Hipovirulentni izolati gljive Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr pogodni za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena (Castanea sativa Mill.)

Živković, Ružica

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:181:930181

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Ružica Matić

Hipovirulentni izolati gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr pogodni za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Diplomski rad

Osijek, 2012.

Predaj Gospodinu svoja djela,

i tvoji će naumi uspjeti! (Izr 16, 3)

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc Mirni Ćurković Perici koja je omogućila izradu ovog diplomskog rada i komentorici doc.dr.sc. Ljiljani Krstin na uloženom trudu i vremenu, na velikodušnoj pomoći, na susretljivosti, strpljivosti i ljubaznosti. Hvala mojoj majci i sestri koje su me poticale i bodrile tijekom izrade ovog diplomskog rada. Želim zahvaliti i mojemu suprugu Iliji na razumijevanju i podršci. Najveća hvala ide Bogu čija me Ruka vodila tijekom cijelog mog života i ovoga studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Znanstveni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Hipovirulentni izolati gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr pogodni za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Ružica Matić

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

Sažetak: Rast i sporulacija većine slovenskih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* uzgojenih *in vitro* nije se značajno razlikovala od virulentnih izolata bez virusa. Hipovirulentni izolati GS14, ZB18 i B11 najsporije su rasli, dok je najmanji broj spora zabilježen u hipovirulentnih izolata K5, V63 te B69. Relativno mali broj spora imao je i izolat B11 koji bi se s obzirom na rezultate rasta i sporulacije mogao upotrijebiti za biološku kontrolu raka kore pitomog kestena. Izolati iz Francuske, Švicarske te Bosne i Hercegovine zaraženi virusom sporije su rasli i imali su manji broj spora od većine hipovirulentnih i svih virulentnih slovenskih izolata. Rast i sporulacija dvaju hrvatskih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica*, nije se značajno razlikovala od većine slovenskih izolata.

Broj stranica: 34
Broj slika: 16
Broj tablica: 6
Broj literaturnih navoda: 31
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fungi, hipovirulentnost, *in vitro* uvjeti, sporulacija, rast

Datum obrane: 20. srpnja 2012.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin
2. Izv. prof. dr. sc. Elizabeta Has Schön
3. Doc. dr. sc. Ivna Štolfa
4. Doc. dr. sc. Goran Palijan

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

BASIC DOCUMENTATION CARD **MS Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University in Osijek
Department of Biology
Graduate Study of Biology
Scientific Area: Natural Science
Scientific Field: Biology

Hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr fungus suitable for biological control of chestnut blight (*Castanea sativa* Mill.)

Ružica Matić

Thesis performed at: Biochemistry and Plant Ecophysiology Institute
Supervisor: Prof. Mirna Ćurković Perica, Ph. D
Co-supervisor: Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph. D

Summary: Growth and sporulation of most Slovenian hypovirulent isolates of fungi *C. parasitica in vitro* was not significantly different from the virulent isolates without the virus. Hypovirulent isolates GS14, ZB18 i B11 were the slowest growing , while the smallest number of spores was recorded in hypovirulent K5 isolates, V63 and B69. The relatively small number of spores had a strain B11, which considering the results of growth and sporulation could be used in biological control of chestnut blight. Reference isolates from France, Switzerland and Bosnia-Herzegovina infected with the virus grew slower and had fewer spores than most virulent hipovirulentnih and all Slovenian. Growth and sporulation of two Croatian hypovirulent *C. parasitica* isolates, was not significantly different from the majority of Slovenian isolates.

Number of pages: 34
Number of figures: 16
Number of tables: 6
Number of references: 31
Original in : Croatian

Key words: Fungi, hypovirulence, *in vitro* conditions, sporulation, growth

Date of the thesis defence: 20th July 2012.

Rewievers:
1. Assist. Prof. Ljiljana Krstin, Ph.D
2. Prof. Elizabeta Has Schön, Ph.D
3. Assist. Prof. Ivna Štolfa, Ph. D
4. Assist. Prof. Goran Palijan, Ph. D

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Opće značajke europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.).....1

1.2. Biološke značajke gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.....4

1.3. *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr - uzročnik raka kore pitomog kestena.....7

1.4. Hipovirulentnost i biološka kontrola raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.).....8

1.5. Cilj rada.....11

2. MATERIJALI I METODE.....12

2.1. Gljivični izolati.....12

2.2. Priprema i izlijevanje hranjive podloge za rast gljive.....13

2.3. Precjepljivanje gljive i njen uzgoj.....14

2.4. Morfologija i mjerenje rasta gljive *in vitro*.....15

2.5. Određivanje sporulacije izolata gljive *in vitro*.....16

3. REZULTATI.....18

3.1. Rast slovenskih izolata gljive *in vitro* …….....18

3.2. Rast europskih referentnih izolata gljive *in vitro*…….....19

3.3. Rast hrvatskih izolata gljive *in vitro*…….....20

3.4. Sporulacija slovenskih izolata gljive *in vitro*.....21

3.5. Sporulacija europskih referentnih izolata gljive *in vitro*.....23

3.6. Sporulacija hrvatskih izolata gljive *in vitro*.....24

4. RASPRAVA.....25

5. ZAKLJUČCI.....30

6. LITERATURA.....31

1. UVOD

1.1. Opće značajke europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) pripada redu *Fagales*, porodici *Fagaceae*, rodu *Castanea*. Ostale značajne vrste roda *Castanea* su *Castanea dentata* Borkh. u Sjevernoj Americi, *Castanea mollissima* Blume. u Kini i *Castanea crenata* Sieb. u Japanu. Drvo 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 1), a ženski u donjem dijelu muških resa. Cvjetovi se pojavljuju početkom lipnja, kada su listovi potpuno razvijeni.



Slika 1. Muške rese pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Plod je kesten u ježolikom tobolcu, s najčešće tri ploda u jednom tobolcu (Slika 2), a godišnje daje do oko 200 kg plodova. Na površini su sjajni, polukuglasti i dozrijevaju početkom listopada (Domac, 1994).



Slika 2. Plod pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Kesten raste u području umjerene kontinentalne klime, umjerene submediteranske i mediteranske klime te na staništima s dosta svjetla i topline, te na dubokom i svježem tlu. Ne uspijeva u području oštre kontinentalne klime, hladnih položaja i mrazišta. Kestenu je potrebno dugo vegetacijsko razdoblje (6 do 7 mjeseci) s prosječnom temperaturom većom od 10˚C i oborinama od 800 do 1600 mm, umjereno vlažan zrak i tlo, te tople i sunčane jeseni. Kesten je acidofilna vrsta. Raste na silikatnim i eruptivnim podlogama, pješčenjacima te na dubokim, kiselim tlima, pjeskovito glinasto-ilovaste teksture tla. Na vapnenačkim podlogama raste samo na mjestima gdje je došlo do dekalcifikacije dubljeg sloja tla, kao što je npr. istarska crvenica.



Slika 3. Stabla pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Stabla kestena se pojavljuju u sastojini ili pojedinačno (Slika 3). Ne uspijevaju na degradiranim tlima bez humusa i na aluvijalnim tlima uz rijeke. Pitomi kesten je rasprostranjen na jugu i jugozapadu Europe, na uskom pojasu sjeverozapadne Afrike, u Maloj Aziji i Kavkaskim zemljama (Rauš, 1987). Vrste roda *Castanea* održale su se od ledenog doba do danas. U našim je krajevima kesten umjetno raširen sadnjom izvan prirodnog areala zbog njegove visoke hranjive vrijednosti (www.istra-istria.hr).

