Biokemijske i epigenetičke promjene u gljive Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr zaražene virusom Cryphonectria hypovirus 1

Nuskern, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:705728

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Lucija Nuskern

BIOKEMIJSKE I EPIGENETIČKE PROMJENE U GLJIVE *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR ZARAŽENE VIRUSOM *Cryphonectria hypovirus 1*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Lucija Nuskern

BIOCHEMICAL AND EPIGENETIC CHANGES IN *Cryphonectria hypovirus 1*-INFECTED FUNGUS *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

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

Prije svega, zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perici, što me odabrala za svoju doktorandicu, ukazala mi povjerenje i pružila šansu za izradu ovog doktorskog rada. Zahvalna sam joj na svom uloženom trudu i angažmanu, te na svim savjetima i motivaciji kako bi ovaj rad bio što kvalitetniji i uspješno završen u tako kratkom roku. Najviše od svega, zahvalna sam joj na izuzetnoj toplini, vedrini i ljudskosti koje unosi u sve međuljudske odnose i zbog kojih je bila mentor i šef za poželjeti!

Kolegi doc. dr. sc. Marinu Ježiću zahvaljujem što me podučio svim tehnikama rada bilo u laboratoriju, bilo na terenu, za svu nesebičnu pomoć i savjete u laboratorijskom radu, statističkoj obradi podataka i prilikom pisanja znanstvenih radova. Također, a nikako manje bitno, hvala mu za svu pozitivnu energiju, šale, sitna podbadanja i popijene kave zbog kojih mi je rad na doktoratu bio izuzetno pozitivno iskustvo.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na nesebičnoj pomoći, angažmanu i prenesenom znanju u radu s mjerenjem enzimske aktivnost; hvala joj na pozitivi, strpljenju i supatništvu kada stvari nisu funkcionirale i još većoj pozitivi kada je sve išlo po planu. Također, i ostalim zaposlenicama Laboratorija za fiziologiju bilja veliko hvala na gostoprimstvu, pomoći, savjetima i ponekoj „čašici razgovora“.

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Zlatku Liberu uz čiju pomoć i poduku sam provela epigenetička istraživanja iz ovog rada.

Dr. sc. Danielu Riglingu sa švicarskog WSL-a zahvaljujem na ustupljenim virusnim sojevima EP713 i SHE30.

Svima zaposlenima u laboratorijima na Marulićevom trgu 9a hvala na ugodnoj i kolegijalnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala Darinki na brizi za funkcioniranje laboratorija i na povremenom prijevozu do doma. Mojim cimericama, sadašnjim i bivšim, najveće hvala na prijateljstvu, savjetima, podijeljenim iskustvima i ugodnim razgovorima uz ručak. Ivana, Silvija, Jelena, Sandra, Valerija – hvala!

Svega ovoga ne bi bilo bez velikog truda i potpore mojih roditelja, na čemu sam im neizmjerno zahvalna.

I na kraju, najvažnijoj osobi u mom životu – Bojane, hvala ti na svemu!

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

BIOKEMIJSKE I EPIGENETIČKE PROMJENE U GLJIVE *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR ZARAŽENE VIRUSOM *Cryphonectria hypovirus 1*

LUCIJA NUSKERN

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sažetak

S ciljem određivanja učinka infekcije virusom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) na intenzitet promjena u metabolizmu gljive *Cryphonectria parasitica,* u tri virulentna izolata gljive uneseno je šest različitih sojeva virusa talijanskog (I), francuskog (F1) i rekombiniranog talijansko-francuskog (F1/I) podtipa. Infekcija virusom CHV1 dovela je do i) indukcije antioksidacijske obrane u zaraženoj gljivi, odnosno do povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima glutation S-transferaze, katalaze i superoksid dismutaze, ii) do porasta aktivnosti lakaza zaražene gljive, iii) do epigenetičkih promjena, odnosno do porasta metiliranosti CpG sekvenci genoma gljive. Postavljena je hipoteza da je povećana metilacija genoma gljive *C. parasitica* nakon infekcije virusom čimbenik virulentnosti virusa, a ne dio obrambenog mehanizma gljive. Svi istraživani parametri pokazali su da intenzitet promjena u metabolizmu gljive ovisi o virusnom soju, a ne podtipu virusa, te o genotipu gljive domaćina i kombinaciji genoma gljive i virusa, te je naglašena važnost korištenja više virusnih sojeva i izolata gljive u pokušajima biološke kontrole.

(120 stranica, 26 slika, 17 tablica, 210 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: biotički stres, antioksidacijski enzimi, lakaza, interakcije patogena i domaćina, MSAP epigenotipizacija, rak kore kestena, biološka kontrola

Mentor: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec
izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
doc. dr. sc. Ljiljana Krstin

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Doctoral thesis

BIOCHEMICAL AND EPIGENETIC CHANGES IN *Cryphonectria hypovirus 1*-INFECTED FUNGUS *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR

LUCIJA NUSKERN

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Abstract

Six different strains of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), of Italian (I), French (F1) and recombinant Italian-French (F1/I) subtype, were transferred into three virulent isolates of fungus *Cryphonectria parasitica* to determine the effect of virus infection on the fungal metabolism. CHV1 infection: i) induced antioxidative defence in infected fungus – increased activities of antioxidative enzymes glutathione S-transferase, catalase and superoxide dismutase, ii) increased activity of fungal laccases, iii) induced epigenetic changes in the genome of infected fungus – increased methylation levels at CpG sites. Methylation of *C. parasitica* genome upon CHV1 infection seems to be a virulence determinant of the virus rather than a part of defensive mechanism of the fungus. The severity of observed effects did not depend on virus subtype, but rather on a particular virus strain, fungal genotype, and the combination of the two, stressing the importance of using more virus strains and fungal isolates in the biocontrol efforts.

(120 pages, 26 figures, 17 tables, 210 references, original in Croatian)

Key words: biotic stress, antioxidative enzymes, laccase, host-pathogen interaction, MSAP epigenotyping, chestnut blight, biocontrol

Supervisor: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Reviewers: assoc. prof. dr. sc. Mirta Tkalec
assoc. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
asst. prof. dr. sc. Ljiljana Krstin

