Raznolikost gljive Cryphonectria parasitica Murrill Barr i njezin utjecaj na populacije pitomoga kestena (Castanea sativa Mill.)

Ježić, Marin

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:893028

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marin Ježić

RAZNOLIKOST GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR I NJEZIN UTJECAJ NA POPULACIJE PITOMOGA KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Marin Ježić

CHESTNUT BLIGHT FUNGUS (*CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR); DIVERSITY AND IMPACT ON SWEET CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA* MILL.) POPULATIONS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najljepše se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perici, koja je kroz zadnjih nekoliko godina uvijek znala kada me treba pogurnuti i kako motivirati. Ovaj doktorski rad proizašao je upravo zahvaljujući njenom interesu i trudu.

Također najljepše se zahvaljujem doc. dr. sc. Ljiljani Krstin s Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayer na nesebičnoj pomoći tijekom istraživanja iz kojih je proizašao ovaj rad. Zahvalio bih se i prof. dr. sc. Marileni Idžojtić i dipl. ing. Igoru Poljaku sa Šumarskog fakulteta s kojima sam obavio više terenskih istraživanja u Lovranu.

Posebna zahvala ide kolegama sa Zavoda za mikrobiologiju kao i Botaničkog zavoda koji su zadnjih godina postali dragi prijatelji i podržavali me cijelim putem. Među njima posebno mjesto zauzimaju Jelena, Antun i Sandro.

I naposljetku zahvalio bih najvažnijim osobama u mojem životu, majci Vesni i ocu Mladenu, za koje se ne mogu sjetiti niti jednog trenutka mojega života kada me nisu podržavali. Nadam se da su ponosni na mene koliko sam im ja zahvalan na svim malim i velikim stvarima koje su učinili za mene.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

RAZNOLIKOST GLJIVE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR I NJEZIN UTJECAJ NA POPULACIJE PITOMOGA KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)

MARIN JEŽIĆ

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Zavod za mikrobiologiju

Sažetak

Devet populacija gljive *Cryphonectria parasitica*, patogena pitomoga kestena, s geografskog područja Hrvatske i Slovenije genotipizirano je upotrebom 11 mikrosatelitnih biljega. Analizom podataka ustanovljena je vrlo velika genska raznolikost populacija ovog patogena na istraživanim područjima te je postavljena hipoteza o dva neovisna unosa ove gljive na područje Hrvatske i Slovenije, od kojih je prvi najvjerojatnije bio sa zapada tijekom 50-tih godina XX. stoljeća, a drugi s jugoistoka, vjerojatno kasnije. Historiografski podaci ukazuju da je upravo na području Lovrana prvi puta zabilježena pojava raka kore kestena, stoga je lovranska voćnjak/šuma s nasadima prirodne populacije kestena i cijepljenih maruna podrobnije istražena. Analizom mikrosatelitnih genotipova kestena utvrđena je velika raznolikost prirodne populacije kao i klonalno porijeklo maruna, cijenjenog kultivara kestena. Osim toga zabilježen je neočekivano velik broj aktivnih rakova kore kao i nedostatak zarastajućih rakova – kalusa, upravo na marunima, unatoč prisutnosti hipovirulentih izolata gljive *C. parasitica* na ovom području. Istraživanje je pokazalo da se, za razliku od prirodne populacije kestena, lovranski marun slabije oporavlja od ove bolesti.

(94 stranice, 16 slika, 15 tablica, 163 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: rak kore kestena, populacijska genetika, mikrosatelitni biljezi, biološka kontrola

Mentor dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izv. prof.

Ocjenjivači dr. sc. Martina Šeruga Musić, doc.
dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izv. prof.
dr. sc. Sandro Bogdanović, doc.

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Doctoral thesis

CHESTNUT BLIGHT FUNGUS (*CRYPHONECTRIA PARASITICA* MURRILL BARR); DIVERSITY AND IMPACT ON SWEET CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA* MILL.) POPULATIONS

MARIN JEŽIĆ

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology
Department of Microbiology

Abstract

Nine populations of sweet chestnut pathogen *Cryphonectria parasitica*, from Croatia and Slovenia were genotyped using 11 microsatellite markers. Data analysis revealed high gene diversity of this pathogen in the studied area. Therefore a hypothesis of two independent introduction events of this fungus in the area of Croatia and Slovenia was proposed: the first one from west during the 1950's, and the second from southeast, probably occurring later. Historical data indicate the Lovran county as the first place where chestnut blight was observed in Croatia, therefore Lovran orchard/forest with naturally growing chestnuts and grafted marrons was further studied. Microsatellite analysis of the chestnuts showed a very diverse natural population as well as clonal origin of the marron, a cherished chestnut cultivar. Besides that, an unexpectedly large number of active cankers as well as the lack of healing cankers – calli, was observed on marrons, despite of presence of hypovirulent strains of *C. parasticia* in this area. This research revealed that, unlike naturally growing trees, the marrons recovery from this disease is much slower.

(94 pages, 16 figures, 15 tables, 163 references, original in Croatian)

Keywords: chestnut blight, population genetics, microsatellite markers, biological control

Supervisor: dr. sc. Mirna Ćurković Perica, asoc. prof.

Reviewers: dr. sc. Martina Šeruga Musić, asst. prof.
dr. sc. Mirna Ćurković Perica, asoc. prof.
dr. sc. Sandro Bogdanović, asst. prof.

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Literaturni pregled 3

2.1. Gljive mješinarke (Ascomycota) i *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr 3

2.2. *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) 17

2.3. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Miller 1768) 20

3. Materijali i metode 25

3.1. Istraživanje raznolikosti gljive *Cryphonectria parasitica* primjenom mikrosatelitnih biljega 25

3.1.1. Kolekcija uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* iz Hrvatske i Slovenije 25

3.1.2. Uzgoj gljive *Cryphonectria parasitica* na PDA podlozi i čuvanje kolekcije u glicerolu 26

3.1.3. Izolacija nukleinskih kiselina 27

3.1.4. Umnožavanje mikrosatelitnih lokusa gljive *Cryphonectria parasitica* 27

3.2. Statistička analiza karakteristika populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji 29

3.3. Uzorkovanje i analiza populacije gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Lovrana 30

3.3.1. Područje istraživanja – Lovran i okolica 30

3.3.2. Uzorkovanje rakova kore kestena 31

3.3.3. Izolacija gljive *Cryphonectria parasitica* iz uzoraka kore kestena 32

3.3.4. Određivanje vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* 32

3.3.5. Utvrđivanje prisutnosti dvolančane RNA *Cryphonectria hypovirusa 1* u izolatima gljive *Cryphonectria parasitica* 33

3.3.6. Elektroforeza dvolančane RNA 34

3.4. Genotipizacija pitomog kestena s područja Lovrana 34

3.4.1. Uzorkovanje prirodne populacije kestena i maruna 34

3.5. Statistička analiza karakteristika populacije pitomih kestena i gljive *Cryphonectria parasitica* u Lovranu 37

4. Rezultati 39

4.1. Karakteristike populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji 39

4.2. Karakteristike populacije kestena u Lovranu 52

4.3. Karakteristike populacije gljive *Cryphonectria parasitica* u Lovranu 55

5. Rasprava 60

6. Zaključci 68

7. Literatura 69

8. Prilozi 84

9. Životopis 91

1. Uvod

Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica*, uzročnik je raka kore kestena, opasne bolesti koja se tijekom XX. stoljeća proširila područjima Sjeverne Amerike i Europe (Anagnostakis 1987). Ovaj patogen spada u skupinu gljiva mješinarki (Gryzenhout i sur. 2006a, 2006b; Hibbett i sur. 2007) i u svojoj domovini – istočnoj Aziji dolazi na lokalnim vrstama roda Castanea: *Castanea crenata, C. mollissima, C. henry* i *C. davidii* koje su tolerantnije prema zarazi gljivom *C. parasitica* od europskog pitomoga i američkog kestena (Graves 1950). U Sjevernoj Americi ova panfitocija gotovo je u potpunosti uništila šume u kojima je upravo *C. dentata* bila dominantna vrsta (Hepting 1974), dok ni europska vrsta kestena, *C. sativa*, nije prošla mnogo bolje (Robin i Heiniger 2001). Situacija u Europi je ipak nešto bolja od one u Sjevernoj Americi pošto je hipovirulentnost – prisutnost jedinki *C. parasitica* koje u citosolu imaju prisutnu dsRNA *Cryphonectria hypovirusa 1*, široko rasprostranjena (Bissegger i sur. 1997; Heiniger i Rigling 1994). Za razliku od Europe, u Sjevernoj Americi hipovirulentnost se nije mogla značajnije proširiti, najvjerojatnije zbog vrlo velike genske raznolikosti ovog patogena.

U Hrvatskoj i Sloveniji genska raznolikost gljive *C. parasitica* istražena je metodom određivanja tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti (Krstin i sur. 2008, 2011), što je vrlo vrijedna metoda u procjenjivanju potencijala širenja hipovirulentnosti kroz i među populacijama ove gljive. U susjednim zemljama, osim ovom metodom, populacije gljive *C. parasitica* istražene su i molekularnim metodama – primjenom analize mikrosatelitnih biljega i to u jugoistočnoj Europi i na nekim populacijama u Italiji (Milgroom i sur. 2008) te u zapadnoj Europi, primarno u Francuskoj (Breuillin i sur. 2006; Dutech i sur. 2010). Prednost mikrosatelitnih biljega je u tom što se oni smatraju neutralnima. Drugim riječima, na njih u prirodi neće biti vršen selekcijski pritisak. Gore spomenuti istraživači su otkrili vrlo veliku raznolikost populacija gljive *C. parasitica* u zapadnoj Europi, a vrlo malu u jugoistočnoj, što područje Hrvatske i Slovenije, smješteno geografski između te dvije velike regije, čini osobito interesantnim u populacijskim istraživanjima.

Rak kore kestena, kako je već spomenuto, ozbiljna je prijetnja genofondu pitomoga kestena. Pri tome osobitu pažnju valja posvetiti jedinstvenim kultivarima kestena, primjerice,

marunima, koji su stoljećima uzgajani na području Lovrana, najviše zbog svojih osobitih plodova (Medak i Perić 2007). Stoga ovom izuzetnom biološkom, ali i kulturnom blagu valja posvetiti posebnu pažnju. U Hrvatskoj je osobito poznat upravo lovranski marun, uzgajan zbog svojih visokokvalitetnih plodova. Osim toga, Lovran je mjesto prvog opažanja bolesti raka kore kestena u Hrvatskoj (Kišpatić 1956), te je od izuzetne važnosti procijeniti stanje upravo te zajednice.

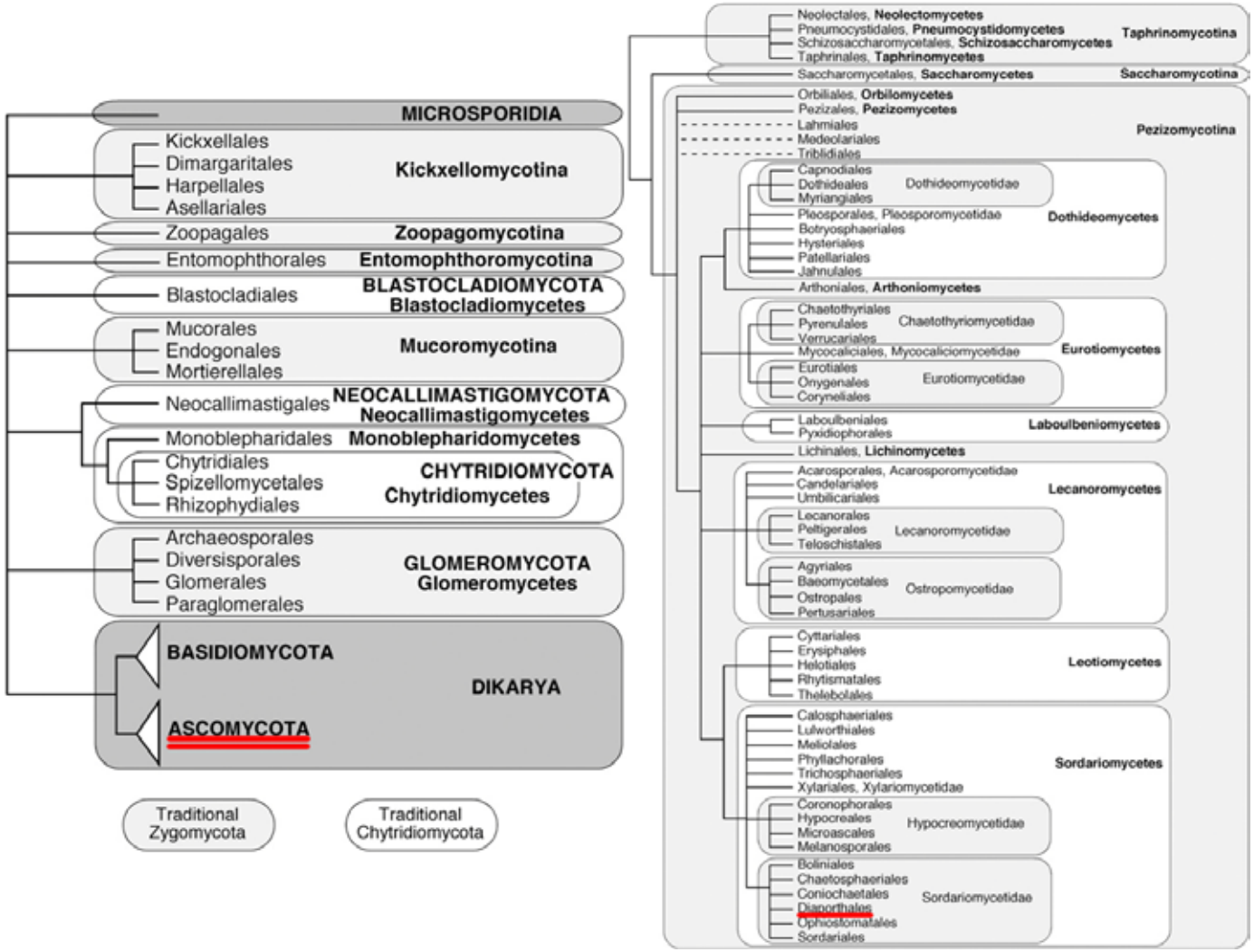
Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili:

1. Procijeniti gensku raznolikost populacija *C. parasitica* u Sloveniji i Hrvatskoj primjenom mikrosatelitnih biljega
2. Odgovoriti na pitanje jesu li istraživane populacije po svojim genetičkim karakteristikama sličnije zapadnoeuropskim ili jugoistočnoeuropskim
3. Razjasniti način širenja gljive *C. parasitica* na istraživanom području
4. Dati uvid u zdravstveno stanje populacije kestena na području Lovrana, procijeniti raznolikost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica* na tom području te utvrditi zastupljenost hipovirulencije (raširenosti *Cryphonectria hypovirusa 1*) na tome području
5. Usporediti genotip lovranskog maruna s prirodnom populacijom kestena te njegov odgovor na zarazu gljivom *C. parasitica* i procijeniti rizik od gubitka lovranskog maruna zbog prisutnosti raka kore kestena

2. Literaturni pregled

2.1. Gljive mješinarke (Ascomycota) i *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr

Cryphonectria parasitica je fitopatogena gljiva mješinarka, porijeklom iz istočne Azije (Shear i Stevens 1913, 1916; Anagnostakis i Hillman 1992; Liu i Milgroom 2007). Gljive mješinarke, Ascomycota, su monofiletska skupina, srodna sa sestrinskim odjeljkom Basidiomycota. Obje skupine – Ascomycota i Basidiomycota, često se objedinjuju u podcarstvo Dikarya (Slika 1), čija je karakteristika, što se iz imena može naslutiti, dikarionski stadij, tijekom kojega se unutar stanica nalaze dva seta haploidnih, neovisnih jezgara, porijeklom od dvaju različitih jedinki (Hibbett i sur. 2007). Dikarya nikada nemaju bičeve (flagele), te iako postoje i jednostanični oblici (kvasci), najčešće su nitaste (filamentozne). Gljive mješinarke, ukoliko jesu filamentozne, imaju septirane hife, s time da su septe nepotpune (porozne), s Woroninovim tjelešcem uz poru (Buller 1933; Gull 1978). Pojedinačne stanice mogu sadržavati jednu ili više jezgara te su u međusobnoj komunikaciji upravo zahvaljujući porama na septama kroz koje mogu prolaziti organeli pa čak i čitave jezgre. Ovoj skupini pripada najveći broj poznatih i opisanih gljiva, od kojih su mnoge lihenizirane, odnosno u simbiotskom odnosu s algama ili cijanobakterijama (Alexopoulos i sur. 1996). Velika skupina Deuteromycota (fungi inperfecti), koja nije bila klasificirana zbog nepoznatog spolnog načina razmnožavanja, danas je uključena u skupinu Ascomycota (Taylor 1995).

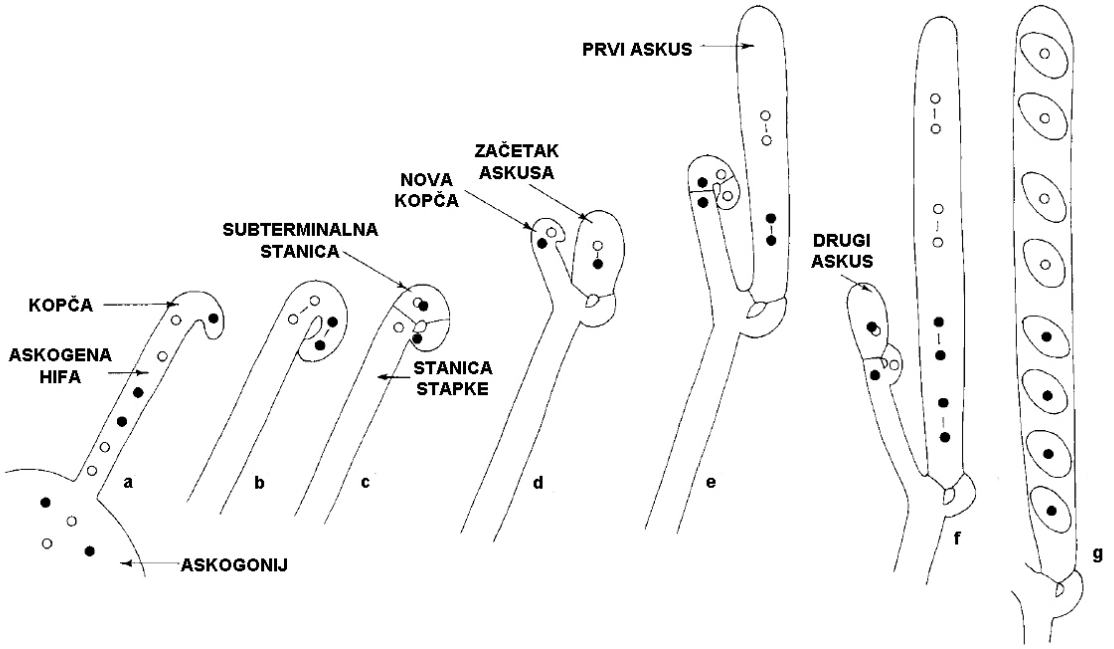


Slika 1 Filogenija i klasifikacija *Fungi* (lijevo), odnosno *Ascomycota* (desno). Preuzeto iz Hibbett i sur. (2007).

Gljive mješinarke, antropocentrički gledano, vrlo su važna skupina organizama. Neke se koriste u ljudskoj prehrani poput smrčaka (*Morchella* spp.) ili tartufa (*Tuber* spp.), izuzetno cijenjenih zbog specifične arome (Webster i Weber 2007). U prehrambenoj industriji u proizvodnji kruha ili fermentiranih proizvoda poput piva ili vina važan je *Saccharomyces cerevisiae*, dok se u industriji lijekova od sredine XX. stoljeća koriste vrste roda *Penicillium* (Kavanagh 2005). Gljive mješinarke koje žive u simbiozi s algama ili cijanobakterijama (lišajevi) važne su pionirske vrste koje naseljavaju nova staništa, odnosno staništa s ekstremnim uvjetima (niske temperature, mala količina vode) (Hale 1983; Webster i Weber 2007). Neke vrste, kao mikorizne gljive, žive u simbiozi s biljkama te omogućuju efikasnije primanje nutrijenata iz supstrata (Webster i Weber 2007). Osim toga, mnoge gljive mješinarke uzročnici su bolesti čovjeka (*Candida* sp.), životinja (red Laboulbeniales na člankonošcima) i biljaka (*Taphrina spp., Ophiostoma novo-ulmi, Claviceps purpurea, Fusarium graminerum, Aspergillus flavus, Cryphonectria parasitica*...) (Blackwell 1994; Agrios 2005; Kavanagh 2005; Weir i Blackwell 2001).

Najveći broj gljiva mješinarki, pa tako i *C. parasitica* uglavnom je haploidno (n) veći dio životnog ciklusa, dok do diploidizacije dolazi isključivo tijekom spolnog razmnožavanja. *Cryphonectria parasitica* je heterotalična gljiva, što znači da do spolnog razmnožavanja može doći samo među jedinkama različitog spola, iako je zabilježena i samo-kompatibilnost (Marra i Milgroom 2001). Spol se kod gljiva mješinarki označava kao "+" i "-", i zapravo nije odgovoran za razvitak određenih spolnih struktura – muške i ženske rasplodne strukture mogu nastajati na miceliju obaju polarnosti. Spol kod gljive *C. parasitica* kontroliran je tzv. *MAT* genom, odnosno, dvama idiomorfima toga gena: *MAT1-1* i *MAT1-2* (Marra i Milgroom 2001; McGuire i sur. 2001). Stoga samo jedinke suprotnih spolova (odnosno jedinke od kojih jedna posjeduje *MAT1-1*, a druga *MAT1-2* idiomorf) mogu inicijalizirati spolno razmnožavanje u kojem dolazi do razvitka askogonija (ženske rasplodne strukture) i spajanja s bilo mikrokonidijom ili hifom suprotne polarnosti (koje imaju funkciju muške spolne strukture, odnosno davaoca jezgre). Nakon spajanja spolnih struktura dolazi do rasta takozvanih askogenih hifa u kojima, međutim, ne dolazi do fuzioniranja jezgara roditeljskih jedinki, već one nastavljaju egzistirati neovisno, u takozvanom dikarionskom stadiju (Read i Beckett 1996; Webster i Weber 2007). Taj, kratkotrajni, dikarionski stadij završava formiranjem završne kopče u kojoj konačno dolazi do spajanja roditeljskih jezgara, koji odmah prati mejoza te formiranje spolnih spora. Spolne spore se nalaze unutar askusa (mješinice), te ih

stoga nazivamo askosporama (Slika 2). Askusi su okruženi sterilnim hifama koje će formirati plodno tijelo – askokarp (peritecij u slučaju *C. parasitica*). Važno je naglasiti da nakon mejoze kod mnogih Ascomycota, pa tako i kod *C. parasitica* slijedi još jedna mitoza, što kao posljedicu ima formiranje osam spolnih spora (Webster i Weber 2007). Askusi kod *C. parasitica* dugački su 30-60 µm, široki 7-9 µm. Osam dvostaničnih, hijalinih spora, dugačkih 7-11 µm i širokih 3,5-5 µm unutar njih poredano je u dva reda (Roane 1986; Halambek 1988; Glavaš 1999). Askospore se pomoću vjetra mogu širiti na velike udaljenosti, čak do 40 km, a oslobađaju se isključivo za kišnog vremena. Spolni način razmnožavanja omogućuje rekombinacije roditeljskih genoma, a time i povećanje raznolikosti unutar populacija. Upravo prema tim spolnim strukturama – askusima i askosporama koje u njima nastaju, taj odjeljak gljiva dobio je svoje ime – Ascomycota, odnosno gljive mješinarke. Askus, odnosno spolni stadij gljiva mješinarki nazivamo teleomorfni ili savršeni stadij (Webster i Weber 2007).

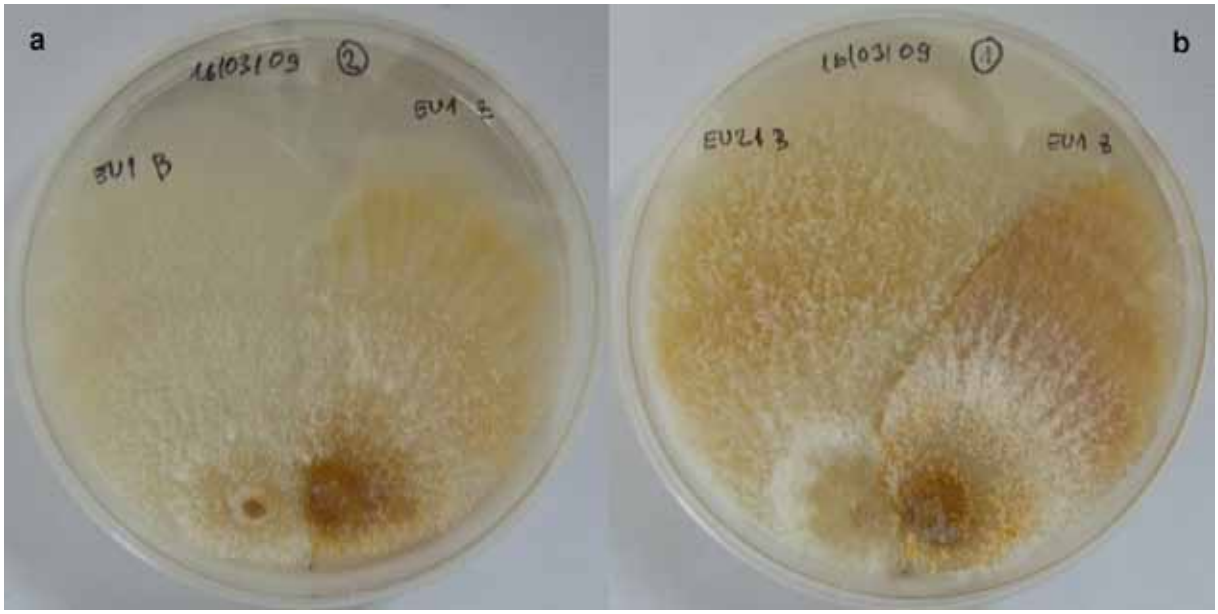


Slika 2 Shematski prikaz razvoja askusa. Askogena hifa s terminalnom kopčom razvija se na askogoniju (a) te nakon istovremene diobe obiju jezgara u kopči (b), dolazi do nastajanja dviju septi koje odvajaju dvojezgrenu subterminalnu stanicu od stanice stapke (c). Povećanjem subterminalne stanice nastaje začetak askusa (d) u kojem dolazi do mejoze jezgre nastale spajanjem roditeljskih i nastajanja nove kopče. Nakon druge mejotičke diobe (e) u novonastalom askusu nalaze se četiri haploidne jezgre koje prolaze kroz jednu mitozu (f) što omogućuje formiranje askusa s osam askospora (g). Preuzeto i prilagođeno iz Webster i Weber (2007).

Osim spolnog razmnožavanja, *C. parasitica*, kao i većina gljiva mješinarki može se razmnožavati i nespolnim putem – fragmentacijom micelija ili nespolnim sporama – konidiosporama koje se razvijaju na konidioforima. U nastanak konidiospora, nespolnih spora, nisu uključeni mejotski događaji pa se tako ovim načinom razmnožavanja ne povećava raznolikost populacija. Konidiospore su male, jednostanične i također se oslobađaju tijekom vlažnog vremena. Nespolni, odnosno konidijalni stadij nazivamo i anamorfni ili nesavršeni stadij. *C. parasitica* se može širiti i askosporama i konidiosporama, najčešće vjetrom, no smatra se da i ptice, kukci kao i čovjek (primjerice nehotičnim prenošenjem spora, zaraženog materijala ili korištenjem nepropisno sanitiziranog alata) imaju svoju ulogu u širenju ovog patogena. Kada spore naiđu na povoljne uvjete – u prirodi to najčešće znači neko oštećenje na drvetu, prokliju i tako inficiraju novog domaćina (Halambek 1988; Guerin i sur. 2001).

