).

CHV1 je najbolje opisani hipovirus iz porodice *Hypoviridae* i jedini koji je za sada otkriven na području Europe (Krstin i sur., 2011). Genom CHV1 veličine je 12 712 bp, ima poliadeniliran pozitivni, kodirajući lanac (na 3' kraju se nalazi poliA rep) te sadrži dva kontinuirana otvorena okvira čitanja (ORF A i ORF B) koja kodiraju poliproteine koji se proteolitički cijepaju (Bryner i sur., 2013; Choi i sur., 1991). ORF A i ORF B odvojeni su 5'-UAAUG-3' sekvencom. UAA dio pentanukleotida predstavlja stop kodon ORF A regije, dok AUG dio predstavlja start kodon ORF B regije (Nuss 2005).

Porodici *Hypoviridae* pripadaju još tri vrste virusa - CHV2, CHV3 i CHV4 koje se pojavljuju na području Sjeverne Amerike (Turina i Rostagno, 2007), te u jugoistočnoj Europi od jugoistočne Francuske do Turske (Krstin i sur., 2011). Europski tip hipovirusa CHV1 pokazuje veliku raznolikost genotipova te je podijeljen na pet podtipova: talijanski (CHV1 I), njemački (CHV1 D), španjolski (CHV1 E) te dva francuska podtipa (CHV1 F1, CHV1 F2) (Montenegro i sur., 2008).

1.4.1. Načini prijenosa hipovirusne dsRNA

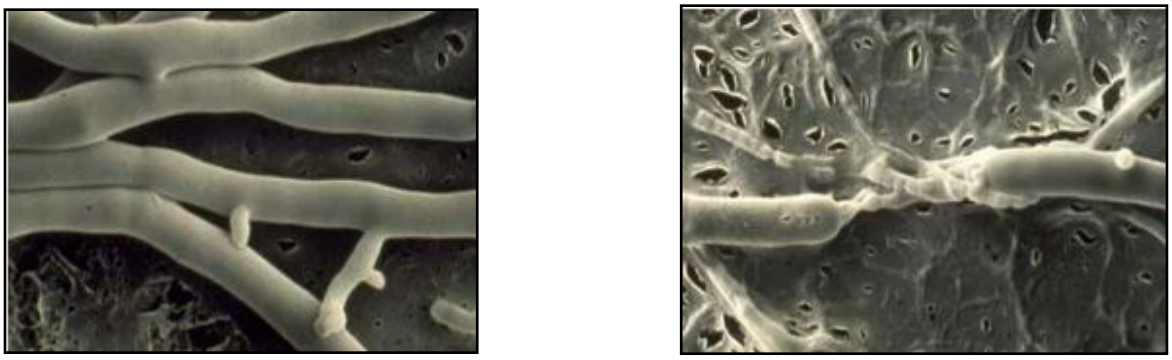
Postoje dva načina prijenosa dsRNA molekule kroz populacije gljiva:

1. vertikalni prijenos - putem konidija (nespolnih spora)
2. horizontalni prijenos - fuzijom hifa između vegetativno kompatibilnih jedinki gljive

Vertikalni prijenos podrazumijeva prijenos hipovirusa iz micelija do konidija te se spore mogu širiti na druge tipove raka kore kestena i tako utjecati na virulenciju sojeva gljive unutar raka (Liu i Milgroom, 1996). Konidije kliju i prodiru ispod kore kestena te anastomozom hifa mogu prenijeti virus u već prisutne virulentne sojeve gljive, reducirajući na taj način njihov patogeni potencijal. Nažalost, stvaranje konidija u hipovirulentnim sojevima gljive je smanjeno i hipovirus se prenosi samo u određeni broj konidija (Elliston, 1985b). Također, prijenos hipovirusa putem askospora (spolnih spora) nije moguć.

Horizontalni prijenos hipovirusa odvija se anastomozom (fuzijom) hifa (Slika 7). Ovaj način prijenosa predstavlja osnovu za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena, no ograničen je sustavom vegetativne inkompatibilnosti (*vic*) gljive (Krstin i sur., 2008). Vegetativna inkompatibilnost je definirana s najmanje šest *vic* lokusa, od kojih svaki sadrži najmanje dva alela (Milgroom i Cortesi, 1999). Sukladno tome, moguća su najmanje 64 različita genotipa (Adamčíková i sur., 2006; Nuss, 2011). Za ostvarivanje vegetativne kompatibilnosti (VC) između dva različita soja gljive njihovi aleli se moraju podudarati na svih šest *vic* lokusa (Montenegro i sur., 2008).

Kod anastomoze hifa između gljiva različitog VC tipa dolazi do formiranja nestabilnog heterokariona i kaskade biokemijskih reakcija koje dovode do programirane stanične smrti zbog čega se hipovirus ne može prenijeti iz jedne jedinke u drugu (Slika 7) (Glass i Kaneko, 2003). Ukoliko takve gljive rastu zajedno u kulturi, formira se baražna linija duž zone njihovog kontakta (Choi i sur., 2012). Ako su jedinke kompatibilne, formira se heterokarionski micelij i ne dolazi do programirane stanične smrti. Takva anastomoza je stabilna i nema baražne linije.



Slika 7. Mikroskopski prikaz vegetativne kompatibilnosti i nekompatibilnosti hifa gljive *C. parasitica*: anastomoza hifa (lijevo), propadanje hifa uslijed nekompatibilnosti (desno) (Nastavni materijali doc. dr. sc. Ljiljane Krstin)

1.4.2. Biološka kontrola bolesti

Uspješnost biološke kontrole bolesti ovisi o načinu razmnožavanja gljive, tipu vegetativne kompatibilnosti te o tipu i izolatu hipovirusa. Potrebno je odabrati hipovirulentne sojeve gljive koji pokazuju najbolji učinak na smanjenje patogenosti gljive. Takvom mješavinom hipovirulentnih sojeva gljive tretiraju se zaražena stabla kestena.

Postotak tretiranih i netretiranih zaraženih stabala kestena koji su se oporavili predstavlja osnovu za procjenu uspješnosti biološke kontrole bolesti. Terapijski učinak horizontalnog prijenosa hipovirusa je vidljiv kao ozdravljenje tretiranog raka kore, dok ozdravljenje netretiranog raka zahtijeva širenje virusa unutar stabla (Robin i sur., 2010).

Protiv bolesti šumskog drveća biološka kontrola je posebno pogodna zbog toga što su druge metode kontroliranja bolesti, poput primjene fungicida i različitih kemijskih sredstava, ekonomski neisplative i štetne za okoliš. Oporavak stabala prvenstveno ovisi o prirodnom širenju hipovirusa, ali može biti i pod utjecajem čovjeka.