POPIS KEMIKALIJA I KRATICA

Naziv	Kemijska formula ili kratica	Proizvođač
Krumpirov dekstrozni agar (engl. potatoe dextrose agar)	PDA	Difco™, Becton, Dickinson and Company
Double-RNA Viral dsRNA extraction mini kit	-	iNtRON Biotechnology Inc.
Kloroform	-	Carlo Erba Reagents
Agaroza	-	Sigma
Tris/borat/EDTA pufer (AccuGENE 10×TBE Buffer)	TBE pufer	Lonza
Gel star nucleic acid gel stain boja	-	Lonza
GoScript™ Reverse Transcription System	-	Promega
Green GoTaq Flexi pufer	-	Promega
Magnezijev klorid	$MgCl_2$	Promega
Smjesa deoksinukleotida za umnažanje virusnih ORF-a	dNTP mix	Promega
GoTaq DNA polimeraza	-	Promega
Kalijev dihidrogenfosfat	KH_2PO_4	Lach-Ner
Kalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	Lach-Ner
Etilendiaminotetraoctena kiselina	EDTA	Kemika
Comassie Brilliant Blue G 250	CBB	Sigma-Aldrich
Fosfatna kiselina	H_3PO_4	Kemika
96%-tni etanol	EtOH	Kemika
Goveđi serumski albumin	BSA	Sigma-Aldrich
Vodikov peroksid	H_2O_2	Panreac Quimica S.A.U.
1-kloro-2,4-dinitrobenzen	CDNB	Sigma-Aldrich
Reducirani glutation	GSH	Sigma-Aldrich
Nitro blue tetrazolium klorid	NBT	Sigma-Aldrich
Ksantin	-	Sigma-Aldrich
Ksantin oksidaza	XOD	Sigma-Aldrich
Superoksid dismutaza (rekombinirana goveđa, eksprimirana u *Escherichia coli*)	SOD	Sigma-Aldrich
2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)	ABTS	Sigma-Aldrich
Natrijev acetat	-	Sigma-Aldrich
Octena kiselina	-	J. T. Baker Chemicals
Akrilamid	AA	Sigma-Aldrich
Bis-akrilamid	Bis	Sigma-Aldrich
Tris(hidroksimetil)aminometan	Tris	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina	HCl	Kemika
Amonijev persulfat	APS	Sigma-Aldrich
Tetrametiletilendiamin	TEMED	Sigma-Aldrich

Glicin	-	Kemika
Fenazin metosulfat	PMS	Sigma-Aldrich
Kalijev ferocijanid	$K_3[Fe(CN)_6]$	Kemika
Željezov klorid	$FeCl_3$	Kemika
Riboflavin	-	Sigma-Aldrich
Natrijev klorid	NaCl	Carlo Erba Reagents
Natrijev lauril-sulfat (natrijev dodecil-sulfat)	SDS	Sigma-Aldrich
Fenol	-	Kemika
Izoamilni alkohol	-	Kemika
Izopropanol (2-propanol)	-	T.T.T.
ColorBurst Electrophoresis Marker	-	Sigma-Aldrich
10 × T4 pufer	-	Thermo Scientific
Goveđi serumski albumin korišten u MSAP metodi	BSA	Thermo Scientific
Restrikcijska endonukleaza *Eco*RI	*Eco*RI	Thermo Scientific
Restrikcijska endonukleaza *Msp*I	*Msp*I	New England Biolabs
Restrikcijska endonukleaza *Hpa*II	*Hpa*II	New England Biolabs
10 × PCR pufer	-	Takara
T4 ligaza	-	Thermo Scientific
Smjesa deoksinukleotida za MSAP metodu	dNTP mix	Takara
HotStart Taq polimeraza	-	Takara

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 4
2. 1. *Cryphonectria parasitica,* UZROČNIK RAKA KORE KESTENA 4
2. 2. MIKOVIRUSI I *Cryphonectria hypovirus 1* 5
2. 2. 1. Mikovirusi – rasprostranjenost, sistematika, biologija 5
2. 2. 2. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) 9
2. 2. 3. Ostali mikovirusi koji inficiraju gljivu *C. parasitica* 12
2. 2. 4. Biološka kontrola raka kore kestena 13
2. 3. UTJECAJ VIRUSA CHV1 NA FIZIOLOŠKE PROMJENE U GLJIVE *C. parasitica* 15
2. 4. BIOTIČKI STRES, OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI 20
2. 4. 1. Biotički stres 20
2. 4. 2. Oksidacijski stres 20
2. 4. 3. Antioksidacijski mehanizmi 22
2. 4. 4. Antioksidacijski enzimi u gljiva 24
2. 5. EPIGENOM I METILACIJSKE PROMJENE 26
2. 5. 1. Istraživanje metilacije genoma metodom polimorfizma duljine DNA odsječaka osjetljivog na metilaciju (MSAP) 29
3. MATERIJALI I METODE 32
3. 1. Izolati gljive *C. parasitica* i sojevi virusa CHV1 korišteni u istraživanju 32
3. 2. Laboratorijski uzgoj kultura gljive *C. parasitica* 34
3. 3. Unos virusa CHV1 u micelij gljive *C. parasitica* 34
3. 4. Dokazivanje prisutnost virusa CHV1 u tkivu gljive *C. parasitica* 35
3. 4. 1. Izolacija virusne dsRNA 35
3. 4. 2. Elektroforeza virusne dsRNA u agaroznom gelu 36
3. 4. 3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR) 36
3. 5. Trajno pohranjivanje uzoraka gljive 39
3. 6. Određivanje biokemijskih parametara gljive *C. parasitica* 39
3. 6. 1. Uzgoj eksperimentalnih kultura gljive *C. parasitica* za određivanje biokemijskih parametara i mjerenje prirasta gljive *in vitro* 39
3. 6. 2. Ekstrakcija ukupnih proteina iz tkiva gljive *C. parasitica* 40
3. 6. 3. Mjerenje koncentracije ukupnih proteina 40

3. 6. 4. Mjerenje aktivnosti stresnih enzima 41
3. 6. 5. Mjerenje ukupne aktivnosti lakaze 44
3. 6. 6. Statistička obrada podataka o aktivnosti enzima 44
3. 6. 7. Razdvajanje i detekcija proteina nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu 45
3. 7. Analiza metilacije genoma gljive *C. parasitica* metodom MSAP 49
3. 7. 1. Uzgoj eksperimentalnih kultura gljive *C. parasitica* za MSAP 49
3. 7. 2. Izolacija genomske DNA iz tkiva gljive 49
3. 7. 3. Provedba metode MSAP 51
3. 7. 4. Analiza epigenetičkih podataka dobivenih metodom MSAP 55
4. REZULTATI 57
4. 1. Uspješnost prijenosa virusa i morfologija hipovirulentnih kultura gljive *C. parasitica* 57
4. 2. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na prirast kultura gljive *C. parasitica in vitro* 59
4. 3. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost stresnih enzima gljive *C. parasitica* 61
4. 3. 1. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost glutation S-transferaze (GST) 61
4. 3. 2. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost katalaze (CAT) 64
4. 3. 3. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) 68
4. 3. 4. Korelacije između mjernih parametara: prirasta gljive, te aktivnosti CAT, GST i SOD 71
4. 4. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost lakaza gljive *C. parasitica* 72
4. 5. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na metilacijske promjene u genomu gljive *C. parasitica* 75
5. RASPRAVA 82
6. ZAKLJUČCI 92
7. LITERATURA 93
8. PRILOZI 113
9. ŽIVOTOPIS 117

1. UVOD

Virusi gljiva, mikovirusi, mogu promijeniti fiziologiju gljive domaćina te modulirati interakcije između gljive i biljke koja joj je domaćin. Iako mikovirus može pozitivno utjecati na simbiotske partnere (primjerice gljivu i biljku) (Márquez i sur. 2007), ipak većina do danas poznatih mikovirusa ili ne uzrokuju vidljive fenotipske promjene u gljive, ili imaju štetan utjecaj na gljivu (Nuss i Koltin 1990; Pearson i sur. 2009; Xie i Jiang 2014). Među potonjima, najbolje je proučen mikovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) i njegova gljiva domaćin, *Cryphonectria parasitica* (Milgroom i Cortesi 2004).

