

# Raznolikost virusa *Cryphonectria hypovirus 1* na području Kašta

---

**Pavičić, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:476012>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivana Pavičić

**Raznolikost virusa *Cryphonectria hypovirus 1* na području**

**Kašta**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice i pod neposrednim vodstvom dr. sc. Lucije Nuskern Karaice. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## ***Zahvale***

*Hvala mami i tati, djedu i baki na brizi i emocionalnoj i financijskoj potpori tijekom školovanja i u svim drugim životnim aspektima.*

*Posebno hvala mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perici na vodstvu i pruženoj pomoći pri pisanju ovog diplomskog rada.*

*Posebno hvala mojoj dragoj pomoćnoj voditeljici Luciji Nuskern Karici na njenom strpljenju, trudu, uloženom vremenu i motivaciji te pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

## Popis kratica i simbola:

<b>CBB</b>	<i>Comassie brilliant blue</i>
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
<b>deH<sub>2</sub>O</b>	destilirana voda
<b>diH<sub>2</sub>O</b>	deionizirana voda
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleozid-trifosfat
<b>dsRNA</b>	dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. <i>double-stranded ribonucleic acid</i> )
<b>kb</b>	kilobaza
<b>ORF</b>	otvoreni okvir čitanja (engl. <i>open reading frame</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PDA</b>	krumpirov dekstrozni agar (engl. <i>potato dextrose agar</i> )
<b>RT</b>	reverzna transkripcija
<b>TBE puffer</b>	Tris-borat-EDTA puffer
<b>UTR</b>	netranslatirana regija (engl. <i>untranslated region</i> )
<b>vc tip</b>	tip vegetativne kompatibilnosti (engl. <i>vegetative compatibility</i> )
<b>T<sub>m</sub></b>	temperatura taljenja (engl. <i>melting temperature</i> )

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Raznolikost virusa *Cryphonectria hypovirus 1* na području Kašta

Ivana Pavičić  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gljiva mješinaraka *Cryphonectria parasitica* uzročnik je raka kore pitomoga kestena (*Castanea sativa*). Virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) inficira gljivu *C. parasitica* te smanjuje njezinu virulenciju, fenomen koji nazivamo hipovirulencija te tako omogućava prirodnu biološku kontrolu raka kore pitomoga kestena. Vrsta CHV1 najbolje je do sada proučena vrsta hipovirusa i jedina prisutna u Europi, gdje postoje četiri podtipa ovog virusa. Prisutnost virusa dokazana je izolacijom virusne dsRNA, reverznom transkripcijom te amplifikacijom otvorenog okvira čitanja ORF A. Nakon sekvenciranja umnoženih fragmenata dobivene su djelomične sekvence ORF A duljine 1134 nukleotida, te su izrađena filogenijska stabla. Prevalencija virusa CHV1 na području Kašta iznosila je 50 %. Virusni sojevi s područja Kašta pripadaju istom, talijanskom podtipu, vrlo su srodni sojevima iz Slovenije, Italije i Švicarske, a manje srodni sojevima iz Španjolske, Njemačke i Francuske. Virusni sojevi s područja Kašta pripadaju genski vrlo srodnoj populaciji virusa, te se značajno ne razlikuju od starih sojeva izoliranih na području Hrvatske i Slovenije.

(56 stranica, 16 slika, 7 tablica, 41 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** *Cryphonectria parasitica*, hipovirus, rak kore kestena, biološka kontrola, molekularna filogenija

**Voditelj:** Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, red. prof.

**Neposredni voditelj:** Dr. sc. Lucija Nuskern Karaica

**Ocjenitelji:** Dr. sc. Marin Ježić, doc.

Dr. sc. Petar Kružić, izv. prof.

Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

**Zamjena:** Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

**Rad prihvaćen:** 1.02.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Diversity of *Cryphonectria hypovirus 1* in Kašt area**

Ivana Pavičić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sac fungus *Cryphonectria parasitica* is a causal agent of chestnut blight, a disease of sweet chestnut (*Castanea sativa*). *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) is a natural biocontrol agent of chestnut blight: it infects *C. parasitica* and reduces its virulence towards chestnut. This phenomenon is called hypovirulence. CHV1 is the best studied species of hypoviruses and the only one present in Europe, where four subtypes of this virus have been identified. CHV1 presence was determined by isolation of viral dsRNA, reverse transcription and amplification of open reading frame (ORF A). After sequencing of amplified fragments, partial ORF A sequences 1134 nucleotides long were obtained and phylogenetic trees constructed. The prevalence of CHV1 in Kašt was 50 %. All virus strains from Kašt are of the same, Italian subtype, and are closely related to strains from Slovenia, Italy and Switzerland, while they are more distantly related to strains from Spain, Germany and France. Virus strains from Kašt form genetically very similar population and they do not differ significantly from the old strains isolated in Croatia and Slovenia.

(56 pages, 16 figures, 7 tables, 41 references, original in: Croatian)

**Key words:** *Cryphonectria parasitica*, hypovirus, chestnut blight, biological control, molecular phylogeny

**Supervisor:** Dr. Mirna Ćurković Perica, Prof.

**Assistant supervisor:** Dr. Lucija Nuskern Karaica

**Reviewers:** Dr. Marin Ježić, Assist. Prof.  
Dr. Petar Kružić, Assoc. Prof.  
Dr. Nada Oršolić, Prof.

**Replacement:** Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof

**Thesis accepted:** 1.02.2018.

# SADRŽAJ

1.1.	Porodica <i>Hypoviridae</i> .....	1
1.2.	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i> (CHV1) .....	2
1.3.	<i>Cryphonectria parasitica</i> .....	5
1.4.	Hipovirulencija .....	7
1.5.	Ciljevi istraživanja .....	10
2.	Materijali i metode .....	11
2.1.	Materijali.....	11
2.1.1.	Kemikalije.....	11
2.1.2.	Uređaji.....	12
2.1.3.	Eksperimentalni izolati gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> i sojevi virusa CHV1 .....	12
2.2.	Metode .....	13
2.2.1.	Uzgoj gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> na krutoj hranidbenoj podlozi .....	13
2.2.2.	Određivanje morfologije gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> inficirane CHV1 virusom.....	14
2.2.3.	Liofilizacija i homogenizacija micelija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> .....	14
2.2.4.	Izolacija dvolančane RNA iz micelija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> .....	14
2.2.5.	Reverzna transkripcija dvolančane RNA .....	15
2.2.6.	Umnažanje otvorenog okvira čitanja virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom .....	16
2.2.7.	Elektroforeza umnožene cDNA u agaroznom gelu.....	18
2.2.8.	Sekvenciranje .....	18
2.2.9.	Analiza sekvenci .....	19
2.2.10.	Određivanje srodnosti virusnih sojeva i izrada filogenijskog stabla.....	19
3.	Rezultati .....	21
3.1.	Prevalencija virusa CHV1 na području Kašta.....	21
3.2.	Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta.....	21
3.3.	Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz drugih hrvatskih i slovenskih populacija.....	25
3.4.	Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz drugih europskih populacija .....	29
4.	Rasprava.....	47
5.	Zaključak.....	50
6.	Popis literature .....	51

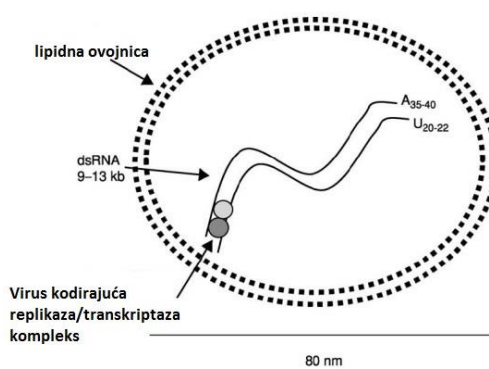


ŽIVOTOPIS..... 56

## 1. Uvod

### 1.1. Porodica *Hypoviridae*

Porodica *Hypoviridae* je prva opisana virusna porodica čiji članovi ne posjeduju strukturne proteine ni kapsidu, nemaju sposobnost stvaranja viriona, niti imaju ekstracelularnu fazu životnog ciklusa. Gola linearna virusna dvolančana RNA (dsRNA, od engl. double-stranded RNA) smještena je u membranskim vezikulama veličine 50 - 80 nm (Slika 1) u citoplazmi domaćina (Dawe i Nuss 2013).



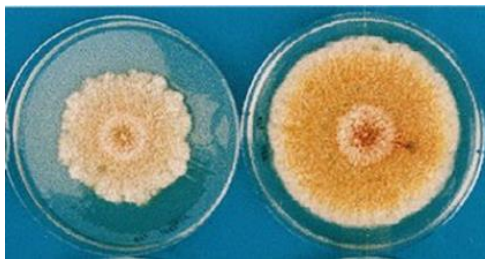
**Slika 1.** Shematski prikaz građe membranskih sekretornih vezikula virusne porodice *Hypoviridae* koje potječu iz trans-Glogijeve mreže unutar kojih se nalazi linearna virusna dvolančana RNA (prilagođeno prema: Hillman i Suzuki 2004).

Porodica *Hypoviridae* sadrži samo jedan rod – *Hypovirus*. Virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) najbolje je do sada proučena vrsta hipovirusa i jedina prisutna u Europi (Milgroom i Cortesi 2004). Prisutan je i u Aziji (Japan i Kina), odakle i potječe, no nije pronađen u Sjevernoj Americi, osim izuzetno na nekoliko mjesta gdje je unesen radi biološke kontrole (Peever i sur. 1997). Uz vrstu CHV1 do danas su poznate i opisane još tri vrste *Cryphonectria* hipovirusa - CHV2, CHV3 i CHV4. Nazvane su redosljedom kojim su otkrivene njihove nukleotidne sekvence, a međusobno se razlikuju u organizaciji genoma, sposobnosti utjecaja na domaćina i rasprostranjenosti. CHV2 je prisutan na području Sjeverne Amerike (New Jersey) i Kine, dok su CHV3 i CHV4 rasprostranjeni samo na području Sjeverne Amerike. Sve vrste roda *Hypovirus* inficiraju fitopatogenu gljivu *Cryphonectria parasitica* (Hillman i Suzuki 2004).

Virusne vrste CHV1 (12.7 kb) i CHV2 (12.5 kb) su vrlo slične i sadrže dva otvorena okvira čitanja (ORF A i ORF B). Nasuprot njima, vrste CHV3 (9.8 kb) i CHV4 (9.1 kb) imaju kraći genom i razlikuju se po tome što imaju samo jedan otvoreni okvir čitanja (Dawe i Nuss 2013).

## **1.2. *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1)***

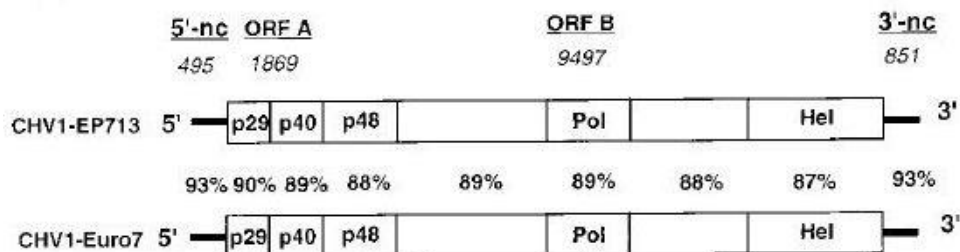
Virus CHV1 najbolje je proučavana vrsta hipovirusa i, kao što je već spomenuto, jedina prisutna u Europi (Milgroom i Cortesi 2004). Smatra se da je unesen u Europu iz Azije zajedno sa svojim domaćinom, fitopatogenom gljivom *C. parasitica* (Bryner i sur. 2012). Europski sojevi virusa CHV1 se na temelju razlika u nukleotidnoj sekvenci dijela genoma klasificiraju u četiri podtipa: talijanski (I), dva francuska (F1 i F2) i njemačko-španjolski (D/E) podtip (Gobbin i sur. 2003). Najrašireniji je talijanski podtip (I), koji je najzastupljeniji na području Švicarske, Italije, Francuske, Slovenije, Bosne i Hercegovine, Grčke, Makedonije, Turske i Hrvatske (Sotirovski i sur. 2006, Robin i sur. 2010, Krstin i sur. 2011, Feau i sur. 2014). Podtipovi F1 i F2 pronađeni su na području Francuske, Španjolske i Turske, dok je podtip D/E zastupljen na području Španjolske i Njemačke (Peters i sur. 2014). Hipovirulentnost i virulentnost, odnosno invazivni utjecaj fitopatogene gljive na domaćina – pitomi kesten, ovisi o prisutnosti virusa CHV1. Virulentni izolati gljive, to jest oni bez virusa CHV1, su izuzetno agresivni prema kestenu, uzrokuju rane te proizvode narančasti ili žuti pigment. Hipovirulentne izolate gljive, inficirane virusnom vrstom CHV1, karakterizira inhibirana spolna reprodukcija, značajno smanjenja nespolna sporulacija, manja agresivnost prema kestenu, te slabija pigmentacija. Takav, hipovirulentni miceliji je često bijeli (Slika 2), što predstavlja dobar, vidljivi biljeg za brzo utvrđivanje prisutnosti virusa (McCabe i sur. 1999, Milgroom i Cortesi 2004).



**Slika 2.** Usporedba hipovirulentnih izolata (lijevo) koji nisu pigmentirani i virulentnih izolata (desno) koje karakterizira narančasta pigmentacija pigmentirani (preuzeto iz: Chen i Nuss 1999).

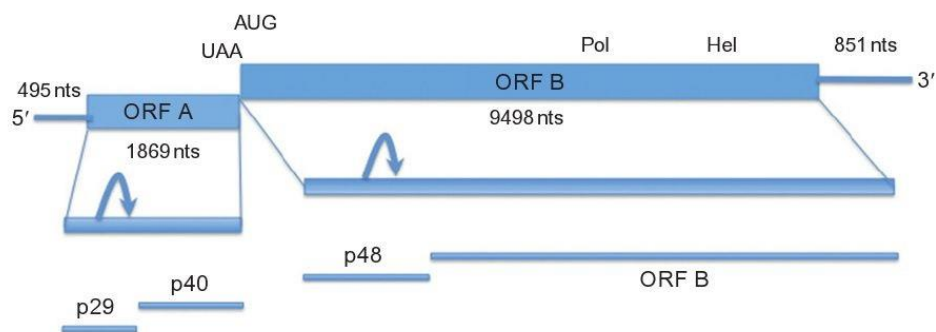
Osim u rasprostranjenosti, podtipovi virusa CHV1 razlikuju se i u virulenciji. Jača virulencija odnosno invazivnost virusa jače utječe na smanjenje sporulacije gljive i na njezino slabljenje što rezultira lošijim ekološkim fitnessom. Francuski podtipovi su najvirulentiji (F1 i F2), dok je talijanski podtip najmanje virulentan (Chen i Nuss 1999). Zbog smanjene mogućnosti prijenosa i održavanja u populacijama gljive *C. parasitica*, najvirulentniji sojevi CHV1 imaju smanjeni ekološki fitness te su jako rijetki u prirodi, dok su manje virulentni sojevi značajno zastupljeniji. Osim o genotipu virusa, smanjenje virulencije gljive u slučaju infekcije virusom CHV1 ovisi i o genotipu gljive (Robin i sur. 2010, Krstin i sur. 2017, Nuskern i sur. 2017).

Prototipski virusni soj CHV1/EP713 (francuski podtip) smanjuje virulenciju gljive i mijenja njezine razvojne procese. Nasuprot tome, *C. parasitica* inficirana virusnim sojem CHV1/Euro7 (talijanski podtip) agresivno kolonizira tkivo kestena nakon inokulacije, stvarajući rak rane 3 do 4 puta veće od onih koje uzrokuje *C. parasitica* inficirana virusnim sojem CHV1/EP713. Gljive inficirane virusnim sojem CHV1/Euro7 rastu brže od izogenih, neinficiranih izolata na umjetnim podlogama. Također, virusni soj CHV1/Euro7 dovodi do manjih fenotipskih promjena gljive domaćina nego virusni soj CHV1/EP713 (Chen i Nuss 1999). Ova dva virusna soja (Slika 3) dijele više od 90% identiteta na razini aminokiselina. Virusni soj CHV1/EP721 (talijanski podtip) uzrokuje fenotipske promjene koje se ne razlikuju od onih uzrokovanih sojem CHV1/Euro7 (Lin i sur. 2007), s kojim dijeli 99% identiteta na razini aminokiselina i 87% do 93% identiteta na razini nukleotida (Nuss, 2012).



**Slika 3.** Shematski prikaz sličnosti virusnih sojeva CHV1/Euro 7 i CHV1/EP713 na razini nukleotida unutar kodirajućih i nekodirajućih regija virusnog genoma. Sličnost pojedinih regija varira od 87% do 93% (preuzeto iz: Chen i Nuss 1999).