EU tipovi se koriste kao testeri za proučavanje genetske kontrole vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* (Cortesi i Milgroom, 1998). Radi lakšeg praćenja i kontrole bolesti važno je povećavati setove EU testera u skladu s novim otkrićima (Robin i Heiniger, 2001).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je karakterizirati izolate gljive *C. parasitica* pronađene u aktivnim rakovima pitomog kestena na osnovi njihove morfologije, tipa vegetativne kompatibilnosti i molekularnih analiza:

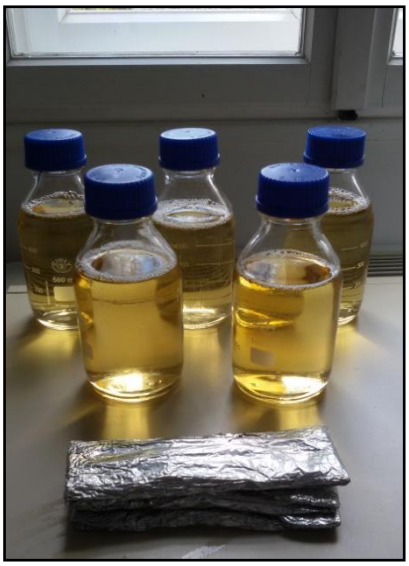
- izolacije dvolančane RNA hipovirusa
- reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom RT-PCR
- polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata, RFLP

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Prikupljanje gljivičnih izolata i njihov uzgoj

Prikupljanje i izolaciju uzoraka gljive *C. parasitica* obavila je prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica u suradnji s kolegama s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su uzimani na području Hrvatske Kostajnice sa zaraženih stabala pitomog kestena na kojima su bili vidljivi aktivni rakovi uzrokovani virulentnim sojem patogene gljive *C. parasitica*.

Izolirane čiste kulture gljive *C. parasitica* uzgajane su na hranjivoj krumpirovoj podlozi PDA (Potato dextrose agar) u Petrijevim zdjelicama (Medicplast, promjer 6 ili 9 cm). Agar je prethodno pripremljen prema uputama proizvođača (Biolife). U 1 litri destilirane vode otopljeno je 42 g PDA te je mješavina raspodijeljena u Shottove boce koje podnose visoke temperature sterilizacije (Slika 8). Sterilizacija PDA se provodi u autoklavu (Sutjeska) u trajanju od 15 min pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1,5 bara (Slika 8).



Slika 8. Shottove boce s hranjivom krumpirovom podlogom (lijevo) i autoklav Sutjeska (desno) (Autorske fotografije)

Sterilizacija je vrlo bitna za daljnje postupke nasađivanja gljive. Procesom sterilizacije potpuno se 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.

Autoklavirani agar se izlijeva u sterilne Petrijeve zdjelice do visine od otprilike 5 mm. Vrlo je bitno da se podloga dobro ohladi i stvrdne te ju je najbolje koristiti tek sljedeći dan za nasađivanje izolata gljive. Izlijevanje agara odvija se u laminaru čija je površina prethodno dezinficirana 70%-tnim etanolom. Laminar je zatvoreni radni prostor koji je steriliziran UV svjetlom te ima neprestan protok sterilnog zraka.

Unutar laminara se također obavljalo i precjepljivanje izolata gljive *C. parasitica* na prethodno pripremljene i ohlađene PDA podloge. Izolati su izrezivani na komadiće dimenzije 0,5×0,5×0,5 cm pomoću sterilnog skalpela koji se prije svake upotrebe morao dezinficirati u 70%-tnom etanolu i flambirati nekoliko sekundi na špiritnoj lampi. Izrezani uzorci su se postavljali naopako tako da micelij gljive bude u dodiru s podlogom kako bi gljiva brže prorasla. Petrijeve zdjelice zatvorene su parafilmom da ne bi došlo do kontaminacije te je na poklopac napisana oznaka izolata i datum precjepljivanja. Svi izolati gljive su precjepljeni u tri replike.

Izolati su se nakon precjepljivanja inkubirali u mraku pri sobnoj temperaturi, u periodu od sedam dana kako bi došlo do rasta micelija. Kada je micelij prorastao, izolati su se izložili još sedam dana danjem svjetlu kako bi došlo do sporulacije (Slika 9). Kulture gljive održavane su stalnim precjepljivanjem na prethodno opisan način, izrezivanjem komadića izolata ili struganjem dijela micelija.

Slika 9. Rast izolata gljive *C. parasitica*
(Autorska fotografija)

Za buduća istraživanja, 4-5 sitnih komadića svakog pojedinog izolata pohranjeno je u sterilne Eppendorf mikroepruvete sa 22%-tnim glicerolom. Tako pohranjeni uzorci mogu se čuvati na temperaturi od -20ºC duži vremenski period. 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.

2.2. Određivanje morfologije izolata gljive

Nakon izlaganja uzoraka danjem svjetlu, virulentni i hipovirulentni uzorci određivani su na temelju morfoloških karakteristika micelija. Virulentni izolati gljive *C. parasitica* koji nisu zaraženi hipovirusom CHV1 razvijaju narančaste do narančasto-smeđe micelije s mnogobrojnim sporama. Hipovirulentni izolati, zaraženi hipovirusom CHV1, razvijaju micelije bijele do blijedožute boje s vrlo malo spora. Hipovirusna dsRNA mijenja morfologiju gljive i smanjuje njezinu sporulaciju.

Postoje uzorci gljive *C. parasitica* kod kojih, na temelju morfologije, nije moguće odrediti jesu li virulentni ili hipovirulentni odnosno je li micelij narančaste ili bijele boje. Takvi izolati se nazivaju prijelazni ili izolati intermedijarne morfologije.

2.3. Test vegetativne kompatibilnosti (VC test)

Test vegetativne kompatibilnosti temelji se na praćenju pojave anastomoze hifa odnosno baražne linije između dva kompatibilna/nekompatibilna uzorka. Ako su izolati kompatibilni, njihovi miceliji će u potpunosti prorasti što znači da imaju identične alele na svih šest *vic* lokusa (Slika 10). Ako se na mjestu kontakta formira baražna linija, izolati se razlikuju u najmanje jednom *vic* lokusu i nekompatibilni su (Slika 10). Na mjestu kontakta dolazi do programirane stanične smrti.

Slika 10. VC test: kompatibilni uzorci (lijevo), nekompatibilni uzorci (desno) (Autorske fotografije)

Testovi vegetativne kompatibilnosti provođeni su u razdoblju od ožujka do lipnja 2015. godine. Sva testiranja izvođena su u laminaru uz prethodnu sterilizaciju radnog prostora i potrebnog pribora. Za određivanje VC tipova izolata gljive *C. parasitica* korištena je PDA hranjiva podloga (Potato dextrose agar). Podloga je prethodno pripremljena prema uputama proizvođača (Difco). U 1 litri destilirane vode otopljeno je 39 g PDA te je mješavina raspodijeljena u Shottove boce i autoklavirana (15 min, 121°C, 1,5 bara). Nakon hlađenja podloga je izlijevana u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm.