Kod filamentoznih Ascomycota važno je spomenuti i fenomen heterokarionske (ne)kompatibilnosti, odnosno, kako se još naziva, vegetativne (ne)kompatibilnosti (Glass i sur. 2000; Saupe 2000; Shiu i Glass 2000). Fenomen somatske (ne)kompatibilnosti poznat je i kod gljiva stapčarki (Basidiomycota) (Worrall 1997). Tijekom rasta micelija, hife različitih jedinki mogu doći u kontakt i spojiti se, stvarajući anastomoze. Ukoliko su tako nastale anastomoze stabilne, dolazi do formiranja heterokariona koji u ovom slučaju nije ograničen na spolne strukture (askogonij i askogene hife), već je prisutan u kompletnom, sada heterokarionskom, miceliju (unutar hifa se nalaze jezgre porijeklom od različitih jedinki). Prepoznavanje je posredovano takozvanim *het* (za heterokarionsku) odnosno *vic* (za vegetativnu) (ne)kompatibilnost (Saupe 2000). Stabilne anastomoze mogu se formirati isključivo među hifama istog tipa heterokarionske/vegetativne (ne)kompatibilnosti. Kontakt hifa nekompatibilnih jedinki dovodi do programirane stanične smrti na mjestu susreta i do razaranja anastomoza, što vrlo učinkovito smanjuje ili čak sprječava prijenos virusa među jedinkama (Huber 1996) (Slika 3). Važno je naglasiti da razlike (heteroalelizam) među lokusima nemaju uvijek za posljedicu smanjenje frekvencije uspješnosti prijenosa virusa. Tako kod gljive *C. parasitica* heteroalelizam, na lokusu *vic4* ne dovodi do smanjenja frekvencije prijenosa virusa među jedinkama, dok razlika na lokusu *vic2* smanjuje vjerojatnost prijenosa za oko 80% (Cortesi i Milgroom 1998; Cortesi i sur. 2001). Dva ili više različitih *vic* lokusa dovode do potpune blokade prijenosa hipovirusa među jedinkama.

Heterokarionska/vegetativna (ne)kompatibilnost je uobičajena pojava kod filamentoznih gljiva mješinarki, no njezino biološko značenje je nepoznato. Prema jednoj hipotezi do nastanka ovog fenomena tijekom evolucije je došlo slučajno i postojanje heterokarionske/vegetativne (ne)kompatibilnosti nema neku značajniju biološku ulogu (Saupe 2000). Teorija suprotstavljena ovoj pretpostavlja da je do nastanka (i zadržavanja) heterokarionske/vegetativne (ne)kompatibilnosti došlo zbog činjenice da nekompatibilnost jedinki može ograničiti stabilnost anastomoza koje se formiraju među hifama i tako ograničiti razmjenu potencijalno štetnih citoplazmatskih elemenata – virusa, plazmida, organela i sl. (Caten 1972).



Slika 3 Rast micelija gljive *Cryphonectria parasitica* na PDA podlozi nakon deset dana. Micelij vegetativno kompatibilnih jedinki prorasta te je stvaranjem stabilnih anastomoza među hifama omogućen je prijelaz CHV-1 iz hipovirulentnog u virulentni uzorak (a). Ukoliko su miceliji vegetativno nekompatibilni, na mjestu susreta stvara se baražna linija koja jasno odjeljuje dva tipa micelija (b). Tijekom kontakta nekompatibilnih micelija dolazi do programirane stanične smrti hifa.

Geni uključeni u heterokarionsku/vegetativnu (ne)kompatibilnost su vrlo različiti, no mnogi kodiraju proteine koji posjeduju DNA-vezujuće domene (α-box; HMG – high mobility group), domene s ponavljajućim sljedovima bogatim glicinom za koje se smatra da imaju afinitet prema jednolančanim nukleinskim kiselinama), domene karakteristične za ribonukleotid reduktazu (enzim uključen u nastajanju deoksiribonukleotida), kao i proteine koji imaju važnu ulogu u staničnom ciklusu, odnosno u prijenosu signala unutar stanica

(prionski proteini, proteini koji posjeduju WD-40 ponavljajuće sljedove ili GTP-vezujuće domene) (Saupe 2000). S obzirom da su mnogi geni uključeni u heterokarionsku/vegetativnu (ne)kompatibilnost odgovorni za mnoge druge važne funkcije unutar stanice, njihova "nova" uloga u heterokarionskoj/vegetativnoj (ne)kompatibilnosti sugerira da je zaista riječ o slučajnom nastanku ovog fenomena. Također, u tome slučaju na *het* odnosno *vic* lokuse ne bi trebao postojati značajniji selekcijski pritisak ukoliko njihova uloga nije presudna u ograničavanju stvaranja anastomoza među različitim jedinkama.

Zaista, Milgroom i Cortesi (1999) su za veći broj analiziranih populacija gljive *C. parasitica* u Italiji, Švicarskoj i SAD-u utvrdili da ne postoji značajniji selekcijski pritisak na *vic* gene. Taj podatak bi išao u korist prvoj, tzv. akcidentalnoj, hipotezi nastanka *het*, odnosno *vic* lokusa, što Saupe (2000) u svojem preglednom članku zaista i smatra snažnim dokazom za tu hipotezu. Međutim, sami autori (Milgroom i Cortesi 1999) daju više različitih objašnjenja za rezultat koji su dobili – pošto su populacije gljive *C. parasitica* još relativno mlade (60 i 100 godina za Europu, odnosno Ameriku), još nije došlo do uspostavljanja ravnoteže učestalosti *vic* alela; polimorfizmi na nekim *vic* genima se u populacijama mogu održavati unatoč činjenici da nije došlo do uspostavljanja ravnoteže u učestalostima alela u populaciji i na koncu, gljiva *C. parasitica* se razmnožava i spolno i nespolno, a za populacije u Europi je dokazano da su vrlo često klonalne, stoga virusi vrše selekciji pritisak na čitave genotipove a ne na intermedijarne učestalosti određenih alela.

U populacijama gljive *C. parasitica* u Europi utvrđeno je postojanje najmanje šest dialelnih, nevezanih lokusa koji kontroliraju vegetativnu (ne)kompatibilnost (Cortesi i Milgroom 1998). Tijekom 15-tak godina postupno je identificirano ukupno šest lokusa (Anagnostakis 1982; Huber 1996; Cortesi i Milgroom 1998). U Europi je u prirodnim populacijama utvrđeno postojanje 31 tipa vegetativne kompatibilnosti koji su imenovani EU-1 do EU-31 (Cortesi i sur. 1998), dok su u laboratorijskim križanjima dobivena ukupno 64 (2^6) različita tipa vegetativne kompatibilnosti, moguća u Europi pod pretpostavkom postojanja šest dialelnih *vic* gena (Milgroom i Cortesi 1999). Posljednjih godina, međutim, u Francuskoj i Španjolskoj pronađeno je više uzoraka koji nisu bili kompatibilni niti s jednim do sada poznatim izolatom (Robin i sur. 2000, 2009), a slično je utvrđeno i za jugozapadnu Njemačku (Peters i sur. 2012).

Gljiva *C. parasitica* u svojoj domovini, istočnoj Aziji, obitava na lokalnim vrstama kestena – *Castanea crenata* (Siebold Zuccarini), *C. mollisima* (Blume), *C. seguinii* (Dode) i *C. henryi* ((Skan) Rehder/Wilson) (Anagnostakis i Hillman 1992). Zbog izuzetno dugog vremena koevolucije gljive *C. parasitica* s domaćinima, na tim azijskim vrstama kestena prisutnost gljive *C. parasitica* nema gotovo nikakvih štetnih posljedica te se smatra da su azijske vrste kestena tolerantne na infekciju gljivom *C. parasitica*. Za razliku od toga, europski pitomi kesten – *C. sativa* Miller i američki kesten *C. dentata* Marshall (Borkhausen) tek su nedavno izloženi ovom patogenu, stoga obolijevaju od bolesti raka kore kestena. Infekcija se od mjesta ulaska patogena vrlo brzo širi okolnim tkivom ukoliko su vremenski uvjeti povoljni. Smatra se da su mlađa stabla posebno osjetljiva na infekciju gljivom *C. parasitica* te se simptomi bolesti mogu uočiti unutar mjesec dana nakon infekcije (Heiniger i Rigling 1994). Rak kore kestena vrlo je ozbiljna bolest i micelij gljive agresivno prodire kroz drvo, postupno razarajući kambij i vaskulaturu stabla, uzrokujući odumiranje vršnih dijelova biljke. To se najjednostavnije vidi kao sušenje pojedinih grana, odnosno, ukoliko je rak kore prisutan na deblu, čitavog stabla, iznad mjesta infekcije. Jedino sposobnost pitomoga kestena da snažno tjera mlade adventivne izbojke ispod mjesta infekcije omogućuje stablu pitomoga kestena da preživi infekciju. Ti novi izdanci, međutim, vrlo često također pobolijevaju i odumiru nakon svega par godina (Anagnostakis i Hillman 1992), prije nego su ušli u generativnu, produktivnu, fazu u kojoj donose plodove.

Kod mladih stabala najuočljivije su promjene na kori na mjestu infekcije – plitko uleknuće praćeno promjenom boje koja iz maslinasto-smeđe prelazi u intenzivno crvenonarančastu. Osim toga javljaju se uzdužne pukotine, kora se ljušti te dolazi do nastanka otvorenih rana i do sušenja listova koji tijekom zime ne otpadaju. Kod starijih stabala bolest se lako otkriva pregledom krošnji gdje se na pojedinim granama može uočiti lokalno sušenje listova, iako na kori oštećenja mogu biti manje uočljiva. Pažljivijim promatranjem grana, posebno na mjestima račvanja, mogu se vidjeti napukline i otvorene rane koje ukazuju na prisutnost gljive *C. parasitica* (Glavaš 1999; Agrios 2005; Krstin 2009).

Nakon smrti čitavog stabla *C. parasitica* prelazi na saprofitni način prehrane te može desetak godina uspješno živjeti na mrtvim dijelovima kestena, i dalje producirajući spore, koje onda mogu biti izvor daljih infekcija (Prospero i sur. 2006). Upravo je to jedan od najvažnijih

načina inficiranja mladih izbojka kestena – mrtvi dijelovi stabla iznad izdanaka su izvor spora koje ih mogu vrlo jednostavno zaraziti (Slika 4).



Slika 4 Rak kore kestena. Najosjetljiviji dijelovi stabla su rane, odnosno u slučaju maruna, svježi cjepovi (a), koji mogu biti zaraženi gljivom *Cryphonectria parasitica* koja saprofitski preživljava na starijim, mrtvim dijelovima drveta (b), što dovodi do naglog razvoja raka kore s tipičnim simptomima (c).

Taksonomski gledano, *C. parasitica* dugo je vremena bila smatrana članom roda Endothia, sve dok (Barr 1978) nije predložila razdvajanje u zaseban rod Cryphonectria. Pripadnici tih dvaju rodova dugo vremena su bili međusobno zamjenjivani, najviše zbog toga što su njihove anamorfne forme vrlo slične i smještene unutar istog roda, Endothiella. Osim toga neki autori su nazive rodova Endothia i Cryphonectria koristili kao sinonime (Gryzenhout i sur. 2006).

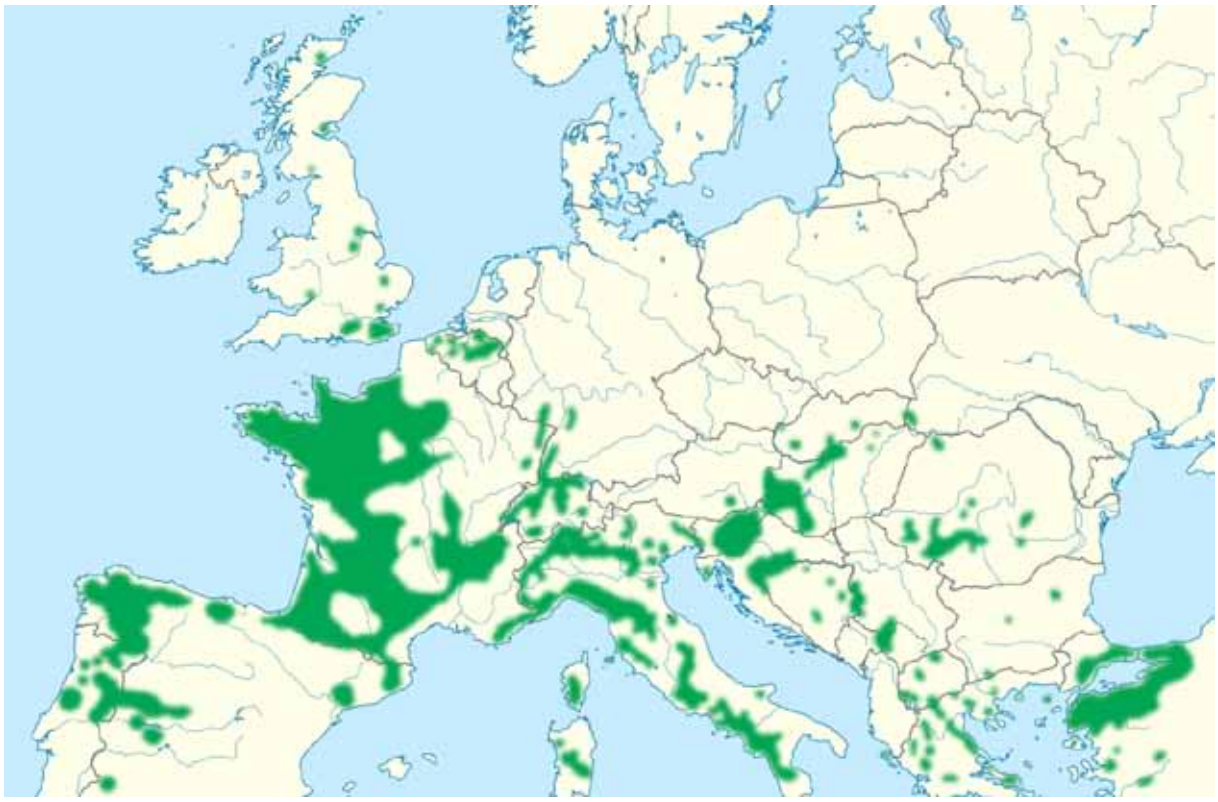
Međutim, kombinacijom morfoloških podataka kao i analize DNA sljedova, ta su dva roda posljednjih godina dobro odijeljena (Myburg i sur. 2004; Gryzenhout i sur. 2006a, 2006b). Danas prihvaćena taksonomija (Gryzenhout i sur. 2006a) unutar roda Diaporthales smješta novu porodicu Cryphonectriaceae, koja obuhvaća veći broj rodova unutar Cryphonectria-Endothia kompleksa. Unutar roda Cryphonectria prihvaćeno je sedam vrsta: *C. parasitica*, *C. nitschkei*, *C. macrospora*, *C. radicalis* s. l., *C. havanensis*, *C. coccolobae*, i *C. eucalypti*. Riječ je uglavnom o tropskim vrstama i jedino je *C. radicalis* otprije poznata u Europi (Hoegger i sur. 2002). Vrlo opasan patogen na vrstama roda Eukaliptus, prije nazivan *C. cubensis* (Van Zyl i sur. 1998; Heerden i Wingfield 2001), u zadnjim taksonomskim revizijama prebačen je u rod Chrysoporte (Gryzenhout i sur. 2006a).

Cryphonectria parasitica u Sjevernu Ameriku vjerojatno je unesena početkom XX. stoljeća, i prvi puta je zabilježena 1904. godine na području New Yorka (Merkel 1905). Od tada bolest se velikom brzinom proširila na šume američkog kestena te ih gotovo u potpunosti uništila (Van Alfen i sur. 1975). Važno je naglasiti da je veći dio istočnog SAD-a (gorje Apalači) do XX. stoljeća bio pokriven gustom šumom u kojoj je upravo američki kesten bio dominantna vrsta s vrlo visokim, stoljetnim stablima koja su bila vrlo važna za tamošnje ekosustave (Slika 5). Od pojave raka kore kestena, gotovo su sva stabla odumrla, te *C. dentata* u prirodi preživljava isključivo sporadično (Anagnostakis i Hillman 1992).



Slika 5 Prirodni areal američkog kestena *Castanea dentata* prije pojave raka kore kestena (tamno zeleno), prema Anagnostakis i Hillman (1992).

U Europi su simptomi raka kore kestena izazvani gljivom *C. parasitica* uočeni nešto kasnije – 1938. godine, u Italiji (Toskana) (Biraghi 1946). Bolest se vrlo brzo proširila te su do 80-tih godina XX. stoljeća sve kontinentalne šume pitomoga kestena zaražene (Robin i Heiniger 2001). Smatra se da su pitomi kesten proširili Rimljani dok je njihovo carstvo obuhvaćalo veći dio Europe, zapadnu Aziju i sjevernu Afriku (Conedera i sur. 2004a, 2004b). Važno je naglasiti da, za razliku od Amerike, u čijim je šumama kesten bio dominantna vrsta i čiji je areal manje-više kontinuiran (Slika 5), u Europi to nije slučaj, zbog specifičnih ekoloških zahtjeva pitomoga kestena (Slika 6).



Slika 6 Rascjepkanost areala europskog pitomoga kestena. Prema Maurer i Fernández-López (2001).

Tijekom 50-tih godina XX. stoljeća gljiva *C. parasitica* je prvi puta primijećena i u Hrvatskoj i Sloveniji i to 1950. u Sloveniji (Krstić 1950), a 1955. godine u Hrvatskoj na području Lovrana (Kišpatić 1956). Bolest se izuzetno brzo i agresivno širila te je do 1961. godine opažena i u Bosni i Hercegovini (Uščuplić 1961). Vrlo brzo nakon prvog opažanja bolesti u Jugoslaviji su se počele primjenjivati fitosanitarne mjere kako bi se spriječilo dalje širenje raka kore kestena (Jurc 2002), na žalost bez značajnijih uspjeha. Stoga je istraživanje raka kore kestena u Jugoslaviji prekinuto do kraja 70-tih kada je prvi puta opažen oporavak određenih stabala, kao i prisutnost hipovirulentnih uzoraka gljive *C. parasitica* (Halambek 1986). Istraživanja u Hrvatskoj i Sloveniji provedena 2000-tih godina (Krstin i sur. 2008, 2011) utvrdila su populacije gljive *C. parasitica* velike raznolikosti, no istovremeno i veliki broj hipovirulentnih izolata, od 11,1% u Olšovcu do 72,2% u Kalu u Sloveniji (Krstin i sur. 2011). U Hrvatskoj su se ti postoci kretali od 12,7% u Istri do 66,6% u Šamarici (Krstin i sur. 2008). Također je u nekim populacijama uočen oporavak stabala kestena, koji je pratio pojavu hipovirulentnosti u populaciji.

Genska raznolikost populacija *C. parasitica* istraživana je najviše upotrebom tipova vegetativne kompatibilnosti. Osim što je metoda široko poznata i prihvaćena, odlična je za planiranje eventualnih koraka biološke kontrole bolesti, pošto može indicirati primjenjivost iste na određenom području. Primjerice, u Europi su pokušaji biološke kontrole bili uspješniji nego u Sjevernoj Americi upravo zbog činjenice da je raznolikost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti manja (Anagnostakis i sur. 1986). Tijekom 90-tih godina XX. stoljeća kao i početkom XXI. stoljeća, u mnogim zemljama Europe provedena su intenzivna istraživanja populacija *C. parasitica*, u Italiji (Cortesi i sur. 1996), Švicarskoj (Bissegger i sur. 1997), Italiji i Švicarskoj (Cortesi i sur. 1998), Makedoniji (Sotirovski i sur. 2004), Češkoj (Jankovský i sur. 2004; Jankovský i sur. 2010) Slovačkoj (Adamčíková i sur. 2006), Bosni i Hercegovini, Španjolskoj i Francuskoj (Trestić i sur. 2001), Mađarskoj, Rumunjskoj i Ukrajini (Radócz 2001), Portugalu, (Bragança i sur. 2007), Turskoj (Akilli i sur. 2009), Njemačkoj (Peters i sur. 2012), Albaniji (Myteberi i sur. 2013) te konačno u Hrvatskoj (Krstin i sur. 2008) i Sloveniji (Krstin i sur. 2011). Odličan, iako nešto stariji pregledni članak u kojem je prikazano širenje raka kore kestena u Europi sastavile su (Robin i Heiniger 2001). Općenito se može zaključiti da starije populacije (okolica Đenovskog zaljeva) pokazuju mnogo veću gensku raznolikost od mlađih populacija (rubni dijelovi areala pitomoga kestena gdje se gljiva *C. parasitica* proširila recentnije) (Slika 7).



Slika 7 Mediteranske zemlje i okolica u kojima je zabilježena gljiva *Cryphonectria parasitica*. Crveno su naznačene zemlje u kojima su provedena istraživanja raka kore kestena te su također navedeni dominantni tipovi vegetative (ne)kompatibilnosti. Zemlje u kojima je gljiva *C. parasitica* zabilježena, ali nisu provedena istraživanja označene su narančasto. Zemlje za koje nema podataka ili gljiva *C. parasitica* nije zabilježena označene su bijelo, izuzev Rusije, u kojoj je *C. parasitica* zabilježena u južnom dijelu europskog dijela zemlje (obale Crnog i Kaspijskog mora te područje Kavkaza).

U međuvremenu znanstvenici su počeli proučavati gljivu *C. parasitica* molekularnim metodama, primjerice metodom DNA otisaka prsta (fingerprinting) (Milgroom i sur. 1992) ili nasumičnim umnožavanje polimorfne DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD) (Kubisiak i Milgroom 2006). Zadnjih nekoliko godina dvije skupine znanstvenika razvile su mikrosatelitne biljege karakteristične za gljivu *C. parasitica* i to njih 11 (Davis i sur. 2005) odnosno 13 (Breuillin i sur. 2006). Zahvaljujući tome istraženo je više populacija jugoistočne Europe, Turske i južne Italije (Milgroom i sur. 2008), odnosno Francuske (Dutech i sur. 2010). Ova istraživanja kao i (Ježić i sur. 2012) na populacijama Hrvatske i Slovenije, pokazala su dobru korelaciju tipova vegetativne kompatibilnosti i mikrosatelitnih genotipova u analizama populacijske strukture gljive *C. parastica*.

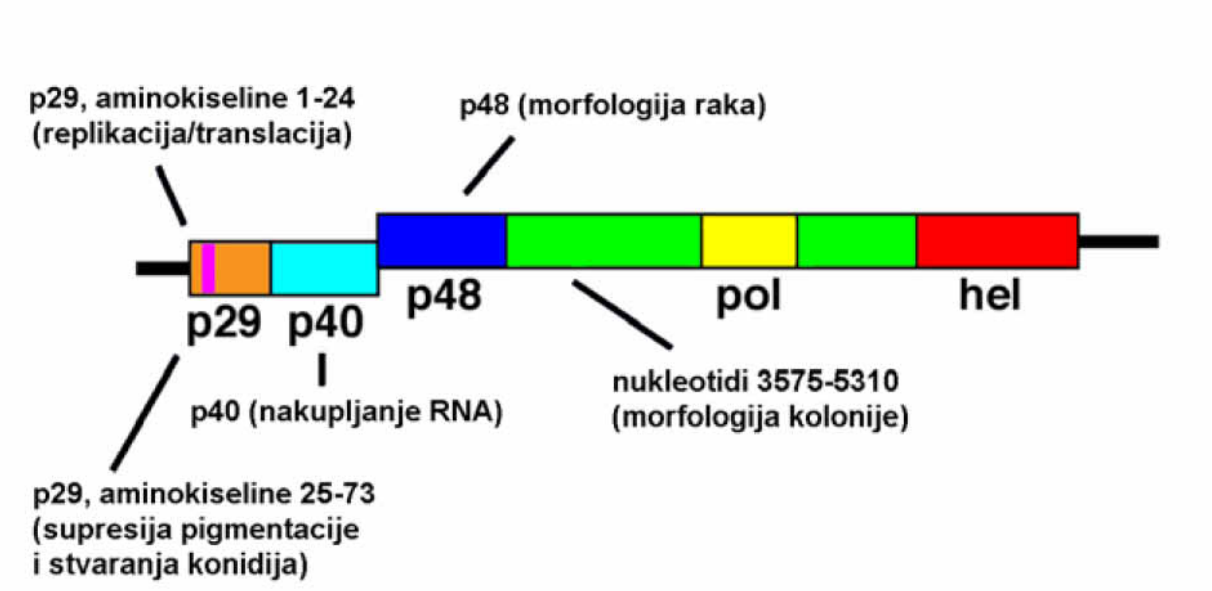
2.2. *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1)

U patosustav *C. parasitica* – pitomi kesten, uključen je i jedan virus – *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), koji, za razliku od većine ostalih poznatih virusa, ne posjeduje kapsidu već se njegova genomska gola dvolančana RNA (dsRNA) nalazi slobodna unutar citoplazme domaćina. Horizontalni prijenos virusne dsRNA vrlo je specifičan, omogućen anastomozama među hifama različitih jedinki ili fragmentima micelija, dok je vertikalni prijenos moguć putem konidiospora (Chen i Nuss 1999; Peever i sur. 2000). Do danas, međutim, nije zabilježen prijenos askosporama. Poznate su četiri vrste CHV-a: CHV-1, -2, -3 i -4, od kojih je u Europi zabilježen isključivo CHV-1 (Heiniger i Rigling 1994; Peever i sur. 1998). U Sjevernoj Americi pronađeni su CHV-2 (Hillman i sur. 1994), CHV-3 (Smart i sur. 1999) i CHV-4 (Linder-Basso i sur. 2005), dok CHV-1 nije pronađen, unatoč mnogim pokušajima unošenja upravo tog virusa kao medijatora biološke kontrole bolesti (Peever i sur. 1997; Linder-Basso i sur. 2005). U Aziji (populacije u Kini i Japanu) su zabilježeni CHV-1 i CHV-2 (Peever i sur. 1998), iako u mnogo nižoj incidenciji nego u Europi i Sjevernoj Americi (Pingyan i sur. 1992; Quan i sur. 1994; Peever i sur. 1998).

Osim navedenih, u hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* nađeni su još i *Mycoreovirus-1/Cp9B021* i *Mycoreovirus-2/C18*, pripadnici porodice Reoviridae koji, za razliku od hipovirusa, posjeduju kapsidu (Hillman i sur. 2004; Suzuki i sur. 2004; Hillman & Suzuki 2004). Male mitohondrijske dsRNA, srodne otprije poznatim T i W dsRNA nađenim kod pivskog kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, odgovorne su za pojavu blage hipovirulentnosti. Uzorci gljive *C. parasitica* u kojima je utvrđena prisutnost tih dsRNA elemenata pokazivali su normalnu morfologiju kolonija kao i primjerenu razinu sporulacije, karakterističnu za uobičajene izolate te gljive (Polashock & Hillman 1994).

Do sada je sekvencirano više izolata CHV-a, primjerice: CHV-1: Euro7 (AF082191), EP713 (M57938); CHV-2: NB58 (L29010); CHV-3: GH2 (WY) (AF188515) i CHV-4: SR2 (NC006431) (NCBI). Genom CHV-1 je oko 12,7 kb duga dvolančana RNA koja ima dva otvorena okvira čitanja, nazvana ORF-A i ORF-B. Otvoreni okvir čitanja bliži 5' kraju virusne genomske dsRNA (ORF-A) kodira poliprotein p69 koji posjeduje autoproteolitičku aktivnost te se njegovim cijepanjem oslobađaju dva manja proteina nazvana p29 i p40. Ekspresijom drugog okvira čitanja, ORF-B, također se sintetizira poliprotein s autoproteolitičkom

funkcijom. N-terminalni kraj oslobađa se kao p48, dok se na C-terminalnom kraju nalaze polimerazna i helikazna domena (Nuss 1992; Dawe i Nuss 2001; Nuss 2005) (Slika 7). Poznato je da ovi proteini utječu na ekspresiju mnogih gena unutar svog domaćina te se smatra da tako moduliraju tijek bolesti (Dawe i Nuss 2001; Allen i sur. 2003; Dawe i sur. 2003). Europski izolati CHV-1 se dijele na pet podtipova – I, F2, D, E i F1 (Gobbin i sur. 2003). Biološka kontrola raka kore kestena u prirodi se provodi unošenjem upravo CHV-1. Unošenje virusa u populaciju gljive *C. parasitica* ne mora nužno dovesti do oporavka populacija stabala kestena, pošto CHV-1 negativno utječe na sposobnost razmnožavanja virusom zaraženih sojeva gljive *C. parasitica*, a time i širenja virusa kroz populaciju.



