

Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* na području Skadra i Boke Kotorske

Šibenik, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:416716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tena Šibenik

**Raznolikost tipova vegetativne
kompatibilnosti gljive *Cryphonectria
parasitica* na području Skadra i Boke
kotorske**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Tena Šibenik

**Diversity of *Cryphonectria*
parasitica vegetative compatibility types in
Skadar and Boka kotorska region**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

Zahvala

Najprije se želim zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Mirni Ćurković-Perici što mi je pružila veliku čast i omogućila izradu ovog diplomskog rada pod svojim mentorstvom. Hvala Vam na cjelokupnom trudu, angažmanu, pomoći, konzultacijama i korisnim savjetima.

Posebno se želim zahvaliti neposrednoj voditeljici dr. sc. Luciji Nuskern Karaici na cjelokupnom angažmanu, uloženom trudu i vremenu. Hvala Vam na prenesenom znanju, pomoći, strpljenju i razumijevanju posebno onda kada se stvari nisu odvijale po planu, te svim savjetima kako bi ovaj rad bio što kvalitetnije napravljen.

Također, hvala Mileni Stojanović s Biotehnološkog fakulteta u Podgorici koja je prikupila i ustupila izolate gljive *C. parasitica*, te doc. dr.sc. Igoru Poljaku sa Šumarskog fakulteta u Zagrebu koji mi je ustupio fotografije s terena.

Veliko hvala Antoniju, Martini, Marti i Ivi koji su zaslužni za stvaranje najljepših uspomena iz studentskih dana. Hvala za sve duge telefonske razgovore, poruke, druženja, ručkove, kave, proslavljene rođendane, hvala na neizmjerne podršci i pomoći u svakom obliku i svim situacijama. Tijekom studiranja postali ste prijatelji kakve sam oduvijek željela imati.

Neizmjerne hvala mojoj obitelji, mojim roditeljima, bakama i bratu koji me uvijek podržavaju. Hvala im što su mi omogućili školovanje i vjerovali u mene čak i kada sama nisam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* na području Skadra i Boke kotorske

Tena Šibenik

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Cryphonectria parasitica je uzročnik raka kore kestena u šumama Europe i Sjeverne Amerike. Mikovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) uzrokuje hipovirulenciju gljive *C. parasitica* i djeluje kao uspješno sredstvo biološke kontrole raka kore kestena. Prijenos virusa je ograničen sustavom vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) gljive, koji u Europi uključuje najmanje šest poznatih dialelnih lokusa (*vic* lokusi). Učinkovitost prijenosa virusa ovisi o raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti gljive na određenom području. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti raznolikost vc tipova populacije *C. parasitica* na području Boke kotorske i jezera Skadar u Crnoj Gori. U dvije regije u Crnoj Gori utvrđeno je 9 vc tipova unutar 79 izolata gljive *C. parasitica* klasičnom i molekularnom metodom. U Boki kotorskoj dominantan vc tip bio je EU-12 što predstavlja 49% ukupnog broj izolata, zatim slijedi EU-2 što čini 14% , EU-8 (8%) dok se EU-17 i EU-22 pojavljuju manje učestalo, svaki sa zastupljenošću od 2%. Za 28% izolata gljive *C. parasitica* s područja Boke kotorske nije određen vc tip. Najzastupljeniji vc tip na području jezera Skadar je EU-12 (58%), zatim EU-11 (8%) i EU-10 (6%), dok se EU-1 i EU-6 pojavljuju manje učestalo, svaki sa zastupljenošću od 3%. U populaciji gljive s područja jezera Skadar nije bilo moguće odrediti vc tip za 22% izolata. Najrasprostranjeniji vc tip na području Crne Gore je tip EU-12 kao i u drugim državama južne i jugoistočne Europe.

Ključne riječi: *Cryphonectria parasitica*, rak kore kestena, vegetativna (ne)kompatibilnost (vc)

(41 stranica, 8 slika, 8 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Voditelj: prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Neposredni voditelj: dr. sc. Lucija Nuskern Karaica

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Doc.dr.sc. Mirela Sertić Perić

Izv.prof.dr.sc. Vesna Petrović Peroković

Zamjena: Izv.prof.dr.sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihvaćen: 15. 9. 2021.

BASIC DOKUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Diversity of *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility types in Skadar and Boka kotorska region

Tena Šibenik

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Cryphonectria parasitica is the causal agent of chestnut blight in European forests. Mycovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) causes hypovirulence of *C. parasitica* and acts as a successful biocontrol agent of the chestnut blight. Virus transmission is limited by a vegetative (in)compatibility (vc) system of the fungus, which in Europe involves at least six diallelic *vic* loci. The effectiveness of virus transmission depends on the diversity of vegetative compatibility types of the fungus in a particular area. The aim of this research was to determine the diversity of vc types in *C. parasitica* populations from Bay of Kotor and lake Skadar in Montenegro. In these two regions in Montenegro the total of 9 vc types were identified among 79 isolates of *C. parasitica* by classical and molecular method. The dominant vc type in Bay of Kotor was EU-12 (49 %), followed by EU-2 (14%) and EU-8 (8%), while EU-17 and EU-22 appeared less frequently (each with 2%). The vc type of 28% of isolates from Bay of Kotor could not have been determined. The most common vc type at lake Skadar was EU-12 (58%), followed by EU-11 (8%) and EU-10 (6%). EU-1 and EU-6 appeared less frequently (each with 3%). The vc type of 22% of isolates from lake Skadar could not have been determined. The most widespread vc type in Montenegro is EU-12, the same as in other southern and southeastern European countries.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, chestnut blight, vegetative (in)compatibility (vc)

(41 pages, 8 figures, 8 tables, 51 references, original in Croatian)

Supervisor: Prof. Mirna Ćurković- Perica

Co-supervisor: Lucija Nuskern Karaica, PhD

Reviewers: Prof. Mirna Ćurković-Perica

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Assoc. Prof. Vesna Petrović Peroković

Replacement: Assoc. Prof. Draganja Mrvoš-Sermek

Thesis accepted: 15. 9. 2021.

Sadržaj

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | Patogena gljiva <i>Cryphonectria parasitica</i> i rak kore kestena | 1 |
| 1.1.1 | Simptomi bolesti raka kore kestena..... | 2 |
| 1.1.2 | Rasprostranjenost raka kore kestena u Europi | 6 |
| 1.2 | Karakteristike mikovirusa <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> | 7 |
| 1.3 | Sustav vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive <i>C. parasitica</i> | 9 |
| 1.4 | Biološka kontrola hipovirusom <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> | 10 |
| 1.5 | Rak kore kestena u Crnoj Gori | 11 |
| 1.6 | Ciljevi | 12 |
| 2 | MATERIJALI I METODE | 13 |
| 2.1 | Popis kemikalija..... | 13 |
| 2.2 | Uzorkovanje populacija na područjima Boke kotorske i Skadra | 14 |
| 2.3 | Laboratorijski uzgoj kultura gljive <i>C. parasitica</i> | 14 |
| 2.4 | Izolacija genomske DNA iz uzoraka gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> | 15 |
| 2.5 | Umnožavanje <i>vic</i> lokusa na genomskoj DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR) | 16 |
| 2.6 | Izražavanje Shannonovog indeksa raznolikosti..... | 20 |
| 3 | REZULTATI | 21 |
| 3.1 | Koncentracije izolirane genomske DNA gljive <i>C. parasitica</i> | 21 |
| 3.2 | Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive <i>C. parasitica</i> na području Skadra i Boke kotorske | 23 |
| 3.3 | Shannonov indeks raznolikosti..... | 29 |
| 3.4 | Raznolikost <i>vic</i> alela u populacijama gljive <i>C. parasitica</i> na području Crne Gore..... | 30 |
| 3.5 | Usporedba populacija gljive <i>C. parasitica</i> na području Crne Gore s populacijama u drugim državama..... | 31 |
| 4 | RASPRAVA | 32 |
| 5 | ZAKLJUČAK..... | 35 |
| 6 | LITERATURA | 36 |
| 7 | ŽIVOTOPIS..... | 41 |

1 UVOD

1.1 Patogena gljiva *Cryphonectria parasitica* i rak kore kestena

Gljiva mješinaraka *Cryphonectria parasitica*, uzročnik raka kore kestena, jedna je od najpoznatijih invazivnih patogenih gljiva u šumama Europe i Sjeverne Amerike. Glavne vrste koje napada spomenuti patogen su iz roda *Castanea* (porodice *Fagaceae*), osobito američki kesten (*C. dentata*), europski kesten (*C. sativa*), kineski kesten (*C. mollissima*) i japanski kesten (*C. crenata*). Osim navedenih vrsta, gljiva može inficirati i hrastove (*Quercus spp.*), javore (*Acer spp.*), europski grab (*Carpinus betulus*) te mali američki kesten (*Castanea pumila*) (Rigling i Prospero, 2018).

Cryphonectria parasitica inficira stablo kroz rane na kori, razarajući kambij i provodni sustav stabla, te uzrokuje odumiranje stabla iznad mjesta infekcije. Odumiranjem kambija, kora se osuši i odvaja od stabla, pa su na tom mjestu vidljive rak rane. Gljiva kroz tkivo kore prodire do kambija tvoreći lepezaste micelije (Heiniger i Rigling, 1994). Vidljivi miceliji ispod kore su jedan od sigurnih znakova infekcije. Micelij gljive može se brzo proširiti na neinficirane dijelove stabla, što dovodi do odumiranja dijelova stabla koji su udaljeni od mjesta početne infekcije (Rigling i Prospero, 2018). Širenje raka dovodi do poremećaja kretanja hranjivih tvari kroz floem i ograničava sposobnost domaćina da proizvodi novo tkivo jer je sloj kambija oštećen. Srećom, korijenski sustav uništenog drveća često preživi i nastavlja stvarati nove izdanke (Choi i Nuss, 1992).