Izolati gljive *C. parasitica* najprije su međusobno križani, a zatim su pojedini izolati iz dobivenih skupina kompatibilnih uzoraka križani sa standardnim europskim (EU) testerima koji su podijeljeni u 2 seta. Prvi set sadrži testere od EU 1 do EU 31, a drugi set od EU 32 do EU 64.

Sterilnim skalpelom sastrugan je svježi micelij iz kulture i nacijepljen uz rub Petrijeve zdjelice (udaljen~3 mm) zajedno s micelijem određenog EU testera. Testeri i izolati međusobno su bili udaljeni 2-5 mm. Zbog veličine Petrijeve zdjelice bilo je moguće napraviti šest križanja, a svako križanje je rađeno u tri replike. Petrijeve zdjelice su prije testiranja obilježene (datum križanja i oznake uzoraka) te su nakon križanja zatvorene parafilmom kako ne bi došlo do kontaminacije. Testirani uzorci u Petrijevim zdjelicama inkubirani su u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom sedam dana, a nakon toga su u istom vremenskom periodu izloženi danjem svjetlu. Nakon perioda inkubacije, rezultati testiranja su očitani vizualno, golim okom. Po potrebi, testiranja su ponovljena.

2.4. Molekularne analize

2.4.1. Izolacija hipovirusne dsRNA iz micelija *C. parasitica*

U uzorcima gljive *C. parasitica* koji su razvili micelij bijele morfologije testirana je prisutnost hipovirusne dvolančane RNA (dsRNA). Uzorak gljive žute morfologije također je uključen u analizu hipovirusne dsRNA kao negativna kontrola. Odabrani uzorci gljive rasli su na PDA hranjivoj podlozi prekrivenoj autoklaviranim celofanom zbog lakšeg struganja micelija gljive. Uzorci gljive rasli su tjedan dana u mraku pri temperaturi od 24°C, a potom je s celofana, s rubnog dijela Petrijeve zdjelice, nožićem sastrugan mladi micelij gljive i prebačen u epruvetu.

Virusna dsRNA izolirana je korištenjem komercijalnog kit-a prema protokolu Double-RNA viral dsRNA extraction mini kit. Postupak izolacije izvodio se pri sobnoj temperaturi, a pribor i kemikalije morali su biti sterilni i bez Rnaza. Svježe tkivo (cca 50 mg) pohranjeno je u mikroepruveti i smrznuto u tekućem dušiku. Tkivo je pomoću mikrotučka usitnjeno u 100 µL pred-pufera. Nakon dodavanja 1 mL pufera za lizu uzorak je vorteksiran 10-tak sekundi te je ostavljen 5 min na sobnoj temperaturi. Isti postupak vorteksiranja ponovio se i nakon dodavanja 200 µL kloroforma. Nakon dodatka kloroforma došlo je do formiranja bijele linije ispod gornjeg plavog sloja. Taj sloj sadržavao je sve nečistoće, proteine, genomsku DNA i RNA. Svrha dodavanja kloroforma je separacija fenolnog sloja od gornjeg vodenog te izolacija RNA i genomske DNA/proteina.

Sljedeći korak bilo je centrifugiranje uzoraka 10 min na 13 000 rpm pri temp. od 4°C te je nakon toga otpipetirano 400 µL gornjeg sloja koji sadrži RNA u praznu mikroepruvetu od 1,5 mL. U 400 µL otpipetiranog gornjeg sloja dodan je jednak volumen pufera za vezanje, lagano je promiješano 2-3 puta i ostavljeno 1 min na sobnoj temperaturi.

Kako bi se pripremila membrana, mikroepruveta za centrifugu dva puta je isprana s 500 µL pufera za ispiranje, centrifugirana 1 min na 13 000 rpm pri temp. od 4°C, nakon čega je filtrat bačen. Ovaj postupak trebalo je ponoviti ukupno dva puta. Prazna mikroepruveta za centrifugu centrifugirana je 2 min na 13 000 rpm kako bi se membrana osušila, a zatim je prebačena u novu mikroepruvetu od 1,5 mL. Na membranu je dodano 30 µL pufera za eluiranje te je centrifugirano 1 min na 13 000 rpm kako bi dsRNA, koja se vezala na membranu spin kolonice, eluirala. Uzorke eluirane dsRNA potrebno je pohraniti na temperaturu od 4°C ili na -20°C ukoliko uzorke želimo čuvati duže vremensko razdoblje.

2.4.2. Reverzna transkripcija hipovirusne dsRNA

Izolirana dsRNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije (RT) kako bi se mogla umnožiti lančanom reakcijom polimerazom, PCR. Pripremljena je reakcijska smjesa (Tablica 1) koja je raspodijeljena u epice (10 µl) zajedno s 10 µl uzorka izolirane dsRNA. Priprema se odvijala na ledu. PCR epice s uzorcima stavljene su u PCR uređaj na inkubaciju od 10 min pri temperaturi od 25°C, zatim 120 min pri 37°C te na 5 min pri 85°C. Nakon inkubacije uzorci cDNA čuvani su na temperaturi od 4°C.

Tablica 1. Sastojci reakcijske smjese za jednu reakciju reverzne transkripcije hipovirusne dsRNA pomoću nasumičnih početnica

KOMPONENTE	KIT inhibitor RNaze (µl)
10x reakcijski pufer	2,0
25xdNTP MIX (100mM)	0,8
10xRT nasumične početnice	2,0
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
H_2O bez nukleaza	3,2
Ukupan volumen	**10,0**

2.4.3. Lančana reakcija umnožavanja polimerazom

Komplementarna DNA dobivena reverznom transkripcijom umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR). PCR je proveden pomoću EmeraldAmp MAX PCR Master Mix-a prema uputama proizvođača. Emerald PCR Mix je zelene boje što olakšava izvođenje PCR reakcije i prilikom elektroforeze uzorke nije potrebno dodatno bojati. Pripremljena reakcijska smjesa za PCR reakciju (Tablica 2) podijeljena je u epice (49 µl) u koje je dodan i 1 µl uzorka. Korištena je i negativna kontrola u koju je umjesto uzorka dodan 1 µl vode.

Tablica 2. Sastojci reakcijske smjese za jednu PCR reakciju

KOMPONENTE	Volumen za 1 uzorak (µl)
Emerald Mix (pufer + $MgCl_2$ + dNTP + Taq polimeraza)	25
EP 5 početnica (10 µM)	1
R početnica (10 µM)	1
H_2O	22
Uzorak DNA	1
Ukupan volumen	**50**

Uzorci su stavljeni u PCR uređaj te se reakcija odvijala prema sljedećim uvjetima: početna denaturacija trajala je 2 min pri 94°C, nakon toga je uslijedilo 35 ciklusa koji su se sastojali od 1 min denaturacije pri 94°C, zatim sparivanje početnica s kalupom 1,5 min pri 55°C i produljivanje lanca DNA 2 min pri 72°C. Završno produljivanje lanca DNA odvijalo se 10 min pri 72°C, nakon čega su se uzorci čuvali na temperaturi od 4°C.