Slika 8 Organizacija genoma CHV1-EP713 s posebno označenim domenama koje se smatraju odgovornima za patološke promjene domaćina. Prema Dawe i Nuss (2001).

Cryphonectria hypovirus 1 ima vrlo zanimljiv utjecaj na svog domaćina jer, za razliku od mnogih mikovirusa koji najčešće ne utječu negativno na svog domaćina (Buck 1986; Nuss 2005; Pearson i sur. 2009; Yaegashi i sur. 2012), CHV-1 u *C. parasitica* dovodi do pojave takozvane hipovirulencije, odnosno, posljedica infekcije tim virusom jest smanjenja virulentnosti gljive (Van Alfen i sur. 1975). Sličan utjecaj zabilježen je za više mikovirusa pronađenih u gljive *Sclerotinia sclerotiorum*. Kod morfološki promijenjenijih izolata te gljive nađena je oko 5,5 kb duga, dvolančana RNA, koja kodira pretpostavljenu RNA-ovisnu-RNA polimerazu, čiji je translatirani slijed nukleotida sličan nađenim kod poteks-virusima sličnih fitovirusa porodice Flexiviridae, odnosno *Botritis virusa F* (BVF), mikovirusu nađenom kod

Botritis cinerea (Xie i sur. 2006). Ovaj virus nazvan je *Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus* (SsDRV) i slično kao i CHV ne posjeduje sljedove koji bi kodirali kapsidni protein. U istom domaćinu, pronađen je i *Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1* (SsHADV-1), čiji je genom oko 2 kb velika jednolančana DNA (ssDNA). Analizom slijeda nukleotida utvrđena je srodnost s virusima porodice Geminiviridae, uključujući protein inicijacije replikacije (Rep1) i kapsidni protein (CP), iako je organizacija genoma i struktura čestica virusa sasvim drugačija (Yu i sur. 2010). Treći identificiran virus koji uzrokuje pojavu hipovirulentnosti u gljive *S. sclerotiorum* našli su (Zhang i sur. 2009) koji su detektirali anatomske promjene u citoplazmi gljive kao i virusne čestice koje su povezali s hipovirulentnim fenotipom izolata. Kod gljive *Diaporthe ambigua*, važnog biljnog patogena identificiran je *D. ambigua RNA virus* (DaRV), filogenetski smješten u grupu s Tombusviridae. Njegov genom također ne posjeduje sljedove koji bi kodirali kapsidni protein i protein za pokretanje virusa. Infekcija ovim virusom također uzrokuje hipovirulentni fenotip kod domaćina (Preisig i sur. 2000). Nasuprot tome, kod gljive *S. sclerotiorum* postoji i *S. sclerotiorum RNA virus L* (SsRV-L) genom kojega u slijedu nukleotida pokazuje određenu sličnost s virusom hepatitisa E. Ovaj virus nema nikakvog utjecaja na domaćina (ne uzrokuje pojavu hipovirulencije), za razliku od prije navedenih (Liu i sur. 2009). Dvolančana RNA pronađena u fitopatogenoj gljivi *Valsa ceratosperma*, koja kodira poliprotein sekvence slične CHV-3, CHV-4 i SsHADV-1, također nema nikakav nepovoljan utjecaj na svog domaćina (Yaegashi i sur. 2012).

Infekcija gljive *C. parasitica* virusom CHV-1 ima za posljedicu i smanjenje fertilnosti zaražene jedinke (Rigling i sur. 1989; Peever i sur. 2000) – odnosno, dovodi do redukcije ženske fertilnosti i smanjenja broja nastalih spora (Zhang i sur. 1998). Takva zaražena, hipovirulentna jedinka ne uzrokuje pojavu teškog oblika bolesti raka kore kestena, već isključivo blagi oblik površinske nekroze, lokaliziran na koru stabla. Osim toga, ukoliko je na stablu primarno bio prisutan agresivni oblik raka kore, uzrokovan viruletnom jedinkom *C. parasitica*, te do infekcije te jedinke virusom CHV-1 dođe sekundarno, agresivan tip raka kore prelazi u blaži – prodiranje micelija kroz drvo se usporava te stablo kestena na to može reagirati stvaranjem kalusa koji postupno zatvara ranu, odnosno oštećenje. Sličan utjecaj na domaćina ima i CHV-2 (Hillman i sur. 1992), dok je utjecaj CHV-3 na domaćina slabije izražen (Smart i sur. 1999). Posljednji od navedenih hipovirusa, CHV-4, ima zanemariv utjecaj na virulentnost gljive *C. parasitica* (Linder-Basso i sur. 2005). Upravo zato što je njegov učinak na gljivu *C. parasitica* najsnažniji, CHV-1 je i najviše proučavan i korišten u

biološkoj kontroli raka kore američkog i europskog pitomoga kestena (Shapira i sur. 1991; Hillman i Suzuki 2004).

2.3. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Miller 1768)

Europska vrsta – pitomi kesten, *Castanea sativa* pripada porodici bukvi – Fagaceae i šumsko je drvo rasprostranjeno uglavnom u južnoj Europi i Mediteranu. Pošto su Rimljani, koji se smatraju najzaslužnijima za rasprostiranje pitomoga kestena kroz Europu, početkom nove ere bili u posjedu većine mediteranskog bazena, teško je sa sigurnošću utvrditi prirodni raspon areala ovog drveta (Conedera i sur. 2004a, 2004b). Nakon ledenog doba pitomi kesten zadržao se u nekoliko refugija: uz južnu obalu Crnog mora, na širem području srednjeg i južnog Apeninskog poluotoka, u sjevernoj Italiji na južnim obroncima Alpa, na sjevernom dijelu Pirinejskog poluotoka, na Balkanskom poluotoku na području južne Grčke, Makedonije i Bugarske te na bliskom istoku uz Mediteransku obalu (Krebs i sur. 2004). Prema sjeveru prirodni areal prvenstveno je bio ograničen planinskim masivima: Alpama, odnosno Dinaridima. Međutim, kultiviranjem je rasprostranjen po čitavoj Francuskoj te sjeverno i istočno od Dinarida i Rodopa. Sporadično se javlja i u južnoj Engleskoj, sjevernoj Švicarskoj, Njemačkoj i Poljskoj (Slika 9). Areal pitomoga kestena, iako velik, izuzetno je fragmentiran, primarno zbog specifičnih ekoloških zahtjeva ove vrste (Schütt i sur. 2006).



Slika 9 Areal pitomoga kestena, *Castanea sativa*. Prirodno rasprostranjenje označeno je tamno zeleno, dok su svijetlo zeleno naznačena područja na koji je pitomi kesten posađen naknadno. Zelenim točkama označena su sporadična pojavljivanja izvan areala. Prema Schütt i sur. (2006).

Pitomi kesten prilagođen je umjereno-vlažnoj, oceanskoj klimi (Anić 1942). Drvo voli toplinu i pripada submontanim, mediteranskim vrstama. Odgovara mu prosječna temperatura od 8 do 15 °C dok su topli jesenski mjeseci od posebne su važnosti za pitomi kesten. Smatra se da je prosječna temperatura zraka viša od 10 °C tijekom šest mjeseci nužna za uspješan rast ovog drveta. Vrsta je izuzetno neotporna na kasni mraz. Što se padalina tiče, pitomi kesten je mezofilan i vrijednosti od 600 do 1600 mm po godini mu najbolje odgovaraju, iako velike količine padalina tijekom lipnja, u vremenu cvatnje, mogu djelovati izuzetno nepovoljno (Anić 1942; Halambek 1988; Schütt i sur. 2006). Osim toga, pitomi kesten treba mnogo sunca te na višim geografskim širinama taj zahtjev postaje sve izraženiji. Kod pitomoga kestena možemo razlikovati tri osnovna ekološka tipa – atlantski, gdje je klima tijekom cijele godine ujednačena, kontinentalni – s većim temperaturnim razlikama tijekom godine, s toplim ljetima i jesenima te relativno hladnim zimama, i na koncu mediteranski tip – s tipično sredozemnom klimom, gdje pitom kesten uspijeva uz uvjet da mu je osigurana dovoljna količina padalina.

U Hrvatskoj i Sloveniji pitomi kesten najbolje raste na kiselim, dubokim, svježim i rahlim tlima s relativno visokim sadržajem kalija i fosfora. Iznimno se javlja na ispranim

karbonatnim tlima, ukoliko sadržaj karbonata ne prelazi 20% i ukoliko su zadovoljeni ostali nutritivni zahtjevi (Halambek 1988; Schütt i sur. 2006).

Pitomi kesten najčešće se javlja na nadmorskoj visini od 200 do 600 m, iznimno i više (Anić 1942). U unutrašnjosti raste na različitim ekspozicijama i tipovima tla te često dolazi u miješanim šumama s hrastom kitnjakom (*Quercus petrea*) ili bukvom (*Fagus sylvatica*)(Halambek 1988; Medak 2004; Medak i Perić 2007; Vukelić 2012). U submediteranskom području (Istra te na otocima Krku i Cresu), nalazimo ga na istočnim i sjevernim ekspozicijama te ispranim tlima na području rasta hrasta medunca (*Quercus pubescens*) uz primjese crnog (*Ostrya carpinifolia*) i bjelograba (*Carpiunus orientalis*) (Anić 1945; Anić 1953; Halambek 1988; Medak 2009).

Stablo kestena obično naraste do visine od 20 do 25 m, najviše do 35 m s promjerom debla 1 do 2 m, ponekad do 4 metra, a samo u ekstremnim slučajevima i do 6 m. Stablo ima ravno deblo koje se vrlo nisko počinje granati. Krošnje su široke i okruglog oblika. Drvo može doživjeti 500 do 600 godina, iako su zabilježena stabla procijenjene starosti od 2000 godina (Camus 1929; Schütt i sur. 2006). Pitomi kesten počinje razvijati listove krajem travnja i početkom svibnja; listovi su dugački 12 do 20 cm, široki 3 do 6 cm s peteljkama od 1,5 do 2,5 cm. Na bazi se nalaze dva palistića koji rano otpadnu. Listovi su eliptični do lanceolatni s ušiljenim vrhom i okruglom bazom. Rub lista je nazubljen. Cvjetovi su monecični, najčešće jednospolni muški, ponekad dvospolni. Muški cvatovi razvijaju se na mladim izdancima i sastoje se od 40-tak glavičastih segmenata cvata smještenih na fleksibilnom izdanku. Na svakom segmentu se nalazi po sedam muških cvjetova. Dvospolni cvatovi su složenije građe – aksilarno su smješteni cimozni ženski cvatovi koji se nalaze na bazi rese te se sastoje od tri ženska cvijeta omotana ljuskavim ovojem koji se kasnije razvije u kupulu. Na vrhu takvog složenog cvata se nalazi resa s muškim cvjetovima. Cvatovi kestena razvijaju se na ovogodišnjim izdancima i sastoje se od 1 do 4 dvospolnih i 15 do 20 muških cvatova (Piccoli 1922). Kesten cvjeta u lipnju. Muški cvatovi se zameću već tijekom ljeta prošle godine. Oprašivanje je anemogamno i entomogamno, s time da je oko 60% entomogamnog oprašivanja posredovano kornjašima koji bivaju privučeni polenom intenzivnog mirisa uzrokovanog prisutnošću trimetilamina. Biljka je proteroandrična, te se fertilni plodovi začinju isključivo stranooplodnjom. Plodovi su tamnosmeđe obojeni orasi, zaštićeni pikavom kupulom. U nekultiviranih kestena kupula je promjera 5 do 6 cm, dok je kod kultiviranih i do

10 cm u promjeru. Kod sazrijevanja otvara se s četiri poklopca i unutar nje se nalaze do tri ploda. Pitomi kesten počinje donositi plodove kada dosegne starost od 25 do 35 godina. Plodove raznose uglavnom glodavci i ptice (Schütt i sur. 2006).

Kesten se razmnožava spolno sjemenom i nespolno vegetativno (u prirodi najčešće bočnim izbojcima, odnosno cijepljenjem posredovanim ljudskom aktivnošću). Plodovi imaju izuzetno visoku klijavost od čak 90% te unatoč činjenici da mnoge konzumiraju divlje šumske životinja, kesten se vrlo dobro rasprostranjuje sjemenom. U toplijim klimama sjeme može proklijati već iste jeseni nakon sazrijevanja, dok je u hladnijim klimama klijanje odgođeno do proljeća iduće godine. Kultivirane sorte uglavnom se razmnožavaju vegetativno i to cijepljenjem, najviše zbog toga jer reznice imaju vrlo slabu mogućnost razvijanja korijenja. Reznice s adventivnih izdanaka zakorjenjuju se nešto bolje, pogotovo ako su skupljene tijekom lipnja i srpnja, odnosno listopada i studenog. Rast adventivnog korijenja može se potaknuti tretmanom biljnim regulatorom rasta poput indol-3-butanske kiseline, (IBA), kao i polivinilpirolidonom (PVP)-om, naftolom, bornom kiselinom ili vitaminima (Rinallo i Mariotti 1993).

Prema načinu korištenja mogu se razlikovati dva osnovna tipa pitomoga kestena: *C. sativa* var. *domestica eudomestica*, kod koje se u kupuli nalaze 2 do 4 ploda. Kod njih testa prodire unutar sjemenke i zatvara dva do tri kotiledona; plodovi su 2,5 do 3,5 cm dugački, 3 do 4 cm široki. Kod *C. sativa* var. *domestica macrocarpa* po kupuli dolaze do dva, velika, ovalna ploda, tanka testa ne prodire u unutrašnjost sjemenke, a one sadrže samo jedan kotiledon; plodovi su veliki – 3 do 4 cm dugački i 3,5 do 4,5 cm široki. Osim zbog plodova drvo pitomoga kestena je izuzetno vrijedno, kako u građevinarstvu tako i u proizvodnji namještaja. Pitomi kesten također ima vrlo visok sadržaj tanina (4 do 12% suhe mase) koji se koristi u industriji (Schütt i sur. 2006).

Slično kao i kod gljive *C. parasitica*, populacije kestena analizirane su raznim metodama poput analize alozima i RAPD-om C. dentata u SAD-u (Huang i sur. 1998), odnosno izozima kod *C. sativa* u sjevernoj Španjolskoj (Fernández-López i Monteagudo 2010). Za pitomi kesten veći broj istraživača je također razvio mnogo mikrosatelitnih biljega, ukupno 50, i to: 13 (Buck i sur. 2003), 33 (Marinoni i sur. 2003) i četiri (Gobbin i sur. 2007). Pošto kesten veći dio životnog ciklusa provodi kao diploid, vrijednost mikrosatelitnih regija kao

kodominantnih biljega koji mogu razlikovati heterozigote od homozigota je vrlo velika. Osim toga, kod pitomoga kestena zabilježen je velik broj alela po lokusu, čak do 21 (Gobbin i sur. 2007). To je daleko veći broj mikrosatelitnih biljega kao i alela po lokusu nego što je razvijeno, odnosno detektirano, za gljivu *C. parasitica*. Više autora (Gobbin i sur. 2007; Martín i sur. 2010a, 2010b; Martín i sur. 2011; Martín i sur. 2012) istraživalo je populacijsku strukturu šuma pitomoga kestena u Europi te je za prirodne populacije pitomoga kestena utvrđena vrlo velika genska raznolikost. Neki autori su genotipizirali i određene kultivare pitomoga kestena poput Buné Negro, Marradi, Torcion Negro, Verdesa kao i hibrid Bouche de Betizac (Gobbin i sur. 2007), te su nastojali utvrditi njihovu međusobnu srodnost. Na taj način (Gobbin i sur. 2007) utvrdili su da u mnogim slučajevima ime određenog kultivara zaista i odgovara jednom konkretnom genotipu (Berögna i Farin), no u nekim slučajevima kao Torcion Negro, Verdesa i Lüina utvrđene su i sinonimije – postojanje više imena za jedan genotip.

3. Materijali i metode

3.1. Istraživanje raznolikosti gljive *Cryphonectria parasitica* primjenom mikrosatelitnih biljega

3.1.1. Kolekcija uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* iz Hrvatske i Slovenije

Tijekom prijašnjih istraživanja (Krstin i sur. 2008, 2011) sakupljeni su uzorci gljive *C. parasitica* na svim područjima rasta kestena u Hrvatskoj i Sloveniji. U svrhu analize populacija upotrebom mikrosatelita, odabrano ih je devet, četiri Hrvatske i pet Slovenskih populacija koje su pokrivale široko geografsko područje obje države (Slika 10), te su ti uzorci posebno obrađeni: Cres (18 uzoraka), Hrvatska Kostajnica (26 uzoraka), Markuševac (23 uzorka) i Požega (21 uzorak) u Hrvatskoj te Brežice (17 uzoraka), Gornji Suhor (20 uzorak), Hočko Pohorje (19 uzoraka), Ostrovica (19 uzoraka) i Valterski Vrh (17 uzoraka) u Sloveniji. Ti uzorci su djelomično bili pohranjeni u 22%-tnom glicerolu u zamrzivaču na -20 °C, a djelomično na krutoj PDA (potato dextrose agar, krumpirov dekstrozni agar) podlozi na Petrijevim zdjelicama u hladnjaku pri 4 °C.



Slika 10 Devet istraživanih populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji.

3.1.2. Uzgoj gljive *Cryphonectria parasitica* na PDA podlozi i čuvanje kolekcije u glicerolu

Uzorci gljive uzgojeni su na krutoj PDA podlozi na Petrijevim zdjelicama (ϕ 90 mm). PDA podloga priprema se prema uputama proizvođača (Biolife): 42 g PDA praška doda se u 1l deionizirane vode i autoklavira pri 120 °C, 20 minuta. Oko 15 ml podloge sterilno se rastoči u Petrijeve zdjelice. Nakon što se podloga ohladi na nju se mogu presaditi komadići agara s micelijem gljive *C. parasitica* kako bi se kultura uzgojila. Nakon dva tjedna rasta pri uvjetima danje svjetlosti i sobne temperature, gljiva *C. parasitica* sporulira te se biološki uzorci, fragmenti micelija i konidiospore, mogu upotrijebiti za istraživanje i/ili pohraniti.

U svrhu pohranjivanja u kabinetu s vertikalnim strujanjem sterilnog zraka (laminar) micelij gljive, zajedno s podlogom, nareže se pomoću sterilnog nožića na malene kockice veličine 3×3×3 mm. Nekoliko takvih kockica prebaci se u sterilnu 22%-tnu otopinu glicerola u mikroepruvete. U zamrzivaču na -80 °C uzorci se na taj način mogu čuvati do deset godina.

U svrhu izolacije i analize DNA maleni komadić micelija s podlogom se izvadi iz mikroepruvete i postavi na svježu PDA podlogu prekrivenu sterilnim celofanom. Kroz tjedan dana micelij preraste čitavu površinu Petrijeve zdjelice (ϕ 90 mm) te se lako može sastrugati s celofana.

3.1.3. Izolacija nukleinskih kiselina

Izolacija nukleinskih kiselina iz tkiva gljive *C. parasitica* napravljena je po modificiranom protokolu (Allemann i sur. 1999). Oko 100 mg micelija gljive *C. parasitica* usitni se pomoću tučka u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika te prebaci u sterilnu epruvetu za centrifugiranje volumena 12 ml. Usitnjenom miceliju doda se 2 ml 2×STE/10%SDS (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0; 10% SDS) pufera i 2 ml smjese fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 12:12:1. Takvu smjesu snažno se miješa na vrtložnoj miješalici i nakon toga centrifugira pri 5000×g, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vodenu fazu (oko 800 µl) pažljivo se otpipetira u mikroepruvetu i doda se jednaki volumen otopine kloroform:izoamilni alkohol omjera 24:1. Mikroepruvetu tada valja snažno promiješati rukom nakon čega slijedi centrifugiranje pri 5000×g, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vodenu fazu (oko 700 µl) prebaci se u novu mikroepruvetu i doda se jednak volumen izopropanola te promiješa i na koncu centrifugira na 15000×g, 30 minuta pri 4 °C. Supernatant se pažljivo odlije i talog ispere s 500 µl 70%-tnog ledeno-hladnog etanola nakon čega ponovno slijedi centrifugiranje na 15000×g, 10 minuta pri 4 °C. Mikroepruveta se ostavi otvorena na sobnoj temperaturi 30-tak minuta, dok se talog ne osuši. Nakon toga se talog nukleinskih kiselina otopi u 50 µl sterilne deionizirane vode te ostavi preko noći u hladnjaku na 4 °C kako bi se nukleinske kiseline hidratizirale i u potpunosti otopile. Idući dan koncentracija nukleinskih kiselina mjeri se pomoću NanoDropa (Thermo Scientific). Uzorci nukleinskih kiselina čuvaju se pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C.

3.1.4. Umnožavanje mikrosatelitnih lokusa gljive *Cryphonectria parasitica*

Ukupno 11 mikrosatelitnih lokusa (Davis i sur. 2005) korišteno je za genetsku analizu devet populacija gljive *C. parasitica* sakupljenih na području Hrvatske i Slovenije. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1×PCR pufer, 1,5 mM magnezijevog klorida, 200 µM dNTP-a, koncentracije početnica prema Tablica 1, 0,5 U Taq polimeraze i 25 ng DNA kalupa. Reakcija

se odvijala u sljedećim uvjetima: 2 minute početne denaturacije pri 94 °C, nakon čega je slijedilo 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije pri 94 °C tijekom 30 sekundi, sparivanja početnica s kalupom tijekom 30 sekundi pri 55 °C i produljivanja lanaca DNA tijekom 2 minute pri 72 °C. Završno produljivanje DNA je trajalo sat vremena pri 72 °C. uzvodne početnice su bile označene fluorescencijskim bojama (Tablica 1) te su neke kombinacije početnica bile korištene zajedno u istoj reakcijskoj smjesi – u višestrukoj (multipleks) reakciji (Tablica 1).

Tablica 1 Sljedovi baza početnica korištenih u lančanoj reakciji polimerazom za određivanje mikosatelitnih genotipova gljive *Cryphonectria parasitica*. Označene su fluorescentne boje korištene za pojedinu početnicu kao i koncentracije u reakciji. Označene su početnice koje su bile korištene u pojedinoj multipleks reakciji.

Lokus[1]	Slijed baza početnica (5'→3')	c/pM[2]	Multipleks[3]
RO4–775	**FAM**-GCAATCAGTCAGGCAAGTCCAGTT AATCTTGGGAGGGAACCTCGTGTT	1	1
499–900	**PET**-ACGAGAGTGACAATGGCGAGGAT TGTCCCTATCGTTCTGGTCGTCCTT	2	
327–1075	**VIC**-TGCTCAAATCTACGGAGGGAATGG AATACCCAAAGAACTGTCCAGCCC	2	
P13–1250	**NED**-AATAAGGGAGGAGAGAAAGGGTGC TCTAGCATTGTCCATCACGCCT	4	
I07– 650	**FAM**-CATGCGAGAAATGCAGGAGTGTTG GGGCTCCAGGATATCGAAGACATT	4	
N14-1200	**NED**-AAGCTCAATTGGCGTTGCTA CTTGCCTCGACGGTATGGTA	4	
I01-1990	**FAM**- TTGGAAACGGCCATAACACAAGCC ATGTGCGAATCTCGGCTCGAT	1	2
I01-800	**PET**-TTGGTCTTGGTCGCCTTAGTCTTC ACAGTGAAGAGACAATCGTCACGC	2	
Z06-1400	**VIC**-TCGTTGGATTCGCGTCCTAGATGA AAACACCGAGTCGTACGTAGCAAG	2	
L19-1425	**NED**-TCGACTGACTTCACACAAGACCCT TGGCCTGTCCTTTGGAATTGTGAC	3	
N19–1190	**PET**-ATCAGAGTGGGAAGCCAGAA GGGTACAGTGGCACAAGACA	4	

[1]Naziv lokusa prema Davis i sur. (2005)
[2]Koncentracija početnice u reakciji
[3]Multipleks mješavina

Nakon PCR-a, uspješnost reakcije potvrđena je pomoću agarozne gel elektroforeze. U tu svrhu po 5 µl svakog produkta nanošeno je na 1,5%-tni agarozni gel te razdvojeno tijekom 45 minuta u 1×TBE (90 mM Tris borat, 2mM EDTA) puferu pri 6 V/cm. U gel je prije elektroforeze dodana DNA boja Stain G, prema uputama proizvođača, (Serva) te su umnoženi fragmenti vizualizirani pod UV svjetlom na transiluminatoru (Syngene).

Određivanje veličine DNA produkata obavljeno je pomoću GenScan usluge u Macrogenu, te su podaci analizirani pomoću Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) aplikacije. Podaci o veličini odsječaka za svaki uzorak i svaki lokus zabilježeni su u Excel tablici (Microsoft) te

korišteni kao genotipovi u daljim analizama. Pošto je *C. parasitica* haploidni organizam, ovom metodom je za svaki lokus detektiran samo jedan alel.

3.2. Statistička analiza karakteristika populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji

Pomoću programa Dispan, za genotipizirane populacije gljive *C. parasitica* s područja Hrvatske i Slovenije izračunate su frekvencije alela na svim lokusima (p_a), prosječna genska raznolikost (h) kao i genetička diferencijacija među populacijama (G_{ST}) (Nei 1973).