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

1.2. Biološke značajke gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr je agresivna fitopatogena gljiva koja uzrokuje rak kore pitomog kestena te propadanje kestenovih stabala, a prisutna je u gotovo svim sastojinama kestena (Novak-Agbaba i sur., 2000). Pripada carstvu Mycota (Fungi), odjeljku Ascomycota, razredu Sordariomycetes te redu Diaporthales (Hibbet i sur., 2007). Ova nitasta askomikota može zaraziti i ostale vrste iz porodice *Fagaceae* te stoga predstavlja moguću opasnost za naše šume.

Razmnožava se nespolno konidijama ili dijelovima micelija (Milgroom i Cortesi, 1999; Montenegro i sur., 2008) te spolno askosporama. Spolno razmnožavanje je genetički kontrolirano prisustvom reprodukcijskog MAT lokusa, na kojem mogu biti 2 alela, MAT 1-1 ili MAT 1-2 (Marra i Milgroom, 2001; Montenegro i sur., 2008). Oplodnja se događa samo između gameta koje imaju različite alele na bialelnom (MAT) lokusu.

Gljiva se može širiti vjetrom, kišom, vektorima (ptice, insekti) te pomoću čovjeka (Halambek, 1988; Heiniger i Rigling, 1994). Zaraza nastaje prodiranjem spora gljive putem otvorenih rana na kori drveta koje su načinili kukci. Spore gljive kliju i dopiru do unutrašnjosti kore tvoreći žućkastosmeđi lepezasti micelij.

Na mladim biljkama bolest se razvija vrlo brzo. Prvo se zapažaju promjene na samoj kori. Na mjestu zaraze nastaje plitko ulegnuće, boja kore je nešto tamnija, a ispod nje svijetla boja kambija postaje smeđa. Kora postaje crvenkasta (Slika 4), uzdužno puca, postepeno se odvaja od drveta te nastaje otvorena rak rana (Novak-Agbaba i sur., 2000).



Slika 4. Početak razvijanja raka kore pitomog kestena na stablu kestena zaraženog patogenom gljivom *Cryphonectria parasitica*
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Na kori u području rak rane lako se uočavaju plodna tijela gljive, narančaste ili crvenkaste boje (Slika 5). Micelij gljive vremenom probija sve do kambija gdje zaustavlja prohodnost provodnih elemenata i dio stabla iznad zaraze odumire (Robin i sur., 2009).



Slika 5. Plodna tijela gljive *C. parasitica* na stablu kestena

Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Kao filamentozna gljiva raste apikalnim produživanjem hifa, grananjem i fuzijom (anastomozom) hifa. Fuzija hifa između različitih izolata gljive rezultira formiranjem heterokariona (više jezgrenih stanica) i miješanjem citoplazmi. Ukoliko sojevi gljive nisu genetički kompatibilni doći će do propadanja hifa u interakcijskoj zoni. Ova pojava naziva se vegetativna nekompatibilnost ili vegetativna inkompatibilnost (eng. *vegetative incompatibility* - *vic*) i definirana je s najmanje šest *vic* lokusa, od kojih svaki sadrži po najmanje dva alela (Milgroom i Cortesi, 1999). Kako bi se ostvarila vegetativna kompatibilnost između dva različita soja gljive moraju se podudarati aleli na svih šest *vic* lokusa (Montenegro i sur., 2008).

1.3. *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr - uzročnik raka kore pitomog kestena

Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr unesena je početkom 20. stoljeća iz Azije u SAD i uništila je gotovo sve nasade američkog kestena *Castanea dentata* Borkh. U Europi je bolest prvi put zapažena 1938. godine u Italiji (Genova), odakle se proširila po cijeloj Europi i ozbiljno ugrozila sastojine europskog pitomog kestena *C. sativa* Mill. (Heiniger i Rigling, 1994; Krstin i sur., 2008). *C. parasitica* je slab patogen na azijskim vrstama kestena i smatra se da je najvjerojatnije iz Azije u Ameriku unesena upravo na stablima azijskih vrsta kestena (Heiniger i Rigling, 1994). Azijske vrste kestena *Castanea mollisima* i *Castanea crenata* su otporne na uzročnika bolesti, gljivu *C. parasitica* (Milgroom i Cortesi, 2004). Bolest je u Hrvatskoj zabilježena prvi puta 1955. godine te se vrlo brzo širila na sve kestenove sastojine u kojima je zabilježen veliki broj aktivnih rakova (Slika 6) uzrokovanih opasnim virulentnim sojem gljive *C. parasitica* (Novak-Agbaba, 2006).



Slika 6. Rak kore pitomog kestena uzrokovan virulentnim sojem gljive *C. parasitica*
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Međutim, u Europi su se stabla počela prirodno oporavljati pojavom hipovirusa *Cryphonectria hipovirus*-1 (CHV-1) koji unosom u virulentni soj gljive *C. parasitica*

smanjuje njezinu virulentnost (hipovirulentnost), sporulaciju i spolno razmnožavanje (Slika 7).



Slika 7. Zacjeljivanje rane i oporavak pitomog kestena (*Castanea sativa*)
Ljubaznošću doc.dr.sc. Ljiljane Krstin

Prenošenjem hipovirusa na aktivni rak dolazi do oporavka zaraženih stabala i stvaranja kalusnog staničja, na temelju čega se zasniva biološka kontrola raka kore pitomog kestena (Novak - Agbaba i sur., 2000; Milgroom i Cortesi, 2004; Sotirovski i sur., 2006; Robin i sur., 2009).

1.4. Hipovirulentnost i biološka kontrola raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.)

Uzročnik hipovirulentnosti (smanjene virulentnosti) gljive *C. parasitica* je prisutnost dvolančane RNA (dsRNA) virusa *Cryphonectria hypovirus* - 1 (CHV-1) iz porodice *Hypoviridae*. Zaraza gljive hipovirusom smanjuje njezin patogeni učinak, sposobnost sporulacije, te produkciju pigmenata zbog čega je micelij hipovirulentnih

sojeva bijeli ili blijedožućkasti do blijedonarančasti, dok virulentni sojevi imaju izrazito žut ili narančast micelij (Kazmierczak i sur., 1996; Novak – Agbaba i sur., 2000).