2.4.4. Polimorfizam duljine restrikcijskih odsječaka

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

2.4.5. Agarozna gel elektroforeza

Elektroforezom je provjerena uspješnost PCR reakcije i RFLP-a. U tu svrhu korišten je 1%-tni odnosno 2%-tni agarozni gel. Gel za provjeru PCR produkata pripremljen je otapanjem 0,2 g agaroze u 20 mL 1xTBE pufera u mikrovalnoj pećnici. Ohlađenom gelu dodano je 2 µl DNA boje (SYBR safe DNA gel stain) te je smjesa nakon hlađenja izlivena u elektroforetsku kadicu. Nakon polimerizacije, gel je preliven 1xTBE puferom. U nastale jažice naneseno je po 9 µl uzorka i 1 µl loading buffer-a što je ukupno 10 µl uzorka u svakoj jažici. Dodana je i negativna kontrola te 2 µl markera (50bp DNA Ladder Takara). Elektroforeza se odvijala pri 100V tijekom 40 min.

Za elektroforezu RFLP-a korišten je 2%-tni agarozni gel, pri čemu je 2 g agaroze otopljeno u 100 mL 1xTBE pufera kojemu je dodano 5 µl boje (SYBR safe DNA gel stain). U jažice je naneseno 20 µl uzorka i 4 µl obojenog pufera. Također su dodane pozitivne kontrole te 2 µl markera (50bp DNA Ladder Takara) kojemu je dodan 1 µl obojenog pufera. Elektroforeza se odvijala pri 100V tijekom 120 min.

Umnoženi i pocijepani fragmenti u obje elektroforeze vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru i fotografirani kamerom (Kodak EDAS 290 System).

2.5. Statistička obrada podataka

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

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

gdje je:

H′ - Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti
pi - frekvencija pojedinog VC tipa

pi se računa po formuli:

$$pi = ni / N$$

gdje je:

ni - brojnost vrste *i* u uzorku
N - ukupna brojnost u uzorku

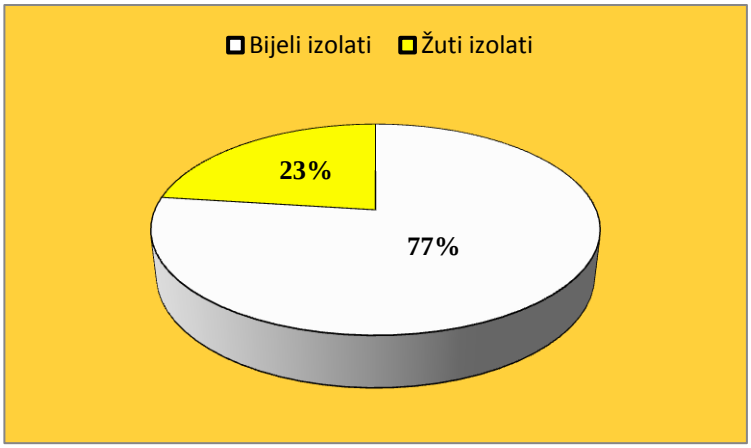
3. REZULTATI

3.1. Morfologija izolata gljive *C. parasitica*

Analizom morfoloških karakteristika 13 izolata gljive *C. parasitica*, prikupljenih u aktivnim rakovima pitomog kestena na području Hrvatske Kostajnice, određeno je 10 žutih (77%) i 3 bijela (23%) izolata gljive (Tablica 3.1, Slika 11). Hipovirulentni sojevi gljive zaraženi hipovirusom CHV1 razvijaju karakterističnu bijelu do svijetložutu boju micelija. Smanjena produkcija žutonarančastog pigmenta prilikom zaraze gljive hipovirusom pruža bolju mogućnost identifikacije zaraženih izolata gljive *C. parasitica*. Virulentni izolati gljive razvijaju micelij žute do narančaste boje te ih karakterizira jaka sporulacija. Podaci o tipu raka kore kestena (Tablica 3.2) dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica. Unutar aktivnog raka prevladavaju žuti sojevi gljive, a jedan aktivni rak od ukupno deset, imao je gljivu bijelog micelija. Iz tri raka, karakteriziranih kao aktivni rak/nekroza, izolirana su dva bijela i jedan žuti soj gljive.

Tablica 3.1. Morfologija izolata gljive *C. parasitica*

Oznaka uzorka gljive *C. parasitica*	**Morfologija gljive *C. parasitica***
1	ŽUTA
2	ŽUTA
3	ŽUTA
4	ŽUTA
5	ŽUTA
6	ŽUTA
7	ŽUTA
8	BIJELA
9	BIJELA
10	ŽUTA
11	BIJELA
12	ŽUTA
13	ŽUTA



Slika 11. Udio bijelih i žutih izolata gljive *C.parasitica*

Tablica 3.2. Tip raka kore pitomog kestena *Castanea sativa* Mill.

Oznaka uzorka gljive *C. parasitica*	**Tip raka kore kestena *C. sativa***
1	AKTIVNI
2	AKTIVNI
3	AKTIVNI
4	AKTIVNI
5	AKTIVNI
6	AKTIVNI
7	AKTIVNI
8	AKTIVNI/NEKROZA
9	AKTIVNI
10	AKTIVNI
11	AKTIVNI/NEKROZA
12	AKTIVNI
13	AKTIVNI/NEKROZA

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

Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti određivana je pomoću VC testa. Uzorci gljive testirani su međusobno ali i sa standardnim europskim VC tipovima iz setova EU 1 do EU 31 te EU 32 do EU 64. Test vegetativne kompatibilnosti nije uvijek dao jasne rezultate što je otežavalo određivanje VC tipova.

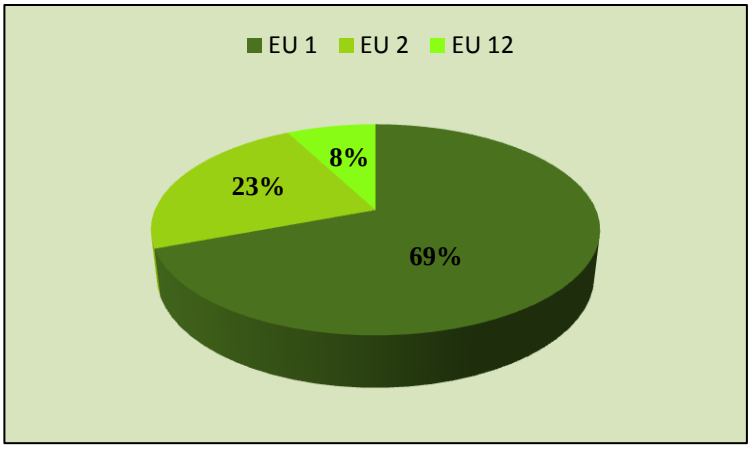
Dodatna pomoć prilikom potvrde nekompatibilnosti je pojava tamne crte na granici između dva uzoraka koja je vidljiva kada se Petrijeva zdjelica okrene naopako.