Shannon-Weaverovim (Shannon i Weaver 1949) informacijskim indeksom

$$H = -\sum p_i \, lnp_i$$

i indeksom genotipske raznolikosti Stoddarta i Taylora (Stoddart i Taylor 1988)

$$G = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

gdje p_i predstavlja frekvenciju pojedinih genotipova, izračunata je vrijednost raznolikosti unutar svake pojedinačne populacije gljive *C. parasitica* i ukupna raznolikost svih analiziranih populacija na temelju genotipova dobivenih analizom mikrosatelitnih lokusa. Osim toga, izračunate su i ujednačenosti kako bi se mogao odrediti raspored genotipova kroz populacije (Grünwald i sur. 2003)

$$e = \frac{H}{lnN}$$

$$E_5 = \frac{G - 1}{e^H - 1}$$

gdje je N broj uzoraka određene populacije, odnosno svih uzoraka ukupno u svim testiranim populacijama. U ovom slučaju vrijednost e, pošto je broj hipotetskih, pretpostavljenih

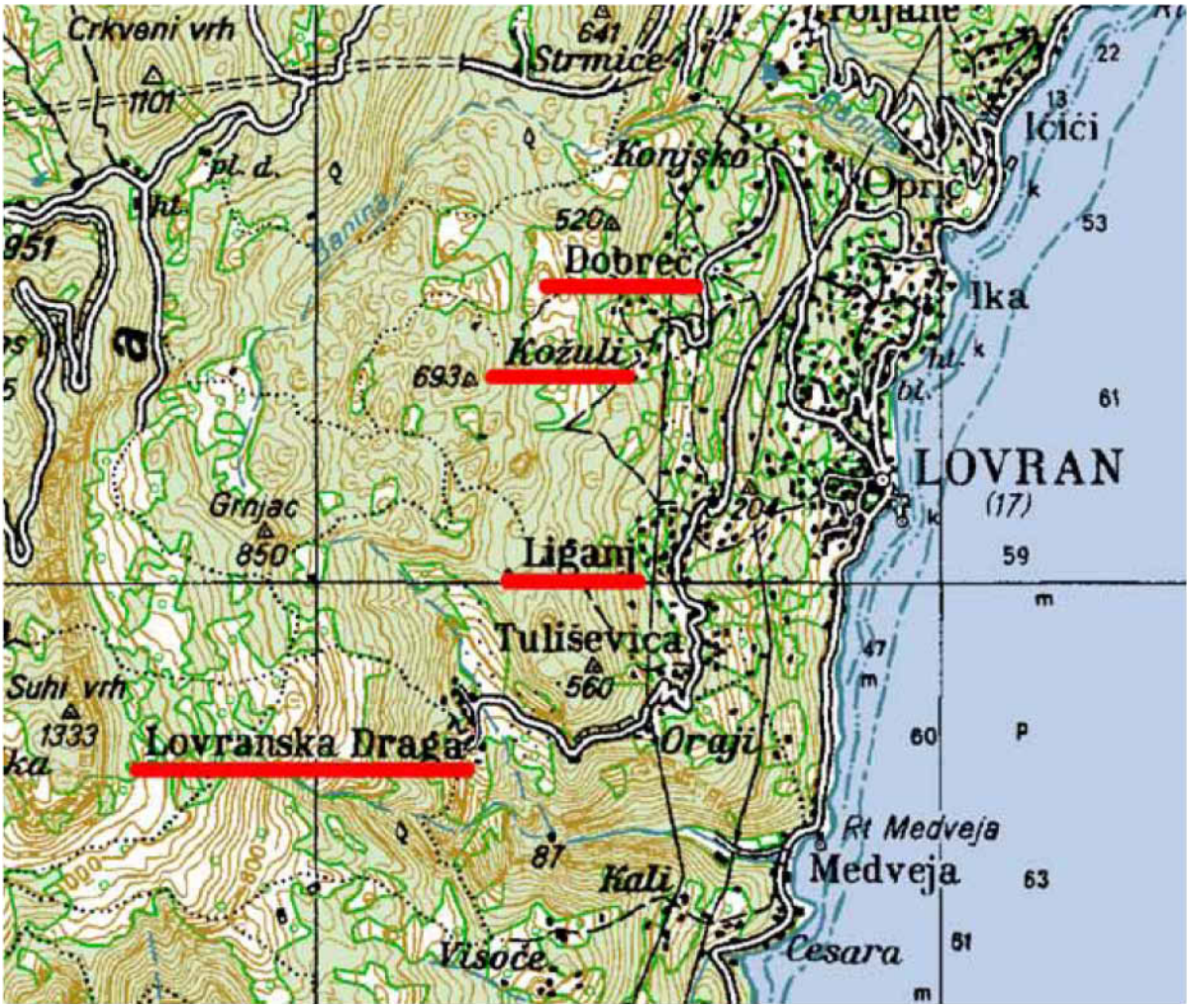
genotipova u populaciji bio veći od broja uzoraka, skalirana je na *lnN*, odnosno prirodni logaritam broja uzoraka u populaciji. Također pomoću programa Dispan (Ota 1993) procijenjena je prosječna heterozigotnost (H_I). U ovom slučaju, pošto je riječ o haploidnom organizmu, taj parametar bilo bi ispravnije nazvati haploidnom raznolikošću. Gametska neravnoteža izračunata je pomoću Fisherovog exact testa implementiranog u programu Genepop 4.0 (Rousset 2008). Indeks asocijacije I_A i indeks višelokusne neravnoteže r_d izračunati su pomoću programa Multilocus 1.3 (Agapow i Burt 2001). Statistička značajnost razlikovanja populacija temeljena na svim lokusima testirana je programom Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002), bez pretpostavljene Hardy-Weinbergove ravnoteže. Ovaj program koristi drugi indeks genetičke diferencijacije, θ (Weir i Cockerham 1984). Analiza glavnih koordinata (PCoA, Principal Coordinates Analysis) obavljena je na svim genotipovima pomoću GenAlEx 6.3 (Peakall i Smouse 2005) te je napravljen dvodimenzionalni graf u kojem je svaki genotip predstavljen tortnim dijagramom koji je predstavljao udio genotipova pretpostavljenih roditeljskih haplotipova, H1 i H2. U programu Past 1.88 (Hammer i sur. 2009) također je testirano postoji li povezanost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti i mikrosatelitnih genotipova pomoću tablica kontingencije te je izračunat Cramerov V indeks. Bayesovska analiza napravljena je u programu Structrue 2.3.1. (Pritchard i sur. 2000; Falush i sur. 2003; Falush i sur. 2007), uz pretpostavku "*admixture*" modela. Za svaku od pretpostavljenog broja populacija K, od dva do osam, napravljeno je po deset neovisnih prolaza uz 10^6 ponavljanja.

3.3. Uzorkovanje i analiza populacije gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Lovrana

3.3.1. Područje istraživanja – Lovran i okolica

Na širem području Lovrana, na površini od 3,4 km^2 (Slika 11) nalazi se miješana šuma/voćnjak kestena. Naime, među necijepljenim stablima pitomoga kestena nalaze se maruni – prirodna populacija stabala na kojima su nacijepljene plemke maruna. Takva stabla moguće je relativno lako razaznati zbog prisutnosti ožiljka na deblu koji označava cijep – prijelaz između podloge (pitomoga kestena) i plemke (maruna). Osim toga, tijekom jeseni maruni donose velike, vrlo karakteristične plodove. Šuma se nalazi na nadmorskoj visini od 400 do 700 metara i karakterizirana je šumskim zajednicama hrasta medunca i crnog graba, dok se na nešto višim nadmorskim visinama nadovezuje pojas u kojem dolaze cer, mukinja i

crni bor. Lokalno stanovništvo na ovom području uzgaja marune dugi niz godina pa se tako mogu pronaći vrlo stara, stoljetna stabla maruna. Na obližnjoj Učki rastu isključivo necijepljeni pitomi kesteni.



Slika 11 Lovranski zaselci obuhvaćeni ovim istraživanjem

3.3.2. Uzorkovanje rakova kore kestena

Na području Lovrana tijekom 2010. i 2011. godine sakupljani su uzorci kore: 26 necijepljenih stabala, prirodne populacije kestena i 26 cijepljenih stabala, maruna na način kako je opisano u (Cortesi i sur. 1996); s rubnog dijela raka odrezan je dio kore otprilike 2 × 3 cm velik. Uzorkovan je po jedan rak po stablu, kako bi se izbjeglo uzorkovanje klona *C. parasitica* s istog drveta, dok je kod cijepljenih maruna uziman uzorak isključivo iznad cijepa i to onaj koji je bio najbliži tlu odnosno najdostupniji. Također, sva uzorkovana stabla bila su slične starosti, promjera najmanje 70 cm. Uzorci kore su pohranjeni u hladnjaku na 4 °C do izolacije gljive *C. parasitica*.

3.3.3. Izolacija gljive *Cryphonectria parasitica* iz uzoraka kore kestena

Kako bi se iz uzorkovanih rakova kore izolirala čista kultura gljive *C. parasitica*, komadić kore prosječne veličine 1×1 cm odrezan je s ruba uzorkovanog raka te kratko površinski dezinficiran 70%-tnim etanolom, 15-tak sekundi, te osušen na papirnatom ručniku. Tako tretirani uzorak položen je na krutu PDA podlogu u Petrijevoj zdjelici ϕ 90 mm te ostavljen u mraku nekoliko dana na sobnoj temperaturi. Od trećeg dana potrebno je svakodnevno motriti rast mikroorganizama na podlozi i pokušati izolirati čistu kulturu gljive *C. parasitica* precjepljivanjem malenog komadića agara sa svježim rastom micelija na novu podlogu. Ponekad je takvo precjepljivanje potrebno napraviti i više puta, sve dok se ne dobije čista kultura. Takvi uzorci se u svrhu pohrane kolekcije populacije čuvaju u sterilnom 22%-tnom glicerolu u zamrzivaču na -80 °C, kako je opisano u poglavlju 3.1.2. Uzgoj gljive *Cryphonectria parasitica* na PDA podlozi i čuvanje kolekcije u glicerolu.

3.3.4. Određivanje vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica*

U svrhu određivanja vegetativne kompatibilnosti, maleni komadići agara (5×5×3 mm) sa svježim rastom micelija postavljeni su uz rub Petrijeve zdjelice sa svježom PDA podlogom i to tako da je komadić micelija gljive izolirane s kore drveta, nepoznatog tipa vegetativne kompatibilnosti postavljen uz isti takav komadić agara s micelijem testera – izolata poznate vegetativne kompatibilnosti. Nakon nekoliko dana rasta dvaju izolata gljive *C. parasitica* na PDA podlozi može se odrediti podudaraju li se po tipu vegetativne kompatibilnosti ili ne. Ukoliko su iste vegetativne kompatibilnosti (podudarnost u svim *vic* lokusima) njihovi miceliji u potpunosti prorastu, međutim ukoliko su različitih tipova (razlika u najmanje jednom *vic* lokusu), na mjestu kontakta formira se baražna linija kao posljedica programirane stanične smrti hifa na mjestu kontakta. Osim toga, uz baražnu liniju se primjećuje pojačana sporulacija micelija. U tu svrhu korišteno je 64 testera – izolata poznate vegetativne kompatibilnosti koji odgovaraju uobičajenim tipovima vegetativne kompatibilnosti zabilježenim u Hrvatskoj i Sloveniji (EU1-EU64)(Krstin i sur. 2008, 2011).

3.3.5. Utvrđivanje prisutnosti dvolančane RNA *Cryphonectria hypovirusa 1* u izolatima gljive *Cryphonectria parasitica*

Uzorci gljive *C. parasitica* presađeni su na svježu PDA podlogu i ostavljeni da rastu tijekom tjedan dana pri sobnoj temperaturi u mraku. U takvim uvjetima micelij poprimi narančastu boju i razvije mnoštvo sitnih piknida ukoliko je uzorak virulentan (nije zaražen virusom CHV-1), odnosno bude bijel do bijelo-žućkast te razvije mnogo manji broj morfološki većih piknida (ukoliko jest zaražen virusom CHV-1).

Uzorci su također presađeni i na podlogu prekrivenu celofanom kako bi se mogla izolirati virusna dsRNA iz micelija. Oko 100 mg tkiva usitni se pomoću tučka u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika te prebaci u sterilnu epruvetu volumena 12 ml. Usitnjenom miceliju doda se 1 ml 2×STE/10%SDS (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0; 10% SDS) pufera i 2 ml smjese fenola:kloroforma:izoamilnog alkohola u omjeru 12:12:1. Takvu smjesu snažno se miješa na vrtložnoj miješalici i nakon toga centrifugira pri 5000×g, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vodenu fazu (oko 800 µl) pažljivo se otpipetira u novu mikroepruvetu i doda se jednaki volumen otopine kloroforma:izoamilnog alkohola omjera 24:1. Mikroepruvetu tada valja snažno promiješati rukom nakon čega slijedi centrifugiranje pri 5000×g, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vodenu fazu (oko 700 µl) otpipetira se u novu mikroepruvetu i doda apsolutnog etanola do koncentracije od 15%. Precipitirane nukleinske kiseline resuspendira se i sadržaj mikroepruvete prebaci na unaprijed pripremljenu CF-11 celulozu te dobro pomiješa. Celuloza za kromatografsku izolaciju nukleinskih kiselina priprema se tako da se 1,25 g CF-11 celuloze (Sigma) prelije s 20 ml 1×STE pufera s 15% etanola (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; 15% etanola) i ostavi u vodenoj kupelji na 95 °C 30 minuta. Celuloza se taloži centrifugiranjem pri 1800×g, 5 minuta, supernatant baci, a celuloza resuspendira u novih 20 ml 1×STE pufera s 15% etanola (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; 15% etanola) te se korak centrifugiranja i uklanjanja supernatanta ponovi. Na koncu se celuloza resuspendira u 20 ml svježeg 1×STE pufera s 15% etanola (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; 15% etanola) te se po 2 ml prebaci u mikroepruvete. Prije dodavanja vodene faze nakon ekstrakcije nukleinskih kiselina celuloza u mikroepruvetama se taloži centrifugiranjem pri 1800×g, 5 minuta i supernatant odlije. Mikroepruvete se inkubiraju na ledu 30 minuta nakon čega se celuloza resuspendira i centrifugira pri 1000×g, 2 minute na sobnoj temperaturi. Supernatant se odvoji u posebnu epruvetu, a celulozi u mikoepruveti se doda 1 ml 1×STE pufera s 15% etanola (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0;

15% etanola) i prebaci u kromatografsku kolonu koja se nalazi na epruveti za centrifugiranje volumena 12 ml. Mikroepruveta u kojoj se nalazila celuloza se ispere s 1 ml 1×STE pufera s 15% etanola i izlije također na kolonu. Nakon toga slijede tri ispiranja sa po 1×STE puferom s 15% etanola. Taj eluat se sačuva jer se iz njega može precipitirati DNA. Dvolančanu RNA koja je vezana za celulozu ispire se dva puta s po 1 ml 1×STE pufera (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) te se eluat sakupi u novoj epruveti za centrifugiranje volumena 12 ml. Eluatu se dodaje 1/10 volumena 3M natrijevog acetata (pH 5,5) i 2 volumena ledeno hladnog apsolutnog etanola te se pohrani preko noći u zamrzivaču na -20 °C. Drugi dan se epruvete centrifugiraju pri 10000×g, 30 minuta na 4 °C, supernatant se dekantira, a talog ispere s 200 µl 70%-tnog etanola nakon čega slijedi centrifugiranje pri 15000×g, 5 minuta na 4 °C. Supernatant se pažljivo ukloni i talog suši 30 minuta na sobnoj temperaturi te na kraju otopi u 30 µl sterilne vode. Uzorci dsRNA čuvaju se pohranjeni u zamrzivaču na -80 °C.

3.3.6. Elektroforeza dvolančane RNA

Prije elektroforeze uzorci se moraju obraditi DNazom kako bi se uklonili ostaci genomske DNA. Stoga se u 8 µl uzorka doda 1 µl 10× reakcijskog pufera i 1 µl DNaze (Fermentas). Inkubacija se provodi 20 minuta na 37 °C.

Elektroforeza 10 µl tako pripremljenih uzoraka provodi se u 0,8%-tnom agaroznom gelu kroz 90 minuta u 1×TBE puferu pri 4 V/cm. Dvolančana RNA detektira se uranjanjem gela nakon elektroforeze u otopinu etidijevog bromida koncentracije 5 µg/ml, 15 minuta i vizualizira pod UV svjetlom na transiluminatoru.

3.4. Genotipizacija pitomoga kestena s područja Lovrana

3.4.1. Uzorkovanje prirodne populacije kestena i maruna

U svrhu izolacije DNA kestena i maruna s Lovranskog područja tijekom 2010. i 2011. godine skupljeni su listovi s istih stabala s kojih su uzorkovani i rakovi. Pri uzorkovanju maruna sakupljani su listovi iznad cijepa. Listovi su kratko pospremljeni u zamrzivač na -20 °C te je DNA izolirana komercijalnim paketom Omniprep for Plant (G Biosciences). Oko 50 mg tkiva listova usitnjeno je u hladnom tarioniku pomoću tučka uz dodatak tekućeg dušika. Smrvljeno

tkivo prebačeno je u mikroepruvetu te mu je dodano 500 µl pufera za lizu (Genomic Lysis buffer) kojemu je prethodno bilo dodano 1µl po 100µl otopine Proteinaze K koja dolazi s komercijalnim paketom. Uzorci su inkubirani na 60 °C sat i pol uz povremeno miješanje nakon čega im je dodano 200 µl kloroforma. Uzorci su snažno protreseni rukom nakon čega je slijedilo centrifugiranje pri 14000×g, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroepruvetu te mu je dodano 50 µl otopine za odvajanje komponenata (DNA Stripping Solution), pomiješano okretanjem mikroepruvete nekoliko puta te inkubirano 10 minuta na 60 °C. U sljedećem koraku uzorcima je dodano 100 µl otopine za precipitaciju (Precipitation solution) te snažno miješano na vrtložnoj miješalici 20 sekundi. Ukoliko se talog nije pojavio u nekom uzorku, dodavano mu je po 50 µl otopine za precipitaciju (Precipitation solution) sve dok se nakon miješanja talog ne bi pojavio. Uzorci su inkubirani 10 minuta na ledu nakon čega je slijedilo centrifugiranje pri 14000×g, 5 minuta također na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroepruvetu te mu je dodano 500 µl izopropanola. Sadržaj mikroepruveta je pomiješan preokretanjem nekoliko puta te su nukleinske kiseline oborene centrifugiranjem pri 14000×g, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen dekantiranjem te su talozi nukleinskih kiselina isprani sa 700 µl 70%-tnog etanola. Posljednje centrifugiranje je bilo obavljeno pri 14000×g, 5 minuta na 4 °C te su uzorci nakon što je etanol odliven, ostavljeni da se osuše na zraku kako bi etanol ispario. Talozi su otopljeni u 50 µl sterilne deionizirane vode. Koncentracije nukleinskih kiselina u uzorcima određene su pomoću NanoDropa (TermoFisher) te su se kretale od 60 do 840 ng/µl.

U svrhu genotipizacije populacije kestena u Lovranu korišteno je deset pari početnica (Tablica 2) prema Buck i sur. (2003), Marinoni i sur. (2003) i Gobbin i sur. (2007). U tu svrhu svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1×PCR pufera, 1,5 mM magnezijevog klorida, 200 µM dNTP-a, 5µM svake početnice i 2,5 U Taq polimeraze i 1 µl 10 puta razrijeđenog DNA uzorka. Bez obzira na količinu DNA u reakciji, amplifikacija je uvijek bila uspješna. Uzvodne početnice bile su označene različitim fluorescencijskim bojama (Tablica 2). U ovom slučaju kombiniranje više različitih pari početnica nije bilo moguće zbog različitih temperatura sparivanja; početnice koje su bile korištene dane su u Tablica 2. Početna denaturacija trajala je 2 minute pri 94 °C, nakon čega je slijedilo 35 ponavljanja ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na 94 °C tijekom 30 sekundi, sparivanja početnica s kalupom pri različitim temperaturama tijekom 45 sekundi i produljivanja lanaca tijekom 90 sekundi na 72 °C. Završno produljivanje lanaca trajalo je 8 minuta pri 72 °C.

Tablica 2 Sljedovi baza početnica korištenih u lančanoj reakciji polimerazom za određivanje mikrosatelitnih genotipova pitomoga kestena. Označene su fluorescentne boje korištene za pojedinu početnicu te temperature sparivanja korištene u pojedinoj PCR reakciji.

Lokus[1]	Sekvenca početnica (5'→3')	Ta/°C[2]
CsCAT01	**FAM**-GAGAATGCCCACTTTTGCA GCTCCCTTATGGTCTCG	50
CsCAT02	**VIC**-GTAACTTGAAGCAGTGTGAAC CGCATCATAGTGAGTGACAG	55
CsCAT03	**HEX**-CACTATTTTATCATGGACGG CGAATTGAGAGTTCATACTC	50
CsCAT04	**NED**-CATAGGTTCAAACCATACCCGTG CTCATCTTTGTAGGGTATAATACC	55
CsCAT06	**FAM**-AGTGCTCGTGGTCAGTGAG CAACTCTGCATGATAAC	50
CsCAT14	**HEX**-CGAGGTTGTTGTTCATCATTAC GATCTCAAGTCAAAAGGTGTC	58
CsCAT16	**HEX**-CTCCTTGACTTTGAAGTTGC CTGATCGAGAGTAATAAAG	50
CsCAT17	**NED**-TTGGCTATACTTGTTCTGCAAG GCCCCATGTTTTCTTCCATGG	58
EMCs15	**FAM**-CTCTTAGACTCCTTCGCCAATC CAGAATCAAAGAAGAGAAAGGTC	55
OAL	**NED**-CAATCTGAAAAGGTAATAGCCAGT CCCAGGACATAAAATAGAAGCTG	60

[1]Naziv lokusa prema Buck i sur. (2003); Marinoni i sur. (2003); Gobbin i sur. (2007)
[2]Temperatura sparivanja početnica

Nakon završene reakcije po 5 µl svakog uzorka naneseno je na 1,5%-tni agarozni gel te razdvajano tijekom 45 minuta u 1×TBE puferu pri 6 V/cm, identično kao i kod umnažanja mikrosatelitnih lokusa gljive *C. parasitica*. I u ovom slučaju je u gel prije elektroforeze dodana DNA boja Stain G (Serva) te je vizualizacija napravljena pod UV svjetlom na transiluminatoru.

Određivanje veličine DNA produkata obavljeno je pomoću GenScan usluge u Macrogenu, a podaci su analizirani pomoću Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) aplikacije. Za svaki uzorak genotip je određen kao veličina umnoženih mikrosatelitnih biljega (broj baznih parova) za svaki lokus. Podaci o dužini mikrosatelitnog lokusa uneseni su u Excel tablicu (Microsoft) te korišteni u daljim analizama. U ovome slučaju, pošto je kesten diploidan organizam, svaki lokus je bio predstavljen s dva broja, za svaki od dvaju alela.

3.5. Statistička analiza karakteristika populacije pitomih kestena i gljive *Cryphonectria parasitica* u Lovranu

Shannon-Weaverovim (Shannon i Weaver 1949) informacijskim indeksom

$$H = -\sum p_i \, lnp_i$$

i indeksom genotipske raznolikosti Stoddarta i Taylora (Stoddart i Taylor 1988)

$$G = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

gdje p_i predstavlja frekvenciju pojedinih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica*, izračunata je vrijednost raznolikosti populacije gljive. I u ovom slučaju su također izračunate ujednačenosti (Grünwald i sur. 2003)

$$e = \frac{H}{lnN}$$

$$E_5 = \frac{G - 1}{e^H - 1}$$

gdje je *N* broj uzoraka populacije u Lovranu. I u ovom slučaju vrijednost *e* je skalirana na *lnN* pošto je broj hipotetskih, pretpostavljenih genotipova u populaciji bio veći od broja uzoraka. Za genotipiziranu populaciju kestena u Lovranu izračunate su frekvencije alela (p_a) u programu Dispan (Ota 1993). Genetička diferencijacija (G_{ST}) nije bila računata jer je obrađena samo jedna populacija, no izračunata je opažena (H_o) i očekivana (H_e) heterozigotnost u programu Identity 1.0. (Wagner i Sefc 1999), kao i koeficijent inbridinga (F_{IS}) pomoću Fstat 2.9.3.2. (Goudet 2002). Gametska neravnoteža izračunata je pomoću Fisherovog exact testa za statističku značajnost implementiranog u programu Genepop 4.0. (Rousset 2008). Indeks asocijacije I_A i indeks višelokusne neravnoteže r_d izračunati su pomoću programa Multilocus 1.3. (Agapow i Burt 2001). Genalex 6.3. (Peakall i Smouse 2005) paket za Excel korišten je i

u ovom slučaju u analizi glavnih koordinati (PCoA, Principal Coordinates Analysis) a genotipovi pojedinih stabala uzeti su kao ulazni podaci.

Podaci o broju i tipu rakova na stablima kestena odnosno maruna, su preuređeni kako bi se testirala asocijacija između tipova raka – aktivni nasuprot kalusa ili nekroze, i tipa izolata gljive *C. parasitica* izoliranog iz konkretnog raka – virulentni ili hipovirulentni. Osim toga napravljeni su i Fisherov exact test za statističku značajnost da se utvrdi postoji li nerazmjer između određenih tipova vegetativne kompatibilnosti kod izolata uzorkovanih iz prirodne populacije kestena ili s maruna, odnosno zastupljenosti hipovirulentnih izolata. Podaci o zastupljenosti uzoraka različitih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti i broja hipovirulentih uzoraka među njima testirani su Kruskal-Wallis testom implementiranim u programu Past 1.88. (Hammer i sur. 2009).

4. Rezultati

4.1. Karakteristike populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji

Podaci dobiveni kapilarnom elektroforezom su analizirani i alelima su pridruženi brojevi koji označavaju veličinu alela u baznim parovima, kako bi ih se identificiralo. Od 11 analiziranih lokusa *C. parasitica*, tri su bila monomorfna, odnosno u populacijama Hrvatske i Slovenije zastupljena samo s jednim alelom – 499_900, N14_1200 i I01_800, veličina alela redom: 116, 401 i 167 baznih parova. Stoga su iz svih daljnjih analiza ti lokusi, kao neinformativni, isključeni. Podaci za ostale lokuse – broj alela na pojedinom lokusu, genska raznolikost lokusa (*He*) kao i genetička diferencijacija (G_{ST}), te frekvencije alela u pojedinim populacijama prikazani su u Tablica 3. Broj lokusa koji su se bili polimorfni bio je različit u pojedinim populacijama – od pet u Ostrovici do osam u Valterskom Vrhu. Također može se vidjeti kako su neki aleli poput alela 96 na lokusu RO4_775 i alela 280 na lokusu L19_1425, zastupljeni u svim populacijama, dominantni. U Požegi su pronađena dva alela koji prethodno nisu bili zabilježeni u literaturi i to alel 172 na lokusu 327_1075 i alel 254 na lokusu Z06_1400.

Tablica 3 Karakteristike osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa u devet Hrvatskih i Slovenskih populacija gljive *Cryphonectria parasitica*.

Lokus[1]	bp[2]	N_a[3]	h[4]	G_{ST}[5]	$p_{a(CR)}$[6]	$p_{a(HK)}$[6]	$p_{a(M)}$[6]	$p_{a(PZ)}$[6]	$p_{a(B)}$[6]	$p_{a(GS)}$[6]	$p_{a(HP)}$[6]	$p_{a(OC)}$[6]	$p_{a(V)}$[6]	$p_{a(ALL)}$[6]
RO4_775	87	2	0,19	0,10	0,11	0,19	0,30	0,19	0,06	0	0	0	0,12	0,12
	96				0,89	0,81	0,70	0,81	0,94	1	1	1	0,88	0,88
327_1075	169	3	0,38	0,23	0,28	0,85	0,65	0,76	0,47	0,30	0,90	0,79	0,82	0,66
	172				0	0	0	0,10	0	0	0	0	0	0,01
	187				0,72	0,15	0,35	0,14	0,53	0,70	0,10	0,21	0,18	0,33
P13_1250	267	2	0,42	0,20	0,67	0,58	0,61	0,95	0,12	0,35	0,68	0,37	0,53	0,55
	297				0,33	0,42	0,39	0,05	0,88	0,65	0,32	0,63	0,47	0,45
I07_650	272	3	0,56	0,17	0,72	0,35	0,52	0,38	0,7	0,55	0,16	0,16	0,18	0,41
	279				0	0,23	0,35	0,24	0,12	0,10	0,26	0	0,18	0,17
	293				0,28	0,42	0,13	0,38	0,18	0,35	0,58	0,84	0,64	0,42
I01_1990	94	2	0,45	0,15	0,28	0,50	0,48	0,71	0,35	0,20	0,58	0,32	0,82	0,47
	103				0,72	0,5	0,52	0,29	0,65	0,80	0,42	0,68	0,18	0,53
Z06_1400	226	3	0,36	0,29	0,94	0,35	0,57	0,20	0,41	0,70	0,84	1	0,82	0,63
	250				0,06	0,65	0,43	0,71	0,59	0,30	0,16	0	0,18	0,36
	254				0	0	0	0,09	0	0	0	0	0	0,01
L19_1425	280	2	0,05	0,01	1	1	1	1	1	0,95	0,90	1	0,88	0,97
	286				0	0	0	0	0	0,05	0,10	0	0,12	0,03
N19_1190	328	2	0,43	0,18	0,94	0,54	0,65	0,48	0,71	0,60	0,16	0,74	0,41	0,58
	347				0,06	0,46	0,35	0,52	0,29	0,40	0,84	0,26	0,59	0,42

[1] Naziv lokusa prema Davis i sur. (2005)
[2] Naziv alela (broj baznih parova)
[3] Broj alela
[4] Genska raznolikost lokusa među populacijama
[5] Genetička diferenciranost lokusa među populacijama
[6] Frekvencije alela u pojedinim populacijama: CR – Cres, HK – Hrvatska Kostajnica, M – Markuševac, PZ – Požega, B – Brežice, GS – Gornji Suhor, HP – Hočko Pohorje, OC – Ostrovica, V – Valterski Vrh, ALL – sve populacije zajedno.