Viralna dsRNA se uspješno prenosi spajanjem (anastomozom) hifa između vegetativno kompatibilnih sojeva. Virus se još prenosi nespolnim konidijama, dok spolne askospore ne sadrže virus (Prospero i sur., 2006; Montenegro i sur., 2008). Prijenos uzročnika hipovirulentnosti moguć je između različitih *vc* tipova, ali nepodudarnost na jednom ili više *vic* lokusa umanjuje mogućnost prijenosa. Velika raznolikost *vc* tipova znatno smanjuje mogućnost biološke kontrole bolesti (Krstin i sur., 2011). Biološka kontrola bolesti se počela primjenjivati prvi puta 1960-tih godina u Europi i tijekom zadnjih desetaka godina istraživanja postignuta su značajna saznanja o raznolikosti populacija gljive *C. parasitica* te vc tipovima. Zajednička karakteristika za sve europske populacije gljive *C. parasitica*, posebno za mediteransku i balkansku regiju, jeste mala *vc* raznolikost u odnosu na populacije gljive u Sjevernoj Americi. To objašnjava neuspjeh u pokušaju biokontrole bolesti u Sjevernoj Americi i uspješno širenje *Cryphonectria hipovirus-1* u Europi. Istraživanja upućuju na snažnu geografsku diferencijaciju populacija *C. parasitica* i stvara se pretpostavka o višestrukom unosu ovog patogena u Europu. U Italiji, istočnoj Francuskoj, Švicarskoj, sjeveroistočnoj Španjolskoj i Njemačkoj, dominantni *vc* tipovi su EU-1, EU-2 i EU-5. U zapadnoj Francuskoj, zapadnoj Španjolskoj i Portugalu su utvrđeni drugi dominantni vc tipovi (EU-1, EU-11, EU-33, EU-66 i EU-72). U istočnim mediteranskim i balkanskim zemljama (Bosna i Hercegovina, Grčka, Makedonija) dominantni *vc* tip je EU-12. (Robin i sur., 2009).

Do sada su pronađene 4 vrste virusa iz porodice *Hypoviridae*: CHV-1, CHV-2, CHV-3, CHV-4 od čega je CHV-1 virus najzastupljeniji u Europi, a CHV-2 i CHV-3 su uglavnom zastupljeni u Sjevernoj Americi. CHV-4 nađen je u Apalačkoj regiji u Sjevernoj Americi, za razliku od drugih hipovirusa ima mali ili gotovo nikakav učinak na virulentnost ili promjenu fenotipa gljive *C. parasitica*. (Milgroom i Cortesi, 2004.) Svi europski hipovirulentni izolati gljive *C. parasitica*, uključujući i istraživane slovenske izolate, sadrže CHV-1 virusa (Krstin i sur., 2008, 2011.) Virus CHV-1 podijeljen je u pet podtipova: talijanski (CHV1-I), njemački (CHV1-D), španjolski (CHV1-E) i dva francuska (CHV1-F1 i CHV1-F2) podtipa (Allemann i sur., 1999; Montenegro i sur., 2008.)

Biološka kontrola pomoću CHV-1 je uspješnija u Europi jer je zabilježena relativno mala raznolikost *vc* tipova u populaciji gljive *C. parasitica* koja omogućava lakše širenje hipovirusa (Milgroom i Cortesi, 2004; Krstin i sur., 2011). Za biološku kontrolu potrebno je odabrati hipovirulentne sojeve gljive koji pokazuju najbolji učinak na smanjenje patogenosti gljive te s odabranom mješavinom bijelih sojeva gljive tretirati stabla kestena zaražena rakom. Protiv bolesti šumskog drveća, biološka kontrola je posebno pogodna zbog toga što druge metode kontroliranja bolesti, poput fungicida, različitih kemijskih sredstava ekonomski nisu isplative i neprihvatljive su za okoliš. Uspjeh hipovirulencije prvenstveno ovisi o prirodnom širenju hipovirusa, ali može biti i potpomognuto ljudskim djelovanjem.

Hipovirulentnost može biti uspješna na razini pojedinačnog raka koji je tretiran hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica,* ali je još bolji uspjeh u kestenovim sastojinama gdje se primjenjuje intenzivna biološka kontrola. Budući da spontano, prirodno širenje hipovirusa u populaciji gljive na zaražena i oboljela stabla nije u potpunosti uspješno, brojna su istraživanja usmjerena upravo na procjeni učinka biološke kontrole na zaraženim stablima pitomog kestena. Procjena biološke kontrole uključuje slijedeće kriterije:

a) prisutnost i prirodno širenje hipovirusa u populacijama gljive *C. parasitica*

b) smanjenje učestalosti bolesti ili ozbiljnosti bolesti

c) povećanje stope rasta stabala i njihovo preživljavanje

d) povećanje produkcije kestenovih produkata (drvo/plodovi).

Nažalost, jedan od problema pri proučavanju biološke kontrole je velika površina kestenovih sastojina koji trebaju biti tretirani, te dugi vremenski period potreban kako bi se utvrdilo da li se hipovirus prirodno širi na populacijskoj razini (Milgroom i Cortesi, 2004; Robin i sur., 2010).

1.5. Cilj rada

Cilj istraživanja je odabrati hipovirulentne izolate sa slovenskog područja koji najviše smanjuju rast i sporulaciju patogene gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr u uvjetima *in vitro* te ih usporediti s referentnim sojevima (M1369-47 (BiH); M1375-16CH (Švicarska); EP713-M1123 (Francuska)), čiji je učinak na smanjenje patogenosti gljive utvrđen u prethodnim istraživanjima, te s hrvatskim hipovirulentnim izolatima prikupljenim 1985. godine. Hipovirulentni izolat s najboljim učinkom na patogenu gljivu mogao bi se upotrijebiti u biološkoj kontroli bolesti u voćnjacima kestena.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Gljivični izolati

U prikupljanju uzoraka gljive *C. parasitica* sudjelovala je prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i dr. sc. Sanja Novak–Agbaba sa Šumarskog instituta u Jastrebrskom. Ukupno je prikupljeno 20 uzoraka sa slovenskog područja. Uzorci su dobili oznake po lokalitetim (Slika 8) s kojih su prikupljeni (B11, B8, B69, GS14, GS42, GS5, HP22, HP33, HP53, HP42, K5, K50, V13, V14, V33, V63, ZB8, ZB18, ZB35 i ZB71). Europski poznati, prethodno istraženi izolati gljive iz Bosne i Hercegovine (M1369), Švicarske (M1375) i Francuske (EP713-M1123) uvršteni su u istraživanje zahvaljujući dr. Danielu Rigling sa švicarskog instituta u Birmensdorfu (Swis Federal Institute, WSL). Dva uzorka gljive *C. parasitica* HR42 i HR43 su iz Hrvatske, a datiraju iz 1985. godine (Allemann i sur., 1999). Od ukupno 25 izolata koji su korišteni u istraživanju, 4 su virulentna izolata (GS5, HP53, GS42, HP42) a ostalih 21 pokazuje svojstva hipovirulencije.