Genom vrste CHV1 sastoji se od 12 712 nukleotida (Shappira i sur. 1991).. Hipovirusna dsRNA ima 40-tak nukleotida dug poliadenilirani 3` kraj kodirajućeg lanca, koji je bazno sparen s poliuridiliranim 5` krajem nekodirajućeg lanca (Tartaglia i sur. 1986). Na kodirajućem lancu između 5` i 3` netranslatirane regije (engl. *untranslated region*, 5`UTR i 3`UTR) nalaze se dva uzastopna okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF A i ORF B) razdvojena pentanukleotidom 5`-UAAUG-3`, u kojemu UAA predstavlja završni kodon ORF A, dok AUG predstavlja početni kodon ORF B (Slika 4).



**Slika 4.** Organizacija genoma virusnog soja CHV1/EP713. Kodirajući lanac RNA sastoji se od 12 712 nukleotida i dvije važne kodirajuće domene ORF A i ORF B. ORF A je varijabilna regija koja kodira dva polipeptida p29 i p40, te je kao takva korisna za proučavanje filogenetskih odnosa na nižim sistemskim razinama, dok ORF B kodira protein p48, RNA-ovisnu RNA polimerazu i helikazu (preuzeto iz: Nuss 2011).

### 1.3. *Cryphonectria parasitica*

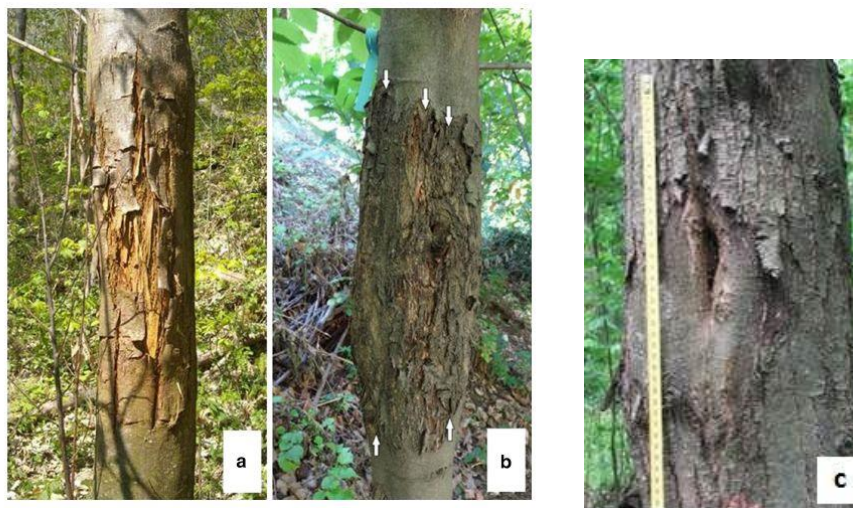
Gljiva mješinarica (odjeljak Ascomycota) *C. parasitica* uzročnik je raka kore pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.). Bolest je u Hrvatskoj prvi put primjećena 1955. godine u okolici Opatije (Kišpatić 1956) dok je u Europi prvi put zabilježena 1938. godine u Italiji (Biraghi 1946).

Stablo kestena inficira se ulaskom askospore (spolne spore) ili konidije (nespolne spore) kroz oštećenja kore koja mogu biti smještena pri bazi, uzduž debla ili na granama stabla. Klijanjem spore nastaje narančasti micelij koji se intenzivno rasprostire ispod kore stabla. Kako se hife gljive šire, tako usporedno proizvode i različite štetne tvari. Najznačajnija je oksalna kiselina koja snižava pH vrijednost inficiranog tkiva s 5,5 na 2,8 (McCarroll i Thor 1978), čime djeluje izrazito toksično na biljne stanice. Ono što se prvo primjećuje pri zarazi su promjene na kori stabla, koja postaje tamnija od okolne kore, plitko ulegnuta i blago crvena. Virulentni izolat gljive uzrokuje promjenu boje i uzdužno pucanje kore što uzrokuje njeno odvajanje (Slika 5) i stvaranje aktivnog raka (Slika 6a). Na tom području vidljiva su žuto-narančasta ili crvenkasta plodna tijela gljive. Dodatni simptomi su još i: žućenje i gubitak lišća, pojave različitih nekroza, hipertrofija te izostanak apscizije suhih listova u jesen (Halambek 1988, Glavaš 1999). Kada aktivni rak proдре do kambija dolazi do zaustavljanja transporta vode i hranjivih tvari, što dovodi do sušenja i odumiranja stabla iznad mjesta zaraze (Robin i sur. 2009). Micelij gljive prodire u stanice domaćina i na njemu parazitira crpeći hranjive tvari. S druge strane, micelij hipovirulentne gljive, koja je zaražena virusom CHV1, uzrokuje samo površinske nekroze karakterizirane hrapavom korom i zadebljanjem debla na mjestu zaraze (Slika 6b). Kako je nekroza u ovom slučaju samo površinska, micelij gljive sporo napreduje i ne prodire do kambija što može omogućiti oporavak stabla i manji stupanj oštećenja tj. blaži tijek infekcije (Novak-Agbaba i sur. 2000). Kalusirajući rak kestenove kore nastaje kada se virulentni izolat gljive inficira hipovirusom. Rana zacjeljuje stvaranjem kalusnog tkiva (Slika 6c) i stablo se oporavlja. Uzročnik hipovirulencije je upravo virus CHV1 koji inficira gljivu *C. parasitica* i smanjuje njezinu virulenciju. CHV1 ne uništava svog domaćina, ali ga oslabljuje, što omogućuje obranu i oporavak kestena zaraženih ovom fitopatogenom gljivom. Kada je došlo do pojave raka kore kestena u Europi, aktivno se započelo s biološkom kontrolom na principu hipovirulencije. Oboljela stabla s rakom

kore tretirana su hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica*, što je potaknulo stvaranje kalusnog tkiva i olakšalo zacjeljivanje rana i oporavak inficiranih stabala (Heiniger i Rigling 1994).



**Slika 5.** Napredna faza zaraze gljivom *Cryphonectria parasitica* na stablu kestena, primjećuje se odvajanje dijela kore od stabla (foto: Lucija Nuskern).



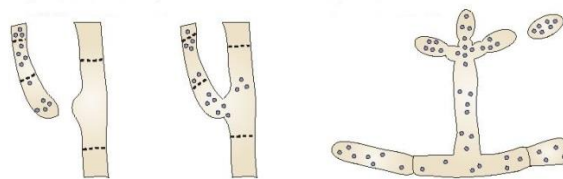
**Slika 6.** Aktivni rak (a), površinska nekroza (b) (preuzeto iz Prospero i Rigling 2016) i kalusno tkivo (c) (foto: Lucija Nuskern).

#### 1.4. Hipovirulencija

Fenomen prirodne biološke kontrole, koji štiti europski pitomi kesten od raka kore, nazvan je hipovirulencija (Heiniger i Rigling 1994) i temelji se na sposobnosti jednog patogena da modificira interakciju drugog patogena i njegovog domaćina. Pošto hipovirusi nemaju ekstracelularnu fazu replikacijskog ciklusa, njihovo širenje u populaciji je moguće horizontalnim prijenosom, što predstavlja osnovu biološke kontrole. Tijekom vegetativne faze rasta nitastih gljiva često dolazi do anastomoze hifa (Slika 7), tj. kontakta i fuzije hifa, miješanja citoplazmi i stvaranja heterokariona. Na taj način virus se također može proširiti sa zaražene jedinke na nezaraženu. Širenje virusa ograničeno je raznolikošću tipova vegetativne kompatibilnosti (vc, od engl. *vegetative compatibility*) gljive. U *C. parasitica* sustav heterokarionske ili vegetativne (ne)kompatibilnosti je antivirusni obrambeni mehanizam na razini populacije (Choi i sur. 2012), kontroliran s namjanje šest nevezanih *vic* lokusa. Jedinke s različitim alelima na jednom ili više *vic* lokusa su vegetativno nekompatibilne. Nakon anastomoze hifa takvih jedinki dolazi do programirane stanične smrti i nemogućnosti stvaranja stabilnih heterokariona (Glass i Kaneko 2003). Dok se virus prenosi vrlo lako između kompatibilnih sojeva gljiva, učinkovitost prijenosa obično je smanjena između jedinki različitih *vc* tipova. Inhibicija prijenosa između nekompatibilnih sojeva, međutim, nije potpuna, već ovisi o broju različitih *vic* lokusa. Virusni soj se može prenijeti i između vegetativno nekompatibilnih izolata, no to se događa s mnogo manjom učestalošću (Cortesi i sur. 2001).

Vertikalno širenje virusa moguće je i nespolnim sporama, konidijama, koje su u hipovirulentnim izolatima prisutne u značajno manjem broju. Vertikalni prijenos virusa do sada nije zabilježen spolnim sporama, askosporama (Prospero i sur. 2006). Konidije su spore nespolnog porijekla koje nastaju mitozom, te se najčešće prenose na male udaljenosti, osim ako u prijenos nisu uključeni vektori, kao što su čovjek, kukci (tvrdo krilci *Agrilus sp.*), ptice, vjetar ili kiša. Spolno razmnožavanje negativno utječe na širenje hipovirulencije, jer osim što askospore ne sadrže virus, rekombinacijom *vic* gena *C. parasitica* povećava se raznolikost *vc* tipova u populaciji, što se može negativno odraziti na efikasnost prijenosa virusa (Cortesi i Milgroom 1998).





**Slika 7.** Način prijenosa virusa CHV1 anastomozom, tj. fuzijom hifa (lijevo) i nespolnom sporulacijom tj. konidijama (desno) (Preuzeto iz Nuss 2005).

Tijekom XX st. u mnogim šumama kestena, aktivno se započelo s biološkom kontrolom na principu hipovirulencije. Oboljela stabla s rakom kore tretirana su hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica*, što je potaknulo stvaranje kalusnog tkiva, olakšalo zacjeljivanje rana i omogućilo oporavak inficiranih stabala. Velik broj tretiranih stabala i visoka stopa hipovirulencije pridonijeli su uspješnosti biološke kontrole u Europi (Heiniger i Rigling 1994). U Hrvatskoj 1978. prvi puta su uočene površinske nekroze u kontinentalnim populacijama kestena i velik broj stabala počeo se oporavljati od bolesti. U dosadašnjim istraživanjima prisutnost virusa CHV1 utvrđena je u svim istraživanim populacijama gljive *C. parasitica* na području Hrvatske što omogućuje prirodnu biološku kontrolu raka kestenove kore, ali prevalencija virusa CHV1 značajno se razlikuje: od samo 12% (u obalnim populacijama) do preko 60% (u nekim kontinentalnim populacijama) (Krstin i sur. 2008). Nadalje, pomoću vc tipizacije otkrivena je velika genska raznolikost koja bi mogla ometati prirodno širenje virusa CHV1 u populacijama *C. parasitica* u Hrvatskoj.

Antropogena biološka kontrola korištenjem dobro definiranih sojeva virusa CHV1 poželjna je u populacijama s niskom prevalencijom hipovirulentih *C. parasitica* izolata. Zbog učinkovitije biološke kontrole bitno je znati trenutno stanje i prirodnu prevalenciju virusnih sojeva u određenoj populaciji, te utvrditi kojem podtipu virusa pronađeni sojevi pripadaju. Za uspješnu biološku kontrolu važno je odabrati odgovarajuće sojeve virusa CHV1 s optimalnim učinkom na gljivu domaćina. Međutim, izabrani sojevi CHV1 mogu imati različit utjecaj na različite genotipove gljive (Peever i sur. 2000, Nuskern i sur. 2017). Predviđanje uspjeha ili neuspjeha biološke kontrole nije jednostavno, s obzirom da su u interakciji tri čimbenika: pitomi kesten, gljiva koja parazitira na kestenu i hipovirus kao agens biološke kontrole. Na oporavak šume ima utjecaj i odgovor stabla kestena na

pojedine hipovirulentne izolate (Krstin i sur. 2016). S obzirom na kompleksnost interakcija među članovima ovog trodijelnog sustava, iznimno je teško pronaći samo jedan virusni soj koji će imati optimalni učinak na sve kombinacije virusa, gljive i kestena, pogotovo u populacijama kestena u kojima je raznolikost gljive iznimno visoka kao što je zabilježeno u Hrvatskoj. U takvim situacijama moguća strategija je upotreba više od jednog virusnog soja (Krstin i sur. 2016).

Dakle, zbog učinkovitije biološke kontrole bitno je znati trenutno stanje i prirodnu prevalenciju virusa u određenoj populaciji, te utvrditi kojem podipu virusa pronađeni sojevi pripadaju.

### 1.5. Ciljevi istraživanja

- Odrediti morfologiju izolata gljive *C. parasitica* prikupljenih na području Kašta
- Odrediti prevalenciju i srodnost sojeva virusa CHV1 u populaciji gljive *C. parasitica* na području Kašta
- Odrediti srodnost pronađenih virusnih sojeva na području Kašta sa virusnim sojevima prethodno izoliranim na području Hrvatske i Slovenije
- Odrediti srodnost virusnih sojeva CHV1 prisutnih na području Kašta sa sojevima virusa u drugim zemljama Europe

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Materijali

#### 2.1.1. Kemikalije

U Tablici 1 prikazane su osnovne kemikalije i komercijalni paketi korišteni u istraživanju.

**Tablica 1.** Osnovne kemikalije

<b>KEMIKALIJA</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
Agaroz	Sigma-Aldrich
<i>Commasie brilliant blue</i> (CBB)	Sigma-Aldrich
Dekontaminacijski reagens <i>DNA away</i>	Thermo Scientific
Etanol 96% p.a.	Kemika d.d.
Fluorescentna boja <i>GelStar Nucleic Acid Gel Stain</i>	Lonza
Hranidbene podloge: Krumpirov dekstrozni agar (PDA)	Difco
Komercijalni paketi: <i>RNeasy Plant Mini Kit</i>	Qiagen
<i>GoScript Reverse Transcription System</i>	Promega
<i>TaKaRa Taq™ Hot Start Version</i>	Takara
Biljeg za određivanje molekularne mase: GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Pufer 10x TBE	Lonza

### 2.1.2. Uređaji

U Tablici 2 prikazani su uređaji i aparature korišteni u istraživanju.

**Tablica 2.** Uređaji

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ
Centrifuga <i>Multi-spin</i>	Biosan
Centrifuga <i>Mikro220R</i>	Hettich Zentrifugen
Kalup i uređaj za elektroforezu	Bio-Rad
Komora za uzgoj u kontroliranim uvjetima, fitotron	Pol-eko aparatura
Liofilizator <i>Alpha 1-2/LD</i>	Christ
Mikrovolumenski spektrofotometar <i>Nanodrop 2000 C</i>	Thermo Scientific
Napajanje za elektroforezu <i>PowerPac HC</i>	Bio-Rad
PCR uređaj <i>GeneAmp® PCR System 2700</i>	Applied Biosystems
UV transiluminator <i>DigiGenius</i>	Syngene
<i>TissueLyser</i>	Qiagen

### 2.1.3. Eksperimentalni izolati gljive *Cryphonectria parasitica* i sojevi virusa

#### CHV1

U ovom istraživanju korištene su laboratorijske kulture gljive *C. parasitica* i virusa CHV1 prikupljene u prethodnim istraživanjima i pohranjene u kolekciji Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju na -80 °C. Svi izolati gljive *C. parasitica* sakupljeni su na području Kašta, nedaleko od slovenske granice tijekom 4 uzorkovanja u vremenskom razdoblju od proljeća 2014. do kraja 2015. godine.

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Uzgoj gljive *Cryphonectria parasitica* na krutoj hranidbenoj podlozi

Izolati gljive *C. parasitica* uzgojeni su u Petrijevim zdjelicama na krutoj hranidbenoj podlozi krumpirov dekstrozni agar (PDA, od engl. *potato dextrose agar*). Hranidbena podloga PDA pripremljena je prema uputi proizvođača: 39 g praha PDA otopljeno je u 1 L deionizirane vode uz zagrijavanje i povremeno miješanje kako ne bi došlo do stvaranja taloga. Staklena tikvica zatvorena je vatenim čepom i aluminijskom folijom. Hranidbena podloga PDA sterilizirana je autoklaviranjem 20 min pri temp. od 121 °C i tlaku od 1,5 bar. Nakon kratkog hlađenja podloga PDA izlivena je u sterilne plastične Petrijeve zdjelice promjera 60 mm do visine 5 mm. Podloge su sterilno izliveno u kabinetu s vertikalnim strujanjem sterilnoga zraka (laminar) (0,45 m/s) na radnoj površini dezinficiranoj 70%-tnim etanolom, u blizini plamenika. Nakon što se agar ohladio i polimerizirao, poklopljene Petrijeve zdjelice pohranjene su u hladnjak na temperaturu od 4 °C.

Uzorci koji su korišteni u ovom istraživanju pohranjeni su u 22 %-tnom glicerolu na -80 °C. Uzorci su nasađeni kako bi se oporavili od posljedica pohranjivanja na -80 °C, a zatim kad su narasli su subkultivirani na celofan kako bi se izolirala RNA. Skalpelom je uzet komadić agara s micelijem veličine 3×3×3 mm te je nasađen u središte Petrijeve zdjelice s tkivom okrenutim prema dolje. Svi postupci manipulacije rađeni su u sterilnim uvjetima u kabinetu sa vertikalnim strujanjem sterilnoga zraka. Skalpel je između obrade uzoraka steriliziran uranjanjem u 70%-tn etanol i opaljen na plameniku. Izolati gljive *C. parasitica* nasađeni su na krutu hranidbenu podlogu PDA u Petrijevim zdjelicama prekrivenu sterilnim celofanom. Nakon nasađivanja označene Petrijeve zdjelice zatvorene su parafilmom zbog sprječavanja mogućeg zagađenja. Nasađeni uzorci inkubirani su u komori za uzgoj u kontroliranim uvjetima pri 24 °C i 70 % relativne vlažnosti u periodu od sedam dana u mraku, a zatim su sedam dana izloženi danjem svjetlu.