Nakon određivanja genotipa svakog uzorka, utvrđeno je da na području istraživanja postoji ukupno 66 različitih genotipova gljive *C. parasitica*. Za najčešće opaženi genotip utvrđeno je da je identičan genotipu kojega su identificirali Milgroom i sur. (2008) i nazvali S1 (nazvan H1 u ovom istraživanju). U Hrvatskoj i Sloveniji 21 uzorak u pet različitih populacija (Cres, Markuševac, Brežice, Gornji Suhor i Ostrovica) imao je taj genotip. Genotip S12 (H2 u ovom istraživanju) za koji je utvrđeno da je dominantan u populacijama gljive *C. parasitica* u jugoistočnoj Europi (Milgroom i sur. 2008) u ovom istraživanju bio je zastupljen sa samo šest jedinki. Dva jedinstvena alela pronađena su u tri uzorka iz Požege, a jedan od ta tri uzorka je posjedovao oba jedinstvena alela (Prilog A).

Za svaku populaciju izračunati su Shannon-Weaverov indeks raznolikosti i Stoddart i Taylorov genotipski indeks te skaliranost prvoga (e) i drugoga (G_5). Shannon-Weaverov indeks kretao se između vrijednosti 1,54 u Ostrovici i 2,97 u Hrvatskoj Kostajnici, dok je genotipski indeks bio između vrijednosti 3,44 i 17,79 za iste populacije. Ujednačenosti e i E_5, su međutim ukazivale da u većini populacija nije bilo dominantnog genotipa te su se vrijednosti kretale od 0,79 do 0,98 za e, odnosno 0,67 do 0,91 za G_5. Podaci za svaku populaciju kao i prosječna genska raznolikost (H_I) te broj genotipova prikazani su u Tablica 4. Vrijednosti ujednačenosti bile su nešto niže za populacije s Cresa i kod Ostrovice, u kojima su se zaista i javili genotipovi koji su bili zastupljeni s većim brojem uzoraka – H1 (=S1) zastupljen s 5 i H7 zastupljen sa 6 uzoraka od 18 na Cresu, te H42 zastupljen u 9 od 19 uzoraka sakupljenih kod Ostrovice (Prilog A).

Tablica 4 Genetička raznolikost i karakteristike mikrosatelitnih genotipova gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji.

Populacija[1]	N[2]	N_{pl}[3]	N_{all}[4]	H_I[5]	N_H[6]	H[7]	e[8]	G[9]	E_5[10]
CR	18	7	1,88	0,27±0,07	8	1,77	0,83	4,63	0,75
HK	26	7	2	0,41±0,07	21	2,97	0,98	17,79	0,91
M	23	7	2	0,44±0,07	16	2,65	0,96	12,30	0,86
PZ	21	7	2,38	0,37±0,08	13	2,47	0,96	9,80	0,82
B	17	7	2	0,35±0,07	11	2,20	0,92	7,05	0,76
GS	20	7	2	0,36±0,07	14	2,43	0,92	10,26	0,86
HP	19	7	2	0,32±0,07	15	2,52	0,93	9,26	0,72
OC	19	5	1,63	0,25±0,08	7	1,54	0,79	3,44	0,67
V	17	8	2,13	0,37±0,05	9	2,04	0,93	7,41	0,86

[1] Naziv populacije: CR – Cres, HK – Hrvatska Kostajnica, M – Markuševac, PZ – Požega, B – Brežice, GS – Gornji Suhor, HP – Hočko Pohorje, OC – Ostrovica, V – Valterski Vrh
[2] Broj analiziranih uzoraka
[3] Broj polimorfnih lokusa u populaciji
[4] Prosječan broj alela po lokusu unutar populacije (monomorfni lokusi nisu uzeti u obzir)
[5] Prosječna genska raznolikost sa standardnom pogreškom
[6] Broj različitih genotipova u populaciji
[7] Shannon-Weaverov indeks
[8] Skalirana vrijednost Shannon-Weaverov indeksa
[9] Stoddart i Taylorov genotipski indeks
[10] Skalirana vrijednost Stoddart i Taylorovog genotipskog indeksa

U programu Multilocus izračunate su vrijednosti indeksa asocijacije (I_A), kao i r_d indeks, dok je u programu Genepop izračunata p vrijednost Fisherovim exact testom za gametsku neravnotežu za svaki pojedini par lokusa. Iako su I_A i r_d indeksi bili vrlo niski, ipak su se statistički značajno razlikovali od nule, što ukazuje na djelomičnu klonalost populacija (Tablica 5). Ti indeksi bili su relativno visoki za populacije na Cresu i kod Ostrovice, koje i jesu pokazivale nešto manju raznolikost, odnosno u kojima su i ujednačenosti indeksa raznolikosti ukazivale na dominaciju određenog genotipa, što se odrazilo i na indeksima asocijacije. S druge strane, u populaciji s Hočkog Pohorja, r_d indeks je bio vrlo nizak i nije se statistički razlikovao od nule, odnosno, može se tvrditi da je u populaciji prisutno i vrlo značajno spolno razmnožavanje koje je dovelo do disocijacije gena, odnosno do smanjenja učestalosti pronalaženja određenih alela prisutnih zajedno u različitim jedinkama.

Tablica 5 Gametska neravnoteža među parovima lokusa za svaku populaciju gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji (p vrijednosti za odbacivanje nul-hipoteze – nema gametske neravnoteže u populaciji, dane su u stupcima dva do deset). Lokusi koji su bili monomorfni u svim populacijama nisu uzeti u obzir.

Lokusni par[1]	CR[2]	HK[2]	M[2]	PZ[2]	B[2]	GS[2]	HP[2]	OC[2]	V[2]	χ^{2}[3]	df[4]	P vrijednost[5]
RO4_775 x 327_1075	1,000	1,000	0,028*	0,412	0,471	NA	NA	NA	0,022*	18,115	12	0,112
RO4_775 x P13_1250	0,529	1,000	0,176	1,000	1,000	NA	NA	NA	0,206	7,943	12	0,790
RO4_775 x I07_650	0,065	0,819	0,011*	0,388	0,294	NA	NA	NA	1,000	19,273	12	0,082
RO4_775 x I01_1990	0,065	0,322	0,027*	0,281	0,353	NA	NA	NA	0,222	27,167*	12	0,007*
RO4_775 x Z06_1400	0,111	0,302	0,169	0,403	1,000	NA	NA	NA	1,000	12,216	12	0,429
RO4_775 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,007*	9,834*	2	0,007*
RO4_775 x N19_1190	0,111	1,000	0,052	0,586	1,000	NA	NA	NA	1,000	11,311	12	0,502
327_1075 x P13_1250	0,113	0,613	0,179	1,000	1,000	0,354	1,000	1,000	0,577	11,901	18	0,852
327_1075 x I07_650	0,248	0,411	0,002*	0,261	0,267	0,523	0,164	0,097	0,127	36,525*	18	0,006*
327_1075 x I01_1990	0,008*	0,344	0,027*	0,022*	0,050*	0,061	0,164	1,000	0,001*	53,802*	18	0,000*
327_1075 x Z06_1400	0,278	0,008*	0,041*	0,131	0,335	0,037*	0,298	NA	0,599	32,274*	16	0,009*
327_1075 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	1,000	1,000	NA	0,022*	7,591	6	0,270
327_1075 x N19_1190	0,278	0,598	0,013*	0,012*	0,620	0,161	1,000	0,296	1,000	28,182	18	0,059
P13_1250 x I07_650	0,615	0,877	0,262	1,000	0,073	0,315	0,422	1,000	0,487	14,587	18	0,690
P13_1250 x I01_1990	0,114	0,270	0,400	1,000	0,110	0,587	0,659	0,000*	0,576	31,451*	18	0,026*
P13_1250 x Z06_1400	1,000	0,217	0,197	1,000	0,485	0,354	1,000	NA	0,576	10,939	16	0,813
P13_1250 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	0,351	0,544	NA	0,206	6,451	6	0,374
P13_1250 x N19_1190	1,000	0,021*	1,000	0,476	0,559	0,643	1,000	0,002*	1,000	23,844	18	0,160
I07_650 x I01_1990	0,008*	1,000	0,000*	0,033*	0,045*	0,053	0,372	1,000	0,127	52,930*	18	0,000*
I07_650 x Z06_1400	0,278	0,251	0,001*	0,335	0,604	0,038*	0,011*	NA	0,003*	49,425*	16	0,000*
I07_650 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	0,449	1,000	NA	1,000	1,593	6	0,953
I07_650 x N19_1190	278	0,026*	0,000*	0,000*	0,546	0,817	0,262	1,000	0,786	49,310*	18	0,000*
I01_1990 x Z06_1400	0,278	1,000	0,001*	0,001*	0,018*	0,061	0,058	NA	0,599	52,070*	16	0,000*

Lokusni par[1]	CR[2]	HK[2]	M[2]	PZ[2]	B[2]	GS[2]	HP[2]	OC[2]	V[2]	χ^{2}[3]	df[4]	P vrijednost[5]
I01_1990 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	1,000	1,000	NA	0,022*	7,688	6	0,262
I01_1990 x N19_1190	0,278	0,695	0,009*	0,004*	0,280	1,000	1,000	0,001*	1,000	41,592*	18	0,001*
Z06_1400 x L19_1425	NA	NA	NA	NA	NA	1,000	1,000	NA	1,000	0,000	6	1,000
Z06_1400 x N19_1190	0,055	0,218	0,074	0,062	0,044*	0,644	0,629	NA	0,537	28,913*	16	0,025*
L19_1425 x N19_1190	NA	NA	NA	NA	NA	0,400	1,000	NA	1,000	1,824	6	0,935
I_A[6]	1,391*	0,178*	1,194*	0,636*	0,529*	0,431*	0,140	0,940*	1,247*			
r_d[7]	0,241*	0,030*	0,199*	0,109*	0,090*	0,074*	0,024	0,235*	0,179*			

NA – tablice kontingencije nisu moguće jer je jedan od lokusa u barem jednoj populaciji monomorfan; statistički značajne vrijednosti (<0,05) označene su zvjezdicom (*)

[1] Par lokusa testiran Fisherovim exact testom za gametsku neravnotežu

[2] Naziv populacije: CR – Cres, HK – Hrvatska Kostajnica, M – Markuševac, PZ – Požega, B – Brežice, GS – Gornji Suhor, HP – Hočko Pohorje, OC – Ostrovica, V – Valterski Vrh

[3] χ^2 test na svim populacijama

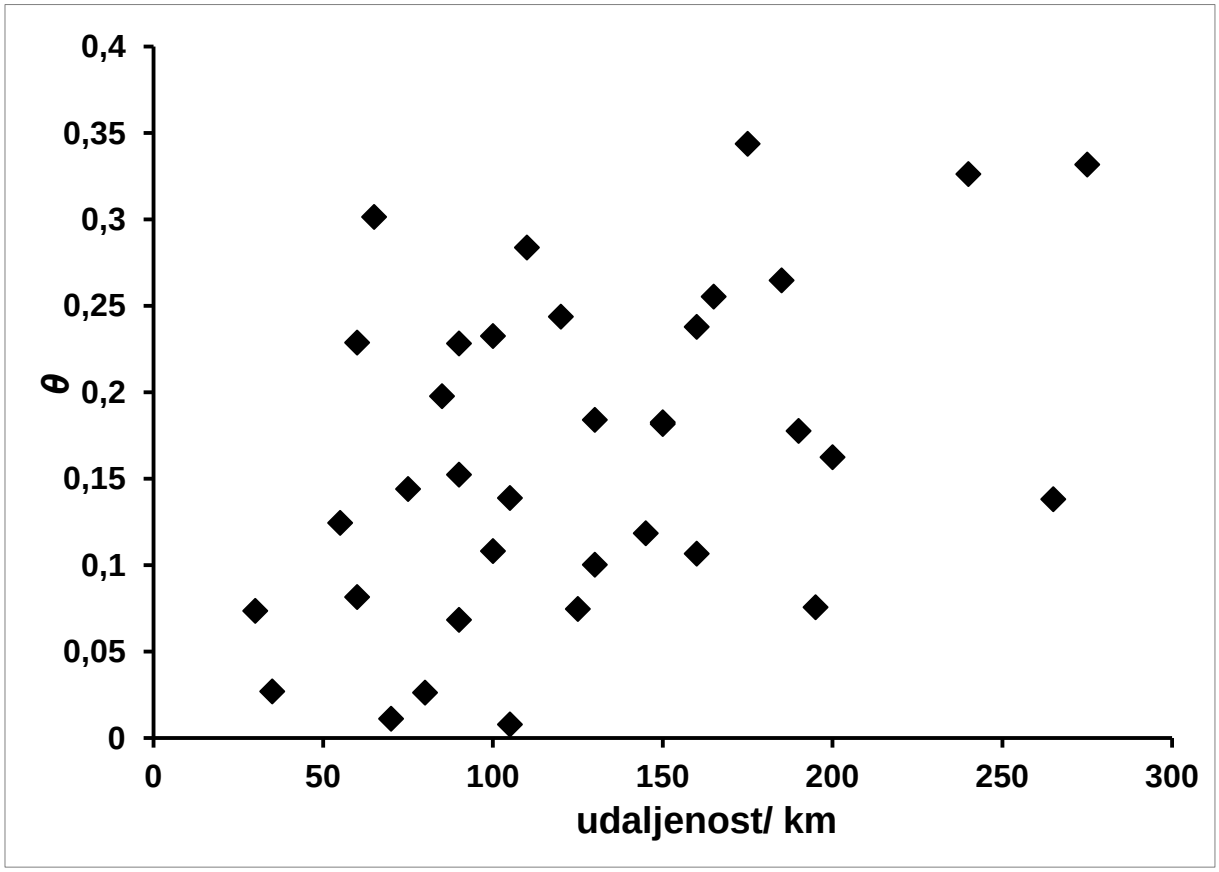
[4] Broj stupnjeva slobode

[5] p vrijednost za odbacivanje nul-hipoteze na svim populacijama

[6] Indeks asocijacije

[7] Indeks višelokusne neravnoteže

Odnos geografske i genetičke diferencijacije među populacijama demonstriran je grafom na kojem se na ordinati nalaze θ (F_{ST}) vrijednosti (genetička diferencijacija za sve parove populacija prema Weir i Cockerham (1984)), dok je udaljenost među populacijama (u kilometrima) dana na apscisi. Izračunata su i dva koeficijenta korelacije koji su bili vrlo niski – Spearman ρ: 0,39923, p vrijednost: 0,015862, i Kendal τ: 0,27978, p vrijednost: 0,013656; iako statistički značajni, što je ukazivalo na postojanje slabe korelacije među ta dva parametra, odnosno općenito slabe diferencijacije populacija (Slika 12).



Slika 12 Ovisnost vrijednosti genetičkog diferenciranja među parovima populacija θ (F_{ST}) i geografske udaljenosti tih parova populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji.

U programu Fstat testirana je statistička značajnost vrijednosti genetičkog diferenciranja θ (F_{ST}) među populacijama (Tablica 6). Vrijednosti pokazuju da s geografskom udaljenošću rastu i vrijednosti θ (F_{ST}), pa su, očekivano, geografski manje udaljene populacije i manje diferencirane – primjeri populacija na Cresu i kod Ostrovice. Dobro (statistički značajno) su odvojene samo najudaljenije populacije, primjerice Creska ili Ostrovička s jedne strane i

Požeška i populacija s Hočkog Pohorja s druge strane. Populacije koje su geografski smještene vrlo blizu ne pokazuju značajniju genetičku diferenciranost, primjerice Markuševac, Brežice i Gornji Suhor.

Tablica 6 Diferencijacija populacija gljive *Cryphonectria parasitica*. U gornjem dijelu tablice dane su θ (F_{ST}) vrijednosti dok su p vrijednosti dane u donjoj. Statistički značajne vrijednosti označene su zvjezdicom.

Populacija[1]	CR	HK	M	PZ	B	GS	HP	OC	V
CR		0,2378*	0,1184	0,3262*	0,1840	0,0683	0,3437*	0,2287	0,2837*
HK	0,00006*		0,0111	0,0262	0,1081	0,1388*	0,1066*	0,1776*	0,0756
M	0,00717	0,19114		0,0746	0,0735	0,0815	0,1440*	0,1826*	0,1002
PZ	0,0006*	0,06383	0,01633		0,2553*	0,2647*	0,1624*	0,3317*	0,1381
B	0,00289	0,00617	0,04389	0,00025*		0,0269	0,3014*	0,2437*	0,2325*
GS	0,02469	0,00047*	0,01019	0,00006*	0,23322		0,2282*	0,1523*	0,1977*
HP	0,00003*	0,00089*	0,00064*	0,00011*	0,00003*	0,00006*		0,1816*	0,0078
OC	0,00158	0,00003*	0,00028*	0,00003*	0,00006*	0,00075*	0,00031*		0,1244
V	0,00017*	0,02378	0,00867	0,00264	0,00039*	0,00067*	0,42119	0,00522	

[1] Naziv populacije: CR – Cres, HK – Hrvatska Kostajnica, M – Markuševac, PZ – Požega, B – Brežice, GS – Gornji Suhor, HP – Hočko Pohorje, OC – Ostrovica, V – Valterski Vrh

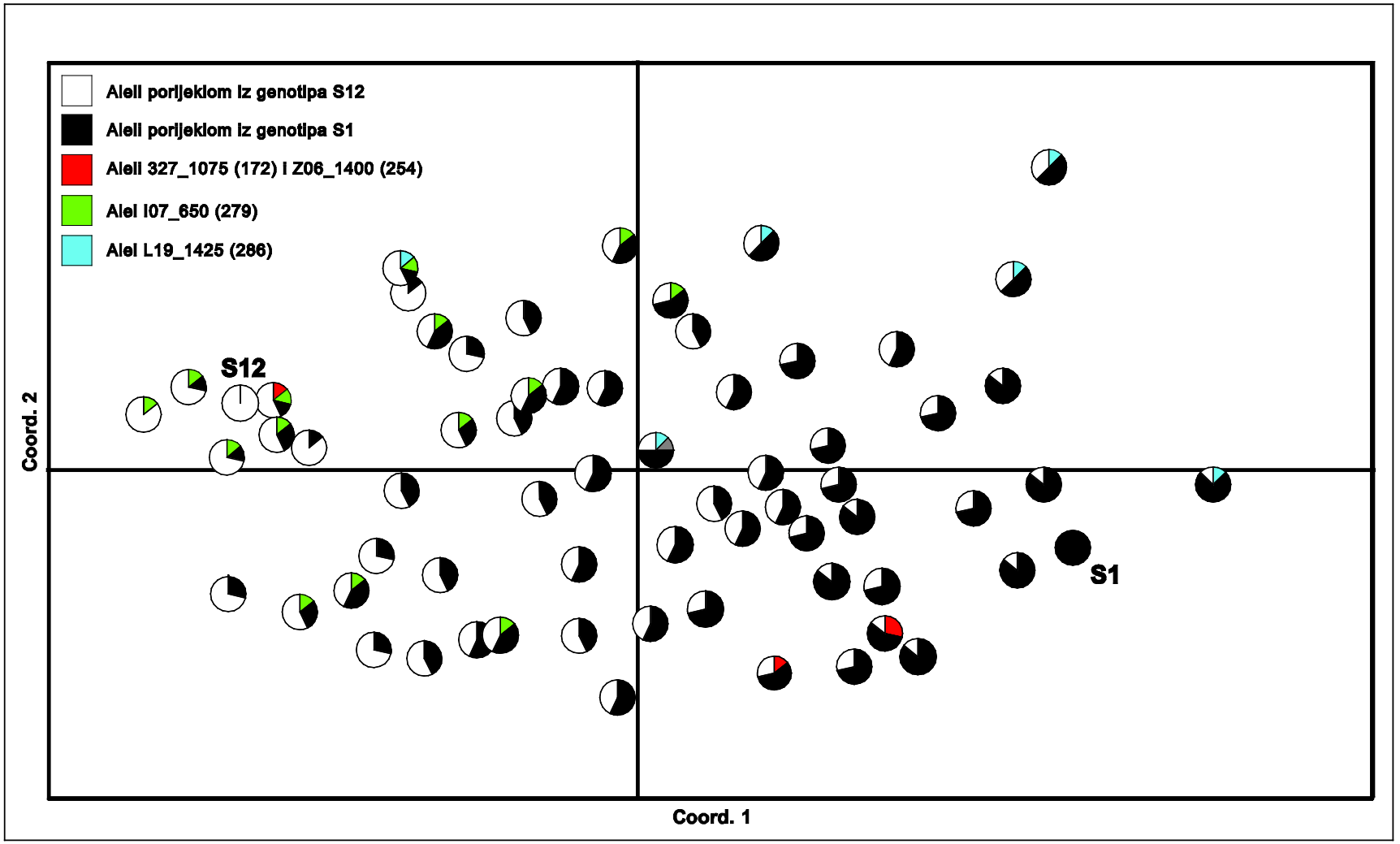
U programu Past istražena je i korelacija između pojavljivanja određenog genotipa i tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti, no samo je za Cresku populaciju ona bila statistički značajna (Tablica 7); odnosno u većini populacija zabilježena je disocijacija genotipa i tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti. Primjerice tri najčešća tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti pronađeni su u asocijaciji, redom, EU1 s čak 24 različita genotipa, EU2 s 19 i EU12 s 18. Vrijedi i obrnuto, primjerice najčešće pronađeni genotip, H1 (=S1), bio je asociran s tipovima vegetativne (ne)kompatibilnosti EU1, EU2, EU5 i EU12. Za svaku istraživanu populaciju izračunate su vrijednosti Cramerovog koeficijenta V, te su, temeljene na χ^2 testu, dane i p vrijednosti: vjerojatnosti nepostojanja asocijacije između mikrosatelitnog genotipa i tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti.

Tablica 7 Vjerojatnost nalaženja određenost tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti i mikrosatelitnog genotipa u istraživanim populacijama gljive *Cryphonectria parasitica*. Statistički značajna vrijednost asociranosti označena je zvjezdicom.

Populacija[1]	P-vrijednost[2]	V[3]
CR	0,014*	1,000
HK	0,240	0,936
M	0,424	0,878
PZ	0,178	0,810
B	0,164	0,908
GS	0,153	0,893
HP	0,231	0,884
OC	0,071	0,694
V	0,268	0,914

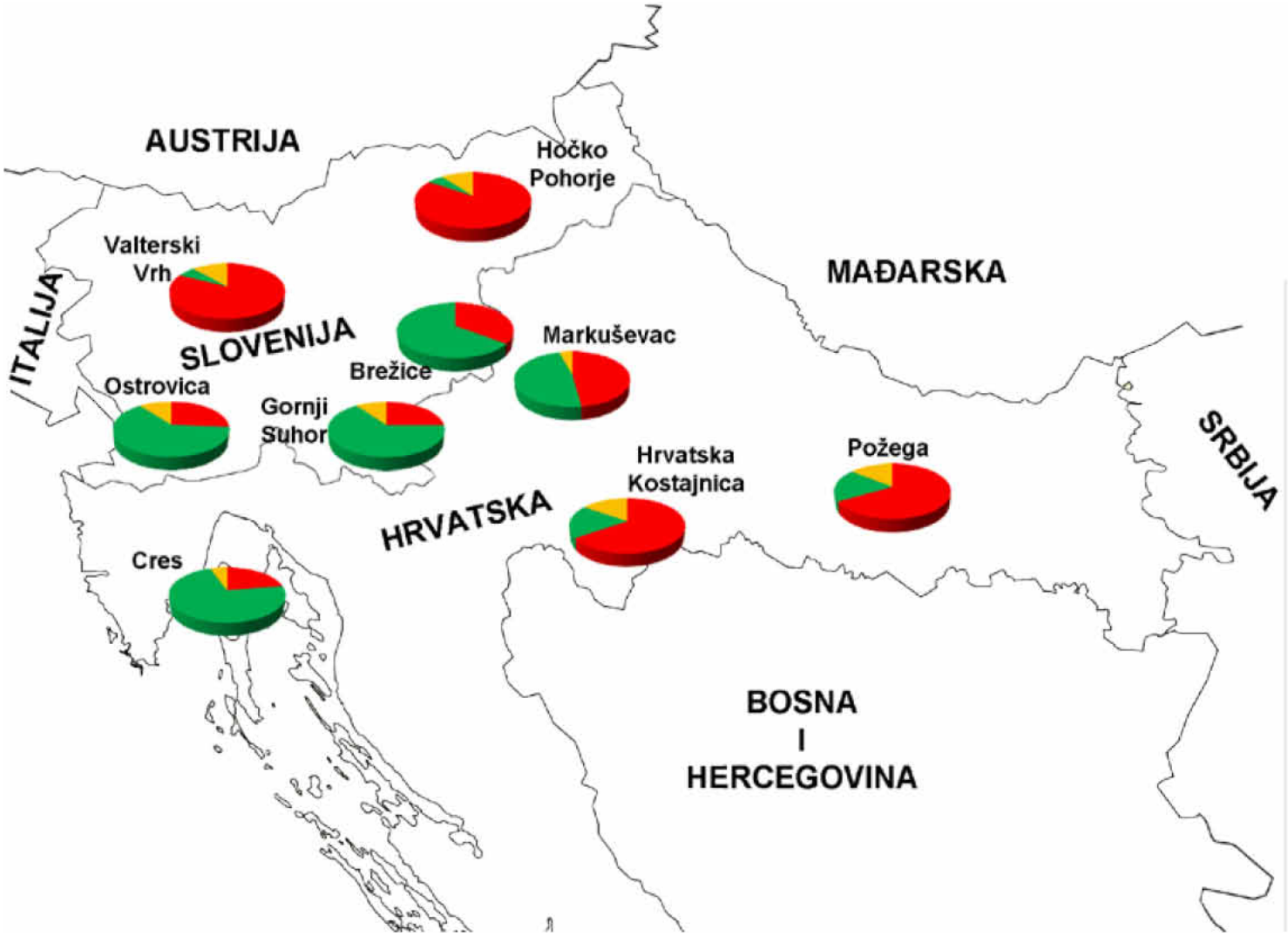
[1] **Istraživana populacije: CR – Cres, HK – Hrvatska Kostajnica, M – Markuševac, PZ – Požega, B – Brežice, GS – Gornji Suhor, HP – Hočko Pohorje, OC – Ostrovica, V – Valterski Vrh**
[2] **P vrijednost vjerojatnosti da ne postojanja asocijacija između mikrosatelitnog genotipa i tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti)**
[3] **Cramerov koeficijent V**

Graf analize glavnih koordinata (PCoA) ukazivao je na vrlo ujednačenu (homogenu) populaciju. Pažljivom analizom može se utvrditi da se od 180 analiziranih uzoraka (66 različitih genotipova) njih čak 149 (46 različitih genotipova) može nastati kao posljedica samo jednog reproduktivnog događaja između pretpostavljenih genotipova H1 (=S1) i H2 (=S12). Stoga su u grafu analize glavnih koordinata (PCoA) ta dva genotipa posebno označena, kao i njihovo pretpostavljeno potomstvo (Slika 13).



Slika 13 Analiza glavnih kordinata za populacije gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji. Tortni dijagrami označavaju udio pretpostavljenih roditeljskih genoma u svakom nađenom genotipu. Prva os opisuje 27,2% genetičke varijabilnosti, a druga 21,3%.