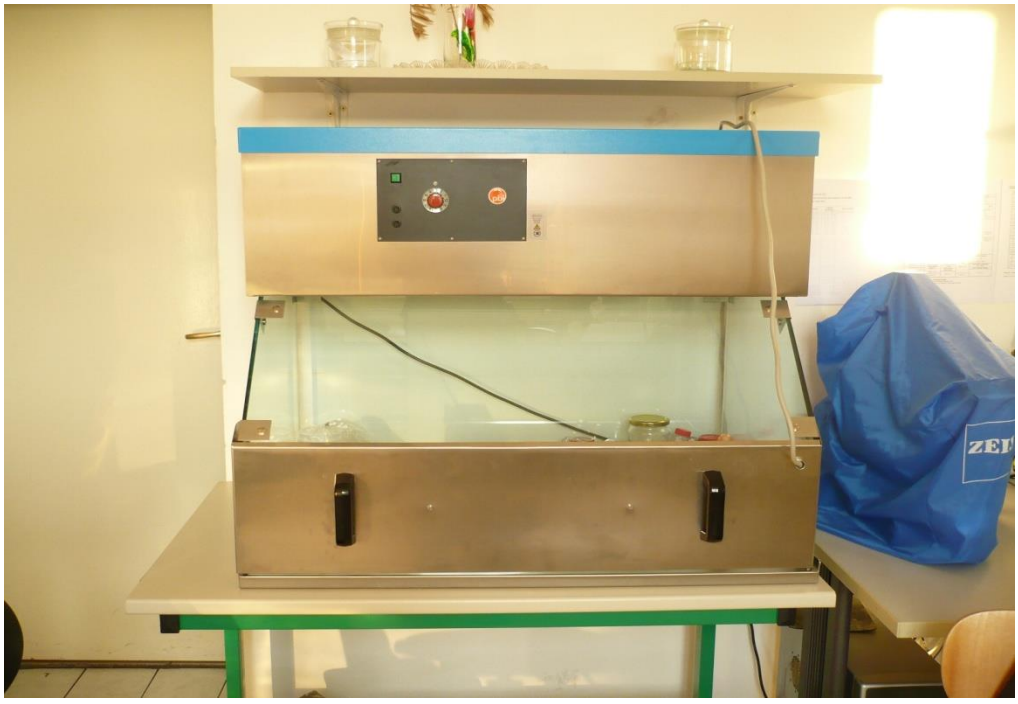


Slika 8. Prikaz lokaliteta s kojih su prikupljeni slovenski uzorci gljive *C. parasitica*.

Izvor: Krstin i sur., 2011.

2.2. Priprema i izlijevanje hranjive podloge za rast gljive

Svi uzorci gljive *C. parasitica* su uzgajani u Petrijevim zdjelicama (Medicplast, promjer 6 ili 9 cm) na PDA (potato dextrose agar, Biolife) hranjivoj podlozi. PDA podloga se priprema prema uputama proizvođača: 42 g krumpirovog agara otopljeno je u 1 litri hladne destilirane vode te kuhano sve dok se agar nije otopio. Potom je agar autoklaviran 15 minuta na temperaturi od 121°C i atmosferi od 1 bara. Nakon autoklaviranja i kratkog hlađenja, tekući topli agar izliven je (25 ml) u sterilne plastične Petrijeve zdjelice. Izlijevanje hranjive podloge odvijalo se u prostoru steriliziranom UV svjetlom, tzv. laminaru (Slika 9) uz neprestano strujanje sterilnog zraka. Kada se agar u Petrijevkama ohladi i stvrdne na njega se mogu precjepljivati uzorci gljive.



Slika 9. Laminar

Autorska fotografija

2.3. Precjepljivanje gljivičnih kultura i uzgoj

Svaki uzorak gljive *C. parasitica* je precijepljen na plastičnu (d=9 cm) Petrijevku s PDA hranjivom podlogom. Precjepljivanje se provodi pomoću sterilnog skalpela kojim se izreže komadić micelija (5 mm x 5 mm x 5 mm) iz kulture u kojoj se održavao izolat. Uzorak gljive stavi se na sredinu Petrijeve posude, okrenut naopako kako bi micelij bio u doticaju s hranjivom podlogom. Skalpel kao i sav pribor koji se koristi mora biti steriliziran 70%-tnim alkoholom i flambiran, da ne bi došlo do zagađivanja bakterijama ili plijesnima iz okoline.



Slika 10. Uzgoj kultura gljive *C. parasitica*
Autorska fotografija

Cijeli postupak precjepljivanja izvodi se u laminaru čija je površina prethodno dezinficirana 70%-tnim etanolom. Na poklopac Petrijeve posude napisana je oznaka izolata i datum nasađivanja (Slika 10). Nakon precjepljivanja uzorci su spremljeni u

uzgojnu komoru (Slika 11), gdje su rasli u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (2500 luxa) i pri temperaturi od 25 ºC. Gljive su bile dnevno izložene 16 sati svjetlosti i 8 sati tami kroz razdoblje od 14 dana. Svi izolati gljive su uzgajani u tri replike.



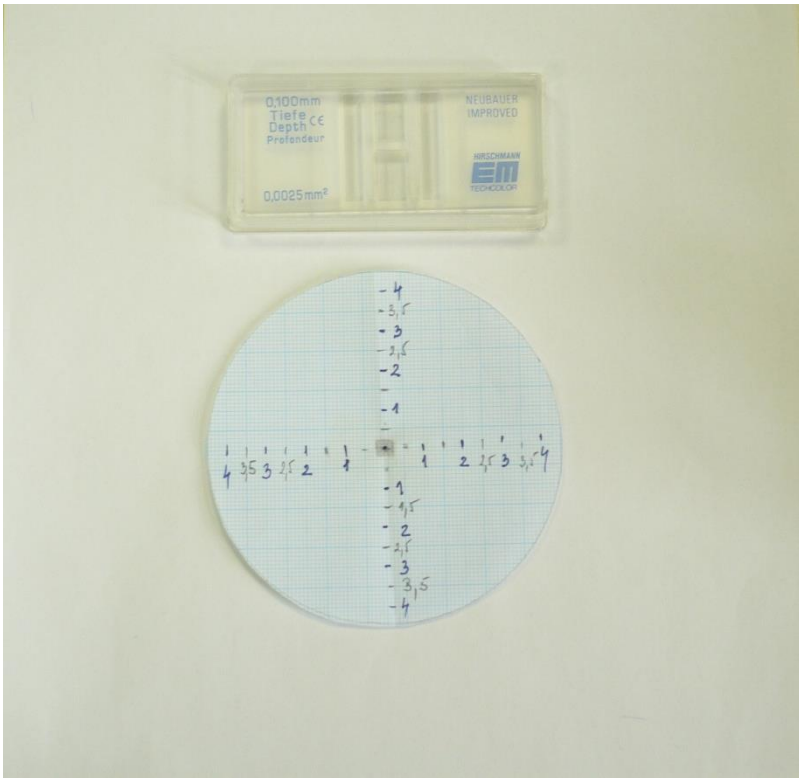
Slika 11. Uzgojna komora

Autorska fotografija

2.4. Morfologija i mjerenje rasta gljive *in vitro*

Na temelju morfologije svježe izraslih kultura potvrđeni su virulentni i hipovirulentni izolati. Virulentni izolati gljive *C. parasitica* koji nisu zaraženi hipovirusom proizvode narančasto–smeđe micelije s mnogobrojnim sporama, dok su hipovirulentni izolati, zaraženi hipovirusom, pretežno bijele do blijedo žute boje s vrlo malo spora. Intenzitet rasta svakog izolata određen je mjerenjem promjera svake kulture

pod kutem od 90º, trećeg i petog dana nakon nasađivanja. Pri mjerenju promjera korišten je milimetarski papir kako je prikazano na slici (Slika 12).