Od ukupno 13 izolata gljive *C. parasitica* prikupljenih iz aktivnih rakova pitomog kestena na području Hrvatske Kostajnice, testovima vegetativne kompatibilnosti određena su tri različita VC tipa (Tablica 3.3). Najzastupljeniji VC tip je EU 1 sa 9 izolata (69%), zatim EU 2 sa 3 izolata (23%) i EU 12 sa 1 izolatom (8%) (Slika 12).

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 3.3. Vegetativna kompatibilnost izolata gljive *C. parasitica*

Oznaka uzorka gljive *C. parasitica*	**VC tip gljive *C. parasitica***
1	EU 1
2	EU 1
3	EU 1
4	EU 2
5	EU 1
6	EU 2
7	EU 2
8	EU 1
9	EU 1
10	EU 1
11	EU 1
12	EU 1
13	EU 12

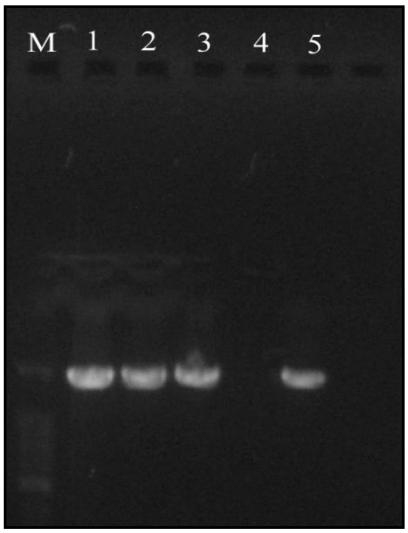


Slika 12. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica*

3.3. Hipovirusna dsRNA u izolatima gljive *C. parasitica*

Nakon uzgoja na hranjivoj PDA podlozi, iz uzoraka gljive bijele morfologije izolirana je dsRNA kako bi se potvrdila prisutnost hipovirusa CHV1. Izolirana hipovirusna dsRNA prevedena je u cDNA metodom reverzne transkripcije (RT) i umnožena lančanom reakcijom polimerazom (PCR), nakon čega je uslijedila agarozna gel elektroforeza.

Nakon provedene agarozne gel elektroforeze dobiveni su rezultati koji ukazuju na prisutnost hipovirusa CHV1 u izolatima 1, 2, 3 i 5, dok hipovirus nije bio prisutan u izolatu 4 čiji je micelij žute morfologije i koji je služio kao negativna kontrola (Slika 13).

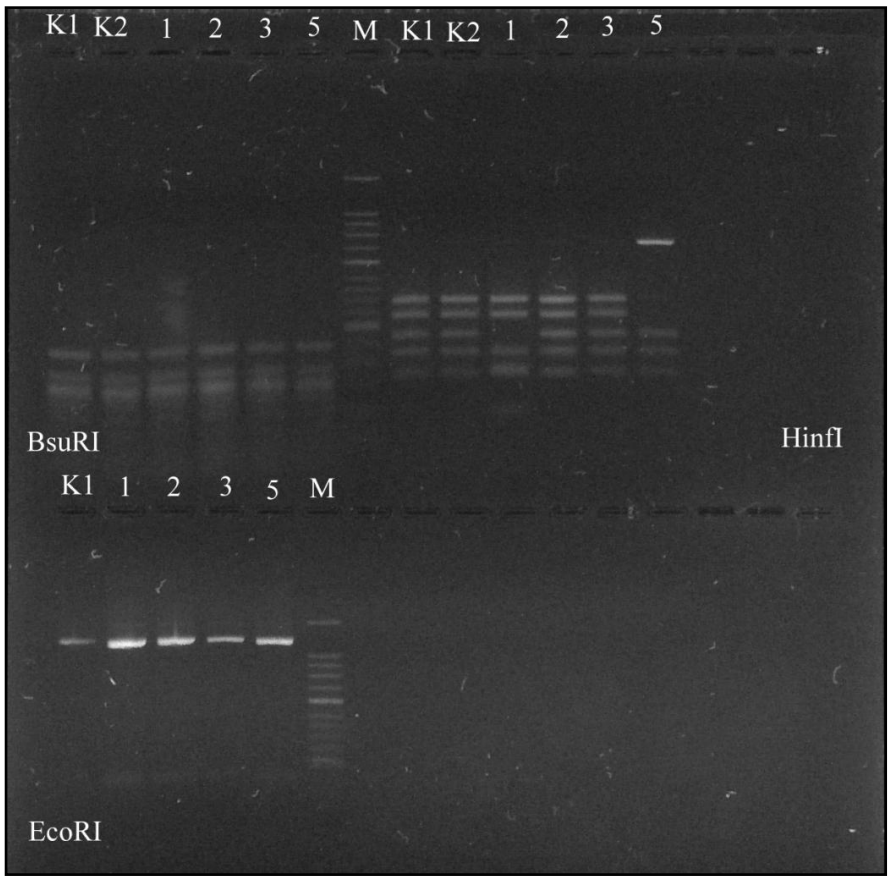


Slika 13. Elektroforeza dsRNA izolirane iz micelija gljive *C. parasitica* u 1%-tnom agaroznom gelu. Redoslijed uzoraka: M - marker 50bp DNA Ladder Takara; 1, 2, 3 - uzorci izolata *C. parasitica*; 4 - negativna kontrola; 5 - pozitivna kontrola

3.4. Utvrđivanje podtipa hipovirusa

Za analizu polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka, RFLP korišteni su uzorci kojima je potvrđena prisutnost hipovirusa CHV1. Kao pozitivne kontrole, prilikom cijepanja PCR produkata restrikcijskim enzimima *BsuRI* i *HinfI*, korištena su dva prethodno istražena CHV1 izolata koje sam dobila ljubaznošću doc. dr. sc. Ljiljane Krstin. Poznato je da ti uzorci pripadaju talijanskom podtipu CHV1 hipovirusa. Za enzim *EcoRI* koristila sam samo jednu pozitivnu kontrolu jer sam pretpostavila da taj enzim neće uspješno pocijepati PCR produkte, što je u krajnjem slučaju i vidljivo na gelu.

Nakon provedene elektroforeze u 2%-tnom agaroznom gelu, rezultati dobiveni cijepanjem PCR produkata enzimima *BsuRI* i *HinfI* potvrdili su da istraživani hipovirusi pripadaju talijanskom podtipu, CHV1 I (Slika 14).



Slika 14. Elektroforetski obrazac umnoženih produkata ORF-A CHV1 I pocijepanih enzimima *BsuRI, HinfI i EcoRI*. Redoslijed uzoraka: K1 i K2 - pozitivne kontrole; M - 50bp DNA Ladder Takara

3.5. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti

Raznolikost VC tipova gljive *C. parasitica* izražena Shannon-Wiener-ovim indeksom raznolikosti (H′) unutar istraživanih uzoraka Hrvatske Kostajnice iznosi 0,7901 (Tablica 4).