Gljiva *C. parasitica* se može razmnožavati spolno i nespolno. Nespolno se razmnožava konidijama ili dijelovima micelija, dok se spolno razmnožava askosporama, kao i ostale mješinarke. Konidije se razvijaju u piknidama (Glavaš, 1999). Kod nespolnog razmnožavanja, budući da konidiospore ne nastaju mejozom, ne dolazi do rekombinacije, pa su spore genetički jednake miceliju. Ovim načinom razmnožavanja se ne povećava raznolikost populacije, ali i nespolne spore mogu uzrokovati širenje infekcije (Webster i Weber, 2007). Spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica* je kontrolirano dialelnim MAT lokusom na kojem se može nalaziti jedan od alela, MAT-1 ili MAT-2. Jedinke se mogu spolno razmnožavati ako imaju suprotne MAT alele (Marra i Milgroom,

1999, 2001). Askospore nastaju mejozom i mitozom u peritecijima u kojima se nalaze askusi (Glavaš, 1999).

Spore se prenose na razne načine: na male udaljenosti spore se rasprostranjuju kišom i vjetrom, a na velike kukcima i pticama. Širenju ove bolesti pridonosi i čovjek i to alatom kojim obrađuje zaražena stabla, zaraženim sadnicama, te transportom zaraženog drveta (Glavaš, 1999).

1.1.1 Simptomi bolesti raka kore kestena

Postoje tri tipa raka kore kestena, a to su aktivni rak, kalusirajući rak i površinska nekroza (Halambek, 1991; Novak-Agbaba i sur., 2000).

Aktivni rak (Slika 1) je prouzročen virulentnom gljivom *C. parasitica*. Glavni pokazatelji su uzdužno raspucala kora, brojne fruktifikacije i otvorene rane.



Slika 1. Aktivni rak kestenove kore
(autor fotografije doc. dr. sc. Igor Poljak)

Kalusirajući rak (Slika 2) uzrokuje gljiva koja je sekundarno inficirana mikovirusom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1). Takva hipovirulentna gljiva ima smanjenu virulentnost, te je omogućeno zarastanje rane. Oko rane se formira kalusno staničje, dok za razliku od prethodnog slučaja nema fruktifikacija ili su rijetke.



Slika 2. Kalusirajući rak kestenove kore

(autor fotografije doc. dr. sc. Igor Poljak)

Površinske nekroze (Slika 3) nastaju kada stablo inficira hipovirulentna gljiva *C. parasitica*. Prisutno je zadebljanje i ljuskava kora, ali infekcija ne prodire do kambija. Prirodno širenje hipovirusa s površinskih nekroza na aktivni rak dovodi do zacjeljivanje rak-rana i pojavu kalusirajućih rakova (Novak-Agbaba i sur., 2011). Hipovirulentni izolati ne uništavaju vaskularni kambij stabla i uzrokuju samo površinske, neletalne rane (Bissegger i sur., 1997).



Slika 3. Površinska nekroza

(autor fotografije doc. dr. sc. Igor Poljak)

Rak kestena najlakše se uočava na kori mladog drveća dok je kora vlažna. U to vrijeme obično je uočljiva crvenkasta boja epiderme, kroz koju je izbio micelij. Rak se ne može lako vidjeti na zreloj kori, gdje je često prvi znak infekcije stvaranje izbojaka ispod raka (Anagnostakis, 1987). U starih stabala se teško mogu uočiti promjene jer imaju debelu i ispucalu koru, pa se tako prvi znaci bolesti uoče tek kada se kora počinje odvajati. Osim na kori, znakovi bolesti se mogu uočiti i na krošnjama drveća gdje dolazi do sušenja lišća na granama i dijelovima krošnje koji su zahvaćeni bolešću (Slika 4). U navedenom slučaju lišće u jesen ne opada nego ostaje preko zime. Ovaj znak bolesti nije pouzdan jer lišće zbog drugih razloga preko zime može ostati na stablu (Glavaš, 1999).



Slika 4. Aktivni rak kestenove kore na stablu kestena. Na granama i izbojcima vidljivo je osušeno lišće koje nije otpalo.

(autor fotografije doc. dr. sc. Igor Poljak)

1.1.2 Rasprostranjenost raka kore kestena u Europi

Cryphonectria parasitica je unesena iz Azije u Sjevernu Ameriku početkom 20. stoljeća (Anagnostakis, 1987). U Europi je službeno prvi put zabilježena 1938. u Italiji u blizini Genove (Biraghi, 1946). Iz Italije se bolest naglo proširila u susjedne regije Francuske, Švicarsku i Sloveniju (Heiniger i Rigling, 1994, Krstin i sur., 2008, Prospero i Rigling, 2012), te u istočnu i sjeveroistočnu Europu i Tursku (Robin i Heiniger, 2001).

U Hrvatskoj je rak kore kestena zabilježen oko 1955. godine u blizini Opatije (Mlinarec i sur., 2018). Vjerojatno se bolest proširila sa sjevera, iz Slovenije, gdje se prvi put pojavila 1950. u Novoj Gorici, 4 km od talijanske granice (Krstin i sur., 2008). Međutim, mnoge europske sastojine kestena su se počele oporavljati od bolesti, na što ukazuje i pojava površinskih neletalnih rakova kestena. Ovaj oporavak pripisuje se hipovirulenciji, pojavi u kojoj mikovirusi značajno smanjuju virulenciju i sporulaciju gljive *C. parasitica* (Anagnostakis, 1987; Bragança i sur., 2007; Grente,

1965; Heiniger i Rigling, 1994). U Europi su hipovirulentni sojevi primijećeni u Italiji 1951. (Heiniger i Rigling, 1994), u Francuskoj 1964., te u Bosni i Hercegovini 1980. (Uščuplić, 1983). Grente (1965) je predložio upotrebu hipovirulentnih sojeva kao sredstva biokontrole raka kore kestena u voćnjacima kestena (Trestić i sur., 2001).

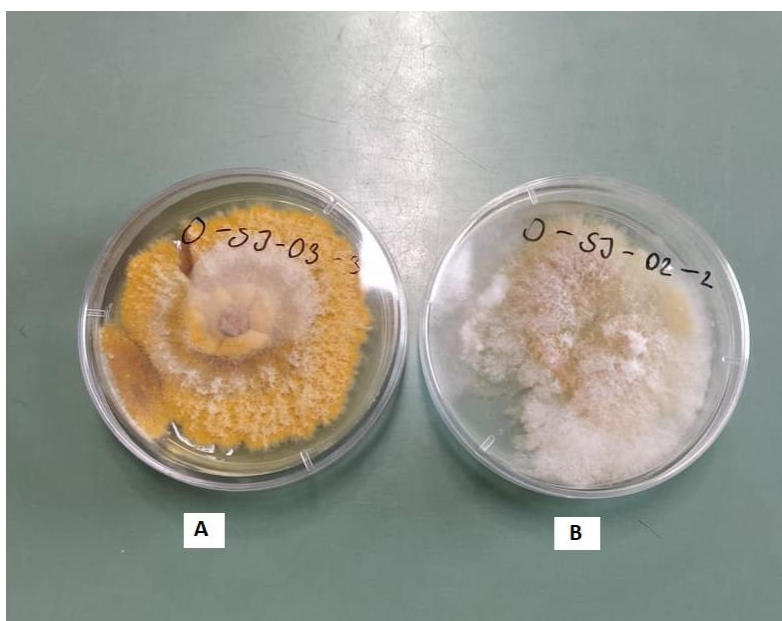
1.2 Karakteristike mikovirusa *Cryphonectria hypovirus 1*

Mikovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) koji smanjuje virulentnost gljive *C. parasitica* se koristi kao sredstvo biološke kontrole raka kore kestena. Pretpostavlja se da je CHV1 unesen u Europu iz Azije zajedno sa svojim domaćinom (Liu i Milgoom, 2007).

Virusna vrsta CHV1 spada u rod *Hypovirus*, koji uz CHV1 sadrži još tri dobro opisane vrste, i to CHV2, CHV3 i CHV4 (Hillman i Suzuki, 2004). Hipovirusi su RNA virusi pozitivnih lanaca, smješteni u citoplazmi domaćina. Nemaju kapsidu i smješteni su u membranskim mjehurićima porijeklom od stanice domaćina (Fahima i sur., 1993; Hansen i sur., 1985). Hipovirusi su tradicionalno otkriveni u miceliju gljiva ekstrakcijom dvolančane RNA, koja predstavlja replikativni oblik virusa (Day i sur., 1977).

CHV1 smanjuje virulenciju, spolnu i nespolnu reproduktivnu sposobnost i pigmentaciju zaraženih jedinki gljive *C. parasitica*, fenomen koji se naziva hipovirulencija, što omogućuje oporavak oboljelih stabala kestena (Peever i sur. 2000; Hillman i Suzuki 2004; Bryner i Rigling, 2012). CHV1, kao tipičan RNA virus, brzo akumulira mutacije, proizvodeći mnoge varijante virusa u kratkom vremenskom razdoblju (Gobbin i sur., 2003; Mlinarec i sur., 2018).

Kod izolata inficiranih hipovirusom, reducirana je pigmentacija i sporulacija za razliku od neinficiranih izolata patogene gljive. U kulturama uzgojeni hipovirulentni izolati gljive najčešće imaju bijeli micelij, a virulentni najčešće imaju žuto-narančasti micelij (Slika 5). Usporedba morfologije bijele kulture izolata zaraženih hipovirusom s narančastom morfologijom izolata bez hipovirusa omogućuje vizualnu procjenu prijenosa hipovirusa (Rigling i Prospero, 2018).



Slika 5. Žuti (A) i bijeli (B) miceliji izolata gljive *Cryphonectria parasitica* uzgojeni na hranidbenoj podlozi krumpirov dekstrozni agar (autorska fotografija)

CHV1 se u populaciji gljive *C. parasitica* širi vertikalno nespolnim sporama ili horizontalno anastomozom hifa - strukturom koja omogućuje izmjenu jezgri i citoplazmi iz jedne hife u drugu. Prijenos virusa posredovan anastomozom je reguliran sustavom vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) gljive (Cortesi i sur., 1998; Mlinarec i sur., 2018). Spolno razmnožavanje gljive ima negativan utjecaj na širenje hipovirusa, jer novi vc tipovi nastaju kombinacijom alela na šest dialelnih *vc* lokusa, čime se povećava bioraznolikost (Cortesi i Milgroom, 1998; Krstin i sur., 2008).