U programu Structure napravljeno je Bayesovsko strukturiranje populacija. Niti za najbolji model, pri vrijednosti K=2, nije došlo do jakog odjeljivanja populacija, iako je trend sjeverozapad-jugoistok vidljiv. Većina uzoraka u zapadnim, odnosno priobalnim populacijama bila je srodnija i priklanjala se jednoj potencijalnoj grupi, dok su uzorci iz istočnijih, kontinentalnih populacija uglavnom bili srodniji drugoj grupi (Slika 14). Valja istaknuti da su mnogi uzorci pokazivali miješano porijeklo, te ih Bayesovska analiza nije uspješno razvrstala u jednu ili u drugu grupu, što se već i pokazalo u PCoA.



Slika 14 Pripadnost jedinki određenoj grupi prema Bayesovskoj analizi provedenoj u programu Structure; pripadnost grupi je procijenjena tako da ukoliko je jedinka pokazivala 70% pripadnosti jednoj grupi je bila smještena u tu skupinu (označeno zeleno ili crveno u tortnim dijagramima), dok su ostale jedinke, koje su pokazivale manje od 70% udjela pojedinog pretpostavljenog roditeljskog genotipa posebno označene (narančasto).

4.2. Karakteristike populacije kestena u Lovranu

Analizom deset mikrosatelitnih lokusa prirodne populacije necijepljenih kestena i cijepljenih kestena – maruna u Lovranu omogućeno je jednoznačno razdvajanje tih dvaju skupina. Na taj način omogućena je usporedba među populacijama patogena na kestenima i na marunima. Genotipizacijom kestena utvrđeno je da je svaki lokus predstavljen s tri (na lokusima CsCAT14 i EMCs15) do devet alela (na lokusu CsCAT03), dok je ukupno nađeno 54 alela u čitavoj populaciji. Prosječna heterozigotnost (*h*) je bila 0,641 ±0,055. U ovom slučaju monomorfni lokusi nisu pronađeni (Tablica 8). Inbriding koeficijent (F_{IS}) za istraživane lokuse je u većini slučajeva bio je negativan, što je ukazivalo na veći broj heterozigota u populaciji od očekivanog. Podaci za sve genotipizarne kestene s područja Lovrana dani su u Prilogu B.

Tablica 8 Karakteristike deset mikrosatelitnih lokusa populacije pitomoga kestena iz Lovrana

Lokus[1]	bp[2]	p_a[3]	H_e[4]	H_o[5]	F_{IS}[6]
CAT01	193	0,442	0,697	0,808	-0,139
	206	0,019			
	208	0,038			
	214	0,135			
	216	0,019			
	218	0,058			
	222	0,288			
CAT02	207	0,115	0,763	1,000	-0,292
	211	0,058			
	215	0,250			
	221	0,019			
	225	0,250			
	231	0,308			
CAT03	197	0,019	0,833	0,962	-0,135
	213	0,154			
	225	0,154			
	227	0,231			
	233	0,135			
	241	0,212			
	245	0,019			
	253	0,038			
	255	0,038			
CAT04	213	0,654	0,521	0,500	0,059**
	221	0,192			
	235	0,038			
	237	0,115			
CAT06	158	0,173	0,748	0,769	-0,009
	164	0,096			
	172	0,404			
	177	0,019			
	180	0,038			
	182	0,212			
	194	0,058			
CAT14	133	0,558	0,587	0,731	-0,227
	141	0,173			
	150	0,269			
CAT16	126	0,365	0,670	0,923	-0,361
	132	0,250			
	143	0,365			
	147	0,019			
CAT17	130	0,038	0,717	0,692	0,055
	138	0,019			
	142	0,019			
	146	0,346			
	152	0,327			
	154	0,019			
	160	0,231			
Cs15	83	0,038	0,240	0,192	0,219
	86	0,096			
	92	0,865			
OAL	298	0,635	0,511	0,654	-0,261
	302	0,0,38			
	306	0,0,38			
	310	0,288			

[1]Naziv lokusa prema Buck i sur. (2003); Marinoni i sur. (2003); Gobbin i sur. (2007)
[2]Naziv alela (broj baznih parova)
[3]Učestalost pojedinog alela u populaciji
[4]Očekivana genetička raznolikost
[5]Opažena genetička raznolikost
[6]Koeficijent inbridinga, izračunat u Fstatu

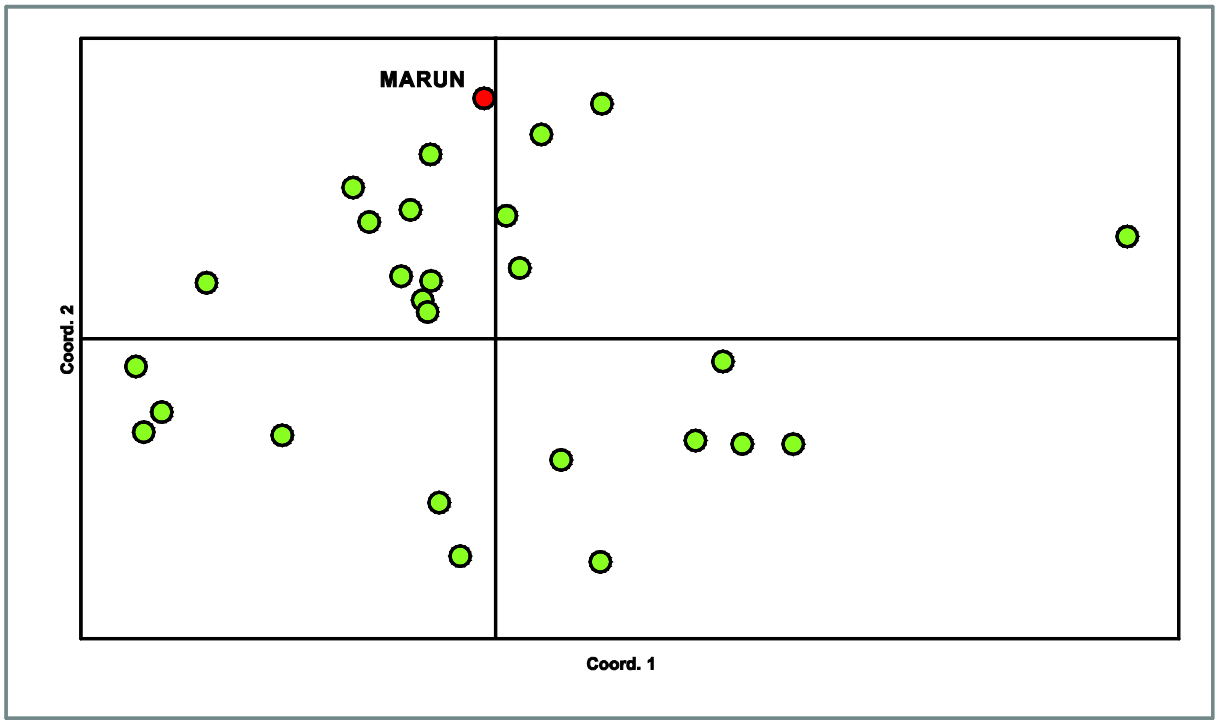
Gametska neravnoteža među parovima lokusa analizirana je programom Genepop i utvrđeno je da osam od 45 parova istraživanih lokusa nisu u ravnoteži (Tablica 9).

Tablica 9 Gametska neravnoteža među parovima lokusa u pitomoga kestena u Lovranu. Statistički značajne P vrijednosti za odbacivanje nul-hipoteze – nema gametske neravnoteže, označene su zvjezdicom.

Lokusni par[1]	P vrijednost[2]	Lokusni par[1]	P vrijednost[2]
CsCAT01 x CsCAT03	0,90889	CsCAT04 x CsCAT14	0,930845
CsCAT01 x CsCAT04	0,037910*	CsCAT04 x CsCAT02	0,457445
CsCAT01 x CsCAT06	0,568300	CsCAT04 x EMCs15	0,310555
CsCAT01 x CsCAT17	0,101515	CsCAT04 x CsCAT016	0,951685
CsCAT01 x OAL	0,092870	CsCAT06 x CsCAT17	0,524975
CsCAT01 x CsCAT14	0,237185	CsCAT06 x OAL	0,050130
CsCAT01 x CsCAT02	0,033660*	CsCAT06 x CsCAT14	0,524510
CsCAT01 x EMCs15	0,199325	CsCAT06 x CsCAT02	0,084030
CsCAT01 x CsCAT016	0,012540*	CsCAT06 x EMCs15	0,039850*
CsCAT02 x EMCs15	0,628250	CsCAT06 x CsCAT016	0,034750*
CsCAT02 x CsCAT016	0,011515*	CsCAT14 x CsCAT02	0,382555
CsCAT03 x CsCAT04	0,728725	CsCAT14 x EMCs15	0,820410
CsCAT03 x CsCAT06	0,255975	CsCAT14 x CsCAT016	0,076060
CsCAT03 x CsCAT17	0,461415	CsCAT17 x OAL	0,207115
CsCAT03 x OAL	0,477525	CsCAT17 x CsCAT14	0,380175
CsCAT03 x CsCAT14	0,061715	CsCAT17 x CsCAT02	0,722490
CsCAT03 x CsCAT02	0,100550	CsCAT17 x EMCs15	0,722755
CsCAT03 x EMCs15	0,036560*	CsCAT17 x CsCAT016	0,832405
CsCAT03 x CsCAT016	0,853950	EMCs15 x CsCAT016	0,196450
CsCAT04 x CsCAT06	0,465150	OAL x CsCAT14	0,958530
CsCAT04 x CsCAT17	0,767105	OAL x CsCAT02	0,743720
CsCAT04 x OAL	0,375830	OAL x EMCs15	0,266010
		OAL x CsCAT016	0,036245*

[1] Par lokusa testiran Fisherovim exact testom za gametsku neravnotežu
[2] P vrijednost statističke značajnosti gametske neravnoteže

Indeks asocijacije I_A iznosio je 0,350, dok je indeks višelokusne neravnoteže r_d bio 0,039, p vrijednost: 0,006. Među necijepljenim pitomim kestenima s područja Lovrana nisu pronađena dva s identičnim genotipom, dok su gotovo svi cijepljeni kesteni pripadali jednom genotipu (klon). Graf glavnih koordinata (PCoA) ilustrira jedinstvenost genotipa maruna (Slika 15).



Slika 15 Grafički prikaz analize glavnih koordinata (PCoA), genotipovi necijepljenih kestena označeni su zeleno, dok je genotip maruna označen crveno. Koordinate pridonose s 26,41% odnosno 19,31% genetičke varijabilnosti.

4.3. Karakteristike populacije gljive *Cryphonectria parasitica* u Lovranu

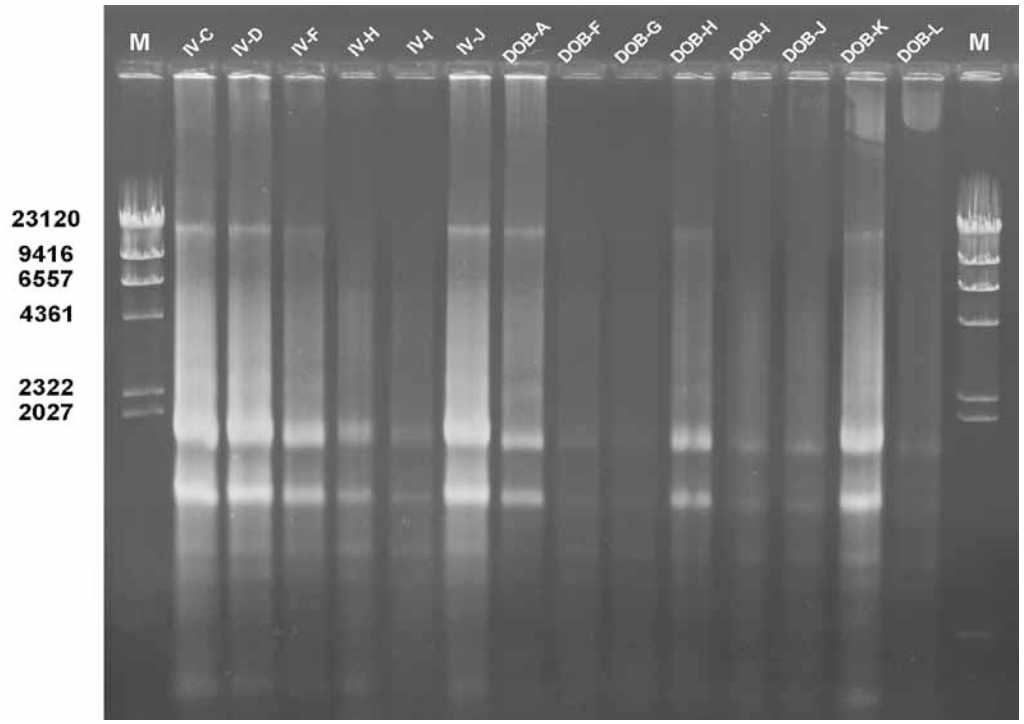
Učestalost raznih tipova raka na kestenima i marunima prikazana je u Tablica 10. Može se uočiti daleko veći broj aktivnih rakova prisutnih u maruna nego u necijepljenih pitomih kestena, odnosno manji broj nekroza i potpuni izostanak kalusirajućih rakova. Broj virulentnih uzoraka izoliranih s maruna također je bio nešto veći, no posebno je zanimljiv nalaz većeg broja hipovirulenih izolata povezanih s aktivnim rakom.

Tablica 10 Karakteristike uzorkovanih rakova s necijepljenih i cijepljenih kestena – maruna u Lovranu

Soj dsRNA[3]	Necijepljeni kesteni[1]				Maruni[2]			
	A[4]	K[5]	N[6]	Ukupno	A[4]	K[5]	N[6]	Ukupno
Virulentni (-dsRNA)	10	0	0	10	15	0	0	15
Hipovirulentni (+dsRNA)	4	5	7	16	10	0	1	11
Ukupno	14	5	7	26	25	0	1	26

[1]Necijepljeni pitomi kesteni
[2]Cijepljeni pitomi kesteni (potvrđeno maruni)
[3]Virulentni soj, dsRNA nije potvrđena, hipovirulentni soj, dsRNA je potvrđena
[4]Aktivni rak
[5]Kalusirajući rak
[6]Površinska nekroza

Uzorci su karakterizirani kao virulentni ukoliko nakon izolacije dsRNA iz micelija gljive *C. parasitica* i agarozne gel elektroforeze karakteristična vrpca CHV-1 dsRNA nije bila vidljiva, odnosno hipovirulentni ukoliko je ona bila prisutna (Slika 16).



Slika 16 Elektroforeza uzoraka hipovirusne dsRNA izolirane iz micelija gljiva *Cryphonectria parasitica* s područja Lovrana u 0,8%-tnom agaroznom gelu, primjer za Ivuliće (IV-C, -D, -F, -H, -I i -J) i Dobreć (DOB-A, -F, -G, -H, -I, -J, -K i -L). Korišteni standard za određivanje molekularne mase je λ/*Hin*dIII (Promega), dok brojevi označavaju duljinu fragmenta u parovima baza.

Za izolate gljive *C. parasitica* određeni su tipovi vegetativne (ne)kompatibilnosti te je utvrđeno da ne postoji značajna razlika između učestalosti javljanja određenog tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti u skupini uzoraka izoliranih s maruna i onih izoliranih s prirodne populacije kestena. Indeksi raznolikosti, kao i skalirane vrijednosti istih za obje skupine uzoraka *C. parasitica* (izoliranih s necijepljenih kestena, izoliranih s maruna, kao i sumarni indeksi) prikazani su u Tablica 11. Skaliranost je i u ovom slučaju ukazivala na veliku raznolikost populacije *C. parasitica* u Lovranu.

Tablica 11 Karakteristike gljive *Cryphonectria parasitica* uzorkovane s necijepljenih kestena i maruna u Lovranu

vc tip[5]	Necijepljeni kesteni[1]		Maruni[2]	
	Virulentni (-dsRNA)[3]	Hipovirulentni (+dsRNA)[4]	Virulentni (-dsRNA)[3]	Hipovirulentni (+dsRNA)[4]
EU1	0,15	0,07	0.23	0.15
EU2	0,11	0,22	0.19	0.04
EU12	0,00	0,15	0.04	0.12
EU13	0,04	0,07	0.04	0.00
EU15	0,04	0,00	0.00	0.04
EU17	0,07	0,07	0.08	0.08
ukupno	0,41	0,58	0.58	0.43
H[6]	1,617		1,532	
e[7]	0,838		0,772	
G[8]	4,44		3,98	
E_5[9]	0,853		0,821	

[1]Necijepljeni pitomi kesteni
[2]Cijepljeni pitomi kesteni (potvrđeno maruni)
[3]Zastupljenost tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti u virulentnom soju, dsRNA nije potvrđena
[4]Zastupljenost tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti u hipovirulentnom soju, dsRNA potvrđena
[5]Tip vegetativne (ne)kompatibilnosti određenog uzorka
[6] Shannon-Weaverov indeks
[7] Skalirana vrijednost Shannon-Weaverov indeksa
[8]Stoddart i Taylorov genotipski indeks
[9] Skalirana vrijednost Stoddart i Taylorovog genotipskog indeksa

Razlike također nije bilo ni u brojnosti hipovirulentnih uzoraka kao ni u njihovom "rasporedu" među različitim tipovima vegetativne (ne)kompatibilnosti, što je pokazao Kruskall-Wallis test (Tablica 12).

Tablica 12 Rezulati Kruskal-Wallis testa u usporedbi skupina uzoraka *C. parasitica* raznih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti i prisutnosti, odnosno odsutnosti CHV-1 dsRNA

Skupina[1]	Necijepljeni kesteni Vir. uzorak (-dsRNA)[2]	Necijepljeni kesteni Hipovir. uzorak (+dsRNA)[3]	Maruni Vir. uzorak (-dsRNA)[4]	Maruni Hipovir. uzorak (+dsRNA)[5]
Necijepljeni kesteni Vir. uzorak (-dsRNA)[2]		0,522	0,750	0,936
Necijepljeni kesteni Hipovir. uzorak (+dsRNA)[3]	1		1	0,689
Maruni Vir. uzorak (-dsRNA)[4]	1	1		0,810
Maruni Hipovir. uzorak (+dsRNA)[5]	1	1	1	

[1]Uspoređivana skupina
[2]Necijepljeni pitomi kesteni s virulentnim uzorkom gljive *Cryphonectria parasitica*
[3]Necijepljeni pitomi kesteni s hipovirulentnim uzorkom gljive *Cryphonectria parasitica*
[4]Cijepljeni kesteni, maruni s virulentnim uzorkom gljive *Cryphonectria parasitica*
[5]Cijepljeni kesteni, maruni s hipovirulentnim uzorkom gljive *Cryphonectria parasitica*

Iako je brojnost hipoviruletnih uzoraka izoliranih s kestena i maruna bila podjednaka, broj aktivnih rakova na marunima je bio veći, kao i broj aktivnih rakovima s hipoviruletnim uzorcima. Dapače, vjerojatnost nalaženja hipovirulentnog uzorka na marunu i to u aktivnom raku je mnogo veća nego na kestenima.

Tablica 13 Tablica s preuređenim podacima korištena za Fisherov exact test kako bi se utvrdila značajnost postojanja razlike učestalosti tipova rakova izoliranih s necijepljenih kestena i maruna u Lovranu

Podjela[1]	Necijepljeni kesteni[2]	Maruni[3]
A[4]	14	25
K/N[5]	12	1
A Hipovir. uzorak[6]	4	15
K/N Hipovir. uzorak[7]	12	1

[1]Način razvrstavanja uzoraka
[2]Necijepljeni pitomi kesteni
[3]Cijepljeni pitomi kesteni – maruni
[4]Uzorak s aktivnim rakom
[5]Uzorak s kalusirajućim rakom ili nekrozom
[6]Uzorak s aktivnim rakom iz koga je izoliran hipovirulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*
[7]Uzorak s kalusirajućim rakom ili nekrozom iz koga je izoliran hipovirulentni soj gljive *Cryphonectria parasitica*

Fisherov exact test pokazao je da su aktivni rakovi mnogo češći na marunima nego na kestenima (p vrijednost 0,00082), kao i veću vjerojatnost nalaženja aktivnih rakova iz kojih je izolirana gljiva *C. parasitica* hipovirulentne morfologije na marunima (p vrijednost 0,00017).

Činjenica da su u maruna hipovirulenti uzorci gljive *C. parasitica* pronađeni u aktivnim rakovima češće nego u prirodnoj populaciji kestena, te odsustvo kalusa je vrlo neobična situacija koja ukazuje na slabiji oporavak maruna od bolesti raka kore kestena.

5. Rasprava

Tijekom ovog istraživanja otkriveno je da je genetska raznolikost populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji izuzetno velika. Među 180 uzoraka nađeno je čak 66 različitih genotipova. Nasuprot tome u zemljama južno i istočno od ovog istraživanog područja – u Bugarskoj, Grčkoj, Makedoniji, Rumunjskoj i Turskoj, među 373 uzoraka nađeno je svega osam različitih genotipova s izuzetnom dominacijom jednoga – S12 (Milgroom i sur. 2008). Stoga autori smatraju da su sve te populacije nastale klonalnim razmnožavanjem tijekom posljednjih 40-tak godina otkako je *C. parasitica* unesena na ta područja. Hipotezu potvrđuju činjenicom da je na tim područjima uglavnom zabilježen *MAT1-1* idiomorf, kao i vrlo mali broj različitih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti koji su vrlo dobro korelirani s mikrosatelitnim genotipovima prisutnim na tom području. Spolno razmnožavanje gljive moguće je jedino uz prisutnost obaju – *MAT1-1* i *MAT1-2* idiomorfa na nekom području, što u istraživanim populacijama nije slučaj. Nasuprot tome, u Sloveniji i Hrvatskoj, zabilježena su oba idiomorfa toga gena i to podjednake učestalosti (Krstin i sur. 2008, 2011). Isti istraživači su utvrdili mnogo veću raznolikost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti *C. parasitica* na istraživanim područjima, nego što je bila, primjerice, u Makedoniji (Sotirovski i sur. 2004), Mađarskoj, Rumunjskoj i Ukrajini (Radócz 2001) ili Turskoj (Akilli i sur. 2009), nalaz koji je potvrđen i ovim istraživanjem. Uspoređivanjem rezultata dobivenih na temelju određivanja tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti i analize mikrosatelitnih lokusa može se utvrditi vrlo veliko podudaranje metoda u procjeni genske raznolikosti populacija kao i mogućnosti procjene dominantnog tipa načina razmnožavanja *C. parasitica*. U slučaju populacija jugoistočne Europe gdje je zabilježen mali broj različitih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti i mikrosatelitnih genotipova kao i izuzetna dominacija jednoga, u kombinaciji s gotovo isključivom prisutnošću jednog *MAT1* idiomorfa, može se govoriti u klonalnom razmnožavanju i rasprostiranju *C. parasitica*, uglavnom konidiosporama. Nasuprot tome, u populacijama Hrvatske i Slovenije gdje je utvrđena značajna raznolikost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti, velik broj mikrosatelitnih genotipova, a bez značajne dominacije jednoga, zajedno s pronalaskom obaju idiomorfa *MAT1* gena, može se govoriti o populacijama koje se razmnožavaju i spolno, askosporama. Razmnožavanje, odnosno rasprostiranje konidiosporama je u životnim ciklusu *C. parasitica*, naravno, važno, no utvrđena raznolikost populacija na istraživanim područjima može biti samo posljedica spolnog razmnožavanja (Liu i Milgroom 2007).

Veliki broj mikrosatelitnih genotipova zabilježen je i u populacijama gljive *C. parasitica* u zemljama zapadno od Hrvatske – Italiji (Milgroom i sur. 2008), Francuskoj i zapadnoj Španjolskoj (Breuillin i sur. 2006; Dutech i sur. 2010) te u južnoj Švicarskoj (Prospero i Rigling 2012). Najzapadnije i sjeverne europske populacije gljive *C. parasitica* pokazuju mnogo manju genetsku raznolikost, od populacija koje se nalaze u široj okolici sjeverne Italije (Toskana), a gdje i jest prvi puta u Europu zabilježena gljiva *C. parasitica* 1938. godine (Biraghi 1946). Petnaestak godina kasnije rak kore kestena pojavio se i na području Hrvatske i Slovenije i to 1950. godine u Sloveniji (Krstić 1950), a 1955. godine u Hrvatskoj, u okolici Lovrana (Kišpatić 1956). Istočnije, zapadnije i sjevernije europske zemlje bile su pošteđene bolesti do kraja 70-tih i 80-tih godina (Robin i Heiniger 2001). Prema ovim podacima može se zaključiti da je gljiva *C. parasitica* na području Hrvatske i Slovenije prisutna oko 60 godina, kraće nego u sjevernoj Italiji, no dulje nego u istočnoj Europi. Time se populacije patogena *C. parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji smještaju među starije u Europi, pošto je rak kore kestena drugim europskim regijama primijećen tek tijekom 70-tih i 80-tih godina XX. stoljeća, a i kasnije (Robin i Heiniger 2001).

Ovi podaci dobro se preslikavaju ukoliko se usporede razni indeksi genske raznolikosti istraživanih populacija gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji s onima iz susjednih zemalja. Primjerice, indeksi raznolikosti populacija gljive *C. parasitica* u Italiji (Milgroom i sur. 2008) i Francuskoj (Breuillin i sur. 2006; Dutech i sur. 2010) bliži su vrijednostima utvrđenim ovim istraživanjem, za razliku populacija jugoistočne Europe (Milgroom i sur. 2008) za koje je utvrđena mnogo manja raznolikost. Indeks asocijacije (I_A), kao i indeks višelokusne neravnoteže (r_d) su ukazivali da su aleli uglavnom neasocirani, što je utvrđeno i za populacije u Italiji i Francuskoj (Breuillin i sur. 2006; Milgroom i sur. 2008), za razliku od populacija jugoistočne Europe za koje su ti indeksi bili visoki (r_d se približava vrijednosti 1) (Milgroom i sur. 2008). Visoki r_d dobra je indikacija dominantno klonalnog, nespolnog razmnožavanja ovog patogena na jugoistoku Europe. U ovom istraživanju iako su pojedini parovi lokusa bili u neravnoteži, mnogi ipak nisu značajno odstupali od Hardy-Weinbergove ravnoteže. To je vrlo snažna indikacija da se populacije gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji uglavnom razmnožavaju spolno te da je od trenutka uspostavljanja populacija na ovim prostora došlo do značajnih rekombinacija gena među jedinkama (Robin i Heiniger 2001; Liu i Milgroom 2007; Milgroom i sur. 2008). To, naravno, predstavlja određeni problem, pošto daljim spolnim razmnožavanjem mogu nastati novi tipovi vegetativne (ne)kompatibilnosti (kao posljedica rekombinacije među *vic* lokusima), koji su rijetki i koji

mogu stoga biti dobro zaštićeni od prijenosa CHV-1, pošto se virus nesmetano prenosi samo anastomozama među vegetativno kompatibilnim hifama (Nuss 1992; Cortesi i sur. 2001). Povećanje frekvencije vegetativno nekompatibilnih jedinki može se stoga nepovoljno odraziti na prirodnu biološku kontrolu raka kore kestena.