Tablica 4. Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti (H′) VC tipova gljive *C. parasitica*

VC tip	**n[a]**	***pi* = n/N**	***pi* * ln (*pi*)**
EU 1	9	0,6923	- 0,2546
EU 2	3	0,2307	- 0,3383
EU 12	1	0,0769	- 0,1972
N[b]	13	-	**H[c] = 0,7901**

[a] Broj izolata određenog VC tipa

[b] Ukupan broj izolata

[c] Shannon-Wiener-ov indeks raznolikosti, $H' = - \sum pi \ln (pi)$, gdje je *pi* frekvencija pojedinog VC tipa

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju korišteni su uzorci gljive *C. parasitica* koji su prikupljeni sa zaraženih stabala pitomog kestena na kojima su bili vidljivi aktivni rakovi uzrokovani virulentnim sojem patogene gljive. Izolati su uzgajani u Petrijevim zdjelicama na krumpirovoj hranjivoj podlozi, PDA. Ovakav način uzgoja olakšava praćenje rasta gljive, uočavanje razvoja zagađenja kao što su plijesni i bakterije te u konačnici pojednostavljuje postupak presađivanja. Također, uzgoj na PDA podlozi omogućuje testiranje vegetativne kompatibilnosti i prenošenje virusa iz hipovirulentnih u virulente izolate.

Morfologija gljive može biti jasan pokazatelj prisutnosti hipovirusa. Micelij hipovirulentnih sojeva zaraženih hipovirusom je bijeli, blijedožućkasti do blijedonarančasti, dok je micelij virulentnih sojeva bez virusa izrazito žut ili narančast (Anagnostakis, 1982; Novak-Agbaba i sur., 2000). U ovom istraživanju utvrđeno je 77% izolata žute morfologije te 23% izolata bijele morfologije.

Patogenost gljive *C. parasitica* zaražene hipovirusom znatno je smanjena i stoga je hipovirulentnost osnova na kojoj se temelji biološka kontrola raka kore pitomog kestena (Hillman i Suzuki, 2004). Uspjeh biološke kontrole ovisi o raznolikosti VC tipova gljive *C. parasitica*, tipu hipovirusa, okolišnim uvjetima te starosti i otpornosti biljke (Marra i Milgroom, 2001). U Europi je zabilježena veća uspješnost biološke kontrole bolesti nego u Americi upravo zbog znatno manje raznolikosti VC tipova gljive *C. parasitica* (Heiniger i Rigling, 1994; Milgroom i Cortesi, 2004).

Negativan utjecaj na biološku kontrolu odnosno povećanje broja VC tipova moglo bi imati spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica*, rekombinacija gena i postojanje mogućeg dodatnog polimorfnog lokusa ili trećeg alela. Sustav vegetativne kompatibilnosti više se ne smatra neprobojnom barijerom jer je zabilježen prijenos hipovirusa između vegetativno nekompatibilnih izolata, što bi moglo pozitivno utjecati na biološku kontrolu raka kore kestena.

Ovim istraživanjem utvrđeno je deset aktivnih rakova na kori kestena dok su tri bila zabilježena kao aktivni rak/nekroza. Aktivni rak na stablima većih promjera ima veću mogućnost konverzije u kalusirajući rak uslijed prirodne biološke kontrole. Za poboljšanje zdravstvenog stanja i kvalitete sastojina pitomog kestena neophodno je provoditi šumsko - uzgojne mjere prorjeđivanja i čišćenja s naglaskom na uklanjanje stabala zaraženih aktivnim rakom kao i nekvalitetnih stabala.

U ovom istraživanju određena su tri različita VC tipa gljive *C. parasitica*, između 13 prikupljenih izolata iz rana aktivnog raka na kori kestena. Najzastupljeniji VC tip u istraživanju je EU 1 s udjelom od 69%. Nakon njega slijedi EU 2 s udjelom od 23% te EU 12 s udjelom od svega 8%.

Prilikom prethodnih istraživanja na području Republike Hrvatske određeno je 18 VC tipova unutar 338 prikupljenih izolata gdje je EU 1 bio najzastupljeniji a zatim su slijedili EU 2 i EU 12 (Krstin i sur., 2008). U susjednoj Sloveniji određeno je ukupno 15 VC tipova unutar 254 prikupljena izolata (Ježić i sur., 2012). Najzastupljeniji je bio EU 13 (40,1%) a 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. U Bosni i Hercegovini određeno je 25 VC tipova unutar čak 920 izolata (Trestić i sur., 2001). Jugozapadni dio Njemačke ima 9 različitih VC tipova od prikupljenih 368 izolata (Peters i sur., 2012). 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 je u Portugalu određeno 9 VC tipova unutar 617 izolata (Bragança i sur., 2007).

Smatra se da su se VC tipovi EU 1 i EU 2 proširili u Hrvatsku i Sloveniju iz sjeverne Italije (Ježić i sur., 2012), gdje su ujedno i najzastupljeniji. VC tipovi EU 1 i EU 2 su dominantni u Italiji, zapadnoj Francuskoj, Švicarskoj, Austriji, sjeveroistočnoj Španjolskoj i Njemačkoj (Cortesi i sur., 1998; Robin i Heiniger, 2001). Porijeklo VC tipa EU 12 je nejasno jer je vrlo rijedak na području sjeverne Italije (Ježić i sur., 2012), a dominantan je na području južne i istočne Europe, u 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 raširena na sjeverozapadnom području Bosne i Hercegovine (Trestić i sur., 2001).

Raznolikost VC tipova gljive može se izraziti i pomoću vrijednosti Shannon-Wiener-ovog indeksa (H′). Za istraživane uzorke gljive *C. parasitica* Shannon-Wiener-ov indeks iznosi 0,7901. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da su vrijednosti raznolikosti VC tipova gljive *C. parasitica* na području Hrvatske relativno visoke i iznose 0,63 - 1,69 (Krstin i sur., 2008). Vrijednost Shannon-Wiener-ovog indeksa raznolikosti za područje Istre - Buje iznosi 1,69. U Bosni i Hercegovini velika raznolikost prevladava u sjeverozapadnim krajevima, dok je u ostalim krajevima relativno niska raznolikost VC tipova (Trestić i sur., 2001).

Na području sjeverne Italije indeks raznolikosti VC tipova iznosi 0,9 - 1,7, dok je vrijednost indeksa na području južne Italije nešto manja 0,4 - 0.8 (Cortesi i sur., 1996). Što se tiče Slovenije, vrijednosti Shannon-Wiener-ovog indeksa su visoke i ukazuju na vrlo veliku raznolikost (H′=1,16 - 1,89).

Poznato je da se velika raznolikost VC tipova javlja na područjima gdje je rak kore pitomog kestena prisutan već duže vrijeme i gdje je spolno razmnožavanje fitopatogene gljive često (Papazova-Anakieva i sur., 2008). Tu spadaju jugozapadna Francuska, Italija, Švicarska (H′=1,94), Amerika te kineske i japanske populacije gdje je gljiva *C. parasitica* autohtona vrsta. U populacijama jugoistočne Europe (Milgroom i sur., 2008) utvrđena je mnogo manja raznolikost, što se poklapa sa kasnijim dolaskom patogena na ta područja.