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr je fitopatogena gljiva iz porodice gljiva mješinarki koja uzrokuje agresivnu bolest rak kore kestena. Početkom 20. stoljeća je unesena iz Azije u Sjevernu Ameriku i Europu gdje se brzo proširila kroz populacije američkoga [*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.] i europskoga pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.) uz velike štetne posljedice (Anagnostakis 1987). Europske populacije kestena su se ubrzo počele oporavljati zbog uspostavljanja prirodne biološke kontrole gljive virusom CHV1 (Robin i Heiniger 2001). Allemann i sur. (1999) su na temelju genetičke sličnosti virusnih izolata u Europi definirali četiri podtipa virusa. Najrasprostranjeniji, i jedini prisutan u hrvatskim populacijama (Krstin i sur. 2008), je talijanski podtip CHV1-I, dok su francuski CHV1-F1 i CHV1-F2, te njemačko-španjolski CHV1-D/E puno manje zastupljeni (Gobbin i sur. 2003). Virusi francuskog podtipa jače utječu na virulentnost i fenotipska obilježja hipovirulentne gljive nego oni talijanskog podtipa (Chen i Nuss 1999), ali i između virusnih sojeva istog podtipa postoje značajne razlike u virulentnosti (Peever i sur. 2000; Krstin i sur. 2017). Razlozi za pojavu tih različitih učinaka još uvijek nisu utvrđeni.

Infekcija virusom CHV1 mijenja ekspresiju gena, te akumulaciju genskih transkripata i proteina u gljivi *C. parasitica* (Chen i sur. 1996; Allen i sur. 2003; Kim i sur. 2012). Među genima osjetljivim na infekciju su i geni za proteine uključene u odgovor na stres, kao što su proteini toplotnog šoka i glutation S-transferaza (Allen i sur. 2003). Prethodna istraživanja u kojima se spominju stresni proteini pokazala su da postoje određena neslaganja u rezultatima dobivenim analizom akumulacije mRNA (Allen i sur. 2003), analizom proteoma (Kim i sur. 2012) i analizom sekretoma (Wang i sur. 2016), ali aktivnost stresnih enzima, o kojoj u konačnici ovisi njihova funkcionalnost, do sada nije istražena. Jedna od hipoteza ovog istraživanja je da infekcija virusom CHV1 dovodi do promjena u aktivnosti stresnih enzima u

gljive *C. parasitica*, te da su te promjene razlog zašto neki virusni sojevi jače a neki slabije smanjuju virulentnost gljive.

Jedan od enzima gljive *C. parasitica* za koje je, uz diferencijalnu ekspersiju, pokazana i smanjena aktivnost uslijed infekcije virusom CHV1 je lakaza, polifenol oksidaza za koju se pretpostavlja da ima važnu ulogu u patogenezi raka kore kestena zbog sposobnosti razgradnje lignina (Rigling i sur. 1989; Choi i sur. 1992). Sva dosadašnja istraživanja o utjecaju virusa CHV1 na aktivnost lakaza u gljivi, uz iznimku onoga Riglinga i suradnika (1989), provedena su na modelnom sustavu sa samo jednim sojem virusa i jednim izolatom gljive. S obzirom na pretpostavljenu ulogu lakaza u patogenezi raka kore kestena, potrebno je utvrditi kako različiti virusni sojevi prisutni u lokalnim populacijama gljive utječu na njihovu aktivnost.

Druga hipoteza ovog istraživanja je da virus utječe na epigenom gljive, te na taj način modulira ekspresiju gena koja dovodi do pojave hipovirulentnog fenotipa. Metilacija citozina u DNA molekuli je jedna od najvažnijih epigenetičkih promjena koja modulira i kontrolira ekspresiju gena u svim skupinama organizama, pa tako i u gljiva (Reyna-López i sur. 1997). Obzirom na važnost metilacije DNA u diferencijalnoj ekspresiji gena, potrebno je utvrditi dolazi li prilikom infekcije virusom CHV1 do promjene u ukupnoj metiliranosti genoma gljive *C. parasitica*, te je li intenzitet tih promjena ovisan o soju virusa.

Ovo istraživanje sam provela kako bih pokušala odgovoriti na pitanje zašto neki virusni sojevi imaju jači a neki slabiji utjecaj na smanjenje virulentnosti gljive. Odgovor na to pitanje je posebno važan s aspekta biološke kontrole, jer njezina dugoročna održivost, između ostalog, ovisi i o intenzitetu utjecaja virusa na gljivu. Zbog potencijalne primjene u biološkoj kontroli na lokalnoj razini, u istraživanju sam dodatnu pažnju posvetila hrvatskim populacijama gljive i virusa.

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Istražiti učinak različitih podtipova i sojeva virusa CHV1 na različite izolate gljive *C. parasitica* na razini aktivnosti stresnih enzima glutation S-transferaze, katalaze i superoksid dismutaze spektrofotometrijskim metodama i nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu.

2. Istražiti povezanost između virulentnosti raznih virusnih sojeva i njihovog učinka na aktivnost lakaza u gljive.

3. Utvrditi dovodi li infekcija virusom CHV1 do epigenetičkih promjena u genomu gljive *C. parasitica* na razini ukupne metilacije citozina u DNA molekuli (metodom polimorfizma duljine DNA odsječaka osjetljivog na metilaciju), te postoji li razlika u takvom učinku između različitih virusnih sojeva.

4. Odabrati sojeve virusa koji bi bili optimalni kandidati za primjenu u proizvodnji paste za aktivnu biološku kontrolu raka kestenove kore u Hrvatskoj.