1.3 Sustav vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica*

U većine nitastih gljiva vegetativnu kompatibilnost čini sustav neveznih genskih lokusa (*vic* lokusi), a sastav alela na lokusim određuje jesu li jedinke gljiva kompatibilne ili ne (Saupe, 2000). Rezultati istraživanja koje je proveo Caten idu u prilog hipotezi da je ovaj sustav služio kao stanični mehanizam za obranu od od štetnih citoplazmatskih elemenata kao što su virusi i plazmidi (Caten, 1972). U gljive *C. parasitica* u Europi sustav vegetativne kompatibilnosti uključuje najmanje šest poznatih dialelnih genskih lokusa (*vic* lokusi: *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6*, *vic7*) (Cortesi i Milgroom, 1998; Mlinarec i sur., 2018). Križanjima prirodno raširenih izolata gljive *C. parasitica* u Europi dobivena su 64 (2⁶) moguća vc tipa (Cortesi i sur., 1998, Cortesi i Milgroom, 1999).

Učinkovitost prijenosa virusa ovisi o raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti gljive na određenom području. Hipovirus se uspješno širi između izolata iste vegetativne kompatibilnosti, ali se širi manje učestalo između izolata različite vegetativne kompatibilnosti (Cortesi i sur., 2001). Prijenos virusa događa se sa 100% učestalosti između izolata koji su identični na svih šest *vic* lokusa, tj. između izolata koji pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti. Nasuprot tome, heteroalizam na *vic* lokusima prilično smanjuje stopu prijenosa (Cortesi i sur., 2001; Papazova-Anakieva i sur., 2008; Robin i sur., 2009).

Izolati su nekompatibilni kada se razlikuju u jednom ili više *vic* lokusa. Ukoliko se razlikuju u dva ili više lokusa dolazi do nemogućnosti prijenosa virusa. Prilikom uzgoja u kulturi, u kompatibilnih izolata miceliji će potpuno prorasti, dok će se u nekompatibilnih pojaviti baražna linija, što znači da se izolati razlikuju u najmanje jednom *vic* lokusu. Testovi sparivanja pokazali su da se prijenos virusa lako događa između vegetativno kompatibilnih sojeva, ali je uvelike smanjen ako su sojevi heteroalelni na pet od šest poznatih lokusa (Cortesi i sur., 2001; Papazova-Anakieva i sur., 2008). Liu i Milgroom (1996) i Cortesi i sur. (2001) procijenili su da heteroalelizam u lokusu *vic4* nema utjecaja na prijenos virusa, ali se prijenos dogodio u samo 21% parova koji su bili heteroalelni na lokusu *vic2*. Kada su *vic3* i *vic6* bili heteroalelni, prijenos virusa je bio srednje učestalosti (76% odnosno 32%) (Mlinarec i sur., 2018).

Testovi vegetativne kompatibilnosti provode se sparivanjem izolata gljive *C. parasitica* s odgovarajućim EU testerima (ranije izolirani sojevi gljive koji pripadaju različitim tipovima vegetativne kompatibilnosti) (Bissegger i sur., 1997). Test vegetativne kompatibilnosti provodi se

praćenjem pojave baražnih linija između dvaju uzoraka. U kompatibilnih izolata (koji imaju identične alele na svih šest *vic* lokusa) miceliji će potpuno prorasti. Ako na mjestu kontakta nastane baražna linija, to znači da se izolati razlikuju u najmanje jednom *vic* lokusu, te nisu kompatibilni. Na mjestu kontakta tada će doći do programirane stanične smrti, što se manifestira pojavom baražne linije. Vc tip se može odrediti i metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) (Short i sur., 2015). U svakoj PCR reakciji koriste se parovi početnica specifični za alele na pojedinom lokusu, a umnožit će se samo onaj alel koji je prisutan u istraživanom izolatu gljive. Veličina umnoženog fragmenta uspoređuje se s poznatim veličinama alela na *vic* lokusima EU testera poznatog genotipa.

Smatra se da je raznolikost vc tipova na nekom području ključan faktor koji određuje uspješnost širenja hipovirusa unutar populacija gljive *C. parasitica* (Heiniger i Rigling, 1994; Krstin i sur., 2008; Liu i Milgroom, 1996; Robin i sur., 2009).

1.4 Biološka kontrola hipovirusom *Cryphonectria hypovirus 1*

Potencijal biokontrole hipovirulencije otkrio je (Grente, 1965) i doveo do mnogih daljnjih studija o biologiji i primjeni hipovirulencije.

U Europi, mikovirus CHV1 djeluje kao uspješno sredstvo biološke kontrole uzročnika raka kore kestena izazivajući takozvanu hipovirulenciju. Uspjeh hipovirulencije određen je sposobnošću virusa CHV1 da inficira veliki dio populacije gljive *C. parasitica*, što ovisi o kombinaciji horizontalnog (na druge jedinke gljive) i vertikalnog prijenosa (na spore) hipovirusa (Rigling i Prospero, 2018). U mnogim regijama populacije gljive *C. parasitica* pokazuju visoku prevalenciju infekcije hipovirusom. U lokalnim sastojinama kestena udio populacije gljive *C. parasitica* zaražen virusom često je veći od 50%. Primjeri toga pronađeni su u Švicarskoj (Bissegger i sur., 1997; Bryner i Rigling, 2012), Francuskoj (Robin i sur., 2010.), Hrvatskoj (Krstin i sur., 2008.), Sloveniji (Krstin i sur., 2011) i Bosni i Hercegovini (Bryner i Rigling, 2012; Rigling i Prospero, 2018).

U europskim državama su provedeni uspješni eksperimenti biološke kontrole hipovirusom CHV1. Nažalost, takav slučaj nije bio u Sjevernoj Americi. Smatra se da je glavni razlog zašto se

hipovirulencija nije mogla uspostaviti među sjevernoameričkim populacijama *C. parasitica* velika raznolikost vrst tipova, što sprječava širenje hipovirusa na populacijskoj razini, stoga liječenje nije bilo uspješno (Anagnostakis, 1987; Heiniger i Rigling, 1994; Krstin i sur., 2011; Liu i Milgoom, 2007).

Da bi mikovirus bio uspješno sredstvo biološke kontrole mora pokazivati ograničen raspon domaćina kako se ne bi proširio na nepredviđene i neočekivane vrste, a mora se širiti unutar ciljane populacije domaćina. Učinkovitost širenja mikovirusa izravno ovisi o kombinacijama gena unutar populacije domaćina (Cortesi i sur., 2001). Prema tome, za različite regije moraju biti dizajnirane različite strategije upravljanja, a najprikladnija biološka kontrola mora se primjenjivati za svaki slučaj pojedinačno (Bryner i Rigling, 2011; Krstin i sur., 2008).

1.5 Rak kore kestena u Crnoj Gori

Šume kestena u Crnoj Gori imaju ekonomski, kulturološki, ekološki, turistički i pejzažni značaj. Pojava raka kore kestena zabilježena je na više lokaliteta na područjima Boke kotorske i jezera Skadar (Stojanović i Magazin, 2020), međutim ne zna se kada se bolest prvi puta pojavila, niti su provedena istraživanja populacija same gljive.

U susjednim državama je *C. parasitica* prisutna već neko vrijeme, te je poznat sastav populacije i prisutnost hipovirusa. Primjerice, u Srbiji je bolest prvi put zabilježena 1975., a dominantni vrst tip gljive je EU-12 (Karadžić i sur., 2019) kao i u Albaniji (Myteberi i sur., 2013). U Bosni i Hercegovini zabilježena je veća bioraznolikost nego u Srbiji, s dominantnim tipovima EU-1, EU-2, EU-12 i EU-13 (Trestić i sur., 2001). Na južnom dijelu Balkana, *C. parasitica* je prvo uočena u Grčkoj i Sjevernoj Makedoniji i na tom području je najzastupljeniji vrst tip EU-12 (Sotirovski i sur., 2004).

Kako bi se upotpunila epidemiološka slika bolesti na jugu Europe, te mogla dati predviđanja o uspjehu širenja hipovirusa, potrebno je odrediti raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti populacija gljive *C. parasitica* na području Crne Gore.

1.6 Ciljevi

- Izolirati DNA iz uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Boke kotorske i Skadra
- Odrediti tipove vegetativne kompatibilnosti (*vic* genotip) uzoraka gljive *C. parasitica* metodom PCR
- Odrediti raznolikost *vc* tipova u uzorcima s područja Boke kotorske i Skadra
- Usporediti populacije gljive *C. parasitica* s područja Boke kotorske i Skadra s populacijama iz drugih zemalja

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Popis kemikalija

Popis kemikalija korištenih u istraživanju prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalije i njihove kratice

| Naziv | Kemijska formula ili kratica | Proizvođač |
|--|------------------------------|---------------------|
| Voda bez nukleaza (<i>AccuGENE Molecular Biology Water</i>) | - | Lonza |
| Agaroz | - | Sigma |
| Komercijalni komplet za izolaciju DNA iz gljive (<i>OmniPrep™ for Fungus</i>) | - | G-Biosciences |
| Boja za bojanja nukleinskih kiselina (<i>GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain</i>) | - | Lonza |
| Glicerol | - | Fisher Chemical |
| Polimeraza <i>GoTaq</i> DNA (<i>GoTaq DNA Polymerase</i>) | - | Promega |
| Pufer <i>Green GoTaq Flexi</i> | - | Promega |
| Klorform | - | Kemika |
| Krupirov dekstrozni agar | PDA | BioScience |
| Magnezijev klorid | MgCl ₂ | Promega |
| Propan-2-ol | - | Fisher Chemical |
| Smjesa deoksinukleotida | dNTP mix | Promega |
| Tris/borat/etilendiamintetraocena kiselina pufer (<i>AccuGENE 10×TBE Buffer</i>) | TBE pufer | Lonza |
| Standard za određivanje molekularne mase DNA, 100 bp <i>DNA Ladder</i> | - | New England BioLabs |
| 96%-tni etanol | EtOH | Lach-Ner |

2.2 Uzorkovanje populacija na područjima Boke kotorske i Skadra

Terenske uzorke gljive *C. parasitica* na području Crne Gore je sakupila i ustupila Milena Stojanović s Biotehničkog fakulteta u Podgorici. Uzorkovane su dvije populacije, a u svakoj su uzorci sakupljeni na dvije lokacije: 1) populacija jezera Skadar s lokacijama Koštanjica (K-SJ) i Ostros (O-SJ), te 2) populacija Boke kotorske s lokacijama Stoliv (S-BZ) i Kostanjica (K-BZ). Uzorci gljive *C. parasitica* prikupljeni su krajem 2019. i početkom 2020.