### 2.2.2. Određivanje morfologije gljive *Cryphonectria parasitica* inficirane virusom CHV1

Nakon 14 dana uzgoja procijenjena je morfologija poraslih kultura gljive. Izolati koji su imali bijelu pigmentaciju umjesto narančaste te usporeni rast klasificirani su kao hipovirulentni, tj. zaraženi virusom CHV1. Takvi uzorci korišteni su u nastavku eksperimenta.

### 2.2.3. Liofilizacija i homogenizacija micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

Miceliji uzoraka sastrugani su s celofana, prebačeni u mikroepruvetu od 2 mL i smrznuti na -80 °C preko noći. Zatim su liofilizirani u otvorenim mikroepruvetama 24 h pod vakuumom pri temperaturi od -50 °C u liofilizatoru. Liofilizacijom se uklanja voda, čime se omogućuje očuvanje integriteta i aktivnosti svih bioloških komponenti. Liofilizirani uzorci usitnjeni su pomoću metalnih kuglica u uređaju za usitnjavanje tkiva *TissueLyser* na frekvenciji od 30 Hz tijekom 1 min.

### 2.2.4. Izolacija dvolančane RNA iz micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

Virusna dvolančana RNA (dsRNA) izolirana je pomoću komercijalnog paketa *RNeasy Plant Mini Kit*, prema protokolu proizvođača. Postupak izolacije izveden je pri sobnoj temperaturi, a pribor i kemikalije su bili sterilni i bez RNaza.

Liofiliziranom tkivu mase 3-5 mg dodano je 450 µL RLC pufera, po potrebi tkivo je dodatno homogenizirano pomoću mikrotučka, te je otopina promiješana na vrtložnoj mješalici (40 Hz). Lizat je prebačen u *QIAshredder spin* kolonu te centrifugiran 2 min pri maksimalnoj brzini okretanja rotora. Supernatant je dekantiran u novu mikroepruvetu, a talog je bačen. U pročišćeni lizat dodano je 225 µL 96 %-tnog etanola te je otopina promiješana okretanjem zatvorene mikroepruvete. Volumen od 650 µL uzorka bez taloga prenesen je u novu *RNeasy Mini spin* kolonu i centrifugiran 15 sekundi pri 8000 g, a eluat je bačen. Volumen od 700 µL RW1 pufera dodan je u kolonu te centrifugiran 15 sekundi pri 8000 g, nakon čega je eluat bačen. Zatim je 500 µL RPE pufera za ispiranje dodano u kolonu te centrifugirano 15 sekundi pri 8000 g. Eluat je bačen, a cijeli korak ispiranja je ponovljen još jednom. Nakon toga je po potrebi kolona centrifugirana 1 min pri maksimalnoj brzini okretanja rotora kako bi se membrana osušila te je prebačena u mikroepruvetu od 1,5 mL. Zatim je dodano 30 µL elucijskog pufera direktno na membranu kolone i centrifugirano 1 min pri 8000 g kako bi se eluirala dsRNA.

Koncentracija i čistoća izolirane dsRNA u uzorcima provjerene su na mikrovolumenskom spektrofotometru *Nanodrop*. Mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm određena je koncentracija dsRNA. Onečišćenje uzorka proteinima izračunato je iz omjera apsorbancija na valnim duljinama od 260 i 280 nm. Kao referentni uzorak za kalibraciju uređaja korišten je pufer za eluiranje.

### **2.2.5. Reverzna transkripcija dvolančane RNA**

Izolirana virusna dsRNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije (RT) pomoću komercijalnog paketa *GoScript reverse transcription system* prema protokolu proizvođača. Prvo je u mikroeprovete za PCR otpipetirano 4  $\mu\text{L}$  izolirane dsRNA i 1  $\mu\text{L}$  nasumičnih početnica (0,5  $\mu\text{g}$  početnica/reakciji). Smjesa je inkubirana 5 min pri temp. od 70 °C u PCR termobloku (*GeneAmp® PCR System 2700*) kako bi se denaturirala dsRNA i vezale početnice (25 °C / 5 min), nakon čega je uslijedila ekstenzija DNA (42 °C / 60 min) i inaktivacija reverzne transkriptaze (70 °C / 15 min). Zatim je smjesa inkubirana 5 min u posudi s vodom i ledom, te odmah pohranjena na led. Kao negativna kontrola reverzne transkripcije umjesto uzorka dodana je deionizirana voda, a kao pozitivna kontrola uzorak s prethodno dokazanom prisutnošću CHV1 dsRNA.

Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju prikazan je u Tablici 3. Ukupni volumen smjese za svaku reakciju bio je 15  $\mu\text{L}$ . Svi sastojci su prethodno promiješani na vrtložnoj miješalici nekoliko sekundi, a pripremljena reakcijska smjesa pohranjena je na ledu. U 5  $\mu\text{L}$  smjese RNA i nasumičnih početnica dodano je 15  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese za RT, te je konačni volumen reakcije bio 20  $\mu\text{L}$ .



**Tablica 3.** Reakcijska smjesa za jednu reakciju reverzne transkripcije dsRNA virusa CHV1 pomoću nasumičnih početnica.

Sastojak	Volumen za 1 RT smjesu ( $\mu\text{L}$ )	Početna koncentracija	Konačna koncentracija u 20 $\mu\text{L}$
GoScript reakcijski pufer	4	5×	1×
MgCl <sub>2</sub>	4	25 mM	5 mM
dNTP Mix	1	10 mM	0,5 mM
Rekombinantni RNazin	0,5	40 U/ $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$
GoScript reverzna transkriptaza	*1	20×	1
Sterilna voda	4,5	-	-
Ukupno	<b>15</b>	-	-
dsRNA + nasumične početnice	<b>5</b>	-	-
<b>Konačno</b>	<b>20</b>	-	-

Proizvođač nije definirao koncentraciju, već samo navodi da je za jednu reakciju od 20  $\mu\text{L}$  potrebno dodati 1  $\mu\text{L}$  enzima.

### 2.2.6. Umnažanje otvorenog okvira čitanja virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom

Komplementarna DNA dobivena reverznom transkripcijom umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) prema protokolu Allemana i sur. (1999). Umnožen je odsječak jedne regije virusnog genoma (ORF A) te je korišten jedan set genski specifičnih početnica (Tablica 4).

**Tablica 4.** Početnice za amplifikaciju otvorenog okvira čitanja ORF A u genomu virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom prema Allemanu i sur. (1999).

Regija CHV1	Početnice	Sekvenca početnice u smjeru 5'→3'	Udio CG/%	T <sub>m</sub> /°C
ORF-A	EP 713-5	TTGGATTCCCGATTCTTCA	45	54
	R2280	CTTACCATCTCGCTTGACAAA	42,86	52,7

Za reakciju umnažanja dijela ORF A (1 439 nukleotida) korišten je komercijalni paket *TaKaRa Taq™ Hot Start Version*. Pripremljena je reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom ORF A (Alleman i sur. 1999) prema Tablici 5, tako da je ukupni volumen smjese za svaku reakciju bio 24,5  $\mu\text{L}$ . Prethodno su svi sastojci promiješani nekoliko sekundi na vrtložnoj miješalici. Pripremljene reakcijske smjese pohranjene su na ledu.

**Tablica 5.** Reakcijska smjesa za jednu lančanu reakciju polimerazom otvorenog okvira čitanja A u genomu virusa CHV1.

Sastojak	Volumen za 1 PCR smjesu ( $\mu\text{L}$ )	Početna koncentracija	Konačna koncentracija u 25 $\mu\text{L}$
puffer	2,5	10 $\times$	1 $\times$
dNTP Mix	2	2.5 mM	0,2mM
Početnica 1	0,5	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
Početnica 2	0,5	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
Taq HS DNA polimeraza	0,25	5 U/ $\mu\text{l}$	0,05 U/ $\mu\text{l}$
Sterilna voda	18,75	-	-
<b>Ukupno</b>	<b>24,5</b>	-	-
Uzorak cDNA	<b>0,5</b>	-	-
<b>Konačno</b>	<b>25</b>	-	-

U mikroeprevete za PCR otpipetirano je 24,5  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese i 0,5  $\mu\text{L}$  uzorka. U svim pokusima korištena je pozitivna kontrola (originalni izolat gljive EP713) i negativna kontrola (sterilna voda). PCR reakcija odvijala se u uređaju *PCR System 2700* prema uvjetima u Tablici 6, nakon čega su uzorci pohranjeni pri temp. od 4  $^{\circ}\text{C}$ . Kako bi se povećala specifičnost vezanja početnica PCR reakcije korišten je tzv. *touchdown* PCR, kod kojeg se specifičnost vezanja postiže višom temperaturom sparivanja početnica koja se postepeno smanjuje kroz određeni broj ciklusa.

**Tablica 6.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom otvorenog okvira čitanja A u genomu virusa CHV1

	Broj ciklusa	Temp.	Trajanje ciklusa
<b>Početna denaturacija</b>	1 ×	94 °C	5:00 minuta
<b>Ekstenzija DNA</b>	10 ×	94 °C	1:00 minuta
		60 °C	1:30 minuta (spuštanje po 0,5 °C u svakom ciklusu)
		72 °C	2:00 minute
<b>Ekstenzija DNA</b>	25 ×	94 °C	1:00 minuta
		55 °C	1:30 minuta
		72 °C	2:00 minute
<b>Inaktivacija polimeraze</b>	1 ×	72 °C	10:00 minuta

### 2.2.7. Elektroforeza umnoženih amplicona u agaroznom gelu

Umnoženi ampliconi analizirani su elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u 0,5× TBE puferu. Ohlađenom gelu dodano je 2 µL boje 0,5× *GelStar<sup>TM</sup> nucleic acid gel stain*. Za određivanje veličina razdvojenih vrpce korišteni su biljezi molekularnih masa: u prvu jažicu otpipetirano je 3 µL markera. U ostale jažice otpipetirano je po 5 µL uzorka umnoženih DNA amplicona pomiješane s 1 µL 6x puferom za nanošenje uzoraka. Elektroforeza se odvijala 30 min pod stalnim naponom od 80/15 5,33 V/cm na uređaju *PowerPac.HC*. Gel je vizualiziran pomoću UV-transiluminatora *DigiGenious* i fotografiran digitalnom kamerom.

### 2.2.8. Sekvenciranje

Umnoženi PCR odsječci su zajedno s početnicama R2280 i EP-713-5 (10 µM) poslani na sekvenciranje u *Macrogen* (Nizozemska). Sekvencirana su oba lanca PCR produkta kapilarnom elektroforezom.

### 2.2.9. Analiza sekvenci

Dobivene neobrađene sekvence analizirane su u programu Sequencher 4.8. Uspoređena su očitavanja sekvencirane sekvence s kodirajućeg i nekodirajućeg lanca s referentnom sekvencom Euro7 (talijanski podtip, GenBank accession number AF082191) koja je preuzeta iz NCBI baze podataka (od engl. *National Center for Biotechnology Information*, Nacionalni centar za biotehnoške informacije).

### 2.2.10. Određivanje srodnosti virusnih sojeva i izrada filogenijskog stabla

Filogenijska stabla izrađena su u programu Mega 7 uz pomoć statističkih metoda i modela: metoda maksimalne vjerojatnosti (od engl. *Maximum Likelihood*), metoda maksimalne štedljivosti (od engl. *Maximum Parsimony*), Tamura-Nei modela i Bootstrap testa. Višestruko sravnjivanje sekvenci odrađeno je u programu Mega 7 korištenjem algoritma Clustal W. Metoda najveće vjerojatnosti proračunava vjerojatnost očekivanja svake moguće nukleotidne pozicije u nutarnjem čvoru i rekonstruira vjerojatnost strukture stabla iz tih vjerojatnosti. Vjerojatnost svih smislenih toplogija stabla traži se na ovaj način, te se najvjerojatnije stablo odabire kao istinito. Metoda najveće vjerojatnosti je najdosljednija od svih metoda (Graur i Li, 2000). Metoda najveće štedljivosti bazira se na filozofskom principu poznatom kao Okamova oštrica. U njoj se nastoji pronaći filogenijskostablo takve topologije da je za njegovo objašnjenje potreban najmanji mogući broj promjena karaktera (npr. mutacija). Metoda najveće štedljivosti ne radi nikakve eksplicitne pretpostavke osim one o štedljivosti, a to znači da je stablo koje zahtjeva manji broj supstitucija bolje od onog stabla koje zahtjeva veći broj. To ujedno znači da takvo stablo smanjuje broj homoplazijskih događaja poput paralelizama, konvergencije i povratnih supstitucija (Graur i Li 2000). Provedene su tri različite analize sekvenci virusa CHV1 s područja Kašta:

- 1) Usporedba sojeva prisutnih na području Kašta međusobno. Filogenijsko stablo ukorijenjeno je virusnim sojem EP713 (F1 podtip, GenBank accession number M57938). Sekvence su analizirane od 953. do 2 087. nukleotida.
- 2) Usporedba sojeva s područja Kašta sa sojevima iz različitih hrvatskih i slovenskih populacija sakupljenih u periodu 2004.-2006. (Krstin i sur. 2008; Krstin i sur. 2011). Filogenijsko stablo je također ukorijenjeno sojem EP713. Sekvence su analizirane od 575. do 1136. nukleotida.

- 3) Usporedba sojeva s područja Kašta sa sojevima iz ostatka Europe: Katalonije (Castano i sur. 2014), Švicarske (Gobbin i sur. 2003, Prospero i Rigling 2016), Njemačke (Peters i sur. 2014). Filogenijsko stablo je također ukorijenjeno sojem EP713. U ovoj analizi sekvence su podijeljene u dvije skupine s obzirom na broj nukleotida u sekvenci i broj sekvenci korištenih prilikom izrade filogenijskog stabla:
- a) dulje sekvence od 951. do 2 087. nukleotida (Peters i sur. 2014, Prospero i Rigling 2016),
  - b) kraće sekvence od 1 526. do 1 789. nukleotida (Castano i sur. 2014., Gobbin i sur. 2003., Prospero i Rigling 2016), uključujući u analizu i dulje sekvence iz slučaja a) ali skraćene na duljinu najkraće sekvence.

**Tablica 7.** Virusni sojevi i GenBank accession number

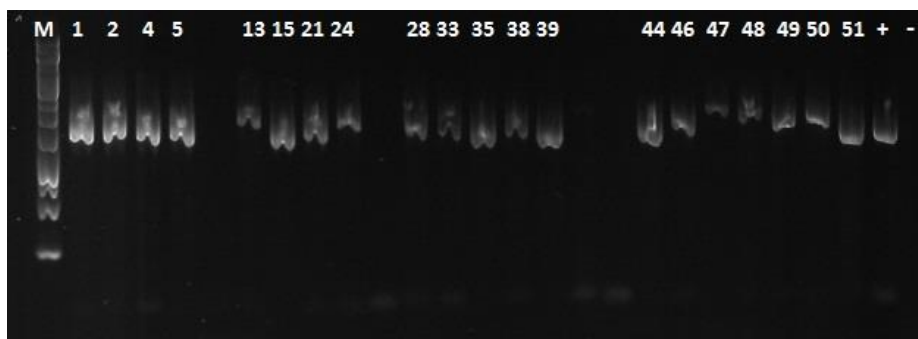
<b>Podtip</b>	<b>Prototipski virusni soj</b>	<b>GenBank accession number</b>
Francuski (F1)	EP713	M57938
Talijanski (I)	EP721	DQ861913
Talijanski (I)	Euro7	AF082191

Sekvence virusnih sojeva EP713 (F1 podtip), EP721 (I podtip, GenBank accession number DQ861913) i Euro7 (I Podtip) preuzete su iz NCBI baze podataka. Svaka molekularna filogenijska analiza provedana je pomoću dvije različite metode (metoda maksimalne vjerojatnosti i metoda maksimalne štedljivosti) pa tako za svaki skup podataka imam dva različita prikaza filogenijskog stabla.