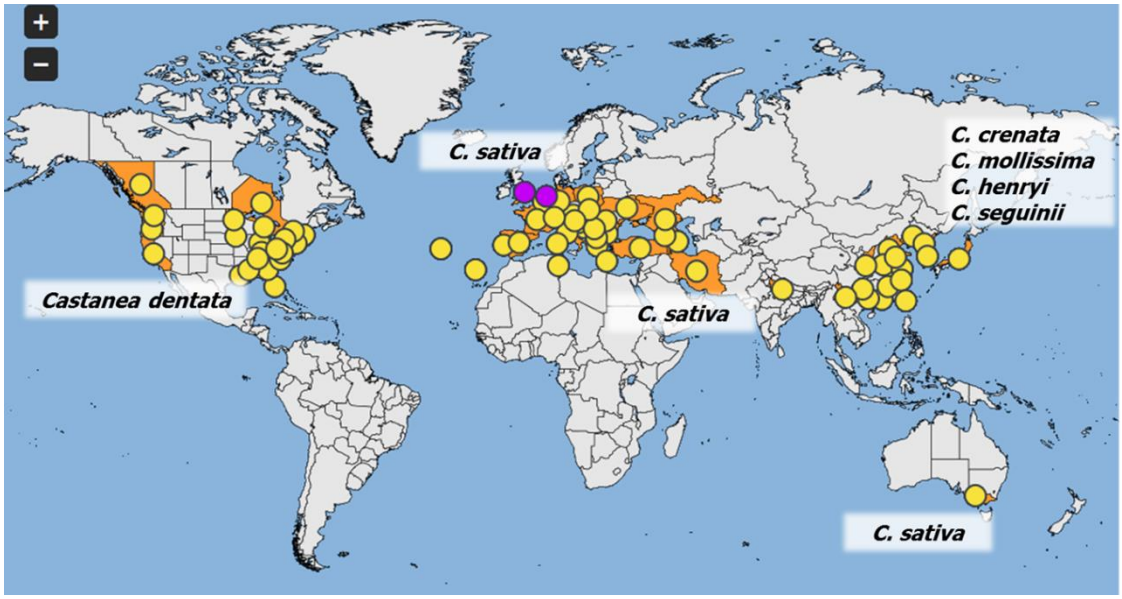
2. LITERATURNI PREGLED

2. 1. *Cryphonectria parasitica,* UZROČNIK RAKA KORE KESTENA

C. parasitica (Murrill) M. E. Barr je fitopatogena gljiva mješinarka (odjeljak Ascomycota) koja parazitira prvenstveno na vrstama roda *Castanea,* ali može inficirati i vrste roda *Quercus* (Heiniger i Rigling 1994; Tziros i sur. 2015; Adamčíková i sur. 2016). Prirodni areal ove gljive je istočna Azija (Shear i Stevens 1913), gdje su lokalne vrste kestena – *Castanea crenata* Siebold i Zucc., *C. mollissima* Blume, *C. henryi* (Skan) Rehder i E.H.Wilson i *C. seguinii* Dode (Slika 1) tolerantne na infekciju zahvaljujući dugotrajnoj koevoluciji s ovim patogenom (Graves 1950). Početkom 20. stoljeća *C. parasitica* je unesena iz Azije, najvjerojatnije iz Kine i Japana, u Sjevernu Ameriku i Europu gdje se brzo proširila kroz populacije američkoga [*C. dentata* (Marshall) Borkh.] i europskoga pitomoga kestena (*C. sativa* Mill.) i kao strana invazivna vrsta uzrokovala agresivnu bolest rak kore kestena (Anagnostakis 1987). *C. parasitica* inficira stablo kroz rane na kori, micelij se agresivno širi kroz drvo, postupno razara kambij i provodni sustav stabla te uzrokuje odumiranje stabla iznad mjesta infekcije. Na mladim stablima na mjestu infekcije se stvara plitko uleknuće crveno-narančaste boje s uzdužnim pukotinama, kora se ljušti te dolazi do nastanka otvorenih rak rana i do sušenja listova koji tijekom zime ne otpadaju. Na odraslim stablima se, uz sušenje pojedinih grana, uočavaju raspukline na kori ispod koje je vidljiv i žutonarančasti micelij gljive. Ispod mjesta infekcije dolazi do intenzivnog razvijanja mladih advantivnih izdanaka (Anagnostakis 1987; Heiniger i Rigling 1994).

Prije unosa ovog patogena u SAD, *C. dentata* je bila dominantna drvenasta vrsta u području svoje rasprostranjenosti na istoku države, na području gorja Apalači (Anagnostakis i Hillman 1992). Međutim, u samo nekoliko desetljeća od prvog opisa raka kore kestena na području New Yorka 1904. godine (Merkel 1905), američki kesten je gotovo u potpunosti uništen (Anagnostakis 1978). U Europi je bolest prvi puta zabilježena 1938. godine u Italiji te se također vrlo agresivno širila u svim populacijama europskoga pitomoga kestena (Biraghi 1946). U Hrvatskoj je bolest prvi puta zabilježena 1955. godine na području Lovrana (Kišpatić 1956). Međutim, već 1950. godine na području Italije je primijećen prirodni oporavak stabala kestena (Biraghi 1953), iz kojih su 1965. izolirani hipovirulentni izolati gljive *C. parasitica* (Grente 1965). Day i sur. (1977) su pokazali da je za hipovirulentnost tih izolata zaslužna dvolančana RNA molekula (dsRNA, od engl. double stranded RNA), kasnije

imenovana *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) i svrstana u novu virusnu porodicu *Hypoviridae* (Hillman i sur. 1995).