2.3 Laboratorijski uzgoj kultura gljive *C. parasitica*

Hranidbenu podlogu, krumpirov dekstrozni agar (engl. *potato dextrose agar*, PDA) za uzgoj gljive pripremila sam prema uputama proizvođača otapanjem 39 g praha PDA u 1 L deionizirane vode u staklenoj laboratorijskoj boci i potom sterilizirala autoklaviranjem (autoklav Kambič A-21) 20 min na 121°C. Nakon autoklaviranja vruću hranidbenu podlogu (oko 10 mL) ulila sam u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm.

Na podlogu sam postavila celofane koji su prethodno autoklavirani. Celofan sam koristila kako bih lakše sastrugala micelije za izolaciju nukleinskih kiselina. Uzorci su bili pohranjeni u zamrzivaču na -80 °C u Eppendorf mikroeprevetama u sterilnom 22%-tnom glicerolu. Tijekom rada uzorci su bili pohranjeni na ledu. Pripremu podloga i sav rad s kulturama provela sam unutar laminara (Klimaoprema Cleanroom Technology KTV-A), kabineta koji osigurava radni prostor od kontaminacija. Radnu površinu sam dezinficirala 70%-tnim etanolom na početku i na kraju rada, a pincete i sav ostali korišteni pribor sterilizirala 70%-tnim alkoholom i spalila.

Iz svake mikroeprevete izvadila sam pincetom jedan komadić agara s tkivom i sporama gljive. Kulture gljive sam nasadila na PDA u Petrijevoj zdjelici s celofanom, a potom ih inkubirala u fitotronu (Pol-eko aparatura), sedam dana u mraku pri 24 °C i 70% vlage, kako bi narasli miceliji, a potom sedam dana na danjem svjetlu, pri sobnoj temperaturi da bi došlo do sporulacije. Nakon što su narasle, kulture sam sastrugala s celofana u Eppendorf epruvete (2 mL) i pohranila u zamrzivač na -80 °C.

Uzorci su liofilizirani 24 sata (liofilizator Alpha 1-2 Freeze Dryer, Christ) na temperaturi -58°C i tlaku od 80 mbara. Nakon liofilizacije sam ih usitnila pomoću čeličnih kuglica ($2r = 5\text{ mm}$) u uređaju TyssueLyser (Qiagen) protresanjem u trajanju od 2 minute na frekvenciji od 30 Hz.

2.4 Izolacija genomske DNA iz uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica*

Iz liofiliziranih uzoraka gljive *C. parasitica* izolirala sam DNA pomoću komercijalnog kompleta za gljive (G-Biosciences) prema protokolu proizvođača. Izvagala sam 5-10 mg usitnjenog praškastog uzorka na analitičkoj vagi (Precisa 62A SWISS QUALITY) u Eppendorf epruvete (2 mL). U plastičnu epruvetu otpipetirala sam 500 μL pufera za lizu (*Lysis Buffer*) po uzorku, te dodala po 1 μL proteinaze K za svakih 100 μL pufera. Na svaki uzorak pipetirala sam 505 μL pripremljene otopine, a grudice koje su nastale usitnila sam mikrotučkom i promiješala na vrtložnoj miješalici kako bi se sav prah tkiva disperzirao u puferu. Zatim sam uzorke stavila na grijaći blok (Eppendorfer Thermomixer comfort) na 60°C u trajanju od 60 minuta. Nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, dodala sam 200 μL kloroforma i promiješala okretanjem epruvete nekoliko puta. Uzorke sam potom centrifugirala na 14 000 g 10 minuta kako bi se faze odijelile. Otpipetirala sam 350 μL gornje vodene faze u nove Eppendorf epruvete (1,5 mL), te dodala 50 μL otopine za odvajanje komponenata (*Stripping Solution*). Uzorke sam inkubirala 8 minuta na 60°C na grijaćem bloku. Potom sam dodala 150 μL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*) i centrifugirala 7 minuta na 15 000 g. Supernatant sam dekantirala u nove Eppendorf epruvete te sam dodala 500 μL izopropanola, zatim lagano protresla 10 puta i centrifugirala na 14 000 g 5 minuta. Pažljivo sam dekantirala supernatant i dodala 700 μL 70%-tnog etanola, a zatim sam centrifugirala 2 minute na 14 000 g. Etanol sam dekantirala, a uzorke posušila na 55°C na grijaćem bloku kako bi etanol ispario. Na kraju sam izoliranu nukleinsku kiselinu rehidrirala u 80 μL vode bez nukleaza. Koncentraciju sam odredila mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini $\lambda=260$, a čistoću pri valnim duljinama $\lambda=260/280$ pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) u 2 μL uzorka i potom izolate DNA pohranila u zamrzivač na -20°C .

2.5 Umnožavanje *vic* lokusa na genomskoj DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Lančanu reakciju polimerazom (PCR) provela sam za 56 uzoraka u PCR termobloku Applied biosystems SimpliAmp™ Thermal Cycler pomoću komercijalnog kompleta *GoTaq PCR* (Promega). Uvjeti u kojima sam provela PCR reakcije većinom slijede protokole opisane u Mlinarec i sur. (2018), ali se razlikovalo vrijeme početne denaturacije koje je trajalo 5 minuta.

Za svaki lokus je provedena posebna PCR reakcija. Reakcijska smjesa za jedan uzorak prikazana je u Tablici 2., a podaci o korištenim početnicama u Tablici 3. Za lokuse u kojih su korištene samo tri početnice (zajednička uzvodna početnica za oba alela), umjesto četvrte početnice u smjesu je stavljen isti volumen vode bez nukleaza. Negativna kontrola sadržavala je 9,5 μL reakcijske smjese i 0,5 μL vode bez nukleaza. Za svaki lokus sam koristila kontrolne uzorke – EU testere poznatog tipa koji na pojedinom lokusu imaju različite alele.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom iz kompleta *GoTaq PCR* (Promega) za umnažanje alela na lokusima gljive *Cryphonectria parasitica*

| Sastojak | Početna koncentracija | Volumen za 1 PCR reakcijsku smjesu | Konačna koncentracija u 10 μL |
|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|--|
| Puffer <i>Green GoTaq Flexi</i> | 5× | 2 μL | 1× |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0,6 μL | 1,5 mM |
| Polimeraza <i>GoTaq</i> DNA | 5 U/ μL | 0,1 μL | 0,5 U |
| dNTP smjesa | 10 mM | 0,2 μL | 0,2 mM |
| Početnica F1 | 10 pmol/ μL | 0,4 μL | 0,4 μM |
| Početnica R1 | 10 pmol/ μL | 0,4 μL | 0,4 μM |
| Početnica F2 | 10 pmol/ μL | 0,4 μL | 0,4 μM |
| Početnica R2 | 10 pmol/ μL | 0,4 μL | 0,4 μM |
| H ₂ O | - | 5 μL | - |
| Uzorak DNA | - | 0,5 μL | - |

Tablica 3. Naziv, veličina amplikona i sljedovi baza početnica korištenih u lančanoj reakciji polimerazom za određivanje *vic* genotipa gljive *Cryphonectria parasitica* prema Short i sur. (2015) i Mlinarec i sur. (2018)

| Lokus | Očekivana duljina amplikona za alel 1 (bp) | Očekivana duljina amplikona za alel 2 (bp) | Naziv početnice | Slijed baza početnica (5'→ 3') |
|--------------|--|--|-----------------|--------------------------------|
| <i>vic1a</i> | 308 | 1470 | vic1a-F | GCTATCCACCCTCACAGAGAA |
| | | | vic1a-1R | CGTCCTGCCTCAAGGAGATT |
| | | | vic1a-2R | CATTTTCGTCATCAGCACAAC |
| <i>vic2</i> | 660 | 1089 | vic2-F | TTGATGGTGGAGTGTGACAGA |
| | | | vic2-1R | TCTCCCAATGACCTGAAATG |
| | | | vic2-2R | GATGTTTGGCATAACATCGGC |
| <i>vic3a</i> | 538 | 1203 | vic3a-1F | CAGGTTTAGCAGGTTCTTCC |
| | | | vic3a-1R | CAGGTTTAGCAGGTTCTTCC |
| | | | vic3a-2F | TCCATTGTCTCTATCCCATCC |
| | | | vic3a-2R | GCATCAGGACTTGCCAGATA |
| <i>vic4</i> | 529 | 741 | vic4-pF | GGTAGGATGACCTTTGCTGCT |
| | | | vic4-1pR | GATACTTGCGCAAAGAAGGCG |
| | | | vic4-2pR | ACGGCGCAGAAATGAGGGGGT |
| <i>vic6</i> | 238 | 813 | vic6-1F | CGCATACTGTGTTTCCCAACT |
| | | | vic6-1R | AAGATCCTTGCGTACCTCCA |
| | | | vic6-2F | ACAGGATAGCAATCACTGCC |
| | | | vic6-2R | ACAGGGA ACTCTGGTCGTTG |
| <i>vic7</i> | 728 | 1109 | vic7-F | AGGTACACCCCAAGATTCC |
| | | | vic7-1R | CCACGAAGTCTCTGGCGTA |
| | | | vic7-2R | CAGGCTCGATTCTCAAGGTG |

Reakcije PCR za lokuse *vic1*, *vic3*, *vic4* i *vic7* odvijale su u sljedećim uvjetima: denaturacija je započela pri 95 °C i trajala 5 minuta, nakon čega je slijedilo 34 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije od 30 sekundi pri 95 °C, sparivanja početnica s kalupom pri 65 °C tijekom 30 sekundi i produljivanje lanca DNA pri 72 °C u trajanju od 105 sekundi. Završno produljivanje odvijalo se pri 72 °C u trajanju od 7 minuta.