Prisutnost hipovirusa CHV1 u izolatima bijele morfologije testirana je izolacijom hipovirusne dsRNA. U ovom istraživanju, od 13 odabranih uzoraka, deset je razvilo micelij žute boje, dok je tri uzorka bilo bijele morfologije. Za izolaciju dsRNA gljiva je uzgajana na PDA podlozi prekrivenoj celofanom kako ne bi došlo do urastanja u agar. Elektroforeza dsRNA u agaroznom gelu često puta nije dovoljno osjetljiva metoda za detekciju male količine dsRNA izolirane iz hipovirusa CHV1 hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* te je za detekciju hipovirusne dsRNA preporučljivo koristiti metodu reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (Krstin i sur., 2008). Nakon RT-PCR-a i agarozne gel elektroforeze, hipovirusna dsRNA uspješno je izolirana iz tri bijela izolata hipovirulentnog soja gljive *C. parasitica*, dok je iz žutih virulentnih izolata nije bilo moguće izolirati, što je bilo i očekivano.

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

Preostali podtipovi CHV1 hipovirusa (CHV2, CHV3, CHV4) geografski su ograničeni na zapadnu Europu. Dva podtipa su pronađena u Francuskoj, dok je po jedan podtip pronađen u Njemačkoj i Španjolskoj, u blizini francuske granice. Prisutnost nekoliko podtipova CHV1 i njihova distribucija u Europi može se objasniti uvozom stabala kestena iz Japana i/ili Sjeverne Amerike.

U prvim godinama otkrića (1964. - 1965.), bijeli izolati CHV1 pronađeni su u sjevernoj Italiji, južnoj Francuskoj i na Pirinejima u zapadnoj Francuskoj (Heiniger i Rigling, 1994), što podržava hipotezu o postojanju više vrsta podtipova CHV1. U Sjevernoj Americi nije otkriven hipovirus CHV1 (Peever et al., 1997), što ukazuje da odatle nije unesen u Europu.

Nema dovoljno saznanja o tome kako gljiva *C. parasitica* završava svoj biološki ciklus u različitim zemljama, pod različitim klimatskim uvjetima, stoga je poznavanje biološkog ciklusa gljive *C. parasitica* od velike važnosti za razumijevanje i predviđanje razvoja bolesti i širenja CHV1 hipovirusa (Robin i Heiniger, 2001; Montenegro i sur., 2008).

Većina kestenovih sastojina izgubila je svoj tipični florni sastav i strukturu, što je povezano s mijenjanjem vegetacije, načinom gospodarenja i širenjem bolesti. Bukva i obični grab značajnim udjelom popunjavaju praznine nastale zbog propadanja stabala kestena. Ipak, zdravstveno stanje kestenovih sastojima razlikuje se od područja do područja. To ovisi o mnogim biotičkim i abiotičkim čimbenicima (Novak-Agbaba i sur., 2000).

Što se tiče biotičkih čimbenika, svakako treba obratiti pažnju na kukce vektore. Iako se mislilo da kukci ne igraju značajnu ulogu u prijenosu bolesti, važno je spomenuti da rak kore kestena ima vrlo veliku i bogatu faunu. U jednom eksperimentu u Americi, na starim ranama aktivnih rakova pronađeno je 495 vrsta kukaca. Znatan broj njih proveo je velik dio svog životnog ciklusa upravo na tim stablima, a kod gotovo 70 vrsta otkriveno je da nose inokulum gljive *C. parasitica* (Russin i Shain, 1984).

Određeni okolišni uvjeti ili planirano upravljanje smanjili bi stres na kestenovim stablima te bi mogli doprinijeti bržem rastu stabala i na taj način pogodovati uspostavljanju hipovirulence (Heiniger i Rigling, 1994; Turina i Rostagno, 2007). Važno je odabrati hipovirulentne izolate koji najviše smanjuju rast i sporulaciju gljive *C. parasitica* u uvjetima *in vitro*. Njihovom aplikacijom na oboljela stabla došlo bi do konverzije virulentnog soja u hipovirulentni odnosno do formiranja kalusnog tkiva a samim tim i do oporavka stabala.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

Analizom morfoloških karakteristika gljive *C. parasitica* određeno je 10 žutih sojeva (77%) i 3 bijela (23%) soja gljive što ukazuje na slabu raširenost hipovirulentnih sojeva gljive u istraživanim uzorcima.

Osim očekivanih virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* u kori kestena zaraženoj aktivnim rakom utvrđeni su i hipovirulentni bijeli sojevi. Biološka kontrola na kestenima zaraženim aktivnim rakom mogla bi biti potpomognuta ljudskim djelovanjem kako bi se omogućilo brže širenje hipovirusa.

Od ukupno 13 uzoraka gljive *C. parasitica* određeno je tri VC tipa. Najzastupljeniji VC tip je EU 1 (69%), zatim slijedi VC tip EU 2 (23%), te EU 12 sa svega 8% zastupljenosti. Raznolikost VC tipova mogla bi se povećati širenjem novih VC tipova iz susjednih područja veće raznolikosti kao i spolnim razmnožavanjem gljive odnosno rekombinacijom postojećih VC tipova.

Shannon-Wiener-ov indeks (indeks vegetativne raznolikosti) za istraživane uzorke gljive *C. parasitica* iznosi 0,7901. Nizak indeks raznolikosti povećava vjerojatnost za učinkovito prirodno uspostavljanje hipovirulencije na istraživanom području.

Izolacijom hipovirusne dsRNA potvrđena je prisutnost hipovirusa CHV1 u izolatima gljive *C. parasitica* koji su razvili bijeli micelij.

Analizom polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (RFLP) dokazano je da CHV1 izolati pripadaju talijanskom podtipu virusa, CHV1 I. Ovakvi rezultati su bili i očekivani s obzirom da je talijanski podtip CHV1 najrasprostranjeniji na području južne i jugoistočne Europe te je ujedno i jedini do sada zabilježeni podtip u Hrvatskoj.

6. LITERATURA

- Adamčiková K, Juhasova G, Kobza M. 2006. Genetic Diversity of *Cryphonectria parasitica* Population in the Štiavnicko-Krupinska Subpopulation in Slovakia. *Plant Protection Science* 42:119-124.
- Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV 1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8:843-854.
- Anagnostakis S. L, Hau B, Kranz J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70:536-538.
- Anagnostakis S. L. 1982. Biological control of chestnut blight. *Science* 215:466-471.
- Anagnostakis S. L. 2000. American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut-blight fungus population. *Forest Ecology and Management* 152:225-233.
- Blomhoff R, Carlsen M. H, Andersen L. F, Jacobs D. R. 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* 96:52-60.
- Borges O, Gonçalves B, Soeiro de Carvalho J. L, Correira P, Silva A. P. 2008. Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry* 106:976-984
- Bragança H, Simões S, Onofre N, Tenreiro R, Rigling D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal-diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology* 37:391-402.
- Bryner S. F, Sotirovski K, Akilli S, Risteski M, Perlerou C, Rigling D. 2013. Informative value of canker morphology on the presence or absence of virus infection in chestnut blight cankers. *Forest Pathology* 43:496-504.
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102:1190-1199.
- Choi G. H, Dawe A. L, Churbanov A, Smith M. L, Milgroom M. G, Nuss D. L. 2012. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 190:113-127.