Slika 12. Milimetarski papir za mjerenje rasta gljive *C. parasitica* i komorica (Neubauer Improved) za brojenje spora.
Autorska fotografija

2.5. Određivanje sporulacije izolata gljive *in vitro*

Nakon 14 dana rasta gljivične kulture, u svaku Petrijevu zdjelicu je dodano 10 ml otopine 0,15% Tween-a 80. Potom je pomoću staklenog štapića prijeđena površina micelija kako bi se odvojile spore s micelija gljive (Slika 13). Otopina sa sporama je profiltrirana kroz sterilni filter papir Miracloth (Filter Vlies-Midi, Bichsel) da bi se uklonili dijelovi micelija. Spore triju replika svake gljivične kultura su izbrojane pomoću komorice za brojanje (Improved Neubauer) (Slika 12). Iz dobivenih podataka

određena je srednja vrijednost broja spora svake gljivične kulture. Formula za izračunavanje broja spora u µl volumena je:

$$\text{broj spora po µl volumena} = \frac{\text{broj izbrojenih spora}}{\text{površina brojenja x dubina komorice x razrjeđenje}}$$

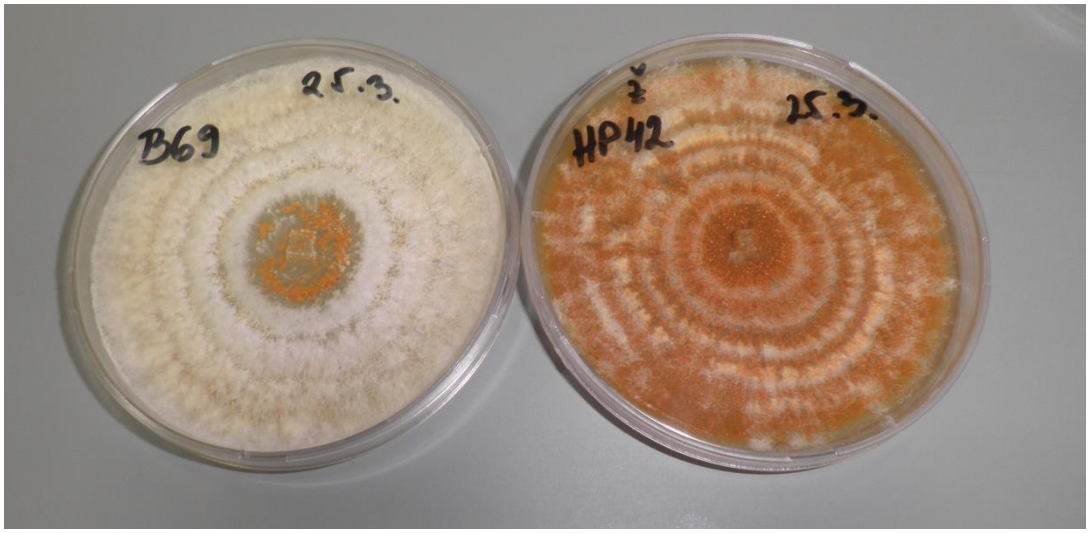


Slika 13. Pribor korišten u određivanju broja spora.
Autorska fotografija

3. REZULTATI

3.1. Rast slovenskih izolata gljive *in vitro*

Budući da hipovirus smanjuje rast fitopatogene gljive *C. parasitica,* jedan od ciljeva bio je odrediti rast 20 (4 virulentna i 16 hipovirulentnih) izolata gljive *in vitro* prikupljenih sa slovenskog područja (Slika 14).



Slika 14. Hipovirulentni soj gljive (lijevo) i virulentni soj gljive (desno).

Autorska fotografija

Prilikom testiranja *in vitro*, nakon trećeg odnosno petog dana inokulacije utvrđeno je da između većine hipovirulentnih izolata koji sadrže virus i virulentnih izolata bez virusa nema značajnih razlika u rastu. Pokazalo se da virulentni izolati bez virusa čak sporije rastu nego neki hipovirulentni izolati. Međutim, uočeno je da je hipovirulenti izolat GS14 najsporije rastao pa bi se zbog toga mogao upotrijebiti u biološkoj kontroli bolesti. Male vrijednosti rasta imao je i izolat ZB18, odnosno B11 (Tablica 1).

Tablica 1. Srednja vrijednost rasta hipovirulentnih i virulentnih izolata gljive *C. parasitica* u kulturi nakon trećeg i petog dana inokulacije sa slovenskog područja.

Hipovirulentni izolati sa slovenskog područja	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon trećeg dana inokulacije (cm)**	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije(cm)**
B11	**1,48**	**2,48**
B8	2,23	3,83
B69	2,19	3,93
GS14	**1,10**	**1,91**
HP22	2,37	4,06
HP33	2,38	4,13
K5	2,18	3,71
K50	2,34	3,97
V13	1,90	3,05
V14	1,92	2,92
V33	1,90	3,06
V63	1,73	2,88
ZB8	2,49	4,15
ZB18	**1,39**	**2,31**
ZB35	1,98	3,41
ZB71	2,20	3,47
Virulentni izolati sa slovenskog područja	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon trećeg dana inokulacije (cm)**	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije (cm)**
GS5	1,8	3,02
HP53	2,14	3,62
GS42	2,1	3,60
HP42	1,98	3,21

3.2. Rast europskih referentnih izolata gljive *in vitro*

Rast slovenskih izolata gljive *C. parasitica* uspoređen je s rastom referentnih sojeva gljive iz Švicarske (M1375), Francuske (EP713-M1123) te Bosne i Hercegovine (M1369). Allemann i suradnici (1999) utvrdili su prisutnost CHV-1 virusa u ta tri

hipovirulentna izolata koji djeluje na smanjenje sporulacije, rasta i pigmentacije (pojavu bijele morfologije micelija) gljive.

Tablica 2. Srednja vrijednost rasta europskih referentnih hipovirulentnih izolata (M1375 - CH, EP713 - M1123 - F i M1369 - BIH) gljive *C. parasitica* u kulturi nakon trećeg i petog dana inokulacije

Hipovirulentni izolati	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon trećeg dana inokulacije (cm)**	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije (cm)**
M1375 (Švicarska)	1,79	2,94
EP713-M1123 (Francuska)	**1,44**	**2,58**
M1369 (Bosna i Hercegovina)	1,32	2,63

Većina hipovirulentnih i svi virulentni slovenski izolati brže su rasli od europskih referentnih hipovirulentnih izolata. Međutim, slovenski hipovirulentni izolat GS14 sporije je rastao od referentnih sojeva gljive što upućuje na zaključak da je virus prisutan u toj gljivi jak te da je najviše utjecao na usporavanje rasta domaćina. Najmanju vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije imao je francuski izolat EP713 za kojeg je iz literature poznato da znatno smanjuje rast patogene gljive *C. parasitica* (Tablica 2).