### 3. Rezultati

#### 3.1. Prevalencija virusa CHV1 na području Kašta

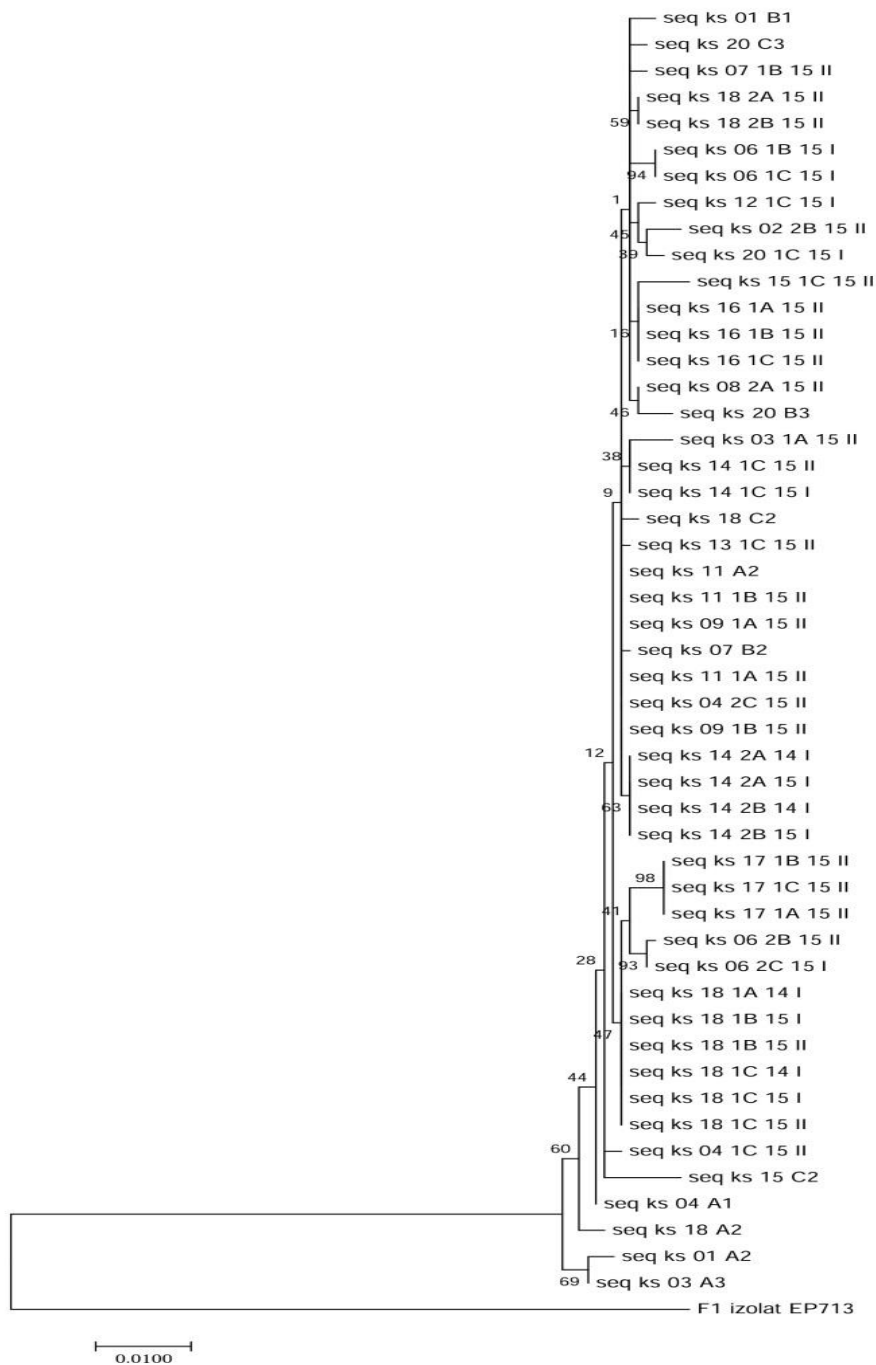
Iz laboratorijske kolekcije uspješno je uzgojeno 113 čistih kultura gljive *C. parasitica*, te je za 77 na temelju morfologije procijenjeno da su hipovirulentne. Iz njih je izolirana virusna dsRNA i njezina prisutnost dokazana PCR reakcijom umnažanja virusnog ORF A. Prisutnost virusa potvrđena je u 56 uzoraka (Slika 8), što je 49,5 % od ukupnog broja uzoraka, odnosno 72,7 % od broja procijenjenog na temelju morfologije. Od tih 56 uzoraka u kojima je prisutnost virusa CHV1 dokazana, 49 ih je uspješno sekvencirano u zadovoljavajućoj duljini.



**Slika 8.** Elektroforeza PCR produkata ORF A virusa CHV1 izoliranih iz micelija gljive *C. parasitica* s područja Kašta. Elektroforeza je provedena u 1%-tnom agaroznom gelu, 20 uzoraka od ukupno 56 pozitivnih uzoraka.

#### 3.2. Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta

Kako bi se utvrdila srodnost virusnih sojeva s područja Kašta napravljeno je filogenijsko stablo maksimalne vjerojatnosti (Slika 9) i maksimalne štedljivosti (Slika 10) na temelju djelomičnih sekvenci ORF A virusa CHV1 ukupne duljine 1 134 nukleotida, od položaja 953 do položaja 2 087. Virusni sojevi se jasno grupiraju u jednu grupu odvojenu od EP713 (F1 podtip) (Slika 9 i 10). Većina glavnih grupa su slabo podržane s malim bootstrap vrijednostima u rasponu od 12 do 70 za glavne grupe. Sekvence *ks 01 A2* i *ks 03 A3* izdvojile su se u zasebnu skupinu, kao i sekvenca *ks 18 A2*, ali u drugoj grupi (Slika 9).

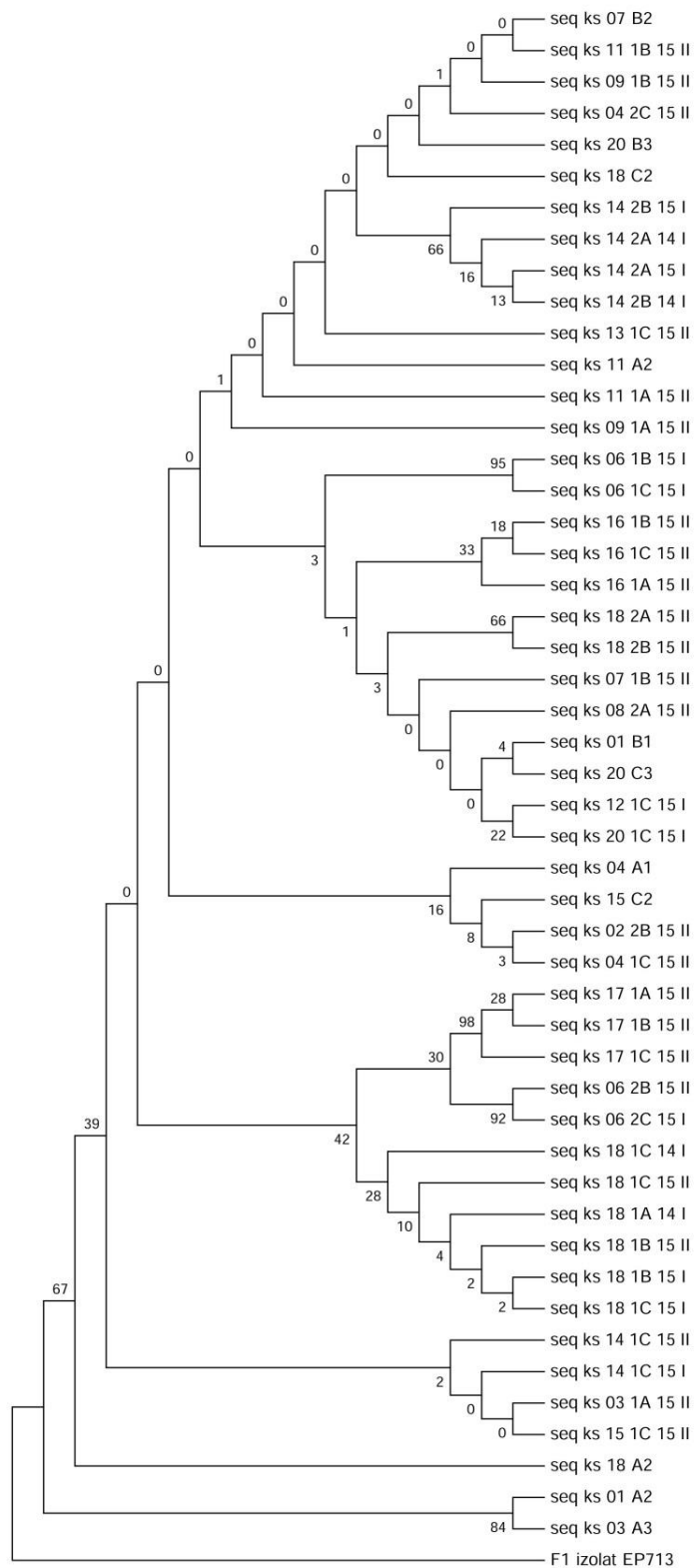


**Slika 9.** Evolucijsko stablo 49 sekvenci virusa CHV1 s područja Kašta (*ks*) dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 134 nukleotida, uz soj EP713 (F1 podtip) kao vanjsku grupu. Evolucijska analiza određena je pomoću metode maksimalne vjerojatnosti temeljene na Tamura-Nei modelu. Prikazano je stablo s najvećom vjerojatnosti, log vjerojatnosti (-2654.56). Brojevi pored svakog čvora predstavljaju mjeru podržanosti (bootstrap vrijednost) za čvor i izraženi su kao postotci – čvorovi s vrijednošću 100 su

maksimalno podržani. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 1 128 položaja.

Obje metode (Slika 9 i 10) pokazuju veliku sličnost virusnih sojeva s područja Kašta. Grupe koje su bolje podržane jednako se odvajaju u obje metode (seq *ks 06 2B 15 II*, seq *ks 06 2C 15 I*), slabije podržane grupe (seq *ks 12 1C 15 I*) se grupiraju drugačije. Sekvence *ks 01 A2* i *ks 03 A3* izdvojile su se u zasebnu skupinu u obje metode. Sekvenca seq *ks 18 A2* se zasebno grupira u oba slučaja. Također jasno je odvajanje virusnih sojeva u jednu grupu odvojenu od EP713 (F1 podtip) u obje metode (metoda maksimalne vjerojatnosti i metoda maksimalne štedljivosti).



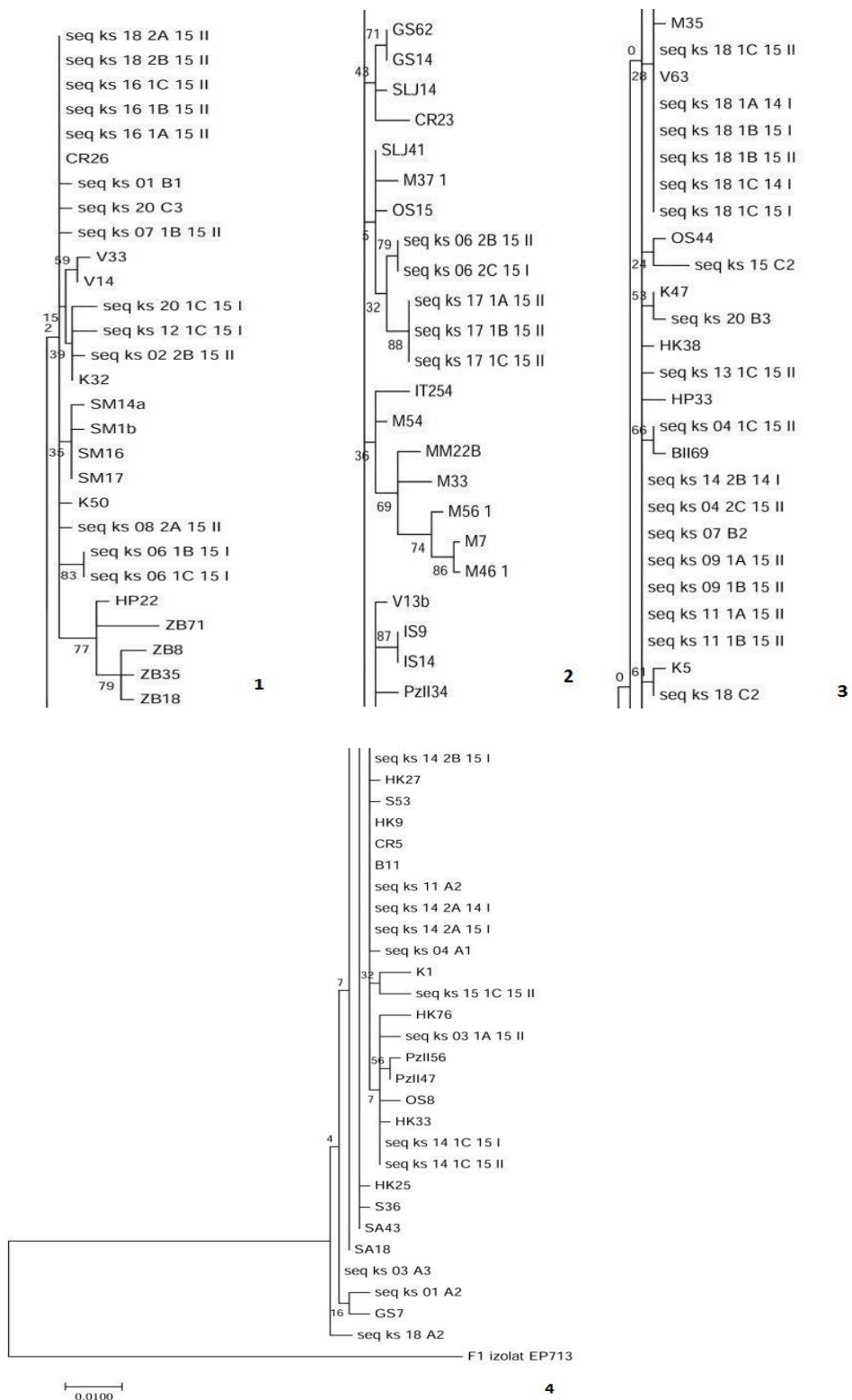


**Slika 10.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne štedljivosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 134 nukleotida. Sadrži

sekvence s područja Kašta (*ks*) i izolat EP713 (F1 podtip) kao vanjsku grupu. Prikazano je stablo # 1 s najvećom vrijednosti štedljivosti (duljina = 212). Indeks konzistencije je (0.555556), indeks zadržavanja je (0.725490), a kompozitni indeks iznosi 0.629671 (0.403050) za sve pozicije i parsimonijsko-informativna mjesta. Postotci prema kojima su pojedine sekvence zajedno grupirane to jest bootstrap vrijednosti pouzdanosti stabla (500 permutacija) prikazani su pored grana. Analiza je uključivala 50 nukleotidnih sekvenci. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 1 128 položaja.

### **3.3. Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz drugih hrvatskih i slovenskih populacija**

Kako bi se utvrdila evolucijska srodnost virusnih sojeva s područja Kašta i starih virusnih sojeva na području Hrvatske i Slovenije napravljeno je filogenijsko stablo maksimalne vjerojatnosti (Slika 11) i maksimalne štedljivosti (Slika 12) na temelju djelomičnih sekvenci ORF A virusa CHV1 ukupne duljine 561 nukleotida, od pložaja 575 do položaja 1 136. Virusni sojevi se jasno grupiraju u jednu grupu odvojenu od EP713. Većina glavnih grupa su slabo podržane s vrlo malim bootstrap vrijednostima. Sekvence s područja Kašta grupiraju se između starih sekvenci s područja Hrvatske (npr. *CR26*, seq *ks 16 IA 15 II*) i Slovenije (npr. seq *ks 11 A2* i *B11*, seq *ks 02 2B 15 II* i *K32*). Također se stare sekvence s područja Hrvatske i Slovenije međusobno grupiraju (npr. *B11*, *CR5*) (Slika 11) (Krstin i sur. 2008, Krstin i sur. 2011).