Indeksi raznolikosti temeljeni na tipovima vegetativne (ne)kompatibilnosti i mikrosatelitnim genotipovima, ponešto se razlikuju, no ipak ukazuju na poprilično dobru korelaciju ovih dviju metoda u procjenjivanju genske raznolikosti populacija – populacije koje pokazuju veće vrijednosti Shannonovog indeksa jednom metodom, pokazuju veće vrijednosti i drugom metodom. Usporedbom skaliranih vrijednosti indeksa raznolikosti dobije se mnogo bolja slika, pošto je broj detektiranih tipova vegetativne kompatibilnosti manji od broja mikrosatelitnih genotipova, najviše zbog same prirode istraživanih biljega, odnosno broja mogućih kombinacija tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti s jedne strane i broja mogućih mikrosatelitnih genotipova s druge. Najveći mogući broj tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti je 64 pod pretpostavkom postojanja šest dialelnih *vic* lokusa, dok je ukupan, maksimalan broj mogućih mikrosatelitnih genotipova na području Hrvatske i Slovenije 864 (pod pretpostavkom postojanja osam raznolikih lokusa kao i većeg broja alela na određenim lokusima (Tablica 3)). Shannononov indeks (*H*) kao i indeks genotipske raznolikosti Stoddarta i Taylora (*G*), uzimaju u obzir i bogatstvo (*richness*) i raznolikost (*diversity*), a pošto je broj mogućih kombinacija dobivenih mikrosatelitnim lokusima puno veći nego kod vic lokusa, ti indeksi, posljedično, pokazuju veće vrijednosti. Skalirane vrijednosti tih indeksa su ipak, u oba slučaja podjednake i ukazuje da su oba načina istraživanja raznolikosti populacija gljive *C. parasitica* dobro korelirani i vrijedni u procjenjivanju stanja populacija. To je zanimljivo, jer se smatra da mikrosatelitni lokusi nisu pod selekcijskim pritiskom, odnosno da je riječ o takozvanim neutralnim markerima, za razliku od *vic* lokusa koji bi trebali biti pod selekcijski pritiskom pošto su upravo oni odgovorni za mogućnost prijenosa CHV-1 među jedinkama gljive *C. parasitica* (Cortesi i sur. 2001). Stoga bi se broj, odnosno učestalost određenih alela u populaciji trebao mijenjati na drugačiji način kod *vic* lokusa nego kod mikrosatelitnih lokusa, što bi kao posljedicu imalo i različite vrijednosti procijenjenih skaliranih indeksa raznolikosti populacija. Međutim, (Milgroom i Cortesi 1999) su utvrdili da je selekcijski pritisak na *vic* lokuse manji nego što se prvotno mislilo, stoga je ovaj rezultat u vrlo dobroj korelaciji s prethodno objavljenim istraživanjima.

Pošto su (Milgroom i sur. 2008) koristili iste mikrosatelitne lokuse u analizi populacija jugoistočne Europe, kao i dviju talijanskih populacija, rezultati su lako usporedivi. Najviše zastupljeni genotip u jugoistočnoj Europi, nazvan S12, bio je prisutan u samo šest uzorka porijeklom iz Hrvatske. Tim uzorcima je u ovom istraživanju prirodan naziv genotipa "H2", dok su ga Milgroom i suradnici (2008) nazvali S12, zbog izuzetne asocijacije s EU12 tipom vegetativne (ne)kompatibilnosti. S druge strane, genotip S1, asociran s tipom vegetativne (ne)kompatibilnosti EU1, koji su Milgroom i sur. (2008) pronašli uglavnom u Turskoj, je u Hrvatskoj i Sloveniji nađen u čak 21 od 180 uzoraka. Čak što više u 11 od 21 uzorka taj genotip (u ovom istraživanju nazvan H1) bio je asociran s tipom vegetativne (ne)kompatibilnosti EU1 (Krstin i sur. 2008, 2011). Međutim, statistički značajne asocijacije mikrosatelitnog genotipa i tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica* u većini populacija u Hrvatskoj i Sloveniji nije bilo, što je u potpunosti drugačije od situacije u jugoistočnoj Europi (Milgroom i sur. 2008). Važno je naglasiti da je upravo genotip H1 (=S1) bio vrlo čest u sjevernim talijanskim populacijama i u Turskoj, dok ga u nekim zemljama jugoistočne Europe (Makedonija, Bugarska, Rumunjska) nije bilo uopće. S druge strane, genotip H2 (=S12), koji je bio dominantan u jugoistočnoj Europi vrlo je rijedak u drugim istraživanim područjima. Svi ti podaci, uzeti zajedno, dobra su indicija kako je invazija jugoistočnog areala *C. sativa* išla dvama putovima, odvojenim geografski, a vjerojatno i vremenski. Istraživanjem Hrvatskih i Slovenskih populacija gljive *C. parasitica*, poglavito uspoređivanjem zastupljenosti određenih genotipova, može se dobiti uvid u dinamiku širenja gljive *C. parasitica* na ovim područjima, kao i na povezanost naših populacija s okolnima.

Iz svih navedenih podataka može se rekonstruirati slika širenja gljive *C. parasitica* na području Hrvatske i Slovenije. Pošto je prvi puta bolest zabilježena u zapadnim dijelovima Hrvatske i Slovenije, može se s velikom sigurnošću tvrditi da je *C. parasitica* primarno unesena u ove krajeve upravo iz regija koje su geografski smještene zapadno od Hrvatske i Slovenije – sjeverne Italije, regije koja se tradicionalno smatra prvim mjestom ulaska gljive *C. parasitica* u Europu. Međutim, uz pretpostavku jednostavnog širenja patogena od zapada prema istoku, približavanjem fronti rasprostiranja bolesti, genska raznolikost populacija trebala bi opadati u istom smjeru kako je svaka sljedeća zaražena populacija pitomoga kestena kolonizirana sukcesivno s jedinkama sve manje genske raznolikosti (serijski osnivački učinak). Međutim, ovim istraživanjem utvrđeno je da se genska raznolikost istraživanih populacija značajno ne mijenja u smjeru zapad-istok, što ukazuje da jednostavan model širenja gljive *C. parasitica* od zapada prema istoku nije primjenjiv (Freeland i sur. 2011). U

Hrvatskoj su zabilježeni uzorci genotipa S12 (H2 u ovom istraživanju), kao i povećan broj uzoraka tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti EU12, koji je dominantan upravo u jugoistočnoj Europi. Važno je naglasiti da je 2001 (Trestić i sur. 2001) za Bosnu i Hercegovinu utvrdio vrlo veliku raznolikost tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti u sjeverozapadnim populacijama (koje graniče s Hrvatskom), a vrlo malu, s jednim dominantnim tipom vegetativne (ne)kompatibilnosti u istočnim i jugozapadnim populacijama Bosne i Hercegovine. U tim regijama dominantni tip vegetativne (ne)kompatibilnosti je bio upravo EU12 kao i u drugim zemljama jugoistočne Europe, kasnije obuhvaćenim istraživanjem (Sotirovski i sur. 2004; Milgroom i sur. 2008). Sve ovo zajedno uzeto u obzir ukazuje na mogućnost dvaju neovisnih unosa gljive *C. parasitica* na ova područja, što su PCoA i Bayesovska analiza i potkrijepile. Većina uzoraka imala je intermedijarni genotip, koji se mogao lako izvesti kombiniranjem alela dvaju hipotetskih majčinskih genotipova H1 (=S1) i H2 (=S12), prvi unesen kao dominantan sa zapada, drugi s istoka. Prema tim analizama, upravo su Hrvatska i Slovenija, obuhvaćene ovim istraživanjem, a vjerojatno i sjeverozapadna područja Bosne i Hercegovine, mjesto susreta tih dvaju glavnih genotipova (Ježić i sur. 2012).

Prvi kalusirajući rakovi kore, kao i hipovirulentni uzorci gljive *C. parasitica* bijele morfologije koji ukazuju na prisutnost CHV-a u citoplazmi primijećeni su ranih 60-tih godina XX. stoljeća u Italiji i Francuskoj (Robin i Heiniger 2001), dok su u Hrvatskoj i Sloveniji zabilježeni krajem 70-tih, odnosno početkom 80-tih godina (Halambek 1986; Robin i Heiniger 2001). Zastupljenost hipoviruletnih uzoraka u raznim populacijama Slovenije i Hrvatske jako varira i to od 11,1% u Olšovcu do 72,2% u Kalu u Sloveniji (Krstin i sur. 2011), odnosno od 12,7% u Istri do 66,6% u Šamarici (Krstin i sur. 2008). Jedna od najstarijih populacija gljive *C. parasitica* je upravo lovranska u kojoj je rak kore kestena prisutan najmanje od 1955. godine (Kišpatić 1956). Ta populacija je detaljnije istražena pošto je riječ o miješanoj "voćnjaku/šumi", odnosno jedinstvenoj kombinaciji kultivara pitomoga kestena – maruna i necijepljenih, prirodno rastućih kestena, sjemenjaka, koji rastu na istom geografskom području. Cijela populacija je stoga istražena na više načina kako bi se utvrdio uzrok naoko slabijeg oporavka maruna od zaraze gljivom *C. parasitica* i bolesti raka kore kestena. Od prije je poznato (Anagnostakis 1992), da različite vrste kestena (*Castanea* spp.) pokazuju različitu toleranciju na zarazu gljivom *C. parasitica* i bolest rak kore kestena (Kubisiak i sur. 1997). Stoga je tijekom XX. stoljeća veći broj projekata bio usmjeren prema uzgoju hibrida američkog (*C. dentata*) i azijskih vrsta kestena poput *C. molissima* i *C. crenata* (Diskin i sur. 2006). U Sjevernoj Americi to je bio logičan korak pošto su pokušaji biološke

kontrole raka kore kestena virusom CHV-1 u potpunosti podbacili. Hibridi europskog pitomoga kestena (*C. sativa*) i azijskih vrsta su također poznati, iako je u Europi biološka kontrola virusom CHV-1 uspostavljena na mnogim područjima te je rak kore kestena mnogo manja prijetnja u Europi (*C. sativa*) nego u Americi (*C. dentata*) (Sotirovski i sur. 2011).

Ovim istraživanjem utvrđeno je da su sva cijepljena stabla kestena istog genotipa, odnosno da su maruni u Lovranu klon, vegetativno propagiran cijepljenjem grančica i/ili pupova starijih maruna na mlađe sjemenjake prirodno rastućih kestena tom području. Genetička raznolikost raznih kultivara pitomoga kestena je već bila istraživana u Europi (Botta i sur. 2001; Marinoni i sur. 2003; Gobbin i sur. 2007;). Marun, prisutan u Lovranu i okolici je specifičan kultivar pitomoga kestena, karakteriziran velikim plodovima u kojima endokarp ne ulazi u kotiledone te se stoga plodovi lako ljušte, zbog čega je vrlo cijenjen. Većina stabala maruna u Lovranu su vrlo stara, dok mlađih gotovo da i nema. Prema navodima lokalnog stanovništva, od XIX. stoljeća do danas njihov broj je u opadanju te se smatra da je od preko 10 000 stabala danas ostalo svega nekoliko stotina. Prisutnost raka kore kestena, u većem ili manjem obimu, utvrđena je na svim stablima, dok je na svježim cjepovima utvrđena vrlo velika učestalost novog, aktivnog rasta raka. Takva situacija nije neočekivana pošto gljiva *C. parasitica* kolonizira stabla upravo na mjestima oštećenja, poput onih nastalih cijepljenjem stabala. Pošto je bolest rasprostranjena na širem području Lovrana, infektivni inokulum, spore, prisutne su u velikoj količini u zraku te je zaraza rana vrlo visoka (Guerin i sur. 2001; Prospero i sur. 2006). Stoga mnoga mlada stabla maruna propadaju već unutar prve godine nakon cijepljenja, posljedica čega je potpuni izostanaka obnavljanja fundusa maruna u Lovranu i okolici.

Genotipizacijom necijepljenih stabala korištenjem početnica koje su razvili (Buck i sur. 2003; Marinoni i sur. 2003; Gobbin i sur. 2007) utvrđeno je da su sva međusobno različitih genotipova, te da je genska raznolikost stabala kestena u Lovranu slična onoj koja je bila utvrđena za prirodne populacije kestena u nekoliko recentnijih studija (Gobbin i sur. 2007; Martín i sur. 2010a, 2010b; Martín i sur. 2011; Martín i sur. 2012). Nasuprot tome cijepljena stabla sva su bila istog genotipa, odnosno, potvrđeno je klonalno porijeklo lovranskih maruna. Time je omogućena usporedba progresije bolesti na različitim stablima, marunima, odnosno prirodnoj populaciji.

Tijekom laboratorijskih istraživanja utvrđen je vrlo velik broj aktivnih rakova nađenih na marunima, dok su se površinske nekroze, odnosno kalusirajući rakovi na njima javljali sporadično, što je indiciralo vrlo slabi oporavak maruna od raka kore kestena. Iz mnogih aktivnih rakova nađenih na marunima izolirani su hipovirulentni uzorci gljive *C. parasitica*, što je bio vrlo neobičan nalaz, pošto su aktivni rakovi češće asocirani s virulentnim sojevima gljive *C. parasitica* (McManus i sur. 1989; Hogan i Griffin 2002). Osim toga, odnos broja virulentnih i hipovirulentnih izolata, kao i zastupljenost određenih tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti, u uzorcima izoliranim s maruna i onih izoliranih s necijepljenih kestena bio je podjednak. Izuzev većeg broja aktivnih rakova koji su bili asocirani s hipovirulentnim sojem gljive *C. parasitica*, među marunima i necijepljenim kestenima nije bilo nikakve druge očite razlike pošto su stabla rasla međusobno vrlo blizu, u istim klimatološkim i pedološkim uvjetima. Osim toga, sva analizirana stabla starija su od 70 godina (Meštrović i Fabijanić 1995), odnosno bila su prisutna na području Lovrana prije prve pojave raka kore kestena u Hrvatskoj. Neka istraživanja sugeriraju da je starije drveće kestena otpornije od mlađeg na infekciju *C. parasitica* (Heiniger i Rigling 1994), no u ovom istraživanju taj parametar je kontroliran jer su sva analizirana stabla bila slične starosti. Drugim riječima eventualne fiziološke razlike među stablima koje su posljedica razlike u starosti ne mogu biti objašnjenje uočenih razlika u oporavku među marunima i necijepljenim kestenima. Stoga se kao moguće objašnjenje fenomena slabijeg oporavka maruna nameće upravo karakteristika ovog genotipa kao manje tolerantnog na infekciju gljivom *C. parasitica* u smislu slabijeg oporavka, čak i u slučaju prisutnosti hipovirulentnog soja u raku. Postoje izvještaji o otpornosti raznih kultivara kestena prema raku kore kestena (CIREA 2010), medu kojima je najtolerantniji na zarazu gljivom *C. parasitica* upravo hibrid *C. sativa* i *C. mollisima,* tzv. Bouche de Betizac. Međutim (Bazzigher i Miller 1991) su utvrdili i postojanje različitih stupnjeva tolerancije na bolest u populacijama kestena u Švicarskoj. Naravno, u ovom slučaju valja spomenuti da je među tim kestenima vjerojatno dio genoma potjecao i od azijskih vrsta kestena, tradicionalno poznatih po otpornosti ili barem toleranciji na rak kore kestena. Logično je pretpostaviti da je među istraživanim stablima postojalo jedinki koje su nastale različitim hibridizacijskim događajima od ishodišne populacije tako da je teško procijeniti udio genoma azijskih vrsta među njima. Stoga je gotovo pa nemoguće izravno dovesti u korelaciju određeni genom i toleranciju na bolest. U slučaju Lovrana, situacija je nešto drugačija. Pošto je jedan kultivar *C. sativa* uspoređen s općom populacijom pitomoga kestena uz sve ostale uvjete identične, ekstrapolacija zaključaka je izravnija. Valja naglasiti da je ovim istraživanjem analizirano pitanje oporavka, odnosno, sposobnosti CHV-1 da smanji virulentnost gljive *C. parasitica* te

tako potakne zatvaranje rane raka kore kalusom i dovede do oporavka pitomoga kestena od ove bolesti. U prirodnoj populaciji kestena u kojoj su zamijećeni kalusi, do oporavka očito dolazi. Međutim, u slučaju maruna, zarastanja rana kalusom nije zabilježeno, čak ni u prisutnosti hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica* prisutnih u uzorku. Stoga su mnoga stabla maruna na području Lovrana jako su oštećena ovom bolešću. Vegetativno razmnožavanje maruna cijepljenjem vrlo je teško, do gotovo nemoguće, zbog zaražavanja svježih cjepova inokulumom (sporama) gljive *C. parasitica* i posljedičnog propadanja mladih maruna. Stoga je opstanak ovog genotipa u lovranskoj šumi je, vrlo upitan.

6. Zaključci

1. Genska raznolikost istraživanih populacija gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji je vrlo velika; među 180 analiziranih uzoraka nađeno je čak 66 različitih genotipova
2. Populacije gljive *C. parasitica* Hrvatske i Slovenije su svojom genskom raznolikošću sličnije istraženim populacijama zapadne Europe (Francuska, sjeverna Italija), koje pokazuju vrlo veliku gensku raznolikost, nego jugoistočnim (Makedonija, Grčka, Bugarska, Rumunjska), koje su uglavnom klonalne
3. Utvrđeno je da mnogi genotipovi uzoraka iz Hrvatske i Slovenije pokazuju miješano porijeklo; drugim riječima, mnogi genotipovi se mogu direktno izvesti jednim rekombinacijskim događajem između dominantnog genotipa nađenog u zapadnoj i dominantnog genotipa nađenog u jugoistočnoj europi, što ide u prilog hipotezi kako su ova područja mjesto susreta jedinki iz zapadne i jugoistočne Europe
4. Rak kore kestena proširen je u Lovranu i sva stabla su zaražena, od kojih mnogi maruni (cijepljena stabla) pokazuju aktivnu, agresivnu formu raka kore; genska raznolikost populacije gljive *C. parasitica* odgovara utvrđenima za druge populacije ove gljive u Hrvatskoj; hipovirulentnost je proširena na ovom prostoru te je iz mnogih uzoraka gljive *C. parasitica* izolirana dsRNA *Cryphonectria hypovirusa 1*
5. Utvrđeno je da je lovranski marun jedan kultivar, drugačijeg genotipa od ostalih kestena s područja Lovrana te da pokazuje slabiji oporavak od zaraze gljivom *C. parasitica*, čak i u prisutnosti hipovirulentnih jedinki u populaciji patogena. Stoga je ovaj genotip pitomoga kestena izuzetno ugrožen.

7. Literatura

Adamčíková K, Juhásová G, Kobza M (2006) Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Štiavnicko-Krupinská subpopulation in Slovakia. *Plant Protection Science* 42: 119–124.

Agapow P, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1: 101–102.

Agrios GN (2005) Plant pathology, Elsevier Academic Press, Burlington.

Akilli S, Katircioğlu YZ, Maden S (2009) Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. *Forest Pathology* 39: 390–396.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory Mycology, John Wiley and Sons, New York.

Van Alfen NK, Jaynes RA, Anagnostakis SL, Day PR (1975) Chestnut blight: Biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science* 189: 890–891.

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

Allen TD, Dawe AL, Nuss, DL (2003) Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulence-attenuating hypoviruses. *Eukaryotic Cell* 2: 1253–1265.

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

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

Anagnostakis SL (1992) Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 568–571.

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

Anagnostakis SL, Hillman B (1992) Evolution of the chestnut tree and its blight. *Arnoldia Arboretum, Harvard*, 1–10.

Anić M (1942) O rasprostranjenosti evropskog pitomog kestena s osobitim obzirom na nezavisnu državu Hrvatsku i susjedne zemlje. C. Albrecht (P. Acinger), Zagreb.

Anić M (1945) Pogledi na šumsku vegetaciju Istre i susjednih zemalja. *Šumarski list* 69: 13–23.

Anić M (1953) Pitomi kesten na Cresu. *Glasnik za šumarske pokuse* 11: 321–356.

Barr ME, (1978) The Diaportales in North America with emphasis on Gnomonia and its segregates. *Mycologa Memoir* 7: 1–231.

Bazzigher G, Miller G (1991) Blight-resistant chestnut selections of Switzerland: a valuable germ plasm resource. *Plant Disease* 75: 5–9.

Biraghi A (1946) Il cancro del castagno causato da Endothia parasitica. *Italia Agricola* 7: 1–9.

Bissegger M, Rigling D, Heiniger U (1997) Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* 87: 50–59.

Blackwell M (1994) Minute mycological mysteries: The influence of arthropods on the lives of fungi. *Mycologia* 86: 1–17.

Botta R, Marinoni D, Beccaro G (2001) Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 425–428.

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.

Breuillin F, Dutech C, Robin C (2006) Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research* 110: 288–296.

Buck KW (1986) Fungal Virology – an overview. U: Buck, KW (ed.) Fungal Virology, CRC Press, Boca Raton, 1-84.

Buck EJ, Hadonou M, James CJ, Blakesley D, Russell K (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (Castanea sativa Mill.). *Molecular Ecology Notes* 3: 239–241.

Buller AHR (1933) Researches on Fungi, 5. Longmans, Green & Co., London.

Camus A (1929) Le châtaigniers Monographie des genres Castanea e Castanopsis. P. Lechevalier, Paris.

Caten CE (1972) Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection of fungi. *Journal of General Microbiology* 72: 221–229.

Chen B, Nuss DL (1999) Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 73: 985–992.

CIREA (2010) Le chancre de l'ecorce du chataignier *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*.

Conedera M, Krebs P, Tinner W, Pradella M (2004a) The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 161–179.

Conedera M, Manetti M, Giudici F, Amorini E, (2004b) Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill) in Europe. *Ecologia mediterranea* 30: 179–193.

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

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

Cortesi P, Milgroom MG, Bisiach M (1996) Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycological Research* 100: 1087–1093.

Cortesi P, Rigling D, Heiniger U (1998) Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. *European Journal of Forest Pathology* 28: 167–176.

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

Dawe AL, McMains VC, Panglao M, Kasahara S, Chen B, Nuss DL (2003) An ordered collection of expressed sequences from *Cryphonectria parasitica* and evidence of genomic microsynteny with *Neurospora crassa* and *Magnaporthe grisea*. *Microbiology* 149: 2373–2384.

Dawe AL, Nuss DL (2001) Hypoviruses and chestnut blight: Exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35: 1–29.

Diskin M, Steiner KC, Hebard FV (2006) Recovery of American chestnut characteristics following hybridization and backcross breeding to restore blight-ravaged *Castanea dentata*. *Forest Ecology and Management* 223: 439–447.

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

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.

Fernández-López, J, Monteagudo A (2010) Genetic structure of Spanish wild populations of *Castanea sativa* as measured by isozyme analysis. *Forest Systems* 19: 156–169.

Freeland J, Kirk H, Petersen S (2011) Molecular Ecology. Wiley-Blackwell, Singapur.

Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* 34: 165–186.

Glavaš M (1999) Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

Gobbin D, Hoegger PJ, Heiniger U, Rigling D (2003) Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research* 97: 39–46.

Gobbin D, Hohl L, Conza L, Jermini M, Gessler C, Conedera M (2007) Microsatellite-based characterization of the Castanea sativa cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* 50: 1089–1103.

Goudet J (2002) Fstat 2.9.3.2. http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

Graves A (1950) Relative blight resistance in species and hybrids of Castanea. *Phytopathology* 49: 1125–1131.

Grünwald N, Goodwin S, Milgroom MG, Fry WE (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93: 738–746.

Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006a) Cryphonectriaceae (Diaporthales), a new family including Cryphonectria, Chrysoporthe, Endothia and allied genera. *Mycologia* 98: 239–249.

Gryzenhout M, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006b) New taxonomic concepts for the important forest pathogen *Cryphonectria parasitica* and related fungi. *FEMS Microbiology Letters* 258: 161–172.

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

Gull K (1978) Form and function of septa in filamentous fungi. U: Smith JE, Berry DR (ed.) The Filamentous Fungi, 3. Developmental Mycology. Edward Arnold, London, 78–93.

Halambek M (1986) Chestnut blight in Yugoslavia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 16: 533–535.

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

Hale ME (1983) The Biology of Lichens, Edward Arnold, Baltimore.

Hammer O, Harper D, Ryan P (2009) Past 1.88. http://folk.uio.no/ohammer/past/

Heerden S, Wingfield MJ (2001) Genetic diversity of *Cryphonectria cubensis* isolates in South Africa. *Mycological Research* 105: 94–99.

Heiniger U, Rigling D (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581–599.

Hepting G (1974) Death of the American chestnut. *Journal of Forest Ecology* 18: 60–67.

Hibbett DS i sur. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111: 509–547.

Hillman BI, Halpern BT, Brown MP (1994) A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology* 201: 241–250.

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

Hillman BI, Supyani S, Kondo H, Suzuki N (2004) A Reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the Coltivirus genus of animal pathogens. *Journal of Virology* 78: 892–898.

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

Hoegger PJ, Rigling D, Holdenrieder O, Heiniger U (2002) *Cryphonectria radicalis*: rediscovery of a lost fungus. *Mycologia* 94: 105–115.

Hogan EP, Griffin GJ (2002) Incomplete movement of *Cryphonectria hypovirus 1* within a vegetative compatibility type of *Cryphonectria parasitica* in natural cankers on grafted American chestnut trees. *Forest Pathology* 32: 331–344.

Huang H, Dane F, Kubisiak T (1998) Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae). *American Journal of Botany* 85: 1013–1021.

Huber DH (1996) Genetic analysis of vegetative incompatibility polymorphisms and horizontal transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Michigan State University, East Lansing, Michigan, doktorska disertacija.

Jankovský L, Haltofová P, Juhásová G, Kobza M, Adamčíkova K, Palovčíková D (2004) The first record of *Cryphonectria parasitica* in the Czech Republic. *Czech Mycology* 55: 45–51.

Jankovský L, Haltofová P, Palovčíková D (2010) New findings and vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 46: 28–33.

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

Jurc D (2002) An overview of the history of the chestnut blight epidemic in Slovenia. *Zbornik grozdarstva in lesarstva* 68: 33–59.

Kavanagh K (2005) Fungi. John Wiley & Sons, Chichester.

Kišpatić J (1956) Rak kestenove kore (*Endothia parasitica* Anders.). *Zavod za zaštitu bilja, Uputstva iz zaštite bilja* 19: 1–12.

Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W (2004) Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 145–160.

Krstić M (1950) *Endothia parasitica* u našoj zemlji. *Zaštita bilja* 2: 113–116.

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

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* 60: 752–761.

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

Kubisiak TL, Hebard FV, Nelson CD, Zhang J, Bernatzky R, Huang H, Anagnostakis SL, Doudrick RL (1997) Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific cross in the genus Castanea. *Phytopathology* 87: 751–759.

Kubisiak TL, Milgroom MG (2006) Markers linked to vegetative incompatibility (vic) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (MAT) in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal genetics and biology* 43: 453–463.

Linder-Basso D, Dynek JN, Hillman BI (2005) Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. *Virology* 337: 192–203.

Liu H, Fu Y, Jiang D, Li G, Xie J, Peng Y, Yi X, Ghabrial S (2009) A novel mycovirus that is related to the human pathogen hepatitis E virus and rubi-like viruses. *Journal of Virology* 83: 1981–1891.

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

Marinoni D, Akkak A, Bounous G, Edwards KJ, Botta R (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11: 127–136.

Marra R, Milgroom MG (2001) The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86: 134–143.

Martín M, Herrera M, Martín L (2012) In situ conservation and landscape genetics in forest species. *Journal of Natural Resources and Development* 2: 1–5.

Martín MA, Mattioni C, Cherubini M, Taurchini D, Villani F (2010a) Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 6: 735–744.

Martín MA, Mattioni C, Cherubini M, Taurchini D, Villani F (2010b) Genetic characterisation of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Annals of Applied Biology* 157: 37–44.

Martín MA, Mattioni C, Molina JR, Alvarez JB, Cherubini M, Herrera M, Villan, F, Martín, LM (2011) Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genetics & Genomes* 8: 127–136.

Maurer WD, Fernández-López J (2001) Establishing an international sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill) provenance test: preliminary steps. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 482–486.

McGuire IC, Marra RE, Turgeon BG, Milgroom MG (2001) Analysis of mating-type genes in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology* 34: 131–144.

McManus P, Ewers F, Fulbright D (1989) Characterization of the chestnut blight canker and the localization and isolation of the pathogen *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Botany* 67: 3600–3607.

Medak J (2004) Fitocenološke značajke šuma pitomog kestena u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, magistarski rad.

Medak J (2009) Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (Castanea sativa Mill.) u Hrvaskoj. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, doktorska disertacija.