3.3. Rast hrvatskih izolata gljive *in vitro*

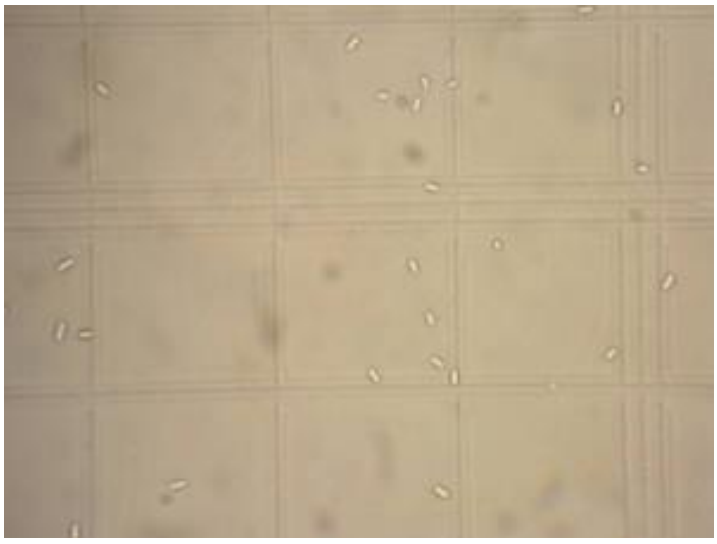
Hrvatske izolate gljive *C. parasitica* HR42 i HR43 prikupljene 1985. godine okarakterizirali su također Allemann i suradnici (1999). Prilikom testiranja *in vitro*, rast tih hipovirulentnih izolata gljive ne razlikuje se značajno od većine slovenskih izolata. Međutim, srednja vrijednost rasta dvaju hipovirulentnih izolata iz 1985. godine nakon trećeg i nakon petog dana inokulacije bila je veća od srednje vrijednosti rasta slovenskih izolata GS14, B11 i ZB18 kao i europskih referentnih hipovirulentnih izolata iz Švicarske, Francuske te Bosne i Hercegovine (Tablica 3).

Tablica 3. Srednja vrijednost rasta hrvatskih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* u kulturi nakon trećeg i petog dana inokulacije prikupljenih 1985. godine

Hipovirulentni izolati	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon trećeg dana inokulacije (cm)**	**Srednja vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije (cm)**
HR42	2,11	3,58
HR43	2,05	3,63

3.4. Sporulacija slovenskih izolata gljive *in vitro*

Spore pojedinih kultura gljive *C. parasitica* izbrojane su koristeći komoricu za brojanje Improved Neubauer. (Slika 15).



Slika 15. Spore gljive *C. parasitica* u mililitru otopine nakon 14. dana inokulacije izbrojane pomoću komorice za brojanje Improved Neubauer.

Autorska fotografija

Broj spora slovenskih hipovirulentnih izolata gljive nakon 14. dana inokulacije iznosio je od 5,02 x 10^6 do 4,66 x 10^8. Najmanji broj spora imao je hipovirulentni izolat K5, potom V63 te B69. Broj spora u izolata zaraženih hipovirusom nije se značajno razlikovao od virulentnih izolata gljive *C. parasitica* bez virusa. Međutim, relativno mali broj spora imao je i hipovirulentni izolat B11 koji bi se s obzirom na rast i sporulaciju mogao upotrijebiti u biološkoj kontroli bolesti (Tablica 4).

Tablica 4. Broj spora hipovirulentnih i virulentnih (v) slovenskih izolata gljive *C. parasitica* u kulturi nakon 14 dana inokulacije u mililitru otopine.

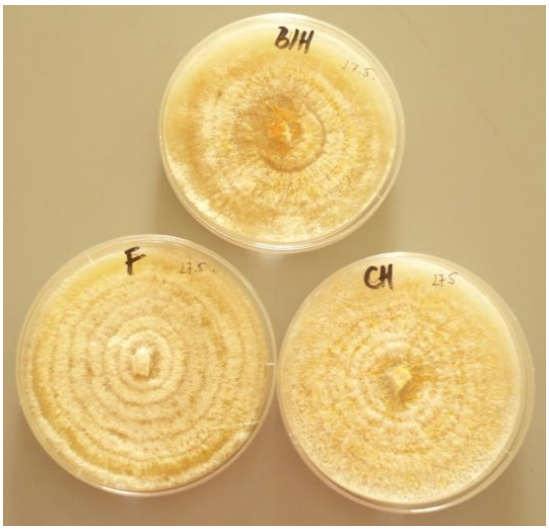
Izolat	**Broj spora u mililitru otopine nakon 14. dana inokulacije**
B11	9,16 x 10^7
B8	4,75 x 10^7
B69	7,50 x 10^6
GS14	2,87 x 10^8
HP22	7,90 x 10^7
HP33	1,28 x 10^8
K5	**5,02 x 10^6**
K50	2,11 x 10^8
V13	
V14	
V33	4,45 x 10^8
V63	**5,46 x 10^6**
ZB8	9,75 x 10^7
ZB18	1,38 x 10^8
ZB35	2,85 x 10^8
ZB71	**4,66 x 10^8**
GS5 v	2,97 x 10^8
HP53 v	
GS42 v	2,58 x 10^8
HP42 v	1,82 x 10^8

3.5. Sporulacija europskih referentnih izolata gljive *in vitro*

Broj spora europskih referentnih izolata nakon 14. dana inokulacije je manji u odnosu na slovenske izolate (1 x 10^5 do 2,30 x 10^6). Najmanji broj spora imao je hipovirulentni izolat iz Švicarske, potom iz Francuske te Bosne i Hercegovine što potvrđuje činjenicu da europski izolati sadrže jak virus koji značajno reducira sporulaciju gljive *C. parasitica* (Tablica 5).

Tablica 5. Broj spora europskih hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* u kulturi nakon 14 dana inokulacije u mililitru otopine.

Izolat	**Broj spora u mililitru otopine nakon 14. dana inokulacije**
M1369 (Bosna i Hercegovina)	2,30 x 10^6
M1375 (Švicarska)	1 x 10^5
EP713-M1123 (Francuska)	3,33 x 10^5



Slika 16. Hipovirulentni izolat gljive *C. parasitica* iz Bosne i Hercegovine (M1369), Francuske (EP713-M1123) i Švicarske (M1375)

Autorska fotografija

3.6. Sporulacija hrvatskih izolata gljive *in vitro*

Broj spora hrvatskih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* iz 1985. godine ne razlikuje se značajno od broja spora većine slovenskih izolata. Međutim, sporulacija tih dvaju hipovirulentnih izolata bila je veća od sporulacije europskih referentnih hipovirulentnih izolata iz Švicarske, Francuske te Bosne i Hercegovine (Tablica 6).

Tablica 6. Broj spora hrvatskih hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* u kulturi nakon 14 dana inokulacije u mililitru otopine.

Izolat	**Broj spora u mililitru otopine nakon 14. dana inokulacije**
HR42	$2{,}41 \times 10^8$
HR43	$1{,}58 \times 10^8$

4. RASPRAVA

Zaraza gljive *Cryphonectria parasitica* hipovirusom znatno smanjuje njenu patogenost prema kestenu. Stoga je hipovirulentnost osnova na kojoj se temelji biološka kontrola raka kore pitomog kestena (Hillman i Suzuki, 2004). Uspjeh biološke kontrole hipovirulencijom ovisi o raznolikosti *vc* tipova gljive *C. parasitica*, tipu hipovirusa, okolišnim uvjetima, starosti i otpornosti biljke. Velika raznolikost *vc* tipova gljive znatno ograničava širenje hipovirusa jer je onemogućena anastomoza hifa između dvije jedinke što rezultira pojavom vegetativne nekompatibilnosti tj. propadanjem hifa u interaktivnom području (Marra i Milgroom, 2001). U Europi je znatno manja raznolikost *vc* tipova gljive nego u Americi, zbog toga je zabilježena veća uspješnost biološke kontrole bolesti u Europi (Heiniger i Rigling, 1994; Milgroom i Cortesi, 2004).