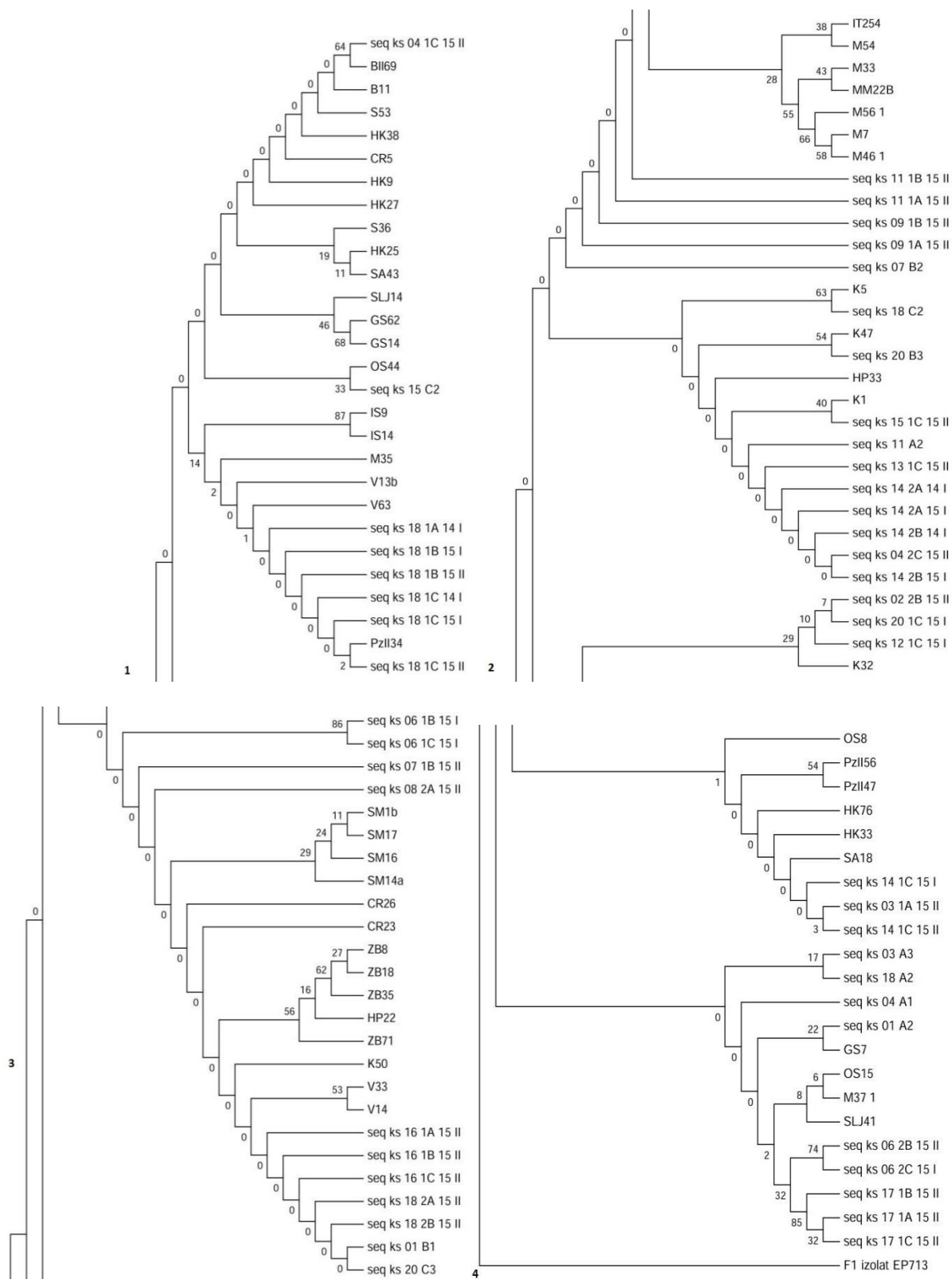
**Slika 11.** Evolucijsko stablo 49 sekvenci virusa CHV1 s područja Kašta i 57 sekvenci virusa CHV1 iz slovenskih i hrvatskih populacija dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize

metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 561 nukleotida. Evolucijska analiza određena je pomoću metode maksimalne vjerojatnosti temeljene na Tamura-Nei modelu. Prikazano je stablo s najvećom vjerojatnosti, log vjerojatnosti (-1955.97). Sadrži sekvence s područja Kašta (ks), sojeve iz različitih hrvatskih (*CR* – Cres, *SM* – Samobor, *SA* – Šamarica, *SLJ* - Sljeme, *OS* – Ozalj, *IS* – Istra-Buje, *Pz* – Požega, *HK* – Hrvatska Kostajnica, *M* - Markuševac) i slovenskih (*ZB* – Zgornji Boč, *HP* – Hočko Pohorje, *K* – Kal, *GS* – Gornji Suhor, *B* – Brežice, *V* – Valterski Vrh) populacija skupljenih u periodu 2004.-2006. (Krstin i sur. 2008; Krstin i sur. 2011). Stablo je ukorijenjeno sa sojem EP713 (francuski podtip) kao vanjskom grupom. Brojevi pored svakog čvora predstavljaju mjeru podrške (bootstrap vrijednost) za čvor i izraženi su kao postotci gdje vrijednost 100 predstavlja maksimalnu podršku. Analiza je uključivala 106 nukleotidnih sekvenci. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 554 pozicije.

Redoslijed slaganja evolucijskog stabla:

- 1
- 2
- 3
- 4

Objektive metode (Slika 11 i 12) pokazuju veliku sličnost virusnih sojeva s područja Kašta i virusnih sojeva iz različitih hrvatskih i slovenskih populacija. Grupe su slabije podržane te se različito grupiraju u obje metode. Također, jasno je odvajanje virusnih sojeva u jednu grupu odvojenu od EP713 (F1 podtip) u obje metode (metoda maksimalne vjerojatnosti i metoda maksimalne štedljivosti).



**Slika 12.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne štedljivosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 561 nukleotida. Sadrži sekvence

sa područja Kašta (*ks*), stare hrvatske (*CR* – Cres, *SM* – Samobor, *SA* – Šamarica, *SLJ* - Sljeme, *Os* – Ozalj, *IS* – Istra-Buje, *Pz* – Požega, *HK* – Hrvatska Kostajnica, *M* - Markuševac) i slovenske (*ZB* – Zgornji Boč, *HP* – Hočko Pohorje, *K* – Kal, *GS* – Gornji Suhor, *B* – Brežice, *V* – Valterski Vrh) sojeve virusa CHV1. Stablo je ukorijenjeno s EP713 (francuski podtip) sojem kao vanjskom grupom. Prikazano je stablo s najvećom vrijednosti štedljivosti (duljina = 192). Indeks konzistencije je (0.558824), indeks zadržavanja je (0.732143), a kompozitni indeks 0.560547 (0.409139) za sve položaje i parsimonijsko-informativna mjesta. Postotci prema kojima su pojedine sekvence zajedno grupirane to jest bootstrap vrijednosti (500 permutacija) prikazani su pored grana. Analiza je uključivala 106 nukleotidnih sekvenci. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su.

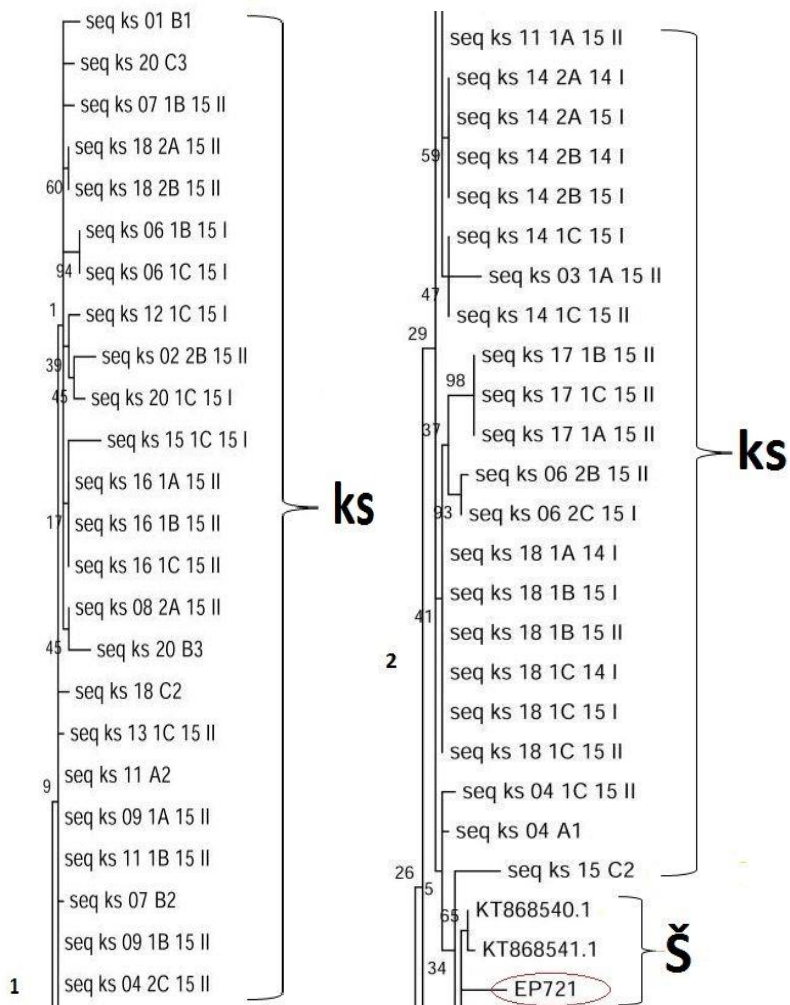
Redoslijed slaganja evolucijskog stabla:

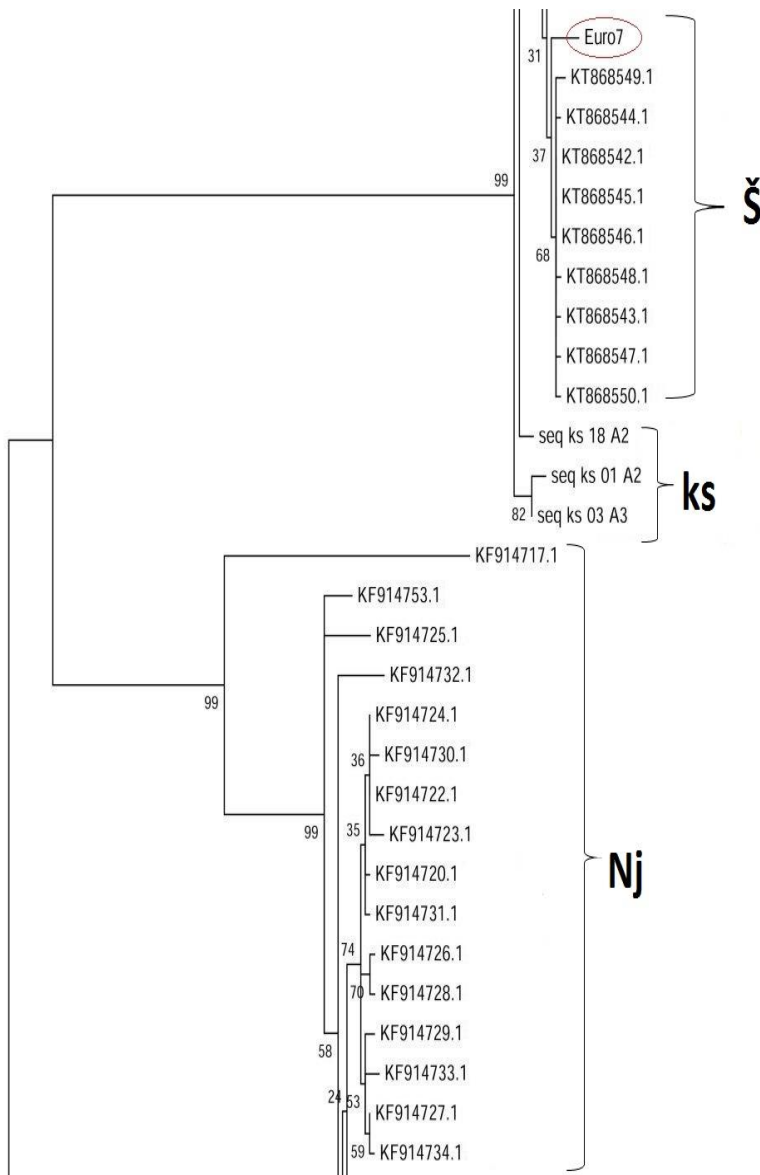
- 1
- 2
- 3
- 4

### 3.4. Srodnost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz drugih europskih populacija

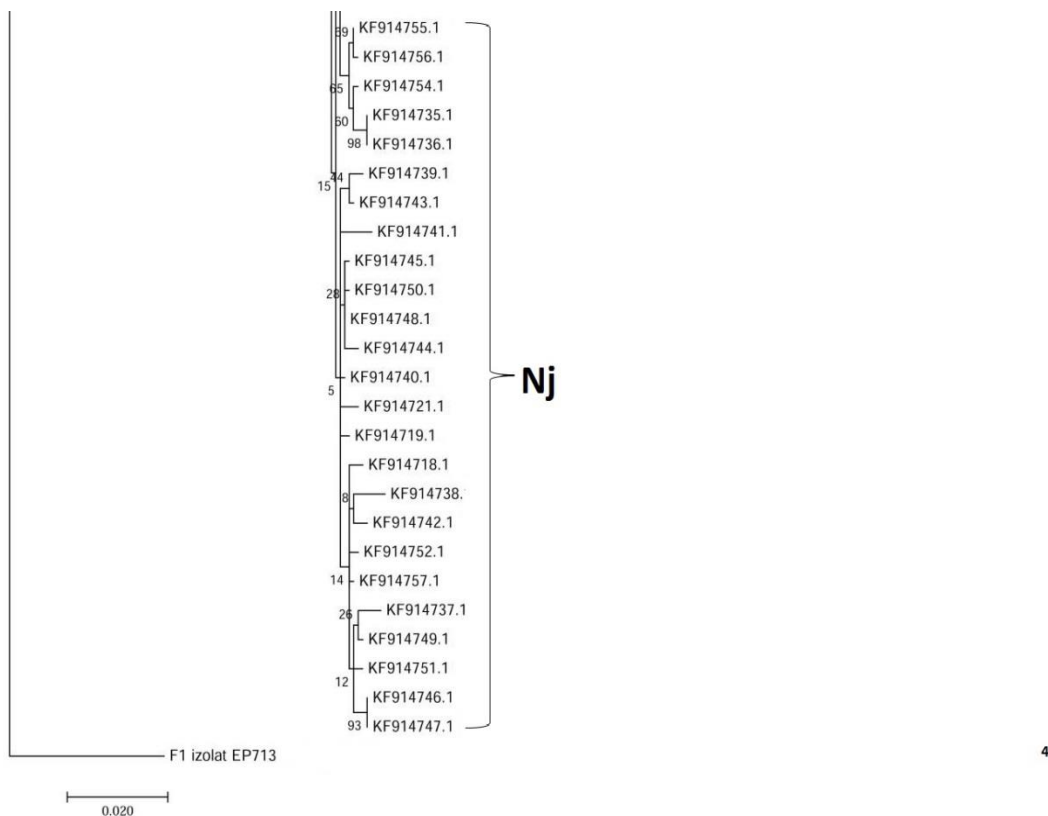
Kako bi se utvrdila evolucijska povezanost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz ostatka Europe (Švicarske i Njemačke) napravljeno je filogenijsko stablo maksimalne vjerojatnosti (Slika 13) i maksimalne štedljivosti (Slika 14) na temelju djelomičnih sekvenci ORF A virusa CHV1 ukupne duljine 1 136 nukleotida, od položaja 951 do položaja 2 087. Sekvence s područja Kašta (*ks*) grupiraju se oko sojeva Euro7 (seq *ks* 18 A2) i EP721 (seq *ks* 15 C2). Sekvence s područja Švicarske (*KT868540.1* – *KT868550.1*) grupiraju se između Euro7, EP721 i *ks* 15 C2 i *ks* 18 A2 (Slika 13), to jest između sekvenci s područja Kašta, dok se sekvence s područja Njemačke (*KF914717.1* – *KF914757.1*) grupiraju u zasebnu skupinu. Dobro su podržane dvije grupe bootstrap vrijednosti u rasponu od 96 do 99 te se sekvence s područja Njemačke grupiraju u jednu skupinu, a sekvence s područja Kašta i Švicarske u drugu skupinu. Virusni sojevi se jasno grupiraju u dvije grupe odvojene od EP713 (Slika 13).

a) Ova analiza sadrži dulje sekvence od 951. do 2 087. nukleotida (Peters i sur. 2014, Prospero i Rigling 2016).









**Slika 13.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 136 nukleotida. Stablo sadrži sekvence sa područja Kašta (*ks*), Švicarske (*KT868540.1 – KT868550.1*, Prospero i Rigling 2016) i Njemačke (*KF914717.1 – KF914757.1*, Peters i sur. 2014), te sojeve Euro7 i EP721. Stablo je ukorišteno sa sojem EP713 (F1 podtip) kao vanjskom grupom. Evolucijska povijest određena je pomoću metode maksimalne vjerojatnosti temeljene na Tamura-Nei modelu. Prikazano je stablo s najvećom vjerojatnosti, log vjerojatnosti (-4336.15). Brojevi pored svakog čvora predstavljaju mjeru podrške (bootstrap vrijednost) za čvor i izraženi su kao postotci gdje vrijednost 100 predstavlja maksimalnu podršku. Analiza je uključivala 104 nukleotidne sekvence. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 1 127 pozicija. Izolati s istog geografskog područja obilježeni su vitičastom zagradom. Kratice su: Nj – Njemačka, Š – Švicarska, ks – Kašt.