Za lokus *vic2* reakcija je provedena metodom *touchdown* PCR, a započela je denaturacijom pri 95 °C koja se odvijala 5 minuta, nakon čega je slijedilo 10 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije od 15 sekundi pri 95 °C, sparivanja početnica s kalupom pri 65 °C koje je trajalo 30 sekundi (u svakom slijedećem ciklusu temperatura sparivanja snižavala se za 0,5 °C) i produljivanje lanca DNA pri 72 °C u trajanju od 105 sekundi. Potom su uslijedila 24 ciklusa u kojima se denaturacija odvijala pri 95 °C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica s kalupom pri 60 °C tijekom 30 sekundi i produljivanje lanca pri 72 °C u trajanju od 105 sekundi. Završno produljivanje lanca odvijalo se pri 72 °C u trajanju od 7 minuta.

Za lokus *vic6* početna denaturacija se odvijala pri 95 °C tijekom 5 minuta, nakon čega je slijedilo 34 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije od 30 sekundi pri 95 °C, sparivanja početnica s kalupom pri 64 °C u trajanju od 30 sekundi i produljivanje lanca DNA pri 72 °C u trajanju od 105 sekundi. Završno produljivanje lanca odvijalo se pri 72 °C, a trajalo je 7 minuta

Uspješnost PCR reakcija provjerila sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u 0,5× puferu Tris borat EDTA (TBE) tijekom 45 minuta pri 90 V. Na gel sam pipetirala 2 µL svakog uzorka. Za bojanje nukleinske kiseline koristila sam boju *GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza), dodanu u gel prije izlivanja. Konačna koncentracija boje u gelu bila je 1×. Za određivanje molekularne mase DNA odsječaka koristila sam standard za određivanje molekularne mase DNA, 100 bp DNA *Ladder* (New England BioLabs). Umnožene odsječke sam vizualizirala pod UV svjetlom na transluminatoru (Syngene). Usporedbom veličine umnoženih odsječaka s poznatim veličinama alela na *vic* lokusima kontrolnih uzoraka (EU-testera) odredila sam *vic* genotip svakog uzorka.

Molekularnom metodom sam odredila vc tip za 56 uzoraka, dok je za 23 uzorka vc tip odredila dr.sc. Lucija Nuskern Karaica klasičnom metodom sparivanja na PDA hranidbenoj podlozi (Bissegger i sur., 1997), te sam i te rezultate uzela u obzir prilikom izračunavanja raznolikosti.

2.6 Izražavanje Shannonovog indeksa raznolikosti

Raznolikost *vc* tipova gljive *C. parasitica* unutar istraživanih populacija izrazila sam Shannonovim indeksom (Anagnostakis, 1986), koji sam izračunala prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje je:

H' – Shannonov indeks raznolikosti

p_i – frekvencija pojedinog *vc* tipa

dok se p_i računa prema formuli:

$$p_i = n / N$$

gdje je:

n – broj uzoraka pojedinog *vc* tipa

N – ukupan broj uzoraka

Maksimaln mogući broj *vc* tipova koji mogu nastati rekombinacijom izračunala sam prema izrazu 2^k , gdje k predstavlja broj polimorfnihi lokusa unutar populacije (Cortesi i Milgroom, 1998).

3 REZULTATI

3.1 Koncentracije izolirane genomske DNA gljive *C. parasitica*

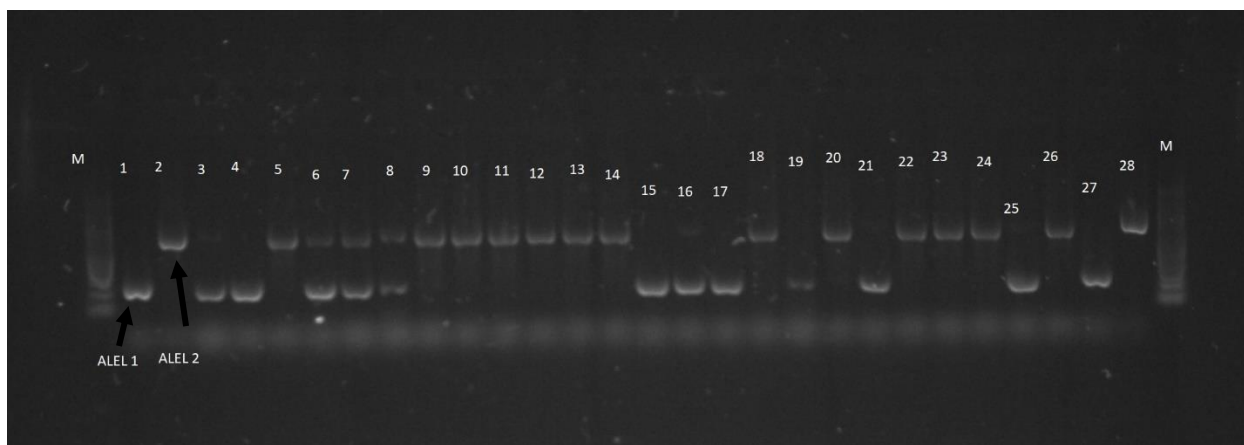
Koncentracije izolirane DNA kretale su se od 16,6 ng/ μ L do 1773 ng/ μ L. Izmjerene vrijednosti prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije izolirane genomske DNA iz izolata gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Skadra s lokacijama Koštanjica (K-SJ) i Ostros (O-SJ) i 2), te s područja Boke kotorske s lokacijama Stoliv (S-BZ) i Kostonjica (K-BZ)

| Boka kotorska | | | Jezero Skadar | | |
|---------------|--------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------|
| Uzorak | Masa liofiliziranog tkiva (mg) | Koncentracija DNA (ng/μL) | Uzorak | Masa liofiliziranog tkiva (mg) | Koncentracija DNA (ng/μL) |
| K-BZ 02-3 | 10,4 | 209,1 | K-SJ 03-3 | 9,4 | 112,3 |
| K-BZ 08-1 | 10,3 | 142,8 | K-SJ 04b-1 | 9,7 | 57,8 |
| K-BZ 11-3 | 10,7 | 246,3 | K-SJ 05-3 | 10,4 | 43,9 |
| K-BZ 16-1 | 11,5 | 30,7 | K-SJ 09-2 | 9,3 | 38 |
| K-BZ 16-2 | 9,8 | 177,1 | K-SJ 09-3 | 11,7 | 1773 |
| K-BZ 17-1 | 11,8 | 37,5 | K-SJ 17-2 | 5,1 | 23,7 |
| K-BZ 18-2 | 9,7 | 48,6 | K-SJ 19-3 | 10,4 | 343,5 |
| K-BZ 18-3 | 10,3 | 108,8 | K-SJ 21-1 | 7,3 | 72,3 |
| K-BZ 20-3 | 11,5 | 219,4 | O-SJ 02-2 | 9,6 | 180,4 |
| K-BZ 23-1 | 9,2 | 166,8 | O-SJ 06-1 | 11,6 | 496,6 |
| K-BZ 27-1 | 9,7 | 212,6 | O-SJ 06-2 | 10,9 | 72,9 |
| K-BZ 27-3 | 9,8 | 135,6 | O-SJ 07-2 | 134,9 | 58,4 |
| S-BZ 01-2 | 11 | 534,9 | O-SJ 09-2 | 10,1 | 16,6 |
| S-BZ 03-3 | 10,9 | 65,8 | O-SJ 09-3 | 11 | 129,7 |
| S-BZ 05-3 | 11,1 | 50,7 | O-SJ 12-1 | 11,1 | 173,6 |
| S-BZ 07-1 | 10,7 | 180,1 | O-SJ 12-3 | 10,3 | 378,9 |
| S-BZ 07-2 | 11,4 | 307,4 | O-SJ 13-1 | 6,5 | 65,3 |
| S-BZ 07-3 | 11,8 | 80,2 | O-SJ 15-1 | 10,2 | 192,3 |
| S-BZ 11-1 | 7,6 | 54,1 | O-SJ 15-2 | 3 | 68,6 |
| S-BZ 12-2 | 10,3 | 122,1 | O-SJ 17-1 | 9 | 81,1 |
| S-BZ 16-1 | 10,1 | 72,7 | O-SJ 19-2 | 9,4 | 48,4 |
| S-BZ 17-2 | 10 | 36,6 | O-SJ 21-1 | 5,5 | 90,4 |
| S-BZ 19-1 | 11 | 50,4 | | | |
| S-BZ 20-3 | 10,1 | 92,4 | | | |
| S-BZ 21-1 | 11,8 | 425,7 | | | |
| S-BZ 23-2 | 11,5 | 75,7 | | | |
| S-BZ 24-2 | 10,6 | 167,7 | | | |
| S-BZ 26-1 | 10,8 | 251,3 | | | |
| S-BZ 26-2 | 10,6 | 90,1 | | | |
| S-BZ 27-1 | 10,2 | 35,7 | | | |
| S-BZ 27-3 | 10,8 | 132,1 | | | |
| S-BZ 28-2 | 11,3 | 149,6 | | | |
| S-BZ 30-3 | 10,4 | 116 | | | |
| S-BZ 31-2 | 10,7 | 57,2 | | | |

3.2 Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* na području Skadra i Boke kotorske

Za 23 uzoraka gljive *C. parasitica* vc tip bio je ranije određen. Za 56 uzoraka gljive s područja Skadra i Boke kotorske određivala sam vc tip PCR metodom, te za svaki uzorak odredila alel prisutan na pojedinom lokusu (Slika 6). Uspješno sam odredila vc tip za 36 uzoraka metodom PCR, a za 20 uzoraka nije bilo moguće odrediti vc tip (Tablica 5).