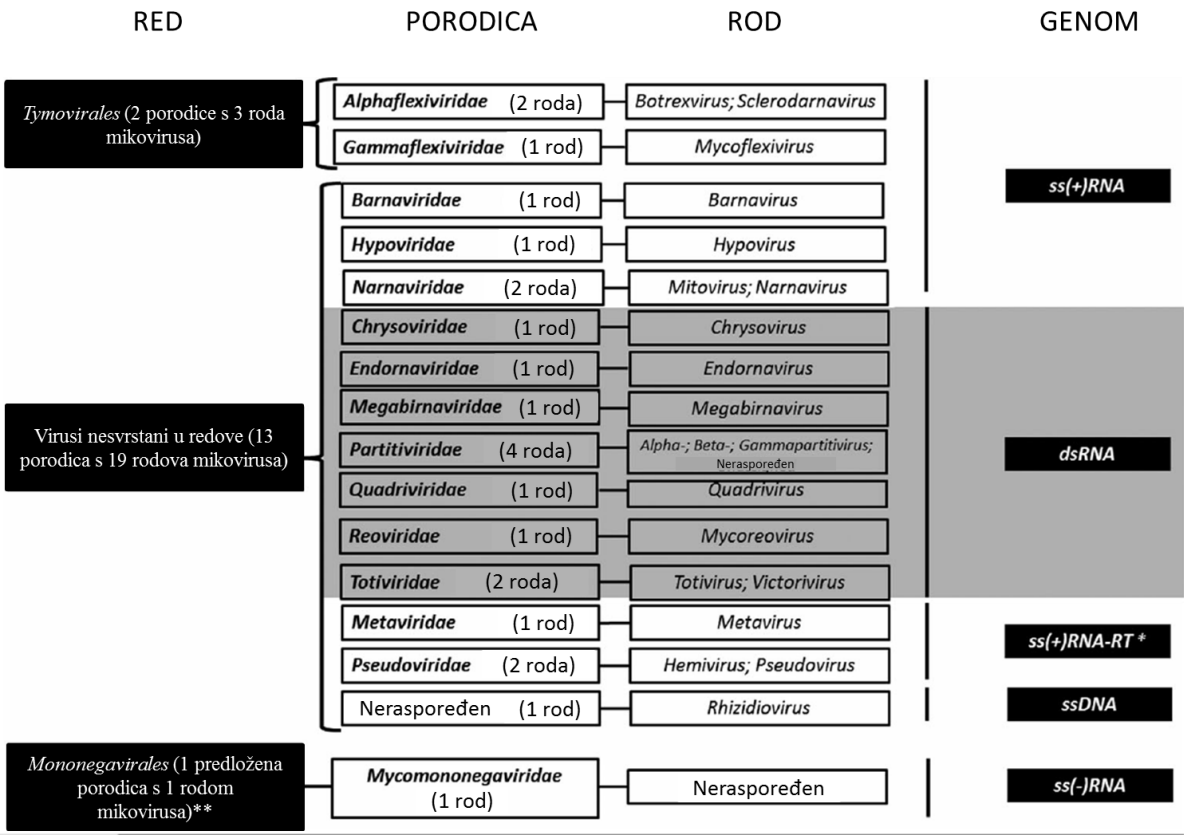
Slika 1. Rasprostranjenost gljive *Cryphonectria parasitica* i domaćinskih vrsta roda *Castanea*. Žuti krugovi označavaju zemlje u kojima je gljiva trajno prisutna, a ljubičasti zemlje u kojima je kratkotrajno prisutna i/ili pred iskorjenjivanjem. Preuzeto sa stranica Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO): https://gd.eppo.int/taxon/ENDOPA/distribution.

2. 2. MIKOVIRUSI I *Cryphonectria hypovirus 1*

2. 2. 1. Mikovirusi – rasprostranjenost, sistematika, biologija

Virusi gljiva, mikovirusi, su izrazito slabo istražena skupina virusa u usporedbi s virusima biljaka i životinja, iako ih se nalazi u vrstama iz svih skupina kraljevstva Fungi (Pearson i sur. 2009). Otkriveni su relativno kasno, tek 1962. godine kada je opisana prva virusna bolest gljiva – La France bolest šampinjona (Hollings 1962; Wach i sur. 1987). Prema podacima Međunarodnog komiteta za klasifikaciju virusa (ICTV), do danas je sekvencirano nešto više od 250 mikovirusa koji su raspoređeni u 22 roda svrstana u 15 porodica, ali mnogi (oko 20 %)

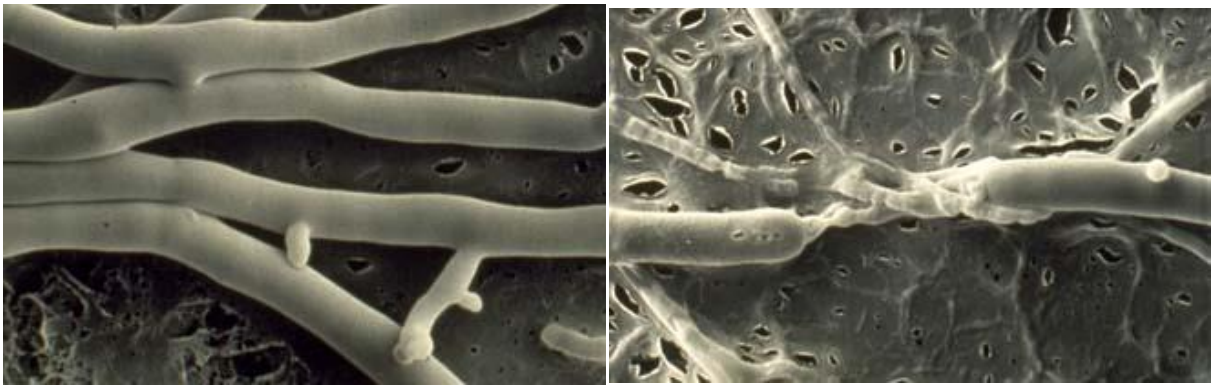
još uvijek nisu taksonomski razvrstani (Slika 2) (Muñoz-Adalia i sur. 2016a). S obzirom na ekonomski značaj koji imaju fitopatogene gljive, nije iznenađujuće da je najviše dosad opisanih mikovirusa izolirano upravo iz te skupine gljiva.



Slika 2. Klasifikacija i genomska organizacija mikovirusa prema podacima ICTV-a. Najzastupljeniji su mikovirusi s dsRNA genomom, označeni sivom bojom. Prilagođeno prema Muñoz-Adalia i sur. (2016a).

Među danas poznatim mikovirusima najviše je onih kojima genom čini dsRNA molekula, međutim ima ih i s jednolančanim RNA genomom (ssRNA, od engl. single stranded RNA) i nekoliko s jednolančanim kružnim DNA genomom (ssDNA, od engl. single stranded DNA) (Slika 2). Ovakva raspodjela ne znači nužno da u prirodi prevladavaju dsRNA mikovirusi, već je vjerojatno odraz metodoloških nedostataka prilikom njihovog istraživanja. Naime, većina istraživanja koja su se bavila pretraživanjem mikovirusa u izolatima gljiva temeljila se na metodama izolacije dsRNA, te su takvi virusi i pronalaženi dok je prisutnost DNA virusa lako mogla proći neopaženo (Pearson i sur. 2009; Son i sur. 2015).

Mikovirusi se uglavnom umnažaju u citoplazmi, iako se neki (npr. *Mitovirus* sp.) umnažaju i u mitohondrijima domaćina. Sve do nedavno se smatralo da se mikovirusi mogu prenositi jedino unutarstaničnim putem, bilo horizontalno ili vertikalno, međutim (Yu i sur. 2013) su dokazali postojanje mikovirusa koji se prenosi i klasičnim, izvanstaničnim putem. Kod horizontalnog prijenosa mikovirus prelazi između dvije jedinke gljive anastomozom hifa (Caten 1972). Ovaj način prijenosa je ograničen sustavom samoprepoznavanja kod gljiva, takozvanom vegetativnom (vc) ili heterokarionskom (het) kompatibilnošću. Vegetativnu kompatibilnost u većine nitastih gljiva čini sustav međusobno nevezanih genskih lokusa (*vic* lokusi), čiji sastav alela definira jesu li jedinke gljive međusobno kompatibilne ili ne (Saupe 2000). Ukoliko je sastav alela na svim *vic* lokusima isti dvije jedinke su kompatibilne i njihove hife se nakon kontakta stapaju tvoreći heterokarionski micelij, te omogućuju nesmetan prijelaz virusa citoplazmatskim putem (Slika 3). U slučaju razlike na jednom ili više *vic* lokusa jedinke gljive nisu kompatibilne, anastomoza takvih hifa nije stabilna jer dolazi do aktivacije reakcija programirane stanične smrti (Jakobson i sur. 1998) i anastomoza propada (Slika 3). Na ovaj način je širenje virusa između nekompatibilnih jedinki ograničeno (Leslie i Zeller 1996), ali ne i u potpunosti onemogućeno jer se anastomoza ipak formira i omogućuje miješanje citoplazmatskog sadržaja, te je uspješnost prijelaza virusa ovisna o brzini reakcije programirane stanične smrti (Cortesi i sur. 2001). Jedna od teorija o evoluciji i biološkom značenju vegetativne kompatibilnosti u gljiva pretpostavlja da je taj mehanizam nastao kao obrana od štetnih citoplazmatskih elemenata – virusa, plazmida, organela i sl. (Caten 1972).