Redoslijed slaganja evolucijskog stabla:

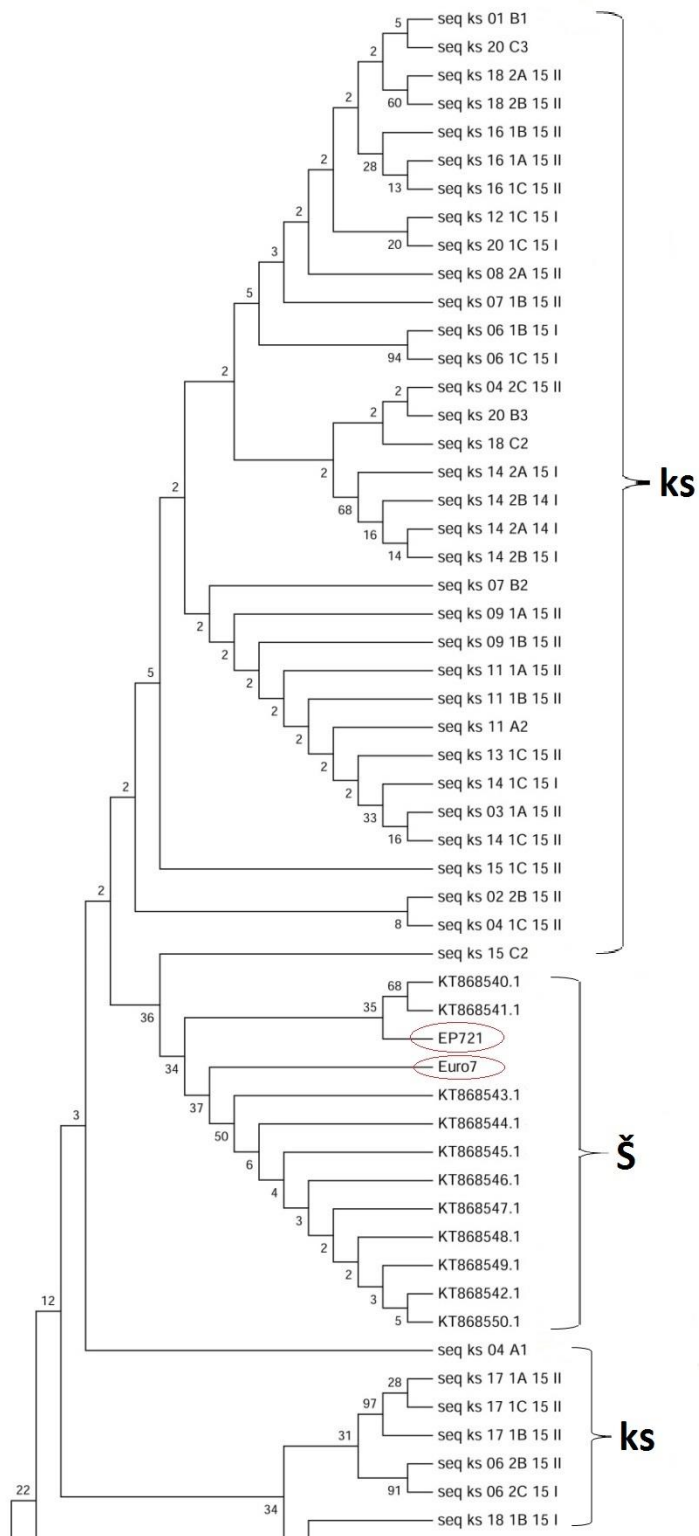
1

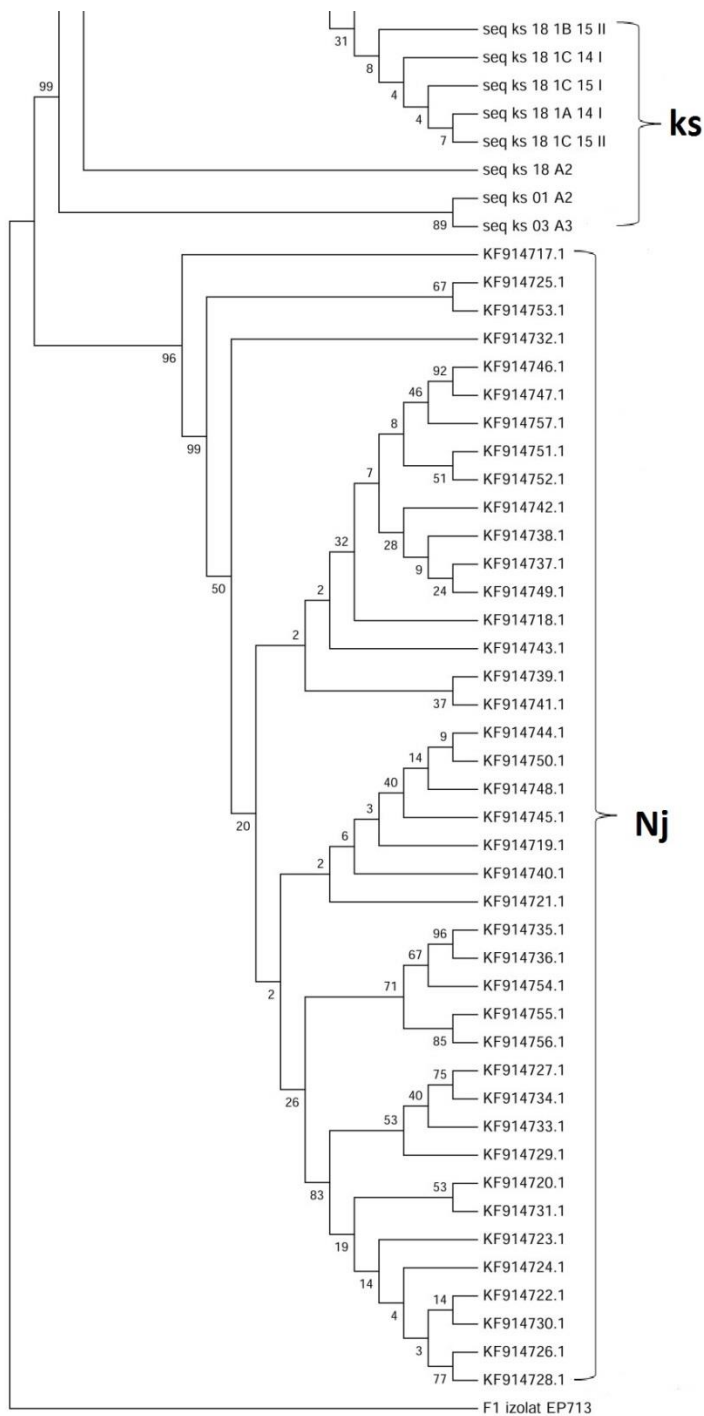
2

3

4

Objе metode pokazuju sličnost virusnih sojeva s područja Kašta i s područja Švicarske te zasebno grupiranje virusnih sojeva s područja Njemačke uz visoku bootstrap vrijednost za dvije glavne grupe u rasponu od 96 do 99 (Slika 13 i 14). Grupe koje su manje podržane drugačije se grupiraju u obje metode. Jasno je vidljivo odvajanje svih virusnih sojeva od korijena stabla u dvije zasebne skupine u obje metode.





**Slika 14.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne štedljivosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 136 nukleotida. Sadrži sekvence sa područja Kašta, Švicarske i Njemačke to i sojeve Euro7 (I podtip) i EP721 (I podtip). Stablo je ukorijenjeno sa EP713 (F1 podtip). Prikazano je stablo sa najvećom vrijednosti parsimonije (duljina = 466). Indeks konzistencije je (0,645349), indeks zadržavanja je (0,980217), a kompozitni indeks 0,723594

(0,632582) za sve položaje i parsimonijsko-informativna mjesta. Postotci prema kojima su pojedine sekvence zajedno grupirane to jest bootstrap vrijednosti (500 permutacija) prikazani su pored grana. Analiza je uključivala 104 nukleotidne sekvence. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 1 127 pozicija. Izolati s istog geografskog područja obilježeni su vitičastom zagradom. Kratice su: Nj – Njemačka, Š – Švicarska, ks – Kašt.

Kako bi se utvrdila srodnost virusnih sojeva s područja Kašta sa sojevima iz ostatka Europe: Švicarske, Njemačke, Italije, Francuske, Španjolske (Katalonije) napravljeno je filogenijsko stablo maksimalne vjerojatnosti (Slika 15) i maksimalne štedljivosti (Slika 16) na temelju djelomičnih sekvenci ORF A virusa CHV1 ukupne duljine 263 nukleotida, od položaja 1 526 do položaja 1 789. Virusni sojevi s područja Kašta (*ks*), Švicarske (*KT868540.1 – KT868550.1, KT868533.1 – KT868539.1, AJ577160.1 – AJ577206.1*) i Italije (*ITHAV-1 – ITHAV-9*) i manji dio sekvenci s područja Španjolske grupiraju se zajedno oko sojeva Euro7 i EP721, uz veliku podržanost glavne grupe veće bootsrap vrijednosti koja u ovom slučaju iznosi 100 (Slika 15). Virusni sojevi s područja Njemačke (*KF914717.1 – KF914757.1*) i manji dio virusnih spojeva s područja Španjolske grupiraju se zajedno uz veliku podržanost glavne grupe (99). Virusne sekvence s područja Francuske grupiraju se oko EP713 (F1 podtip).

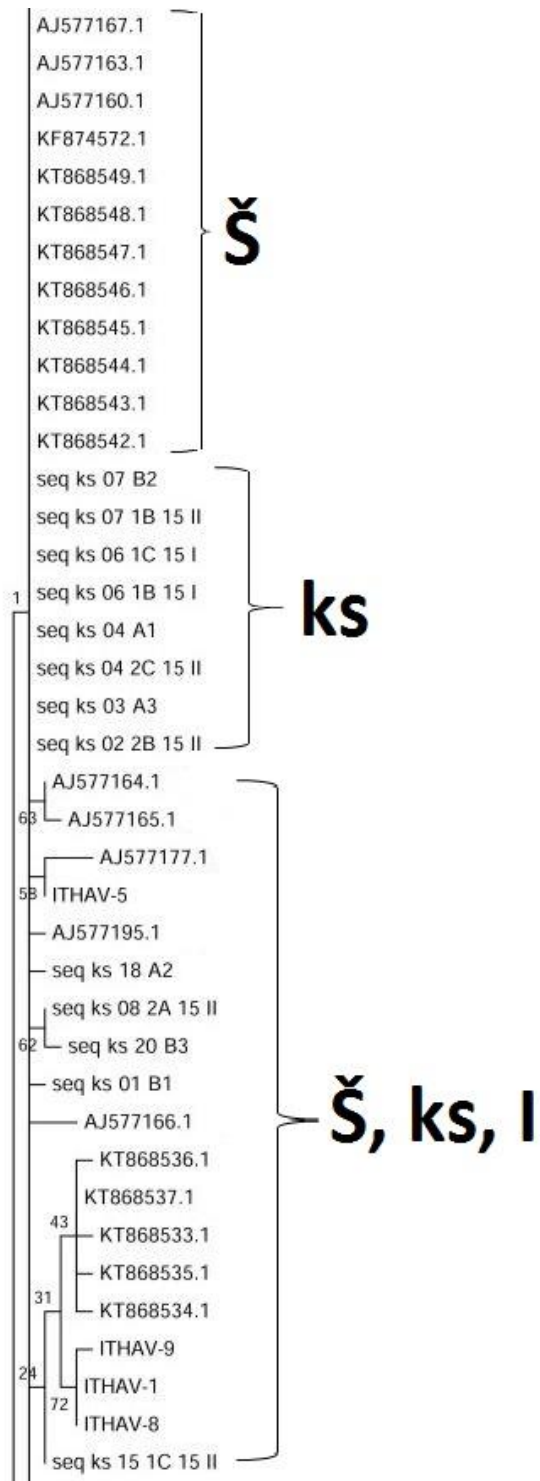
b) Ova analiza sadrži kraće sekvence od 1 526. do 1 789. nukleotida (Castano i sur. 2014., Gobbin i sur. 2003., Prospero i Rigling 2016), uključujući u analizu i dulje sekvence iz slučaja a) ali skraćene na duljinu najkraće sekvence.

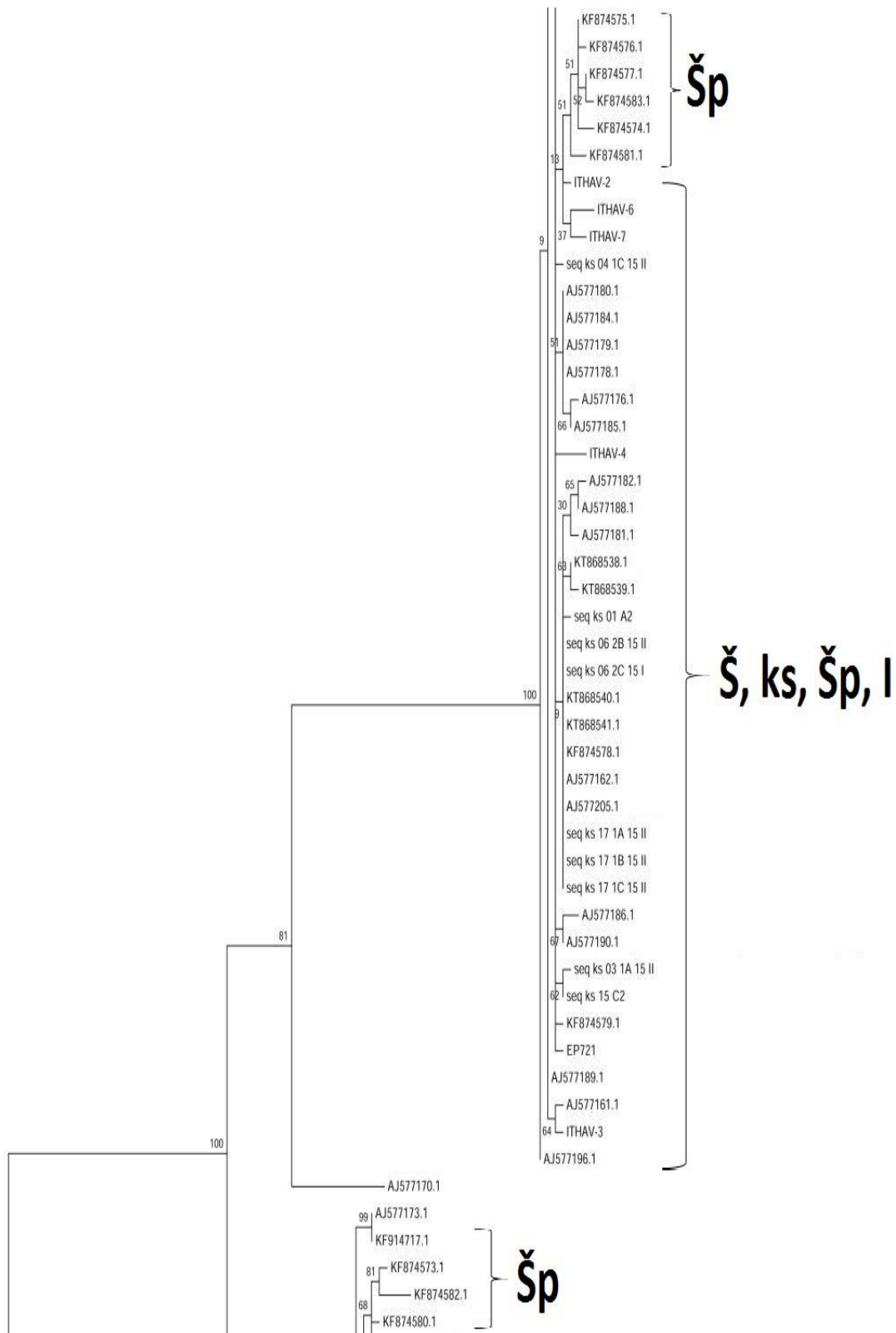
seq ks 20 1C 15 I  
 seq ks 20 C3  
 seq ks 18 C2  
 seq ks 18 2B 15 II  
 seq ks 18 2A 15 II  
 seq ks 18 1C 15 II  
 seq ks 18 1C 15 I  
 seq ks 18 1C 14 I  
 seq ks 18 1B 15 II  
 seq ks 18 1B 15 I  
 seq ks 18 1A 14 I  
 seq ks 16 1C 15 II  
 seq ks 16 1B 15 II  
 seq ks 16 1A 15 II  
 seq ks 14 2B 15 I  
 seq ks 14 2B 14 I  
 seq ks 14 2A 15 I  
 seq ks 14 2A 14 I  
 seq ks 14 1C 15 II  
 seq ks 14 1C 15 I  
 seq ks 13 1C 15 II  
 seq ks 12 1C 15 I  
 seq ks 11 A2  
 seq ks 11 1B 15 II  
 seq ks 11 1A 15 II  
 seq ks 09 1B 15 II  
 seq ks 09 1A 15 II