Hipovirus se širi konidijama *C. parasitica*, bilo da konidije nose virus koji će formirati novi rak (vertikalni prijenos) ili se virus prenosi na drugu gljivu putem anastomoze hifa (horizontalni prijenos). Hipovirus uzrokuje redukciju u sporulaciji gljive, mijenja njenu morfologiju, pri čemu je micelij hipovirulentnih sojeva bijeli do bijeložuti, dok virulentni sojevi bez virusa imaju izrazito žut ili narančasti micelij (Anagnostakis, 1982; Elliston, 1985; Novak-Agbaba i sur., 2000).

Međutim, fenotipske karakteristike gljive *C. parasitica* u uvjetima *in vitro* mogu biti djelomično promijenjene svjetlom visokog intenziteta, pa analize morfologije gljive u takvim uvjetima mogu dati nepotpune rezultate. Dakle, promjena intenziteta svjetlosti pri uzgoju gljive u kulturi može utjecati na njene morfološke karakteristike. Tako npr. virulentni soj gljive uzgojen u mraku je bijele boje i raste po cijeloj površini Petrijeve zdjelice. Pri visokom intenzitetu osvjetljenja (10 000 lux-a), kolonija je tamnonarančaste boje i prekriva samo 65 % površine hranjive podloge, a pri srednje jakom osvjetljenju (2500 lux-a) kolonija je žućkaste boje i umjerenog rasta. Hipovirulentni soj gljive uzgojen u mraku je bijele boje, vrlo slabog rasta i nepravilnog oblika kolonije. Pri srednje jakom osvjetljenju, povećan je radijalni rast uz malo povećanje pigmentacije. Ukoliko se hipovirulentni izolat izloži visokom intenzitetu osvjetljenja dolazi do velikog povećanja pigmentacije, ali bez povećanja stope rasta. Iz navedenog se može zaključiti da je za uzgoj gljive *C. parasitica* u uvjetima *in vitro*, najpogodniji intenzitet svjetlosti od 2500 lux-a (Hillman i sur., 1990).

Stoga su izolati gljive, korišteni u ovom eksperimentu, uzgajani pri umjerenom intenzitetu svjetlosti od 2500 lux-a. Testiranjem rasta slovenskih hipovirulentnih i virulentnih izolata gljive *C. parasitica in vitro*, može se uočiti kako nema značajne razlike u rastu virulentnih i hipovirulentnih izolata s područja Slovenije. Međutim, hipovirulentni izolati GS14, ZB18 i B11 pokazali su najsporiji rast. Nadalje, broj spora u slovenskih izolata zaraženih hipovirusom nije se značajno razlikovao od virulentnih izolata gljive *C. parasitica* bez virusa. Najmanji broj spora zabilježen je u hipovirulentnih izolata K5, V63, odnosno B69. Relativno mali broj spora imao je i virusom zaražen izolat B11 koji bi se s obzirom na rast i sporulaciju mogao upotrijebiti u biološkoj kontroli raka kore pitomog kestena.

Europski referentni hipovirulentni izolati sporije su rasli od većine hipovirulentnih i svih virulentnih slovenskih izolata. Međutim, jedan slovenski hipovirulentni izolat GS14 sporije je rastao od referentnih sojeva gljive. No, najmanju vrijednost rasta gljive nakon petog dana inokulacije imao je francuski izolat EP713 za kojeg je iz literature poznato da smanjuje rast patogene gljive *C. parasitica* (Nuss, 2005). Također, broj spora europskih referentnih izolata nakon 14. dana inokulacije je manji u odnosu na slovenske izolate. Najmanji broj spora imao je švicarski hipovirulentni izolat, potom francuski te bosanski. Svi ti rezultati potvrđuje činjenicu da referentni europski izolati sadrže jak CHV-1 virus koji značajno reducira sporulaciju gljive *C. parasitica* (Carbone i sur., 2004).

Poznato je da jaki virusni sojevi kao što je CHV-1/EP713 sprječavaju sporulaciju te da kulture zaražene tim sojem sporije rastu. U Francuskoj je taj soj upotrijebljen u biološkoj kontroli, ali je nakon dvadesetak godina pronađen samo blagi tip virusa koji se vjerojatno prirodno raširio (Allemann i sur., 1999; Nuss, 2005; Pearson i sur., 2009).

Rast i sporulacija hrvatskih izolata gljive *C. parasitica* HR42 i HR43 prikupljenih 1985. godine (Allemann i sur., 1999) ne razlikuje se značajno od većine slovenskih izolata, ali je rast i sporulacija tih dvaju izolata bila veća od nekih slovenskih izolata kao i od svih europskih referentnih hipovirulentnih što upućuje na zaključak da ti stari izolati gljive nisu zaraženi jakim virusom.

Uobičajeno je da mnogi izolati gljive *C. parasitica* zaraženi virusom CHV-1 podtipa I rastu brže na PDA hranjivoj podlozi od izolata koji nisu zaraženi virusom.

Pretpostavlja se kako prevelika količina svjetlosti sprječava djelovanje CHV-1 virusa na gljivu te da *C. parasitica*, iako zaražena virusom, pod utjecajem velikog intenziteta svjetlosti raste brže i stvara velik broj spora koji nije uobičajen za hipovirulentne izolate gljive u uvjetima *in vivo*. Unatoč tomu, prema morfološkoj procjeni gljivičnih kultura bile su vidljive jasne razlike između hipovirulentnih (bijela boja, slabo uočljive spore) i virulentnih (narančasta boja, spore vidljive i brojne) izolata.

Postotak konidija koje sadrže hipovirus je varijabilan i može također utjecati na sposobnost širenja virusa u prirodi. Neki virusni sojevi inhibiraju sporulaciju previše, a drugi, malo blaži sojevi, također zaražavaju gljivičnu populaciju, ali nisu dovoljno snažni da mogu spriječiti odumiranje stabala. Pretpostavlja se da je potrebna osrednja virulencija kako bi biološka kontrola uspjela (Milgroom i Cortesi, 2004; Robin i sur., 2009).

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 CHV-1 virusa (Robin i Heiniger, 2001; Montenegro i sur., 2008).

Biološka kontrola hipovirulencijom provodi se unošenjem mješavine hipovirulentnih sojeva odgovarajućeg tipa vegetativne kompatibilnosti (*vc*) gljive. Budući da je uspjeh biološke kontrole u negativnoj korelaciji s brojem prisutnih *vc* tipova, pri odabiru mješavine hipovirulentnih sojeva u biološkoj kontroli važno je da to budu lokalni *vc* tipovi, (Robin i Heiniger, 2001) kako bi se spriječilo unošenje novih nepoznatih sojeva, jer bi oni mogli ometati prirodno širenje hipovirulence. Uspješnost ove tehnike zabilježena je u Francuskoj i Italiji. Međutim, istraživanja su pokazala kako je biološka kontrola uspješnija u voćnjacima gdje je uzgoj stabala kontroliran i gdje se primjenjuje odabrana mješavina hipovirulentnih sojeva jednako na sva stabla, za razliku od zapuštenih sastojina gdje nema kontrole ni upravljanja od strane čovjeka (Heiniger i Rigling, 1994; Milgroom i Cortesi, 2004). Stabla koja rastu u voćnjacima imaju veću šansu za preživljavanje zbog toga jer je kompeticijska vegetacija uklonjena i stabla mogu brže rasti. Stabla tanjih promjera i

tanje kore podložnija su zarazi virulentnog agresivnog soja gljive *C. parasitica* čiji micelij brže raste od hipovirulentnog soja gljive.