Slika 6. Elektroforeza PCR produkata (reprezentativna slika gela za lokus *vic6*) dobivenih umnožavanjem izolirane genomske DNA iz liofiliziranih uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Skadar s lokacijama Koštanjica (K-SJ) i Ostros (O-SJ) i 2), te područja Boke kotorske s lokacijama Stoliv (S-BZ) i Kostanjica (K-BZ). Brojevima su označeni izolati : **1-** EU-3, **2-** EU-18 (testni izolati), **3-** K-BZ 02-3, **4-** K-BZ 08-1, **5-** K-BZ 11-3, **6-** K-BZ 16-1, **7-** K-BZ 16-2, **8-** K-BZ 17-1, **9-** K-BZ 18-2, **10-** K-BZ 18-3, **11-** K-BZ 20-3, **12-** K-BZ 23-1, **13-** K-BZ 27-1, **14-** K-BZ 27-3, **15-** S-BZ 01-2, **16-** S-BZ 03-3, **17-** S-BZ 05-3, **18-** S-BZ 07-1, **19-** S-BZ 07-2, **20-** S-BZ 07-3, **21-** S-BZ 11-1, **22-** S-BZ 12-2, **23-** S-BZ 16-1, **24-** S-BZ 17-2, **25-** S-BZ 19-1, **26-** S-BZ 20-3, **27-** EU-3, **28-** EU-18, **M-** Standard za određivanje molekularne mase DNA

Tablica 5. Sastav alela na vic lokusima, te određeni vc tip za uzorke gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Skadar s lokacijama Koštanjica (K-SJ) i Ostros (O-SJ) i 2), te područja Boke kotorske s lokacijama Stoliv (S-BZ) i Kostanjica (K-BZ).

* - tip vegetativne kompatibilnosti određen je klasičnom metodom;

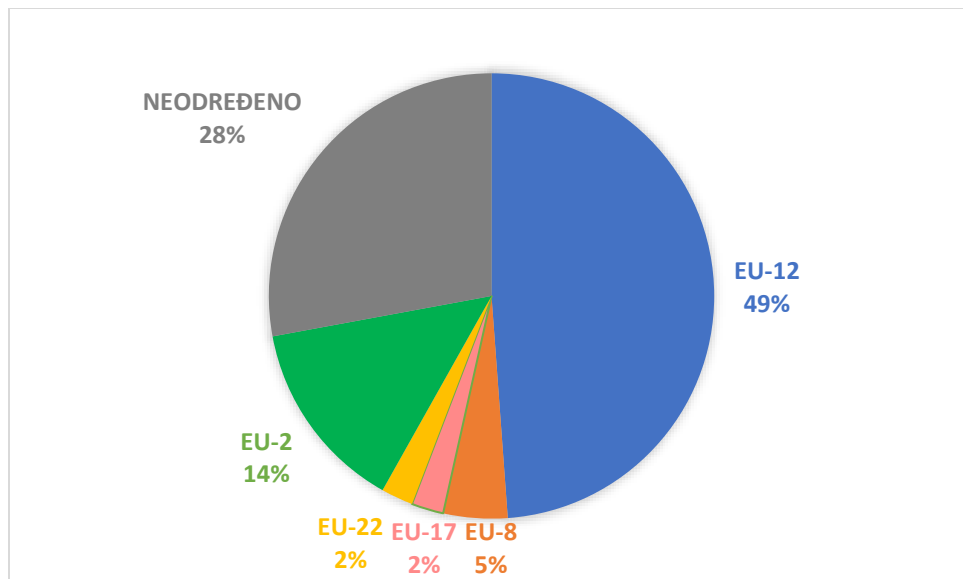
NA - *not applicable* (nije primjenjivo), jer se klasičnom metodom ne određuju pojedinačni aleli;
X - neuspješno određivanje alela, pa time i vc tipa i nakon ponovljene PCR reakcije; nije umnožen ni jedan ili su umnožena oba alela

| Uzorak | vic1 | vic2 | vic3 | vic4 | vic6 | vic7 | vc tip |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| Boka kotorska | | | | | | | |
| K-BZ 02-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 02-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| K-BZ 03-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 08-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| K-BZ 11-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | EU-8 |
| K-BZ 15-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 16-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | X | 1 | X |
| K-BZ 16-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | X | 1 | X |
| K-BZ 17-1 | X | 1 | 1 | 2 | X | 1 | X |
| K-BZ 18-2 | X | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | X |
| K-BZ 18-3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |
| K-BZ 20-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 20-2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 20-3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |
| K-BZ 23-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| K-BZ 24-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 26-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-BZ 27-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| K-BZ 27-3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| K-BZ 30-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| S-BZ 01-2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-17 |
| S-BZ 03-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 05-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 07-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| S-BZ 07-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 07-3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| S-BZ 11-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 12-2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |
| S-BZ 16-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |

| | | | | | | | |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|--------|
| S-BZ 17-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 19-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | EU-8 |
| S-BZ 20-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 21-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |
| S-BZ 23-2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| S-BZ 24-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 26-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 26-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 27-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| S-BZ 27-3 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | - | X |
| S-BZ 28-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| S-BZ 29-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| S-BZ 30-3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | EU-22 |
| S-BZ 31-2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | EU-2 |
| Jezero Skadar | | | | | | | |
| K-SJ 01-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-1* |
| K-SJ 03-3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| K-SJ 04b-1 | X | 2 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| K-SJ 05-3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| K-SJ 08-2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-SJ 09-2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| K-SJ 09-3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-11 |
| K-SJ 17-2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| K-SJ 19-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| K-SJ 20-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| K-SJ 21-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 01-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 02-2 | X | 1 | 1 | 2 | X | 1 | X |
| O-SJ 03-2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 03-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 04-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 05-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 05-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 06-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 06-2 | X | 1 | X | 2 | 1 | 1 | X |
| O-SJ 07-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 08-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 09-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 09-3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 11-2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 12-1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | EU-10 |

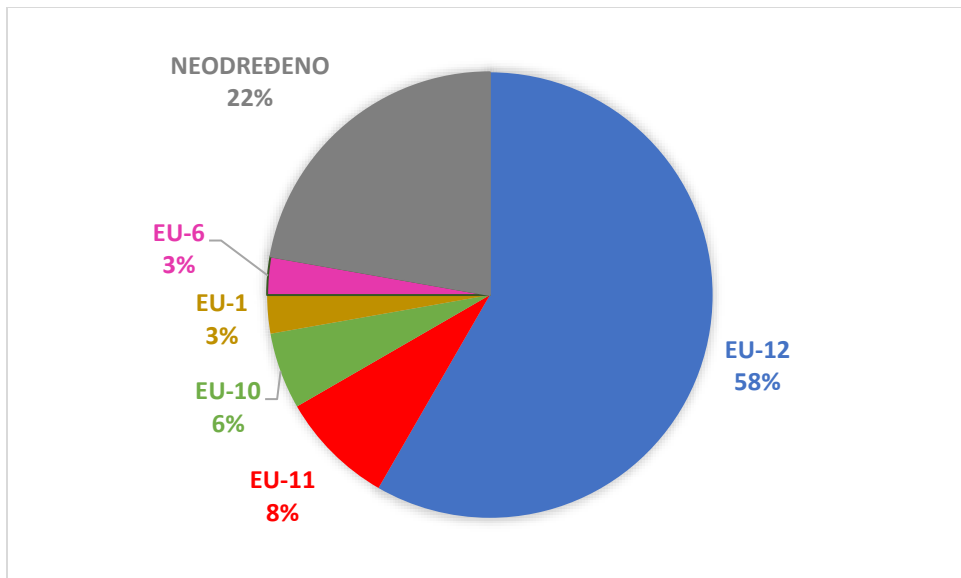
| | | | | | | | |
|-----------|----|----|----|----|----|----|--------|
| O-SJ 12-3 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | EU-10 |
| O-SJ 13-1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 14-1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 14-2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 14-3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | EU-12* |
| O-SJ 15-1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-11 |
| O-SJ 15-2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | - | X |
| O-SJ 17-1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | EU-6 |
| O-SJ 19-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-12 |
| O-SJ 21-1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | EU-11 |

Na području Boke kotorske od ukupno 43 izolata vc tip nije određen za 12 izolata (28%). Od određenih vc tipova prisutni su EU-12 s 21 izolatom (49%), EU-2 sa šest izolata (14%), EU-8 s 2 izolata (5%), EU-22 s jednim izolatom (2%), EU-17 s jednim izolatom (2%) (Slika 7).



Slika 7. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) gljive *Cryphonectria parasitica* na području Boke kotorske

Na području jezera Skadar od ukupno 36 izolata vc tip nije određen za osam izolata (22%). Od određenih vc tipova prisutni su EU-12 s 21 izolatom (58%), EU-11 s tri izolata (8%), EU-10 s dva izolata (6%), te EU-1 i EU-6 s po jednim izolatom (3%) (Slika 8).



Slika 8. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) gljive *Cryphonectria parasitica* na području jezera Skadar

3.3 Shannonov indeks raznolikosti

Raznolikost vc tipova gljive *C. parasitica* izražena pomoću Shannonova indeksa za populaciju s područja Boke kotorske iznosi 0,98 a za populaciju na području Skadra 0,88 (Tablica 6).

Tablica 6. Shannonov indeks raznolikosti vc tipova gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Boke kotorske i Skadra

| vc tip | n | $p_i = n/N$ | $p_i \ln p_i$ | |
|----------------------|----|-------------|---------------|-------------|
| Boka kotorska | | | | |
| EU-2 | 6 | 0,1935484 | -0,317850529 | |
| EU-8 | 2 | 0,0645161 | -0,176828389 | |
| EU-12 | 21 | 0,6774194 | -0,263830971 | |
| EU-17 | 1 | 0,0322581 | -0,110773781 | |
| EU-22 | 1 | 0,0322581 | -0,110773781 | |
| N | 31 | | H' | 0,98 |
| Jezero Skadar | | | | |
| EU-1 | 1 | 0,0357143 | -0,119007304 | |
| EU-6 | 1 | 0,0357143 | -0,119007304 | |
| EU-10 | 2 | 0,0714286 | -0,188504095 | |
| EU-11 | 3 | 0,1071429 | -0,239313452 | |
| EU-12 | 21 | 0,75 | -0,215761554 | |
| N | 28 | | H' | 0,88 |

n - broj uzoraka pojedinog vc tipa

N - ukupan broj uzoraka kojima je uspješno određen vc tip

H' - Shannonov indeks raznolikosti

p_i - frekvencija pojedinog vc tipa

3.4 Raznolikost *vic* alela u populacijama gljive *C. parasitica* na području Crne Gore

Na temelju podataka o alelima na pojedinim *vic* lokusima odredila sam broj polimorfnih lokusa u svakoj populaciji (Tablica 7). U Boki kotorskoj polimorfni su bili lokusi *vic1*, *vic6* i *vic7*, dok je u populaciji Skadarskog jezera polimorfno bilo svih šest lokusa. Na temelju podatka o broju polimorfnih lokusa, prema izrazu 2^k izračunala sam maksimalan broj mogućih novih *vc* tipova, koji bi u toj populaciji mogli nastati spolnim razmnožavanjem – osam za Boku kotorsku i svih 64 za jezero Skadar.