**ks**

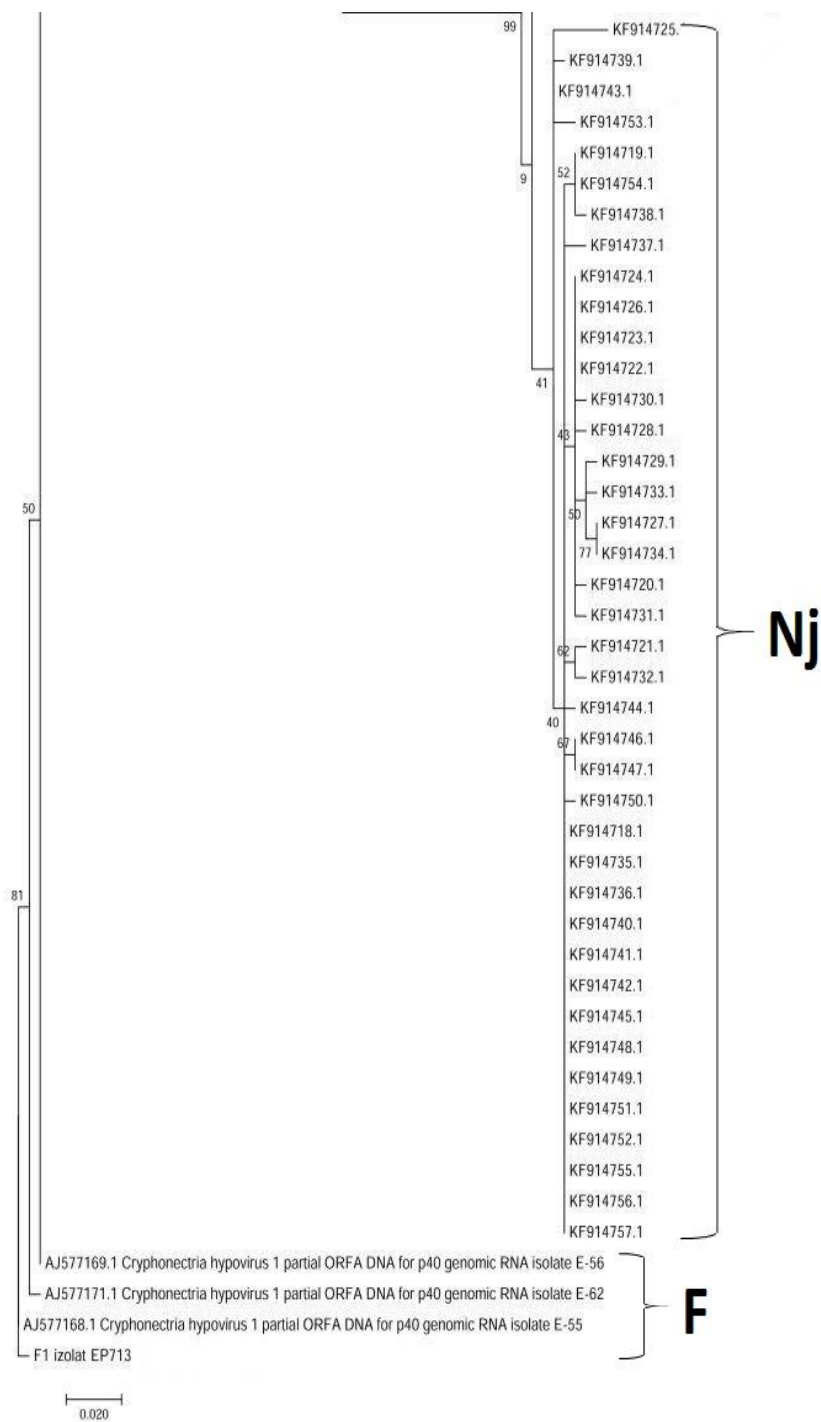
KT868550.1  
 AJ577206.1  
 AJ577204.1  
 AJ577203.1  
 AJ577202.1  
 AJ577200.1  
 — AJ577201.  
 AJ577199.1  
 AJ577198.1  
 AJ577197.1  
 Euro7  
 AJ577194.1  
 AJ577193.1  
 AJ577192.1  
 AJ577191.1  
 AJ577187.1  
 AJ577183.1  
 AJ577175.1  
 AJ577174.1

**Š**





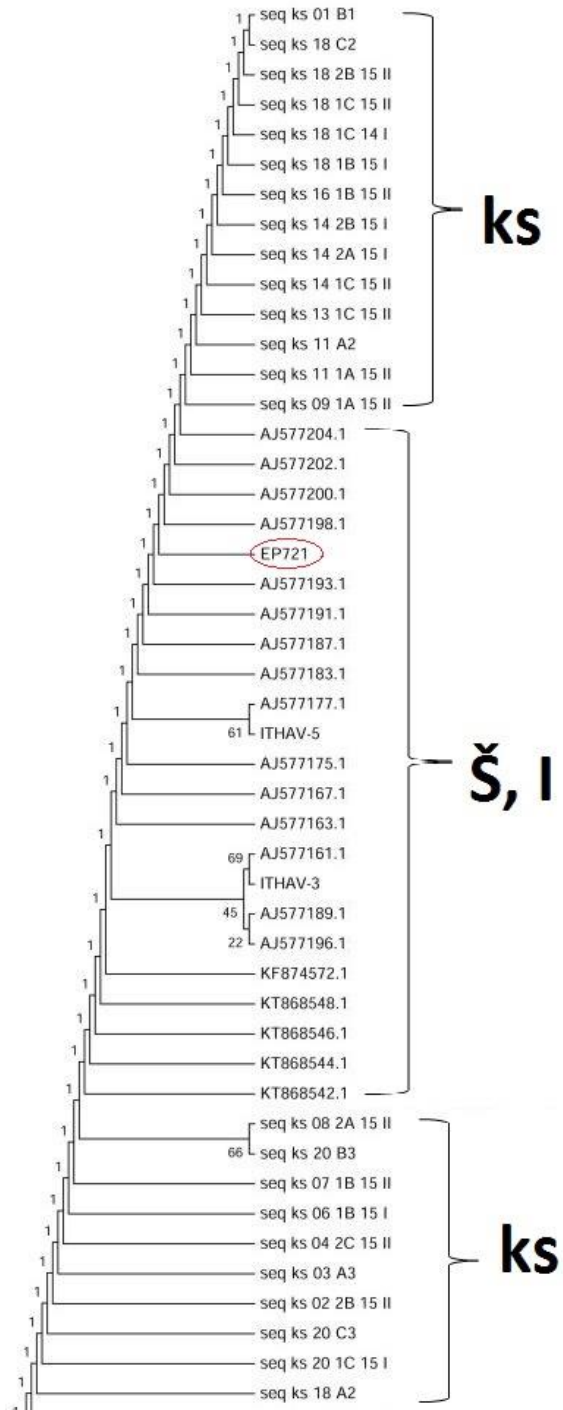


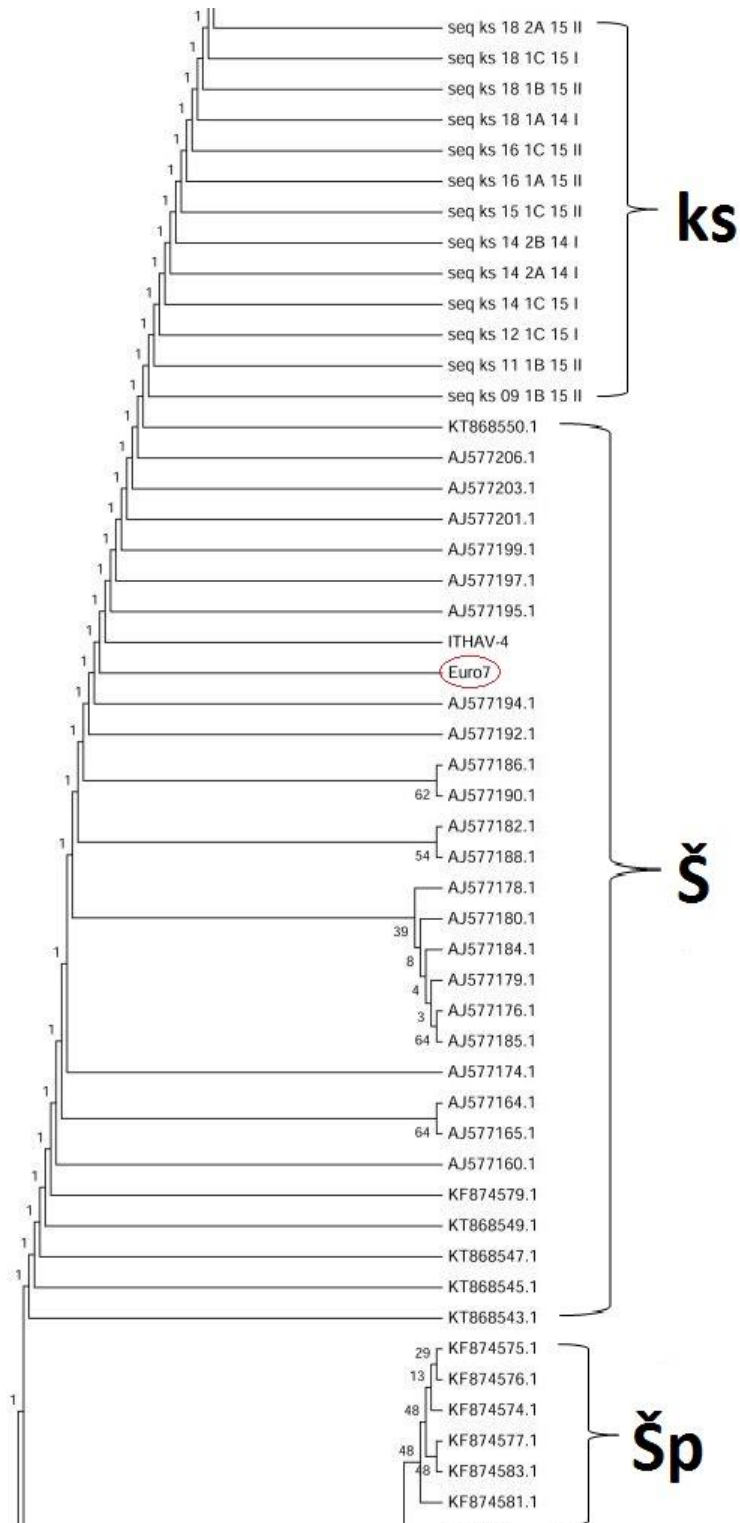


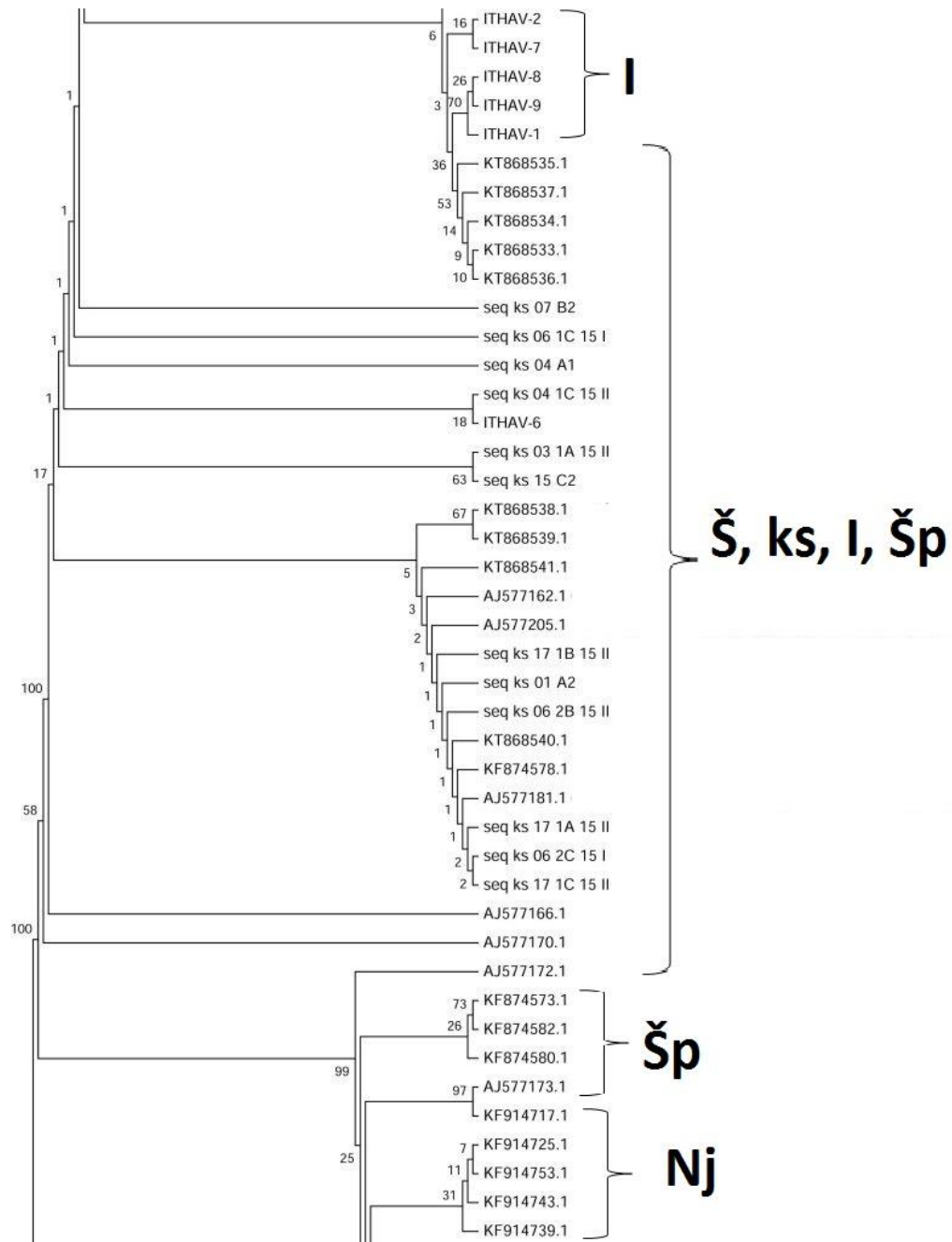
**Slika 15.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 263 nukleotida. Evolucijska analiza određena je pomoću metode maksimalne vjerojatnosti temeljene na Tamura-Nei modelu. Stablo sadrži sekvence s područja Kašta (*ks*), Španjolske (Katalonije) (*KF874572.1 – KF874583.1*, Castano i sur. 2015), Švicarske (*KT868540.1 – KT868550.1*, *KT868533.1 – KT868539.1*, Prospero i Rigling 2016;

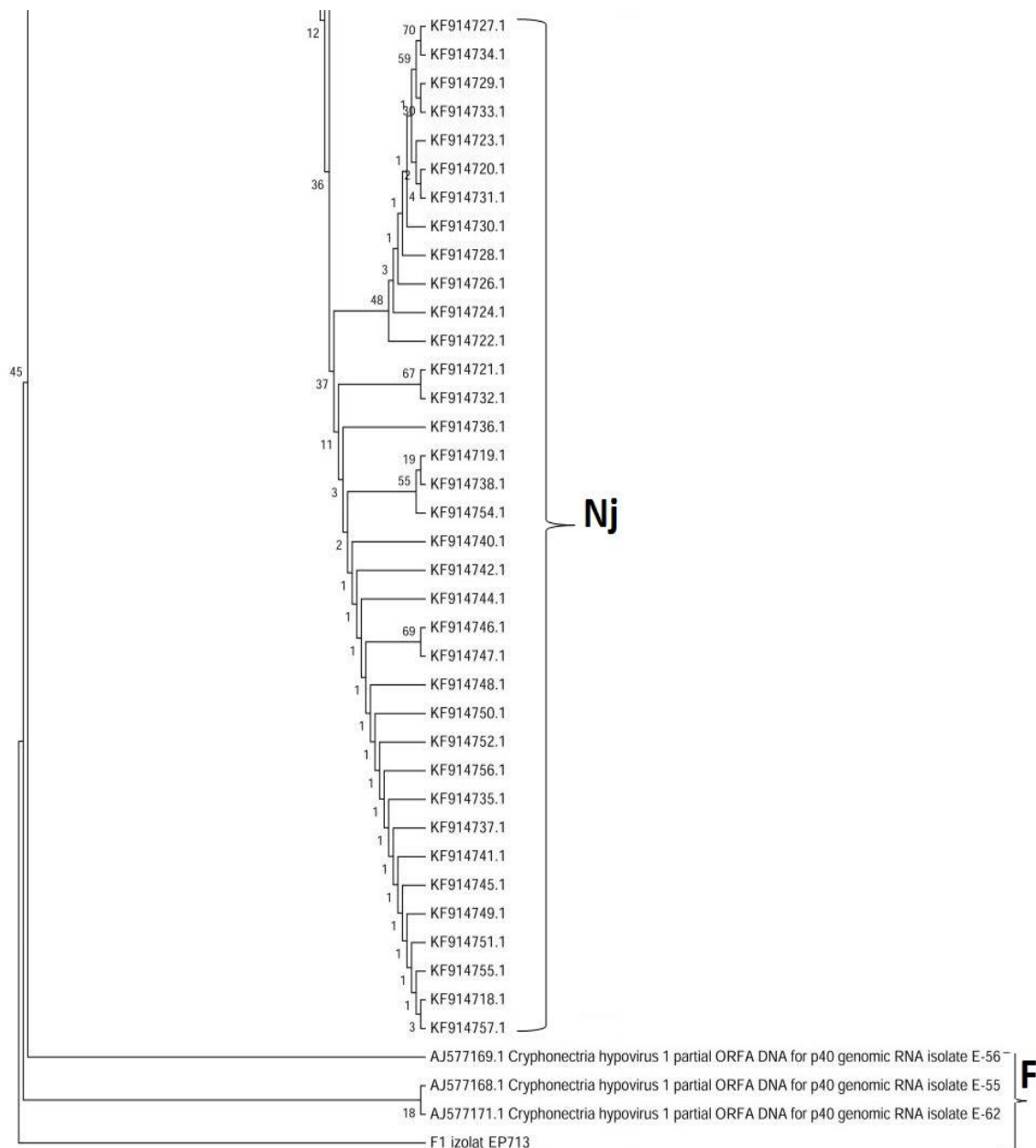
*AJ577160.1 – AJ577206.1*, Gobbin i sur. 2003), Njemačke (*KF914717.1 – KF914757.1*, Peters i sur. 2014), Italije (*ITHAV-1 – ITHAV-9*), Francuske (izolati E55, E56 i E62, podtip F1), te sojeve Euro 7 (I podtip) i EP721 (I podtip). Stablo je ukorijenjeno sa sojem EP713 (F1 podtip) kao vanjskom grupom. Prikazano je stablo s najvećom vjerojatnosti, log vjerojatnosti (-1526.38). Brojevi pored svakog čvora predstavljaju mjeru podrške za čvor (bootstrap vrijednost) i izraženi su kao postotci gdje vrijednost 100 predstavlja maksimalnu podršku. Analiza je uključivala 179 nukleotidnih sekvenci. Sve pozicije koje sadrže praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bila je ukupno 261 pozicija. Izolati s istog geografskog područja obilježeni su vitičastom zagradom. Kratice su: Nj – Njemačka, Š – Švicarska, ks – Kašt, I – Italija, Šp – Španjolska, F – Francuska.