- Choi G. H, Shapira R, Nuss D. L. 1991. Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* USA 88:1167-1171.
- Cortesi P, Milgroom M. G. 1998. Genetics of Vegetative Incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 8:2988-2994.
- Domac R. 1994. *Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja.* Školska knjiga, Zagreb.
- Elliston J. E. 1985b. Further evidence for two cytoplacmic hypovirulence agens in a strain of *Endothia parasitica* from western Michigan. *Phytopathology* 75:1405-1413.
- Glass N. L, Kaneko I. 2003. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2:1-8.
- Glavaš M. 1999. Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Gobbin D, Hoegger P. J, Heiniger U, Rigling D. 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria* hypovirus 1 (CHV-1) in Europe. *Virus research* 97:39-46.
- Halambek M. 1988. Istraživanje virulentnosti gljive *Endothia parasitica* (Murr.) i uzročnika raka pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, doktorska disertacija.
- Haltofová P, Ankovský L. J. 2003. Distribution of sweet chestnut *Castanea sativa* Mill. in the Czech Republic. *Journal of Forest Science* 49(6):259-272.
- Heiniger U, Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32:581-599.
- Hepting G. H. 1974. Death of the American chestnut. *Journal of Forest History* 18:60-67.
- Hillman B. I, Suzuki N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances of Virus Research* 63:423-472.
- Idžojtić M, Poljak I, Zebec M, Šatović Z, Liber Z. 2012. Analiza genetske raznolikosti „Lovranskog maruna“ (*Castanea sativa* Mill.) korištenjem mikrosatelitnih biljega. Šumarski list 136,11-12.
- Jacob-Wilk D, Turina M, Van Alfen N. K. 2006. Mycovirus *Cryphonectria* Hypovirus 1 Elements Cofractionate with *trans*- Golgi Network Membranes of the Fungal Host *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 13:6588-6596.
- Jaynes R. A, DePalma N. K. 1984. Natural infection of nuts of *Castanea dentata* by *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 74:296-299.

- 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.
- Ježić M. 2013. Raznolikost gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr i njezin utjecaj na populacije pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, doktorska disertacija.
- Kazmierczak P, Pfeiffer P, Zhang L, Van Alfen N. K. 1996. Transcriptional Repression of Specific Host Genes by the Mycovirus *Cryphonectria* Hypovirus 1. *Journal of Virology* 2:1137-1142.
- 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.
- Krstin Lj, 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* 6(4):752-761.
- Kües U, Casselton L. A. 1992. Fungal mating type genes-regulators of sexual development. *Mycological Research* 96:993-1006.
- Larson T. G, Choi G. H, Nuss D. L. 1992. Regulatory pathways governing modulation of fungal gene expression by a virulence-attenuating mycovirus. *The EMBO Journal* 12:4539-4548.
- Liu Y. C, Milgroom M. G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86:79-86.
- Marra R. E, Milgroom M. G. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86:134-143.
- Maurer W. D, Fernández-López J. 2001. Establishing an international sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) provenance test: preliminary steps. *Forest Snow and Landscape Research* 3:482-486.
- Milgroom M, Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* 42:311-338.
- Milgroom M. G, and 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.

- Montenegro D, Aguin O, Sainz M. J, Hermida M, Mansilla J. P. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecology and Management* 256:973-980.
- Nikolić T. ur. 2015. Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 16.8.2016.)
- Novak-Agbaba S. 2006. Monitoring raka kore pitomog kestena na trajnim plohama Radovi Šumararski institut. Izvanredno izdanje 9:199-211
- Novak-Agbaba S, Ćelepirović N, Ćurković Perica M. 2011. Zaštita šuma pitomog kestena. Šumski list, Poseban broj 202-210.
- Novak-Agbaba S, Liović B, Pernek M. 2000. Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Radovi Šumarskog instituta Jastrebarsko 35(1):91-110.
- Nuss D. L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3:632-642.
- Nuss D. L. 2011. Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. *Advances in Virus Research* 80:25-48.
- OEPP/EPPO, 2005. *Cryphonectria parasitica*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35:295-298.
- Pagliarini C. 2011. Bolesti i štetnici pitomog kestena. http://www.agroklub.com/hortikultura/bolesti-i-stetnici-pitomog-kestena/6120/
- Peever T. L, Liu Y. C, Milgroom M. G. 1997. Diversity of Hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* 87:1026-1033.
- Peters F. S, Holweg C. L, Rigling D, Metzler B. 2012. Chestnut blight in south-western Germany: multiple introductions of *Cryphonectria parasitica* and slow hypovirus spread. *Forest Pathology* 42(5):397-404.
- Read N. D, Beckett A. 1996. Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycological Research* 100:1281-1314.
- Robin C, Capdevielle X, Martin M, Traver C, Colinas C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58:527-535
- Robin C, Heiniger U. 2001. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* 76(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.
- Rossman A. Y, Farr D. F, Castlebury L. A. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48:135-144.
- Russin J, Shain L. 1984. Initiation and development of cankers caused by virulent and cytoplasmatic hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus. *Canadian Journal of Botany* 62:2660-2664.
- 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.
- Sotirovski K, Papazova-Anakieva I, Grünwald N. J, Milgroom M. G. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology* 53:325-33.
- Šilić Č. 1973. *Atlas drveća i grmlja*. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo.
- Trestić T, Uščuplić M, Colinas C, Rolland G, Giraud A, Robin C. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Landscape Research* 76:391-3966.
- Turina M, Rostagno L. 2007. Virus- induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. *Plant Pathology* 89(2):165-178.
- Webster J, Weber R. 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zavišić N, Radić T, Trubajić T. 2014. Utjecaj tipa tla na morfološka svojstva sijanaca pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture, Book of abstracts, p740 -744, Dubrovnik, Hrvatska.

INTERNETSKE STRANICE

- web 1 http://www.deepdale-trees.co.uk/trees/2012/08-Castanea-sativa.html
- web 2 http://www.floralimages.co.uk/page.php?taxon=castanea_sativa,3
- web 3 http://www.bbowt.org.uk/events/2014/09/28/silchester-common-and-pamber-forest-walk
- web 4 https://online.science.psu.edu/biol110_sandbox_8862/node/8972
- web 5 https://www.pmf.unizg.hr/zzm/znanost/hrzz_curkovic
- web 6 http://www.agroklub.com/sumarstvo/rak-kore-goruci-problem-suma-pitomog-kestena/24267/
- web 7 http://www.wsl.ch/