Tablica 7. Sastav alela za dialelne *vic* lokuse za *vc* tipove određene u populacijama Boke kotorske i jezera Skadar, broj polimorfnih lokusa i maksimalan broj mogućih novih *vc* tipova

| vc tip | Ukupan broj izolata u populaciji | <i>vic1</i> | <i>vic2</i> | <i>vic3</i> | <i>vic4</i> | <i>vic6</i> | <i>vic7</i> |
|--|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Boka kotorska | | | | | | | |
| EU-12 | 21 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| EU-2 | 6 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| EU-8 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| EU-17 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| EU-22 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Broj alela 1 | | 23 | 31 | 31 | 0 | 22 | 25 |
| Broj alela 2 | | 8 | 0 | 0 | 31 | 9 | 6 |
| Broj polimorfnih lokusa | 3 | | | | | | |
| Maksimalan broj mogućih novih <i>vc</i> tipova | 8 | | | | | | |
| Jezero Skadar | | | | | | | |
| EU-12 | 21 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| EU-11 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| EU-10 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| EU-1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| EU-6 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| Broj alela 1 | | 24 | 24 | 26 | 27 | 26 | 26 |
| Broj alela 2 | | 4 | 4 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Broj polimorfnih lokusa | 6 | | | | | | |
| Maksimalan broj mogućih novih <i>vc</i> tipova | 64 | | | | | | |

3.5 Usporedba populacija gljive *C. parasitica* na području Crne Gore s populacijama u drugim državama

Dobivene podatke o raznolikosti populacija gljive *C. parasitica* u crnogorskim populacijama usporedila sam s podacima o europskim populacijama dostupnim u literaturi (Tablica 8).

Tablica 8. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* u Europi.

*NA-podatak nije dostupan

| Država | Broj različitih vc tipova | Broj uzoraka/izolata | Dominantni vc tip | Indeks raznolikosti | Literaturni izvor |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------|--|---------------------|----------------------------|
| Crna Gora | 9 | 79 | EU-12 | 0,88-0,98 | |
| Republika Hrvatska | 18 | 338 | EU-1 | 0,63-1,69 | (Krstin i sur., 2008) |
| Bosna i Hercegovina | 29 | 920 | EU-12, EU-2, EU-1 | 0,22-2,52 | (Trestić i sur., 2001) |
| Srbija | 3 | 82 | EU-12, EU-2, EU-1 | 0,65 | (Karadžić i sur., 2019) |
| Albanija | 5 | 147 | EU-1, EU-2, EU-3, EU-10, EU-12 | NA | (Myteberi i sur., 2013) |
| Sjeverna Makedonija | 5 | 786 | EU-12, EU-1, EU-2, EU-10, EU-22 | 0,11-0,78 | (Sotirovski i sur., 2004) |
| Grčka | 1 | 379 | EU-12 | | (Sotirovski i sur., 2004) |
| Slovenija | 15 | 254 | EU-13 | <1,15 | (Krstin i sur., 2011) |
| Italija | 20 | 716 | EU-2 | 0,4-1,76 | (Cortesi i Milgroom, 1998) |
| Švicarska | 26 | 367 | EU-2 | 1,48-2,18 | (Cortesi i Milgroom, 1998) |
| Južna Španjolska i zapadna Francuska | 61 | 682 | EU-66, EU-72 EU-66, EU-72, EU-33, EU-2 | 0,327-0,782 | (Robin i sur., 2009) |
| Njemačka | 15 | 284 | EU-2 | | (Peters i sur., 2014) |
| Portugal | 9 | 617 | EU-11 | 0,146-1,209 | (Bragança i sur., 2007) |

4 RASPRAVA

Prilikom istraživanja populacija gljive *C. parasitica* na području Crne Gore, od ukupno 79 izolata zabilježeno je sveukupno devet različitih vc tipova. Za usporedbu s drugim državama, u Republici Hrvatskoj pronađeno je 18 vc tipova unutar 338 izolata (Krstin et al., 2008), u Bosni i Hercegovini 29 vc tipova unutar 920 izolata (Trestić i sur., 2001), u Srbiji unutar 82 izolata 3 različita vc tipa (Karadžić i sur., 2019), u Albaniji među 147 izolata 5 vc tipova (Myteberi i sur., 2013), u Sjevernoj Makedoniji među 786 izolata 5 vc tipova (Sotirovski i sur., 2004), u Sloveniji 15 različitih vc tipova među 254 izolata (Krstin i sur., 2011), u Italiji 20 vc tipova među 716 izolata (Cortesi i Milgroom, 1998), u Švicarskoj 26 različitih vc tipova unutar 367 izolata (Cortesi i Milgroom, 1998), u Njemačkoj 15 vc tipova među 284 izolata (Peters i sur., 2014), a u Portugalu je među 617 izolata zabilježeno 9 različitih vc tipova (Bragança i sur., 2007).

Na području Boke kotorske zabilježeni su vc tipovi EU-12, EU-2, EU-8, EU-17 i EU-22, a na području jezera Skadar EU-12, EU-11, EU-10, EU-1 i EU-6. Najzastupljeniji vc tip i na području Boke Kotorske (49%) i na području Skadra (58%) jest tip EU-12. Jedini zajednički vc tip i na području Boke kotorske i Skadra jest EU-12. Nijedan od drugih utvrđenih vc tipova u ovom istraživanju nije pronađen na oba područja.

Prema prethodnim istraživanjima (Krstin i sur., 2008), u Republici Hrvatskoj je EU-12 najzastupljeniji vc tip na području Markuševca. U Bosni i Hercegovini EU-12 je dominantan u istočnom i jugozapadnom dijelu države (Trestić i sur., 2001). U Srbiji je EU-12 jedan od tri prisutna vc tipa: EU-2, EU-12 i EU-1 (Karadžić i sur., 2019). EU-12 je također najzastupljeniji vc tip i na području Makedonije (94%) i Grčke (96%) (Sotirovski i sur., 2004), te Albanije (39%) (Myteberi i sur., 2013). Prema provedenom istraživanjima može se primijetiti da su u Crnoj Gori pronađeni EU tipovi koji su prisutni i u susjednim državama, a u većini je najzastupljeniji tip EU-12. U Sloveniji je dominantan EU-13 (Krstin i sur., 2011) koji u ovom istraživanju nije pronađen na području Crne Gore. U Njemačkoj je dominantan vc tip EU-2 (64%) (Peters i sur., 2014), dok su u Italiji i Švicarskoj to EU-2 i EU-1, a u Portugalu EU-11 (80,2%) (Bragança i sur., 2007).

Iz navedenih podataka mogu se uočiti razlike u dominantnosti vc tipova u različitim dijelovima Europe. Tip vegetativne kompatibilnosti EU-12 je dominantan u južnoj i istočnoj Europi dok je

EU-2 rasprostranjen većinom u zapadnoj i sjeverozapadnoj Europi (Karadžić i sur., 2019; Robin i Heiniger, 2001).

Pokazatelj raznolikosti populacije je i Shannonov indeks (H'). Za populaciju gljive *C. parasitica* na području Boke kotorske Shannonov indeks raznolikosti iznosi 0,98, a za populaciju na području Skadra 0,88. Vrijednosti Shannonovog indeksa su približne vrijednostima indeksa raznolikosti u susjednim državama (Karadžić i sur., 2019; Krstin i sur., 2008; Trestić i sur., 2001), dok su u odnosu na Švicarsku i Italiju (države u kojima je ova vrsta duže prisutna) znatno manje (Cortesi i sur., 1998; Ježić i sur., 2021). U odnosu na Republiku Hrvatsku (Krstin i sur., 2008) i Bosnu i Hercegovinu (Trestić i sur., 2001) bioraznolikost populacija u Crnoj Gori je manja, dok je veća bioraznolikost u odnosu na Srbiju gdje su zabilježena samo tri različita vc tipa (Karadžić i sur., 2019) i Albaniju gdje je prisutno pet vc tipova (Myteberi i sur., 2013).

Za 20 uzoraka u kojih su se na pojedinim *vic* lokusima pojavila oba alela ili se aleli nisu uspješno umnožili nisam mogla odrediti vc tip. Iako su PCR reakcije ponovljene za navedene uzorke, određivanje je bilo neuspješno. Aleli se većinom nisu amplificirali na lokusu *vic7*. Jedno od mogućih objašnjenja je da je kod svih tih uzoraka na lokusu *vic7* prisutan alel 2 te da je došlo do degradacije početnica za taj alel. U uzorcima u kojima su se amplificirala oba alela, to može biti posljedica višestruke infekcije. Naime, u istom raku mogu biti prisutne dvije gljive različitih vc tipova koje su mogle biti sakupljene istovremeno, te se umnožavanjem takvih uzoraka umnože aleli obiju gljiva.

U razmaku od nekoliko godina ponovljena su istraživanja u Švicarskoj, Sjevernoj Makedoniji, Hrvatskoj i Njemačkoj. U Makedoniji se situacija s godinama gotovo i nije promijenila te je i dalje dominantan tip EU-12 (Ježić i sur., 2021; Peters i sur., 2014). Trenutna visoka učestalost tipova EU-1 i EU-2 u Švicarskoj i Hrvatskoj unutar populacija ukazuje na prilično stabilnu strukturu populacije tijekom vremena (Ježić i sur., 2021). Kao i u prethodnim istraživanjima provedenim prije 20 godina, ovom populacijom dominiraju vc tipovi EU-1 i EU-2, te njihova dva rekombinanta EU-5 i EU-6 (Krstin i sur., 2008; Robin i sur., 2000; Robin i Heiniger, 2001; Ježić i sur., 2021.). Ova stabilnost je neobična, budući da bi se očekivalo povećanje raznolikosti u populacijama koje imaju nekoliko polimorfnih *vic* lokusa i gdje je bila zabilježena spolna reprodukcija (Ježić i sur.,

2018). Pretpostavlja se da bi se s vremenom dominantnost tipova EU-1 i EU-2 mogla smanjiti u Švicarskoj i Hrvatskoj (Ježić i sur., 2021).