Aktivni rak na stablima većih promjera ima i veću mogućnost konverzije u kalusirajući rak uslijed prirodne biološke kontrole. Za poboljšanje zdravstvenog stanja i kvalitete sastojina pitomog kestena neophodno je provoditi šumsko-uzgojne mjere prorede i čišćenje s naglaskom na uklanjanje stabala zaraženih aktivnim rakom i nekvalitetnih stabala.

Sastojine u kojima je provedena proreda ima veći postotak zdravih stabala i stabala s kalusirajućim rakom. Na pokusnoj plohi gdje je proveden jači intenzitet prorede, postotak aktivnih rakova je manji nego na pokusnoj plohi manjeg intenziteta prorede. Kalusirajući rak javlja se na stablima većih prsnih promjera, dok se aktivni rak javlja većinom na stablima nižih prsnih promjera (Novak-Agbaba i sur., 2011).

Određeni okolišni uvjeti ili planirano upravljanje koje bi smanjilo stres na kestenovim stablima mogli bi doprinijeti bržem rastu stabala te na taj način pogodovati uspostavljanju hipovirulence (Heiniger i Rigling, 1994; Turina i Rostagno, 2007). Budući da svi virusni izolati ne utječu jednako na smanjenje rasta i sporulacije gljive, važno je odbrati 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 a time i do oporavka stabala, odnosno do formiranja kalusnog tkiva. Širenjem pogodnog hipovirulentnog soja među stablima pitomog kestena stvarale bi se površinske nekroze koje ne prodiru do kambija, a time bi se spriječilo odumiranje stabala.

Krstin i suradnici (2011) istražili su 254 izolata gljive *C. parasitica* iz 11 slovenskih populacija. Utvrđeno je ukupno 15 *vc* tipova gljive. Dominantni vc tip je EU-13 i iznosi 40,1 % od ukupnog broja izolata gljive. Zatim slijedi *vc* tip EU-1 (19,7 %), EU-2 (12,2 %) i EU-12 (9 %). Stoga bi osim odabira hipovirulentnih izolata koji najviše smanjuju rast i sporulaciju gljive *C. parasitica* u uvjetima *in vitro,* trebalo bi odrediti *vc* tipove tih izolata. Međutim, unatoč velikom broju *vc* tipova u Sloveniji, prirodna hipovirulentnost je pronađena u 6 od 7 testiranih populacija s učestalošću od

72,2 % u populaciji blizu granice s Hrvatskom i 11,1 % u populaciji koja je blizu austrijske granice. U onim populacijama gdje je zabilježena mala učestalost hipovirulence biološka kontrola potpomognuta ljudskim djelovanjem mogla bi dodatno doprinijeti širenju hipovirusa u kestenovim populacijama te oporavku zaraženih stabala. Međutim, unatoč tomu potrebno je mnogo istraživanja kako u laboratoriju tako i na terenu jer hipovirulentni izolati koji se pokažu pogodnima za biološku kontrolu u kontroliranim uvjetima često ne pokažu veliki uspjeh u suzbijanju bolesti u prirodnim uvjetima.

5. ZAKLJUČCI

Prilikom testiranja slovenskih izolata gljive *C. parasitica in vitro* nije bilo značajne razlike u rastu i sporulaciji virulentnih izolata bez virusa i hipovirulentnih izolata zaraženih virusom CHV-1.

Slovenski hipovirulentni izolati GS14, ZB18 i B11 najsporije su rasli, a najmanji broj spora zabilježen je u hipovirulentnih izolata K5, V63, odnosno B69. Relativno mali broj spora imao je i hipovirulentni izolat B11 koji bi se s obzirom na rast i sporulaciju mogao upotrijebiti u biološkoj kontroli bolesti.

Europski referentni izolati iz Francuske, Švicarske te Bosne i Hercegovine zaraženi virusom sporije su rasli i imali su manji broj spora od većine hipovirulentnih i svih virulentnih slovenskih izolata.

Rast i sporulacija hrvatskih izolata gljive *C. parasitica* HR42 i HR43 prikupljenih prije 27 godina ne razlikuje se značajno od većine slovenskih izolata. Rast i sporulacija tih dvaju izolata bila je veća od rasta i sporulacije nekih slovenskih izolata kao i od svih europskih izolata što upućuje na zaključak da izolati iz 1985. nisu zaraženi jakim virusom.

6. LITERATURA

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

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

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

Domac R. 1994. *Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja*. Školska knjiga, Zagreb.

Elliston JE. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75:151-158.

Halambek M. 1988. *Istraživanje virulentnosti gljive Endothia parasitica Murr./And. uzročnika raka kore pitomog* kestena (*Castanea sativa* Mill.), Šumarski fakultet Zagreb, doktorska disertacija.

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

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

Hillman BI, Shapira R, Nuss DL. 1990. Hypovirulence-associated suppresion of host functions in *Cryphonectria parasitica* can be partially relieved by high light intensity. *Phytopathology* 80:950-956.

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

Kazmierczak P, Pfeiffer P, Zhang L, Van Alfen N. 1996. Transcriptional repression of specific host genes by the mycovirus *Cryphonectria hypovirus 1*. *J Virol* 70(2):1137–1142.

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 Pathol* 6(4):752-761.

Krstin Lj, Novak-Agaba 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 Pathol* 57(6):1086-1096.

Marra RE, Milgroom MG. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86:134-1343.

Milgroom M, Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annu Rev Phytopathol* 42:311-338.

Milgroom MG, Cortesi P. 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96: 10518-10523.

Montenegro D, Aguin O, Sainz MJ, Hermida M, Mansilla JP. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *For Ecol Manage* 256:973–980.

Novak Agbaba S. 2006. Monitoring raka kore pitomog kestena na trajnim plohama Rad. Šumar. inst. Izvanredno izdanje 9:199–211.

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

Novak-Agbaba S, Liović B, Pernek M. 2000. Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Rad. Šumar. inst. 35(1):91–110.

Nuss DL. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat Rev Microbiol* 3:632-642.

Pearson MN, Beever RE, Boine B, Arthur K. 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol Plant Pathol* 10(1):115-128.

Prospero S, Conedera M, Heiniger U, Rigling D. 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96:1337-1344.

Robin C, Capdevielle X, Martin M, Traver C, Colinas C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France andnorthern Spain**.** *Plant Pathol* 58:527-535.

Robin C, Heiniger U. 2001. Chestnut blight in Europe: Diversity of Cryphonectria parasitica, hypovirulence and biocontrol. *For. Snow Landsc. Res*. 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. *Biol Control* 53:55-61.

Rauš Đ. 1987. *Šumarska fitocenologija*. Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

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

Šilić Č. 1973. *Atlas drveća i grmlja*. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo.

Turina M, Rostagno L. 2007. Virus- induced hypovirulence in Cryphonectria parasitica: still an unresolved conundrum. *Plant Path* 89(2):165-178.

www.istra-istria. (12.07.2011.)