Slika 3. Hife gljive *C. parasitica* snimljene elektronskim mikroskopom. Pri kontaktu hifa dvaju jedinki istog tipa vegetativne kompatibilnosti (vc) dolazi do njihovog stapanja (anastomoze) (lijevo), dok između jedinki različitih vc tipova dolazi do programirane stanične smrti i propadanja anastomoze (desno). Fotografije snimio C. Scheidegger, WSL, Švicarska.

Vertikalni prijenos mikovirusa uključuje prijenos konidiosporama (nespolne spore) i askosporama (spolne spore). Uspješnost ovog oblika prijenosa uvelike ovisi o tipu spora i o vrsti gljive. Tako je primjerice u samo 3 % konidiospora vrste *Heterobasidion annosum* bila prisutna virusna dsRNA (Ihrmark i sur. 2002), u usporedbi sa 100 % konidiospora vrste *C. prasitica* inficiranih virusom CHV1 (Ding i sur. 2007). Iako danas prevladava mišljenje da je učestalost prisutnosti mikovirusa u spolnim sporama manja i da se većina vertikalnog prijenosa mikovirusa odvija putem nespolnih spora, neka istraživanja pokazuju da nije nužno uvijek tako. Tako su Chun i Lee (2009) pokazali da se virusna dsRNA prenosi u samo 8 – 13 % askospora u vrste *Magnaporthe grisea,* dok se u vrste *H. annosum* taj postotak kreće između 10 i 84 % (Ihrmark i sur. 2004), u vrste *Botrytis cinerea* između 35 i 53 % (Tan i sur. 2007), a u vrste *Fusarium graminearum* doseže i 100 % (Chu u sur. 2004). Izvanstanični put prijenosa mikovirusa infektivnim virusnim česticama do danas je opisan samo za virusnu vrstu *Sclerotinia sclerotiorum* hypovirulence-associated DNA virus 1 (SsHADV-1), koja inficira fitopatogenu gljivu *Sclerotinia sclerotiorum* (Yu i sur. 2013). Ipak, unutarstanični put prijenosa mikovirusa prevladava, a takav način širenja omogućio je i pojavu specifičnih virusnih oblika bez proteinske kapside, s golom nukleinskom kiselinom koja se nalazi slobodna u citoplazmi domaćina i ne treba joj zaštita proteinskog omotača jer niti u jednoj fazi nije izložena uvjetima izvan stanice.

Učinci mikovirusa na gljivu domaćina mogu biti raznoliki. Najčešći oblik su kriptične (asimptomatske) infekcije koje su evolucijski pogodne i za gljivu i za mikovirus (Pearson i sur. 2009; Xie i Jiang 2014). Naime, kako većina mikovirusa nema izvanstaničnu infektivnu fazu, za njihovo rasprostiranje je nužno postojanje živih gljiva visokog ekološkog fitnesa kako bi se virus mogao dalje širiti u populaciji domaćina (Pearson i sur. 2009; Robin i sur. 2010). Uz kriptične infekcije postoje i infekcije kod kojih mikovirusi imaju pozitivne učinke na svoje domaćine. Primjerice, kvasci-ubojice uslijed infekcije mikovirusom počnu lučiti toksin koji ubija druge jedinke iste vrste koje nisu inficirane. Na taj način kvasci-ubojice postaju kompetitivniji, posebno u ograničavajućim ekološkim uvjetima (Wickner i sur. 2013). Nadalje, neke mikovirusne infekcije dovode do povećane virulentnosti fitopatogenih gljiva (hipervirulentnost), čime mikovirus povećava ekološki fitnes gljive domaćina, a samim time i svoj vlastiti (Cai i Hillman 2013). Također, infekcija mikovirusom može proširiti ekološku nišu njegovom domaćinu, pa čak i simbiotskom partneru gljive domaćina. Drastičan primjer za takav utjecaj mikovirusa u interakcijama gljiva i biljaka je trostruka simbioza tropske trave iz geotermalnih izvora *Dichanthelium lanuginosum,* njezine endofitske gljive *Curvularia*

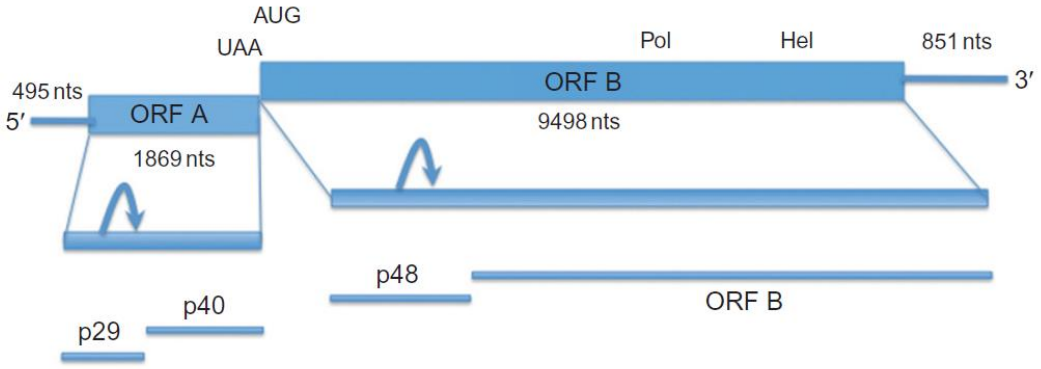
protuberata i mikovirusa *Curvularia* thermal tolerance virus (CThTV), gdje prisutnost mikovirusa dovodi do termotolerancije u trave *D. lanuginosum* (Márquez i sur. 2007). Hyder i sur. (2013) su na primjeru dvaju virusa nađenih u gljivi *Heterobasidion* sp. pokazali da isti mikovirus može imati i korisne i štetne učinke za domaćina, ovisno o ekološkim uvjetima. Ipak, sa stajališta agroekonomije i šumarstva najzanimljiviji su mikovirusi koji imaju negativan utjecaj na gljivu domaćina, bilo da se radi o smanjenom urodu ekonomski isplativih gljiva ili o smanjivanju virulentnosti (hipovirulentnost) fitopatogenih gljiva, štetnika na poljoprivrednim kulturama i šumskim drvenastim vrstama.