Medak J, Perić S (2007) Šume pitomog kestena u Hrvatskoj – fitocenološke, ekološke i gospodarske karakteristike. U Britvec M, Škvorc Ž (ed.) Zbornik 2. botaničkog kongresa, Zagreb, 89–90.

Merkel HW (1905) A deadly fungus on the American chestnut. *New York Zoological Society, 10th Annual Report* 10: 97–103.

Meštrović Š, Fabijanić G (1995) Priručnik za uređivanje šuma. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva Hrvatske, Hrvatske šume, Zagreb.

Milgroom MG, Cortesi P (1999) Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10518–10523.

Milgroom MG, Lipari S, Powell W (1992) DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 131: 297–306.

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

Myburg H, Gryzenhout M, Wingfield BD, Stipes RJ, Wingfield MJ (2004) Phylogenetic relationships of Cryphonectria and Endothia species, based on DNA sequence data and morphology. *Mycologia* 96: 990–1001.

Myteberi IF, Lushaj AB, Keča N, Lushaj AB, Lushaj BM (2013) Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence, and possibilities for biocontrol of chestnut canker in Albania. *International Journal of Microbiological Research and Reviews* 1: 11–21.

NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321–3323.

Nuss DL (1992) Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews* 56: 561–765.

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

Ota T (1993) Dispan. http://www.dispan.com-about.com/

Peakall R, Smouse PE (2005) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

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

Peever TL, Liu YC, Cortesi P, Milgroom MG (2000) Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4863–4869.

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

Peever TL, Liu YC, Wang K, Hillman BI, Foglia R, Milgroom MG (1998) Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology* 88: 811–817.

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

Piccoli L (1922) Monografia sul Castagno. Tripolito Spinelli, Firenca.

Pingyan L, Kaiying C, Zhou S, Quan Y, Liu H (1992) Isolation and conversion of dsRNA from hypovirulent etrains of *Endothia parasitica* in China. *Acta Microbiologica Sinica* 32: 253–261.

Polashock JJ, Hillman BI (1994) A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8680–8684.

Preisig O, Moleleki N, Smit WA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2000) A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen Diaporthe ambigua. *The Journal of general virology* 81: 3107–3114.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

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

Prospero S, Rigling D (2012) Invasion genetics of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. *Phytopathology* 102: 73–82.

Quan Y, Liang P, Chen K, Zhou S (1994) Sequence homology of dsRNA among Chinese, European and American Hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Acta Microbiologica Sinica* 34: 1–5.

Radócz L (2001) Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 368–372.

Read ND, Beckett A (1996) Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycological Research* 100: 1281–1314.

Rigling D, Heiniger U, Hohl HR (1989) Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. *Phytopathology* 79: 219–223.

Rinallo C, Mariotti D (1993) Rooting of *Castanea sativa* Mill shoots: effect of Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes. *Journal of horticultural science* 68: 399–407.

Roane MK (1986) Taxonomy of the genus Endothia. U: Roane MK, Griffin GJ, Elkins JR (ed.) Chestnut blight, other Endothia diseases, and the genus Endothia (American Phytopathological Society Press, St. Paul, 28–39.

Robin C, Anziani C, Cortesi P (2000) Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730–737.

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: 27–535.

Robin C, Heiniger U (2001) Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 361–367.

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106. http://genepop.curtin.edu.au/

Saupe SJ (2000) Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 489–502.

Schütt P i sur. (2006) Enzyklopädie der Laubbäume, Nikol Verlag, Hamburg.

Shannon CE, Weaver W (1949) The Mathematical Theory of Communication, University of Illinois Press, Urbana.

Shapira R, Choi GH, Nuss DL (1991) Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *The EMBO Journal* 10: 731–739.

Shear C, Stevens N (1913) The chestnut-blight parasite (*Endothia parasitica*) from China. *Science* 38: 295–297.

Shear C, Stevens N (1916) The discovery of the chestnut-blight parasite (*Endothia parasitica*) and other chestnut fungi in Japan. *Science* 43: 173–176.

Shiu PK, Glass NL (2000) Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 3: 183–188.

Smart CD, Yuan W, Foglia R, Nuss DL, Fulbright DW, Hillman BI (1999) *Cryphonectria hypovirus 3*, a virus species in the family hypoviridae with a single open reading frame. *Virology* 265: 66–73.

Sotirovski K, Papazova-Anakieva I, Grünwald N, Milgroom MG (2004) Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology* 53: 325–333.

Sotirovski K, Rigling D, Heiniger U, Milgroom MG (2011) Variation in virulence of *Cryphonectria hypovirus 1* in Macedonia. *Forest Pathology* 41: 59–65.

Stoddart JA, Taylor JF (1988) Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705–711.

Suzuki N, Supyani S, Maruyama K, Hillman BI (2004) Complete genome sequence of Mycoreovirus-1/Cp9B21, a member of a novel genus within the family Reoviridae, isolated from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *The Journal of General Virology* 85: 3437–3448.

Taylor JW (1995) Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. *Canadian Journal of Botany* 73: 754–759.

Trestić T, Uščuplić M, Colinas C, Rolland G, Giraud A, Robin C (2001) Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 391–396.

Uščuplić M (1961) Pojava raka kestenove kore u Bosni. *Narodni šumar* 10-12: 581–588.

Vukelić J (2012) Šumska vegetacija Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Wagner H, Sefc K (1999) Identity 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Beč. http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~sefck

Webster J, Weber R (2007) Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge.

Weir A, Blackwell M (2001) Molecular data support the Laboulbeniales as a separate class of Ascomycota, Laboulbeniomycetes. *Mycological Research* 105: 1182–1190.

Weir B, Cockerham C 1(984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

Worrall JJ (1997) Somatic incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* 89: 24–36.

Xie J, Wei D, Jiang D, Fu Y, Li G, Ghabrial S, Peng Y (2006) Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Journal of General Virology* 87: 241–249.

Yaegashi H, Kanematsu S, Ito T (2012) Molecular characterization of a new hypovirus infecting a phytopathogenic fungus, *Valsa ceratosperma*. *Virus Research* 165: 143–150.

Yu X, Li B, Fu Y, Jiang D, Ghabrial S, Li G, Peng Y, Xie J, Cheng J, Huan, J, Yi X (2010) A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8387–8392.

Zhang L, Baasiri RA, Van Alfen NK (1998) Viral Repression of Fungal Pheromone Precursor Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 18: 953–959.

Zhang L, Fu Y, Xie J, Jiang D, Li G, Yi X (2009) A novel virus that infecting hypovirulent strain XG36-1 of plant fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology Journal* 6: 96.

Van Zyl LM, Wingfield MJ, Alfenas AC, Crous PW (1998) Population diversity among Brazilian isolates of *Cryphonectria cubensis*. *Forest Ecology and Management* 112: 41–47.

8. Prilozi

Tablica A Genotipovi uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* iz Hrvatske i Slovenije.

UZORAK	RO4_775	499_900	327_1075	P13_1250	I07_650	N14_1200	I01_1990	I01_800	Z06_1400	L19_1425	N19_1190	GENOTIP
CR2	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
CR3	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
CR5	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
CR12	96	116	169	267	272	401	94	167	226	280	328	4
CR13	96	116	187	297	293	401	103	167	226	280	328	5
CR14	87	116	187	267	293	401	94	167	226	280	328	6
CR19	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
CR24	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
CR25	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
CR26	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
CR27	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
CR29	96	116	169	267	272	401	103	167	226	280	328	8
CR30	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
CR38	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
CR40	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
CR52	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
CR54	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
CR55	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
HK3/2	96	116	169	267	279	401	103	167	250	280	347	9
HK6	96	116	169	267	272	401	94	167	226	280	347	10
HK18	96	116	169	267	272	401	94	167	250	280	328	11
HK20	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
HK21	96	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	13
HK22	96	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	13
HK24/2	87	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	14
HK27	96	116	169	267	293	401	103	167	226	280	347	15
HK31	87	116	187	267	293	401	94	167	226	280	328	6
HK33	96	116	169	297	272	401	103	167	250	280	328	16
HK34	96	116	169	297	272	401	103	167	250	280	328	16
HK38	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
HK42	96	116	169	297	272	401	103	167	250	280	328	16
HK44	96	116	169	297	293	401	103	167	250	280	328	17
HK45	87	116	169	297	293	401	94	167	250	280	328	18
HK46	87	116	169	267	272	401	94	167	250	280	328	19
HK50	87	116	169	297	279	401	103	167	226	280	347	20
HK53	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HK54	96	116	169	297	293	401	103	167	250	280	328	17
HK54/2	96	116	187	297	293	401	103	167	226	280	328	5
HK64	96	116	169	267	272	401	103	167	250	280	328	22
HK67/1	96	116	169	267	279	401	103	167	250	280	347	9
HK71	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	328	23
HK76	96	116	187	267	293	401	103	167	226	280	347	24
HK78	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	347	25
HK79/2	96	116	169	297	272	401	94	167	250	280	328	26

UZORAK	RO4_775	499_900	327_1075	P13_1250	I07_650	N14_1200	I01_1990	I01_800	Z06_1400	L19_1425	N19_1190	GENOTIP
M5	96	116	169	297	272	401	103	167	226	280	328	27
M8	96	116	169	267	272	401	103	167	226	280	328	8
M10	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	347	25
M14	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
M15	96	116	187	267	272	401	103	167	250	280	328	28
M18	87	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	29
M22	96	116	187	297	272	401	94	167	226	280	328	30
M22Ž	96	116	169	267	272	401	103	167	226	280	328	8
M26	96	116	169	297	279	401	103	167	226	280	347	31
M27	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	328	32
M28	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
M28B	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	12
M29	87	116	169	267	272	401	103	167	226	280	328	33
M30	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
M33	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	328	32
M34	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
M36	87	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	14
M44	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
M46	87	116	169	267	279	401	94	167	250	280	328	34
M47	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
M52	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
M56/1	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
M58	87	116	169	297	279	401	94	167	250	280	347	35
PŽ4	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
PŽ6	96	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	13
PŽ7B	96	116	169	267	272	401	103	167	226	280	328	8
PŽ9	87	116	169	267	272	401	94	167	250	280	328	19
PŽ10	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
PŽ12A	96	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	13
PŽ13	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
PŽ19	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
PŽ20	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
PŽ27B	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
PŽ29	96	116	169	267	273	401	103	167	226	280	328	8
PŽ34	87	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	2
PŽ36A	96	116	169	267	279	401	94	167	254	280	347	64
PŽ38	96	116	169	267	293	401	94	167	250	280	347	13
PŽ40A	96	116	169	297	293	401	94	167	250	280	328	36
PŽ41	96	116	187	267	293	401	103	167	226	280	328	37
PŽ47	96	116	172	267	272	401	103	167	250	280	328	65
PŽ52	96	116	172	267	272	401	103	167	254	280	328	66
PŽ53	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
PŽ54	96	116	187	267	272	401	94	167	250	280	328	38
PŽ56	96	116	169	267	272	401	94	167	250	280	328	11

UZORAK	RO4_775	499_900	327_1075	P13_1250	I07_650	N14_1200	I01_1990	I01_800	Z06_1400	L19_1425	N19_1190	GENOTIP
B6	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	347	25
B8	96	116	187	297	272	401	103	167	250	280	347	39
B9	96	116	169	297	272	401	103	167	250	280	328	16
B11	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
B13	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
B18	96	116	187	297	272	401	103	167	250	280	347	39
B24	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
B25	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
B30	87	116	169	297	293	401	94	167	250	280	328	18
B34	96	116	169	297	272	401	103	167	226	280	328	27
B41	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
B53	96	116	169	297	272	401	94	167	250	280	347	40
B58	96	116	187	267	293	401	94	167	250	280	328	41
B69	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	328	32
B73	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
B83	96	116	187	297	272	401	103	167	250	280	328	43
B85	96	116	169	297	272	401	94	167	250	280	347	40
GS2	96	116	169	297	293	401	103	167	250	280	347	44
GS3	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	347	45
GS4	96	116	187	267	293	401	103	167	226	280	328	37
GS5	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
GS6	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	347	45
GS10	96	116	169	297	272	401	94	167	250	280	347	40
GS12	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
GS13	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	328	7
GS14	96	116	169	297	293	401	103	167	250	280	328	17
GS15	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	347	25
GS16	96	116	169	297	272	401	103	167	226	280	347	46
GS19	96	116	187	297	293	401	103	167	250	280	328	47
GS22	96	116	187	267	279	401	94	167	250	280	328	48
GS26	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
GS31	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
GS40	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
GS41	96	116	187	267	293	401	103	167	226	280	328	37
GS42	96	116	187	267	293	401	103	167	226	286	347	49
GS51	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	347	50
GS61	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	327	1

UZORAK	RO4_775	499_900	327_1075	P13_1250	I07_650	N14_1200	I01_1990	I01_800	Z06_1400	L19_1425	N19_1190	GENOTIP
HP11	96	116	169	267	272	401	103	167	226	280	347	51
HP16	96	116	169	267	293	401	103	167	226	280	328	52
HP18	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HP21	96	116	169	297	279	401	94	167	226	280	347	53
HP22	96	116	169	297	279	401	103	167	250	280	347	54
HP25	96	116	169	297	293	401	94	167	226	280	328	55
HP26	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HP28	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	347	45
HP31	96	116	169	297	272	401	94	167	226	280	347	56
HP32	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HP33	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HP34	96	116	169	297	293	401	94	167	226	280	347	57
HP35	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
HP42	96	116	187	267	279	401	103	167	250	280	347	58
HP46	96	116	169	267	279	401	94	167	226	286	347	59
HP48	96	116	169	267	293	401	103	167	226	280	347	15
HP49	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
HP53	96	116	169	267	279	401	103	166	250	280	347	9
HP56	96	116	169	267	293	401	103	167	226	286	347	60
OC1	96	116	169	267	293	401	103	167	226	280	328	52
OC2	96	116	187	267	293	401	94	167	226	280	328	61
OC3	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC5	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
OC7	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
OC8	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
OC12	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1
OC15	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
OC16	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC17	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC19	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC20	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC21	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC22	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC23	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC24	96	116	169	297	293	401	103	167	226	280	328	42
OC25	96	116	187	297	293	401	103	167	226	280	328	5
OC26	96	116	169	267	272	401	94	167	226	280	347	10
OC27	96	116	187	297	272	401	103	167	226	280	328	1

UZORAK	RO4_775	499_900	327_1075	P13_1250	I07_650	N14_1200	I01_1990	I01_800	Z06_1400	L19_1425	N19_1190	GENOTIP
V1	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	328	23
V2	96	116	187	267	272	401	103	167	226	280	347	50
V9	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
V13	96	116	169	297	272	401	94	167	226	280	347	56
V15	96	116	169	297	293	401	94	167	226	280	347	57
V19	96	116	169	297	293	401	94	167	226	280	347	57
V26	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
V33	87	116	187	297	293	401	103	167	226	286	347	62
V34	96	116	169	297	279	401	94	167	250	280	328	23
V36	87	116	187	297	272	401	103	167	226	286	328	63
V38	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
V42	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
V43	96	116	169	267	279	401	94	167	250	280	347	12
V45	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21
V48	96	116	169	297	293	401	94	167	226	280	347	57
V63	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	328	3
V69	96	116	169	267	293	401	94	167	226	280	347	21

Tablica B Genotipovi svih analiziranih stabala kestena u Lovranu.

UZORAK	CsCAT01		CsCAT03		CsCAT04		CsCAT06		CsCAT17		OAL		CsCAT14		CsCAT02		EMCs15		CsCAT16	
IV-C	214	222	225	213	213	221	158	172	146	146	298	310	150	150	215	225	92	92	132	143
IV-D	218	222	227	213	213	237	194	172	146	160	298	298	133	141	225	235	86	86	132	143
IV-F	214	193	241	213	213	213	172	172	152	160	310	310	133	133	225	235	92	92	132	143
IV-H	222	193	241	233	213	221	172	172	146	152	298	310	133	150	210	225	92	92	126	143
IV-I	214	193	227	233	213	213	158	172	146	160	298	310	133	150	225	230	92	92	126	143
IV-J	222	193	245	241	235	235	182	172	152	152	298	298	133	133	215	225	92	92	126	143
DOB-A	218	193	227	241	213	213	182	182	160	160	298	310	141	150	215	225	92	92	132	143
DOB-F	193	206	233	225	237	237	182	182	138	152	298	310	133	150	210	230	92	92	126	132
DOB-G	193	222	233	227	213	237	164	172	146	152	298	310	133	150	215	230	92	92	126	132
DOB-H	193	222	213	227	213	213	172	182	130	152	298	310	133	150	215	230	92	92	126	143
DOB-I	193	214	241	227	213	213	158	172	146	152	298	310	133	141	206	230	92	92	126	132
DOB-J	222	222	225	225	213	213	172	172	152	152	298	298	133	133	225	230	82	92	132	143
DOB-K	193	222	227	241	213	221	158	172	146	152	298	298	141	150	215	230	92	92	126	143
DOB-L	214	208	241	253	213	213	158	172	152	160	298	310	133	141	206	232	92	92	126	132
ANT-D	193	193	241	253	213	221	164	172	146	160	298	302	133	141	206	232	92	92	126	126
ANT-E	193	193	227	241	213	221	158	172	142	146	298	310	133	141	216	232	92	92	126	132
ANT-F	193	193	213	227	213	221	164	182	146	160	298	302	133	150	212	232	92	92	126	132
ANT-G	214	222	225	227	213	221	182	172	152	160	298	310	133	133	216	225	86	92	126	143
ANT-H	193	216	225	255	213	221	180	172	160	160	298	306	133	141	216	230	86	92	126	143
ANT-I	193	222	213	233	221	237	182	172	130	146	298	298	133	133	215	225	92	92	126	143
ANT-L	222	222	213	241	213	213	158	172	146	152	298	310	133	150	225	232	92	92	126	143
LD-A	193	218	225	233	213	213	182	177	146	146	298	310	133	133	206	225	92	92	132	143
LD-D	193	222	225	227	213	237	158	182	152	152	298	298	133	150	217	225	86	92	126	143
LD-E	193	222	213	227	213	213	158	194	146	154	298	298	133	150	207	232	92	92	126	143
LD-G	193	208	197	241	213	221	180	194	146	146	298	306	133	150	215	222	92	92	132	148
LD-J	193	214	233	255	213	213	164	164	152	160	298	298	133	141	206	215	82	92	143	143
MARUN	214	222	227	241	213	213	158	172	146	152	298	310	133	150	225	232	92	92	126	132

Popis kratica

CHV-1	*Cryphonectria hypovirus 1*
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina)
dNTP	*Deoxyribonucleotide triphosphate* (deoksiribonuleotid trifosfat)
dsRNA	*Doublestranded ribonucleic acid* (dvolančana ribonukleinska kiselina)
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid* (etilendiamintetraetanska kiselina)
GTP	*Guanosine triphosphate* (gvanozin trifosfat)
HMG	*High mobility group*
IBA	*Indol-3-butyric acid* (indol-3-butanska kiselina)
ORF	*Open reading frame* (otvoreni okvir čitanja)
PCoA	*Principal Coordinate Analysis* (analiza glavnih koordinata)
PCR	*Polymerase chain reaction* (lančana reakcija polimerazom)
PDA	*Potato dextrose agar* (krumpirov dekstrozni agar)
PVP	*Polyvinylpyrrolidone* (polivinilpirolidon)
RAPD	*Random amplification of polymorphic* DNA (nasumično umnožavanje polimorfne DNA)
RNA	*Ribonucleic acid* (ribonukleinska kiselina)
SDS	*Sodium dodecyl sulphate* (natrijev dodecil sulfat)
STE	*Sodium-Tris-EDTA buffer* (Natrijev-Tris-EDTA pufer)
TBE	*Tris-borate-EDTA buffer* (Tris-boratni-EDTA pufer)
Tris	*Tris(hydroxymethyl)aminomethane* (tris(hidroksimetil)aminometan)
UV	*Ultraviolet* (ultraljubičasto)
vc	*Vegetative compatibility* (vegetativna kompatibilnost)

9. Životopis

Rođen sam 3. rujna, 1983. godine u Zagrebu gdje sam završio osnovnu i srednju školu. 2002. godine upisujem na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu smjer diplomirani inženjer biologije – molekularna biologija. Diplomski rad naslova "Razgradnja gena *rbc*L tijekom starenja listova javora (*Acer pseudoplatanus* L.)" izradio sam pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice te sam 2007. godine i diplomirao. Krajem iste godine počinjem volontirati na Botaničkom zavodu, Biološkog odsjeka PMF-a, a od siječnja 2008. godine zaposlen sam na Botaničkom zavodu (danas: Zavod za mikrobiologiju), Biološkog odsjeka PMF kao znanstveni novak – asistent. Znanstveno sudjelujem na dva projekta: "Biološka kontrola biljnih bolesti" Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta te na projektu "Epidemiology and population structure of *Cryphonectria parasitica* and associated *Cryphonectria hypoviruses*", koji financira Švicarska nacionala zaklada za znanost. Nastavno sudjelujem u održavanju praktikuma odnosno vježbi iz kolegija Mikrobiologija, Opća mikrobiologija i Metode istraživanja nukleinskih kiselina. Objavio sam tri znanstvena rada citirana u bazi Current Contents, dva rada u časopisima s međunarodnom recenzijom te 17 sažetaka u zbornicima skupova.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Fulgosi, Hrvoje; Ježić, Marin; Lepeduš, Hrvoje; Peharec Štefanić, Petra; Ćurković Perica, Mirna; Cesar, Vera (2012): Degradation of chloroplast DNA during natural senescence of maple leaves. Tree physiology. 32: 346-354

2. Ježić, Marin; Krstin, Ljiljana; Rigling, Daniel; Ćurković-Perica, Mirna (2012): High diversity in populations of the introduced plant pathogen, *Cryphonectria parasitica*, due to encounters between genetically divergent genotypes. Molecular ecology. 21: 87-99

3. Leljak-Levanić, Dunja; Ježić, Marin; Cesar, Vera; Ludwig-Müller, Jutta; Lepeduš, Hrvoje; Mladinić, Marin; Katić, Marija; Ćurković-Perica, Mirna (2010): Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. Journal of applied microbiology. 109: 2069-2078

Znanstveni radovi u drugim časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Kozina, Andrijana; Ježić, Marin; Tkalec, Mirta; Kozina, Bernard; Osrečak, Mirela; Ćurković-Perica, Mirna (2011): Effect of indole-3-butyric acid on the recovery of phytoplasma-infected grapevine. Bulletin of insectology. 64: 195-196

2. Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin (2010): Detrimental effect of quercetin on phytoplasma-infected Catharanthus roseus (L.) G. Don shoots grown in vitro. Acta botanica Croatica. 69: 155-162

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Ježić, Marin; Leljak-Levanić, Dunja; Ludwig-Müller, Jutta; Mladinić, Marin; Katić, Marija; Ćurković-Perica, Mirna (2009): Differential host DNA methylation might be the cause of phytoplasma elimination upon the treatment with auxins. Abstracts of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, pp 84-85, Neustadt, Njemačka.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Ćurković-Perica, Mirna; Krstin, Ljiljana; Poljak, Igor; Liber, Zlatko; Idžojtić, Marilena; Zebec, Marko; Ježić, Marin (2013): Biological control of chestnut blight: interaction of the pathogen-*Cryphonectria parasitica* with biocontrol agent-hypovirus and chestnut genotype. Plant Diseases and Resistance Mechanisms, Programme and Abstracts p30, Beč, Austrija

2. Ježić, Marin; Krstin, Ljiljana; Poljak, Igor; Liber, Zlatko; Idžojtić, Marilena; Jelić, Marija; Meštrović, Jasenka; Zebec, Marko; Ćurković-Perica, Mirna (2012): Different response of marrons versus naturally-growing sweet chestnut trees to *Cryphonectria parasitica* infection. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, book of abstracts p45, Primošten, Hrvatska

3. Ježić, Marin; Krstin, Ljiljana; Rigling, Daniel; Ćurković-Perica, Mirna (2012): Genetic Diversity and Invasion Pathways of *Cryphonectria parasitica* in Croatia and Slovenia Inferred by SCAR Markers. Internatinal Conference Molecular Ecology, p47, Beč, Austrija

4. Ježić, Marin; Poljak, Igor; Idžojtić, Marilena; Ćurković-Perica, Mirna. (2012): First report of 'Candidatus Phytoplasma pini' in Croatia. Book of Abstracts of the 19th Congress of the International Organisation for Mycoplasmology, pp158-159, Toulouse, Francuska

5. Ježić, Marin; Poljak, Igor; Šafarić, Barbara; Idžojtić, Marilena; Ćurković-Perica, Mirna (2012): 'Candidatus Phytoplasma pini' in Pinus mugo and P. halepensis from Croatia. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, book of abstracts, p70, Primošten, Hrvatska

6. Krstin, Ljiljana; Ježić, Marin; Rigling, Daniel; Ćurković-Perica, Mirna (2012): *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) from Croatia - Sequence Variation and Impact on Fungal Host, Internatinal Conference Molecular Ecology, p33, Beč; Austrija

7. Ježić, Marin; Rigling, Daniel; Krstin, Ljiljana; Ćurković-Perica, Mirna (2011): Invasion pathways of *Cryphonectria parasitica* in Croatia as revealed by SCAR-typing. FEMS 2011, abstract book, p188, Ženeva, Švicarska

8. Krstin, Ljiljana; Rigling, Daniel; Ježić, Marin; Ćurković-Perica, Mirna (2011): Genetic variation and virulence of *Cryphonectria hypovirus* (CHV-1) from FEMS 2011, abstract book, p155, Ženeva, Švicarska

9. Marček, Tihana; Tkalec, Mirta; Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin; Vidaković-Cifrek, Željka (2011): Oxidative stress and antioxidative defence in tobacco dihaploid lines under salinit, 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. p168, Budimpešta, Mađarska

10. Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin; Cesar, Vera; Ludwig-Müller, Jutta; Lepeduš, Hrvoje; Mladinić, Marin; Katić, Marija; Leljak-Levanić, Dunja (2010): Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. Abstract book of the Second scientific meeting of the COST Action (FA0807) "Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management" p79 Sitges, Španjolska

11. Ježić, Marin; Krstin, Ljiljana; Rigling, Daniel; Ćurković-Perica, Mirna (2010): Populacijska Struktura gljive mješinarke *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj i Sloveniji. Treći hrvatski botanički kongres pp104-105, Murter, Hrvatska

12. Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin; Cesar, Vera; Ludwig-Müller, Jutta; Lepeduš, Hrvoje; Mladinić, Marin; Katić, Marija; Leljak-Levanić, Dunja (2009): Auxin-induced recovery of phytoplasma-infected periwinkle. Book of Abstracts of the 3rd Intrernational Conference on Enviromental, Industrial and Applied Microbiology. p146, Lisabon, Portugal

13. Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin; Ćelepirović, Nevenka; Novak-Agbaba, Sanja; Rigling, Daniel; Krstin, Ljiljana (2009): Population diversity of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. Book of Abstracts III International Conference on Enviromental, Industrial and Applied Microbiology, p133, Lisabon, Portugal

14. Ježić, Marin; Ćelepirović, Nevenka; Novak-Agbaba, Sanja; Ćurković Perica Mirna (2009): Genetska raznolikost gljive *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem pp123-124 Osijek, Hrvatska

15. Ježić, Marin; Leljak-Levanić, Dunja; Ludwig-Müller, Jutta; Mladinić, Marin; Katić, Marija; Ćurković-Perica, Mirna (2009): Diferencijalna metilacija DNA domaćinskog genoma bi mogla biti uzrok eliminacije fitoplazmi u izdancima madagaskarskskog zimzelena uzgajanog in vitro nakon tretmana auksinima. 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka p148, Osijek, Hrvatska

16. Ježić, Marin; Tkalec, Mirta; Vidaković-Cifrek, Željka; Kozina, Andrijana; Kozina, Bernard; Karoglan, Marko; Osrečak, Mirela; Ćurković-Perica, Mirna (2009): Pokazatelji okidacijskog stresa u vinovoj lozi inficiranoj fitoplazmama Zbornik sažetaka 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem pp152-153, Osijek, Hrvatska