Objе metode (Slika 15 i 16) pokazuju visoku podržanost (100%) grupe sekvenci s područja Kašta, Švicarske, Italije i većeg dijela sekvenci s područja Španjolske (*KF874575.1*) (Slika 15). Također u obje metode dobro je podržano (99%) grupiranje sekvenci s područja Njemačke i manjeg dijela sekvenci s područja Španjolske (*KF874573.1*) (Slika 15). Navedene sekvence su jasno odvojene u zasebne grupe od EP713 (F1 podtip), dok se sekvence s područja Francuske grupiraju oko EP713 (F1 podtip). Grupe koje su slabije podržane u svakoj od metoda se grupiraju drugačije, dok kod bolje podržanih grana nema razlike u grupiranju uzoraka.









**Slika 16.** Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne štedljivosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 263 nukleotida. Stablo sadrži sekvence s područja Kašta, Španjolske, Švicarske, Njemačke, Italije, Francuske, te Euro 7 i EP721 (I podtip). Stablo je ukorijenjeno sa sojem EP713 (F1 podtip). Prikazano je stablo s najvećom vrijednosti štedljivosti (duljina = 204). Indeks konzistencije je (0,678571), indeks zadržavanja je (0,978278), a kompozitni indeks 0.719322 ( 0.663832) za sve položaje i parsimonijsko-informativna mjesta. Postotci prema kojima su pojedine sekvence zajedno grupirane to jest bootstrap vrijednosti (500 permutacija) prikazani su pored grana. Analiza je uključivala 179 nukleotidnih sekvenci. Sve pozicije koje sadrže

praznine i nedostajuće podatke uklonjene su. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 261 pozicija. Izolati s istog geografskog područja obilježeni su vitičastom zagradom. Kratice su: Nj – Njemačka, Š – Švicarska, ks – Kašt, I – Italija, Šp – Španjolska, F – Francuska.

#### 4. Rasprava

Metoda procijenjivanja prisutnosti virusa CHV1 u miceliju gljive *C. parasitica* na temelju morfologije nije u potpunosti pouzdana (Akilli i sur. 2013), što je pokazano i u ovom istraživanju. Iako je u 77 uzoraka bila prisutna slabija pigmentacija, samo je u njih 56 (72,7 %) potvrđena prisutnost CHV1. U dosadašnjim istraživanjima (Akilli i sur. 2013, Castano i sur. 2015) također je zaključeno da pojedini izolati gljive *C. parasitica* mogu imati slabiju pigmentaciju iako virus nije prisutan. Primjerice, u istraživanju koje su proveli Castano i sur. (2015), od 179 izolata promijenjene morfologije samo 35 ih je bilo pozitivno na prisutnost virusa CHV1, što iznosi svega 20%. Nasuprot tome, na području Turske u 75,7 % izolata bijele morfologije i 55 % izolata prijelazne morfologije je dokazana prisutnost virusne dsRNA metodom RT-PCR (Akilli i sur. 2013). Prevalencija virusa CHV1 na području Kašta iznosila je 50%, što je više nego u većini ostalih hrvatskih populacija u kojima je bilo između 13 i 67 % hipovirulentih izolata (Krstin i sur. 2008).

Kako bi utvrdili srodnost virusnih sojeva s područja Kašta napravljena je molekularna filogenijska analiza i usporedba sekvenci na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 134 nukleotida (Slika 9 i 10). Analiza pokazuje da se svi sojevi s područja Kašta grupiraju zajedno, odvojeno od soja EP713, što ukazuje da ne pripadaju podtipu F1, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Krstin i sur. 2008). Evolucijsko stablo dobiveno kao rezultat molekularne filogenijske analize metodom maksimalne vjerojatnosti na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 561 nukleotida (Slika 11) pokazuje da se sekvence virusnih sojeva s područja Slovenije (Zgornji Boč, Hočko Pohorje, Kal, Gornji Suhor, Breice, Valterski Vrh) i drugih područja iz Hrvatske (Cres, Samobor, Šamarica, Sljeme, Ozalj, Istra-Buje, Požega, Hrvatska Kostajnica, Markuševa) iz dosadašnjih istraživanja također grupiraju zajedno sa sekvencama virusnih sojeva s područja Kašta. Dobiveni rezultati su također u skladu sa dosadašnjim istraživanjima što znači da imaju slabo podržane grupe velike sličnosti, pripadaju istom podtipu i genetički se značajno ne razlikuju. Štoviše, sekvence virusnih sojeva s područja Hrvatske i Slovenije često se grupiraju zajedno na istim, slabo podržanim, grupama, što znači da ovi virusni sojevi zapravo pripadaju jednoj genetički vrlo nediferenciranoj populaciji, što su pokazala i prethodna istraživanja (Krstin i sur. 2008, Krstin i sur 2011).



Usporedba s drugim europskim sojevima prema molekularnoj filogenijskoj analizi na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 1 136 nukleotida (Slika 13 i 14) pokazuje da se sekvence s područja Kašta i Slovenije grupiraju oko sojeva Euro7 i EP721 što ukazuje da pripadaju istom, talijanskom (I) podtipu. Navedeno je u skladu s istraživanjem Krstin i sur. (2008) koje je utvrdilo da su na području Hrvatske prisutni samo virusni sojevi CHV1 upravo tog podtipa. Talijanski podtip je ujedno i najrašireniji u Europi (Gobbin i sur. 2003), što se objašnjava njegovim optimalnim ekološkim fitnessom, pogotovo u odnosu na sojeve francuskog F1 podtipa (Chen i Nuss 1999, Robin i sur. 2010). Pojedine sekvence (pr. seq ks 17 IA 15 II, seq ks 17 IB 15 II, seq ks 17 IC 15 II) s područja Kašta (Slika 9) grupiraju se u skupine koje predstavljaju genetički istovjetne virusne sojeve, to jest navedeni sojevi su na temelju sekvence isti. Što se tiče srodnosti sojeva virusa s područja Kašta s ostalim sojevima u Europi može se uočiti prema filogenetskoj analizi na temelju djelomičnih sekvenci ORF A duljine 263 nukleotida (Slika 15 i 16) da su virusni sojevi s područja Kašta srodniji s virusnim sojevima s područja Švicarske (Gobbin i sur. 2003) i Italije (Prospero i Rigling 2016), i pripadaju istom podtipu (talijanski podtip) te se grupiraju Srodnost s virusnim sojevima s područja Njemačke (Peters i sur. 2014) i Španjolske (Castano i sur. 2015) je nešto manja. Sekvence s područja Njemačke pripadaju njemačko/španjolskom virusnom podtipu D/E (Peters i sur. 2014), dok sekvence s područja Španjolske pripadaju talijanskom (I) i njemačko/španjolskim (D/E) podtipu. Sukladno tome dio sekvenci s područja Španjolske (talijanski podtip) grupira se sa sekvencama s području Italije, Švicarske i Kašta, a dio sekvenci podtipa D/E se grupira sa sekvencama s područja Njemačke (Slika 14), što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Nasuprot tome, sekvence s područja Francuske grupiraju se zasebno i najviše su filogenijski bliske soju EP713 (Gobbin i sur. 2003).

Iako je korištena ista skupina podataka, grupiranje sekvenci nije bilo istovjetno u svim slučajevima već je ovisilo o korištenoj metodi filogenijske analize i samoj duljini analiziranih sekvenci. Na temelju filogenijske analize 3.4. b) (Slika 15 i 16) može se vidjeti da su sekvence s različitih područja Europe istog podtipa (talijanski podtip) uniformnije grupirane ukoliko je korištena metoda maksimalne štedljivosti, a veća je stopa ispreplitanja sekvenci s različitih područja, ali istog podtipa (Švicarska, Italija, Slovenija, Kašt) ukoliko je korištena metoda maksimalne vjerojatnosti. Manje su razlike između dvije metode ukoliko su u analizi korištene dulje sekvence kako što je to u slučaju filogenijske analize 3.4. a) (Slika 13 i 14). Bez obzira na

male razlike dobivenih filogenijskih stabala, obje metode su dovodile do istih zaključaka o sličnosti virusnih sekvenci s područja Kašta te su ih konzistentno odvajale od izolata francuskog F1 podtipa.

Učinkovitost širenja mikovirusa izravno ovisi o kombinacijama gena unutar populacije domaćina. Stoga, različita strategija upravljanja bi trebala biti dizajnirana za različite regije, a najprikladnija biološka kontrola mora se primjenjivati za svaki slučaj pojedinačno. Dakle, za što bolju biološku kontrolu i uvid u populacijsku strukturu potrebna su daljnja nadziranja populacija gljive, raznolikosti ve tipova, prevalencije i širenja virusa, te dodatna istraživanja koja su pogodna za precizniju genetičku analizu kao što je na primjer korištenje bioloških markera za preciznije nadziranje širenja određenog virusnog soja u prirodi (Robin i sur. 2009).

## 5. Zaključak

Od ukupno 113 uzoraka kod 77 uzoraka je uočena promjena morfologije tj. pigmentacije iz naranačaste u bijelu, a za 56 uzoraka je utvrđena prisutnost virusa CHV1 RT-PCR metodom.

Možemo zaključiti da su virusne sekvence sa područja Kašta grupirane u slabo podržane grupe velike sličnosti, pripadaju talijanskom podtipu te je kod njih prisutna velika genska raznolikost. Sve informacije su u korist teze o genski raznolikoj, ali nediferenciranoj populaciji virusa. Nema velikih razlika između virusnih sojeva s područja Kašta i virusa izoliranih s ostalih lokaliteta u Hrvatskoj u prethodnim istraživanjima.

Što se tiče srodnosti s virusnim sojevima iz drugih zemalja Europe, najveća je srodnost s virusnim sojevima iz Slovenije, Italije i Švicarske, dok je uočena manja srodnosti s virusnim sojevima iz Španjolske, Njemačke i Francuske.

## 6. Popis literature

- Alleman C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assed using restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 843-854.
- Akilli S., Ulubaş Serçe Ç., Katircioğlu Y. Z., Rigling D. (2013): Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 135: 323-334.
- Biraghi, A (1946): Il cancro del castagno causato da *Endothia parasitica*. *Italia Agricola*, 7: 1-9.
- Bryner S. F., Rigling D., Brunner P. C. (2012): Invasion history and demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus 1* across European populations of the chestnut blight fungus. *Ecology and Evolution* 2: 3227-3241.
- Castano C., Bassie L., Oliach D., Gomez M., Medina V., Liu B., Colinas C. (2015): *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) survey reveals low occurrence and diversity of subtypes in NE Spain. *Forest Pathology* 45: 51-59.
- Chen B., Nuss D. L. (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.
- Choi G. H., Dawe A. L., Churbanov A., Smith M. L., Milgroom M. G., Nuss D. L. (2012): Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 190: 113-127.
- Cortesi P., McCulloch C. E., Song H., Lin H., Milgroom M. G. (2001): Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* *Genetics* 159: 107-118.

- Cortesi P., Milgroom M. G. (1998): Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2988-2994.
- Dawe A. L., Nuss D. L. (2013): Hypovirus molecular biology: From Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus. *Advances in Virus Research* 86: 109-147.
- Feau N., Dutech C., Brusini J., Rigling D., Robin C. (2014): Multiple introductions and recombination in *Cryphonectria hypovirus 1*: perspective for a sustainable biological control of chestnut blight. *Evolutionary Applications* 7:580-596.
- Glass N. L., Kaneko I. (2003): Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2: 1-8.
- Glavaš M. (1999): Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Gobbin D., Hoegger P. J., Heiniger U., Rigling D. (2003): Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV 1) in Europe. *Virus Research* 97: 39-46.
- Graur D., Li W. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second edition. Sunderland, Massachusetts, SAD. Sinauer Associates, 2000.
- Halambek M. (1988): Istraživanje virulentnosti gljive *Endothia parasitica* (Murr. And.) uzročnika raka kore pitomog kesetena (*Castanea sativa* Mill.). Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, doktorska disertacija.
- Heiniger U., Rigling D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581-599.
- Hillman B. I., Suzuki N. (2004): Viruses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria Parasitica*. *Advances in Virus Research* 63: 423-472.
- Kišpatić J (1956): Rak kestenove kore (*Endothia parasitica* Anders.). *Zavod za zaštitu bilja, Uputstva iz zaštite bilja*, 19: 1-12.
- Krstin Lj., Katanić Z., Ježić M., Poljak I., Nuskern L., Matković I., Idžojtić M., Čurković-Perica M. (2017): Biological control of chesnut blight in Croatia: an interaction between host-

- sweet chestnut, its pathogen *Cryphonectria parasitica* and the biocontrol agent – *Cryphonectria hypovirus 1*. *Pest Management Science* 73: 582-589.
- Krstin L., Novak-Agbaba S., Rigling D., Ćurković-Perica M. (2011) Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* 60: 752–761.
- Krstin 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.
- Lin H., Lan X., Liao H., Parsley T. B., Nuss D. L, Chen B. (2007): Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV1-EP721. *Journal of Virology* 81(4): 1813-20.
- McCabe P. M., Pfeiffer P., Van Alfen N. K. (1999): The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology* 7: 377-381.
- McCarroll D. R., Thor E. (1978): The role of oxalic acid in the pathogenesis of *Endothia parasitica*. *Proceedings of the American Chestnut Symposium* 60-63. West Virginia University Press, Morgantown, WV, U.S.A. (1978).
- Milgroom M. G., Cortesi P. (2004): Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* 42: 311-338.
- Novak-Agbaba S., Liović B., Pernek M. (2000): Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. *Radovi Hrvatskog šumarskog instituta* 35: 91-110.
- Nuskren L., Tkalec M., Ježić M., Katanić Z., Krstin Lj., Ćurković-Perica M. (2017): *Cryphonectria hypovirus 1*-induced changes of stress enzyme activity in transfected phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *Microbial Ecology* 74:302-311
- Nuss D. L. (2011): Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. *Advances in Virus Research* 80: 26-44.

- Nuss D. L. (2005): Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3: 633-640.
- Peever T. L., Liu Y. C., Cortesi P., Miligrom M. G. (2000): Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4863-4869.
- Peever T. L., Liu Y. C., Milgroom M. G. (1997): Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* 87: 1026-1033.
- Peters S. F., Bumbkamp J., Prospero S., Rigling D., Metzler B. (2014): Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. *Fungal Biology* 118: 193-210.
- Prospero S., Rigling D. (2016): Using molecular markers to assess the establishment and spread of a mycovirus applied as a biocontrol agent against chestnut blight. *BioControl* 61:313-323.
- Prospero S., Conedera M., Heiniger U., Rigling D. (2006): Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forest with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96: 1337-1344.
- Robin C., Lanz S., Soutrenon A., Rigling D. (2010): Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in southern-eastern France is associated with fitness related traits. *Biological Control* 53: 55-61.
- Robin C., Capdeville X., Martin M., Traver C., Colinas C. (2009) *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58: 527-535.
- Shapira R., Choi G. H., Nuss D. L. (1991): Virus-like genetic organization and expression strategy for double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *The EMBO Journal* 10: 731-739.

- Sotirovski K., Milgroom MG., Rigling D., Heiniger U. (2006): Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia. *Forest Pathology* 36:136-143.
- Tartaglia J., Paul C. P., Fulbright D. W., Nuss D. L. (1986): Structural properties of double-stranded RNAs associated with biological control of chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 9109-9113.
- Zhang X., Shi D., Nuss D. L. (2012): Variations in hypovirus interactions with the fungal-host RNA-silencing antiviral-defense response. *Journal of Virology* 86: 12933-12939.



## ŽIVOTOPIS

Ivana Pavičić rođena je 9. lipnja 1992. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Nova Rača upisala je Opću gimnaziju u Bjelovaru koju je završila 2011. godine. Iste godine upisala je preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij molekularne biologije upisala je 2015. godine.

Za vrijeme studija nekoliko puta je sudjelovala na manifestaciji "Noć biologije" i "Otvoreni dan kemije" te je dobitnik posebne Rektorove nagrade u sklopu manifestacije "Otvoreni dan kemije".

Sudjelovala je i u istraživanjima u okviru multilateralnog međunarodnog projekta SCOPES Joint Research Project Invasive chestnut diseases in the Balkans and Georgia – epidemiological research and management options.