Hipovirulentnost neke fitopatogene gljive inficirane mikovirusom prvi puta je opisana u patosustavu CHV1-*C. parasitica*-kesten, te je taj sustav do danas najbolje istražen i ujedno modelni sustav za istraživanja interakcija između mikovirusa i gljive domaćina (Eusebio-Cope i sur. 2015). Uspješna primjena virusa CHV1 u biološkoj kontroli raka kore kestena potakla je daljnja istraživanja drugih fitopatogenih gljiva u potrazi za mikovirusima sličnih svojstava, koji bi se također mogli koristiti u biološkoj kontroli. Neki od mikovirusa s potencijalom za biološku kontrolu su: *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 (RnMBV1), mitovirusi pronađeni u gljivi *Ophiostoma novo-ulmi* (Nuss 2005), *Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus* (SsDRV), SsHADV-1 (Jiang i sur. 2013) i *Sclerotinia sclerotiorum* hypovirus 2 (Marzano i sur. 2015), *Botrytis cinerea* mitovirus 1 (BcMV1) (Pearson i Bailey 2013), *Fusarium graminearum* virus 1 (FgV1) (Cho i sur. 2013), *Diaporthe* RNA virus (Nuss 2005), *Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S) i *Helminthosporium victoriae* virus 145S (HvV145S) (Ghabrial i sur. 2013), te dsRNA virusi izolirani iz gljiva *Rhizoctonia solani* (Xie i Jiang 2014) i *Sclerotium rolfsii* (Zhong i sur. 2016).

2. 2. 2. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)

Nakon što su Day i sur. (1977) povezali hipovirulentnost izolata gljive *C. parasitica* s prisutnošću dsRNA molekule u miceliju gljive, Dodds (1980) je pokazao da se ne radi o klasičnom obliku virusa, već o goloj RNA molekuli koja je u citoplazmi smještena u membranskim vezikulama. Veličina genoma virusa CHV1 je 12,7 kbp s poli-A repom na 3' kraju, sastoji se od dva otvorena okvira čitanja (ORF, od engl. open reading frame), ORF A i ORF B, koji se preklapaju u pentanukleotidnoj sekvenci UAAUG gdje je UAA stop kodon

ORF-a A, a AUG start kodon ORF-a B (Shapira i sur. 1991). Svaki otvoreni okvir čitanja kodira za jedan poliprotein – ORF A za poliprotein p69 koji se autokatalitički cijepa na proteine p29 i p40, a ORF B za veći poliprotein od kojeg se autokatalitički cijepa protein p48 dok ostatak produkata na C-terminalnom kraju još nije poznat, osim što je identificirano da sadrži domenu za RNA-ovisnu RNA polimerazu (RdRP) i helikazu (Slika 4).



Slika 4. Organizacija genoma prototipnog soja EP713 mikovirusa *Cryphonectria hypovirus 1*. Preuzeto iz Nuss (2011).

Infekcija gljive *C. parasitica* virusom CHV1 je perzistentna, ali virus ne ubija gljivu nego joj usporava rast i smanjuje sposobnost nespolne sporulacije i spolnog razmnožavanja (Van Alfen i sur. 1975; Grente i Berthelay-Sauret 1978; Elliston 1985; Peever i sur. 2000; Hillman i Suzuki 2004; Bryner i Rigling 2012). U kulturi virulentni micelij gljive ima izraženu žuto-narančastu pigmentaciju i tvori mnogo piknidija iz kojih se oslobađaju nespolne spore, dok je hipovirulentni micelij manje pigmentiran, često bijel, i proizvodi znatno manje piknidija koje su i puno manje nego u virulentnog micelija (Elliston 1985). U nekim slučajevima hipovirulentni izolati u kulturi rastu brže od virulentnih, a u nekim slučajevima znatno sporije (Elliston 1985; Chen i Nuss 1999; Krstin 2009; Nuskern i sur. 2017). Allemann i sur. (1999) su na temelju genetičke sličnosti virusnih izolata definirali četiri podtipa virusa CHV1 u Europi. Najrasprostranjeniji je talijanski podtip CHV1-I, dok su francuski CHV1-F1 i CHV1-F2, te njemačko-španjolski CHV1-D/E puno manje zastupljeni (Gobbin i sur. 2003). U hrvatskim populacijama virusa CHV1 zastupljen je samo talijanski podtip (Krstin i sur. 2008). Razlog za širu rasprostranjenost virusnog podtipa I je njegov bolji ekološki fitnes. Naime, pokazalo se da virusni sojevi francuskog F1 i F2 podtipa jače utječu na virulentnost i fenotipska obilježja hipovirulentne gljive nego oni talijanskog podtipa, čime više oslabljuju gljivu (Chen i Nuss 1999; Robin i sur. 2010; Bryner i Rigling 2011). Manja virulentnost

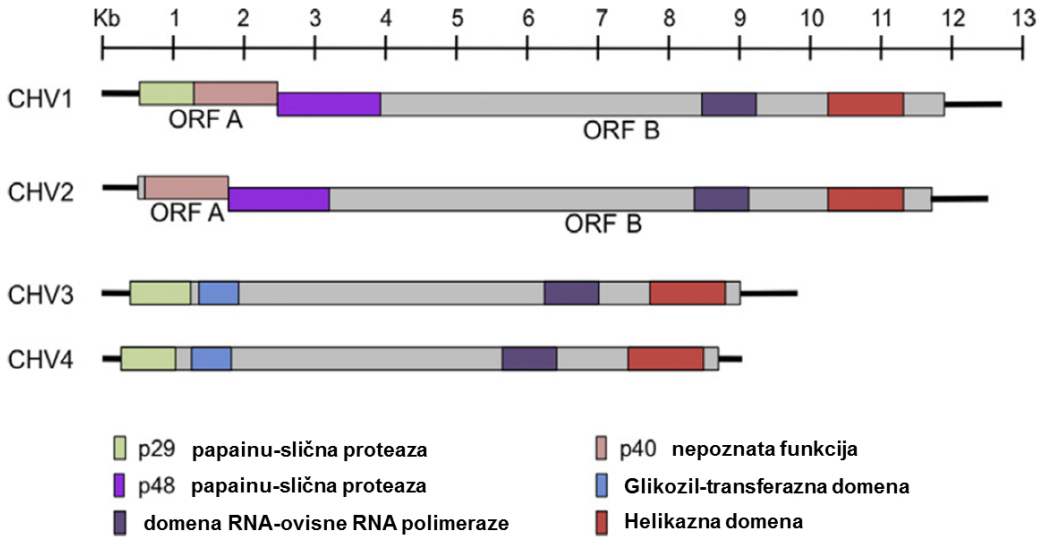
sojeva talijanskog podtipa, sa slabijim utjecajem na sporulaciju i rast gljive ipak omogućuje gljivi rasprostiranje u prirodi, čime se povećava i stopa širenja virusa (Robin i sur. 2010). Uz razliku u utjecaju između podtipova virusa Peever i sur. (2000), Sotirovski i sur. (2011) i Krstin i sur. (2017) su pokazali da i između virusnih sojeva istog podtipa postoje značajne razlike u virulentnosti, gdje pojedini virusni sojevi talijanskog podtipa imaju jednako jak ili čak i jači utjecaj na virulentnost nego sojevi francuskog F1 podtipa. Razlozi za pojavu tih različitih učinaka još uvijek nisu utvrđeni.