Istraživanja provedena u Njemačkoj su pokazala da se broj vc tipova u šumskim područjima više nego udvostručio u razdoblju između 1992. i 2012. (Peters i sur., 2012, 2014).

Povećana raznolikost vc tipova zabilježena je i za druga područja, primjerice u zapadnoj Španjolskoj, gdje je 2008. opisano šest vc tipova (Montenegro i sur., 2008) i 11 vc tipova u 2012. (Peters i sur., 2014; Zamora i sur., 2012).

Očekuje se da bi se na području Crne Gore rekombinacijom mogao povećati broj vc tipova. Za populaciju na području Boke kotorske broj vc tipova mogao bi se povećati do 8 (2^3) jer su 3 lokusa polimorfna, a za populaciju na području jezera Skadar, gdje je svih 6 lokusa polimorfno, maksimalni broj vc tipova bi mogao biti i 64 (2^6). Svakako, u obzir treba uzeti da su prilikom izračunavanja korišteni podaci samo za uspješno određene vc tipove.

Stabla kestena u Crnoj Gori potrebno je liječiti jer im prijete propadanje. Jedan od mogućih načina liječenja mogla bi biti biološka kontrola virusom CHV1. Primjena hipovirulencije kao biološke kontrole jednostavnija je u populacijama gljive *C. parasitica* manje raznolikosti u kojima dominira nespolno razmnožavanje gljive jer se virus uspješno širi kroz populacije anastomozom i nespolnim sporama (Sotirovski i sur., 2004). Liječenje može biti otežano ako rekombinacijom s vremenom u populaciji nastanu novi vc tipovi. Nastajanje novih vc tipova doprinosi povećanju bioraznolikosti gljive, a povećanjem bioraznolikosti smanjuje se vjerojatnost uspješnog prijenosa hipovirusa u populaciji. Veliki broj različitih vc tipova predstavlja veliki problem u biološkoj kontroli bolesti (Krstin i sur., 2008). Na temelju dobivenih podataka za crnogorske populacije, nastanak mogućih novih vc tipova (osam novih vc tipova u Boki kotorskoj i 64 na području jezera Skadar) može predstavljati prepreku za uspješnu biološku kontrolu.

S obzirom da su populacije relativno blizu, također postoji mogućnost unosa novih vc tipova iz jednog područja u drugo. Kako bi se bolest raka kesteneve kore mogla kontrolirati važno je pratiti područja prirodnog rasta i/ili uzgoja kestena, raznolikost populacija gljive *C. parasitica* i zastupljenost hipovirusa u populaciji kroz duži vremenski period.

5 ZAKLJUČAK

Uzorcima gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Boke kotorske i Skadra odredila sam vc tip lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Sveukupno je utvrđeno devet različitih vc tipova na području Crne Gore.

U populaciji gljive *C. parasitica* na području Boke kotorske pronađeno je pet različitih vc tipova, a Shannonov indeks raznolikosi iznosi 0,98. U populaciji gljive *C. parasitica* na području jezera Skadar pronađena su četiri različita vc tipa, a Shannonov indeks raznolikosti iznosi 0,88. Vrijednosti Shannonovog indeksa raznolikosti populacija gljive *C. parasitica* u Crnoj Gori su slične vrijednostima u susjednim državama, a znatno manje nego u državama u kojima je ova vrsta duže prisutna. Najzastupljeniji vc tip i na području Boke kotorske i na području Skadra je EU-12. To je najzastupljeniji vc tip i u drugim državama južne i jugoistočne Europe.

6 LITERATURA

- Anagnostakis, S. L. (1986). Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70; 536-538.
- Anagnostakis, Sandra L. (1987). Chestnut Blight: The Classical Problem of an Introduced Pathogen. *Mycologia* 79; 23–37.
- 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.
- Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R., Rigling, D. (2007). *Cryphonectria parasitica* in Portugal: Diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest pathology* 37; 391–402.
- Bryner, S. F., Rigling, D. (2011). Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. *The American naturalist* 177; 65–74.
- Bryner, S. F., Rigling, D. (2012). Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in populations of the chestnut blight fungus. *Phytopathology* 102; 1161–1167.
- Caten, C. E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of general microbiology* 72; 221–229.
- Choi, G. H., Nuss, D. L. (1992). A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. *EMBO Journal* 11; 473–477.
- 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.
- 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.
- Day, P. R., Dodds, J. A., Elliston, J. E., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L. (1977). Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 67; 1393–1396.

- Fahima, T., Kazmierczak, P., Hansen, D. R., Pfeiffer, P., Vanalfen, N. (1993). Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Virology* 195; 81–89.
- 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* (CHV1) in Europe. *Virus research* 97; 39–46.
- Grente, J. (1965). Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. Académie d'Agriculture de France, Extrait du Procès-verbal de la Séance 51; 1033–1037.
- Halambek, M. (1991). Hipovirulentni sojevi *Cryphonectria parasitica* - nova mogućnost za oporavak pitomog kestena. *Radovi* 26; 223–240.
- Hansen, D.R., Van Alfen, N. K., Gillies, K., Powell, W. (1985). Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicles. *Journal of general virology* 66; 2605–2614.
- 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.
- Ježić, M., Mlinarec, J., Vuković, R., Katanić, Z., Krstin, L., Nuskern, L., Poljak, I., Idžojić, M., Tkalec, M., Ćurković-Perica, M. (2018). Changes in *Cryphonectria parasitica* populations affect natural biological control of chestnut blight. *Phytopathology* 108; 870–877.
- Ježić, M., Schwarz, M., Prospero, S., Sotirovski, K., Risteski, M., Ćurković-Perica, M., Nuskern, L., Krstin, L., Katanić, Z., Malenčić, E., Poljak, I., Idžojić, M., Rigling, D. (2021). Temporal and spatial genetic population structure of *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus across an invasive range of chestnut blight in Europe. *Phytopathology*. doi: 10.1094/PHYTO-09-20-0405-R.
- Karadžić, D., Radulović, Z., Sikora, K., Stanivuković, Z., Ćurguz, V. G., Oszako, T., Milenković, I. (2019). Characterisation and pathogenicity of *Cryphonectria parasitica* on sweet chestnut and sessile oak trees in Serbia. *Plant protection science* 55; 191–201.
- 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, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M., Čurković 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.
- Liu, Y. C., Milgroom, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology 86; 79–86.
- Liu, Y., Milgroom, M. (2007). High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. Mycologia 99, 279–284.
- Marra, R. E., Milgroom, M. G. (1999). PCR amplification of the mating-type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. Molecular ecology 8; 1947–1950.
- Marra, R. E., Milgroom, M. G. (2001). The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: Selfing and self-incompatibility. Heredity 86; 134–143.
- Mlinarec, J., Ježić, M., Čosić, J., Čurković-Perica, M. (2018). Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in populations of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. Plant pathology 67; 741–749.
- Montenegro, D., Aguín, O., Sainz, M. J., Hermida, M., Mansilla, J. P. (2008). Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. Forest ecology and management 256; 973–980.
- Myteberi, I. F., Lushaj, A. B., Keča, N., Lushaj, A. B., Lushaj, B. M. (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.
- Novak-Agbaba, S., Čelepirović, N., Čurković-Perica, M. (2011). Zaštita šuma pitomog kestena, Protection of sweet chestnut stands. Šumarski list, posebni broj, 202–210.
- Novak-Agbaba, S., Liović, B., Pernek, M. (2000). Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Radovi Šumarskog instituta Jastebarsko 35; 91–110.
- Papazova-Anakieva, I., Sotirovski, K., Cortesi, P., Milgroom, M. G. (2008). Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. European Journal of Plant Pathology 120; 35–42.

- Peters, F. S., Bußkamp, 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.
- Peters, F. S., Holweg, C., Rigling, D., Metzler, B. (2012). Chestnut blight in south-western Germany: multiple introductions of *Cryphonectria parasitica* and slow hypovirus spread. *Forest pathology* 36; 413–421.
- Prospero, S., Rigling, D. (2012). Invasion genetics of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. *Phytopathology* 102; 73–82.
- Rigling, D., Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular plant pathology* 19; 7–20.
- Robin, C., Capdevielle, X., Martin, M., Traver, C., Colinas, C. (2009). *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant pathology* 58; 527–535.
- Robin, C., 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., Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest snow and landscape research* 76; 361–367.
- Saupe, S. J. (2000). Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and molecular biology reviews* 64; 489–502.
- Short, D. P. G., Double, M., Nuss, D. L., Stauder, C. M., MacDonald, W., Kasson, M. T. (2015). Multilocus PCR assays elucidate vegetative incompatibility gene profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. *Applied and environmental microbiology* 81; 5736–5742.
- Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N. J., Milgroom, M. G. (2004). Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant pathology* 53; 325–333.
- Stojanović, M., Magazin, N. (2020). Variability of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Montenegro according to morphological traits of fruits and upov descriptors. *Genetika* 52; 571–584.
- 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. (1983). New investigation on the sweet chestnut blight. *Zaštita Bilja*, 34/3,165: 317–328.

Webster, J., Weber, R. W. S. (2007). *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge

Zamora, P., Martín, A. B., Rigling, D., Diez, J. J. (2012). Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. *Forest pathology* 42; 412–419.

7 ŽIVOTOPIS

U Županji sam završila Opću gimnaziju 2015. godine i iste godine upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Poznajem rad na računalu te svakodnevno koristim Microsoft Office alate (Word, Excel, Power Point, Outlook). Također, poznajem i koristim engleski jezik i u govoru i u pismu, a služim se i njemačkim jezikom. Otvorena sam, komunikativna i orijentirana prema timskom radu. Tijekom akademskih godina 2018./2019. i 2019./2020. sudjelovala sam u organizaciji Dana Karijera “*WorkIn’ Science -WISe*“ na PMF-u. Dobitnica sam Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj zajednici u akademskoj godini 2018./2019. radi sudjelovanja u organizaciji navedenog događaja.