U prirodi CHV1 inficira samo gljivu *C. parasitica*. Međutim Chen i sur. (1994) su elektroporacijom unijeli sintetske dsRNA virusa CHV1 u sferoplaste srodnih vrsta gljiva – patogene na eukaliptusu *C. cubensis* (danas *Chrysoporthe cubensis*) i *C. havanensis* (danas *Microthia havanensis*), nepatogenu saprotrofnu gljivu *C. radicalis* i vrstu *Endothia gyrosa* (danas *Melogramma gyrosum*), patogenu gljivu na hrastu. Van Heerden i sur. (2001) su pokazali da se virus CHV1, inicijalno unesen u jedan izolat gljive *C. cubensis* elektroporacijom, uspješno dalje širio između izolata gljive anastomozom hifa. Sve četiri vrste su podržavale replikaciju virusne dsRNA nakon unosa, imale promijenjenu morfologiju i smanjenu virulentnost, što bi moglo proširiti metode upotrebe ove virusne vrste u biološkoj kontroli i drugih biljnih mikoza osim raka kore kestena.

Soj EP713 (NCBI broj: M57938) francuskog podtipa F1 prvi je sekvencirani soj virusa CHV1 (Shapira i sur. 1991), te je postao prototipni soj i soj koji se najviše koristi u istraživanjima. Nomenklatura soja EP713 kroz literaturu je dosta zamršena jer originalni terenski izolat gljive *C. parasitica* tog naziva nikada nije postojao. Radi se o soju virusa koji se nalazio u hipovirulentnom terenskom izolatu gljive *C. parasitica* B2025 skupljenom u Francuskoj 1971. godine (Grente 1971). Supkultura tog izolata je u laboratoriju S. Anagnostakis dobila oznaku EP113, te je anastomozom hifa virusni soj prisutan u njoj prenesen u virulentni izolat gljive *C. parasitica* EP155 (Anagnostakis 1981b). Izolat EP155 je izoliran iz raka na području Bathanya, Connecticut, SAD i pripada vc tipu EU-5. Laboratorijska kultura gljive EP155 s unesenim virusnim sojem iz gljive EP113 dobila je oznaku 155[113], odnosno kasnije CAES (College of Agricultural and Environmental Sciences) broj 713, tj. EP713 (Anagnostakis 1990), te se i virusni soj počeo nazivati također EP713. Uz virusni soj EP713, sekvencirani su još i sojevi Euro7 (NCBI broj: AF082191) i EP721 (NCBI broj: DQ861913) talijanskog podtipa I, te soj CN280(09280) (NCBI broj: KT726153) izoliran na sjeveru Kine. Na temelju fenotipskih promjena u zaraženoj gljivi, Chen i Nuss (1999) su utvrdili da soj EP713 virusa CHV1 ima „jaki“ učinak na gljivu, dok je učinak soja Euro7 opisan kao „blag“.

2. 2. 3. Ostali mikovirusi koji inficiraju gljivu *C. parasitica*

Porodica *Hypoviridae* sadrži samo jedan rod, *Hypovirus*, u kojem se uz vrstu CHV1 nalaze još tri vrste *Cryphonectria* hipovirusa – CHV2, CHV3 i CHV4 (Hillman i Suzuki 2004; Dawe i Nuss 2013) (Slika 5). Naravno, vrste roda *Hypovirus* nisu pronađene isključivo u gljivi *C. parasitica* već i u drugim vrstama gljiva – *Diaporthe longicolla, F. graminearum* i *Valsa ceratosperma* – te nisu uvijek povezane s pojavom hipovirulentnosti (Marzano i sur. 2015). Organizacija i veličina genoma vrste CHV2 (12,5 kbp) je slična vrsti CHV1, s time da protein kojeg kodira ORF A nema autokatalitičku domenu sličnu proteinu p29 već je prisutan u obliku jedinstvenog proteina veličine 50 kDa. Prototipni soj virusa CHV2 čiji genom je sekvenciran je NB58 (Hillman i sur. 1994). Vrste CHV3 (prototipni sekvencirani soj GH2, Smart i sur. 1999) i CHV4 (prototipni sekvencirani soj SR2, Linder-Basso i sur. 2005) imaju puno manji genom nego CHV1 i CHV2, konkretno CHV3 9,8 kbp, a CHV4 9,1 kbp, te sadrže samo jedan otvoreni okvir čitanja. Uz autokatalitičku proteaznu domenu sličnu proteinu p29 i domenu za RdRP, sadrže i domenu za UDP-glukoza/sterol glukoziltransferazu (UGT) koja nije pronađena u genomima vrsta CHV1 i CHV2. Vrste CHV2, CHV3 i CHV4 su prvi puta izolirane iz izolata gljive *C. parasitica* na području SAD-a, s time da je CHV2 pronađen i u domovini vrste *C. parasitica*, Aziji (Hillman i Suzuki 2004). Ipak, u Aziji i Europi prevladava vrsta CHV1, dok je u Sjevernoj Americi najzastupljenija vrsta CHV4 (Linder-Basso i sur. 2005). U SAD-u se CHV1 pronalazi izuzetno rijetko, iako su europski sojevi CHV1 u nekoliko navrata uneseni u SAD u pokušajima biološke kontrole (Dawe i Nuss 2013). Za vrste CHV2 i CHV3 na području SAD-a se pokazalo da uzrokuju hipovirulentnost gljive, međutim najrasprostranjenija vrsta, CHV4, uzrokuje samo kriptične infekcije te se ne može koristiti u biološkoj kontroli raka kore kestena (Hillman i Suzuki 2004). Uz vrste roda *Hypovirus* u gljivi *C. parasitica* su pronađeni još i mikovirusi *Mycoreovirus 1* (MyRV1) i *Mycoreovirus 2* (MyRV2) (*Reoviridae*) te *Cryphonectria mitovirus 1* (CpMV1) (*Narnaviridae*), od kojih se MyRV-1 i CpMV1 povezuju s hipovirulentnim fenotipom (Hillman i Suzuki 2004; Muñoz-Adalia i sur. 2016a).



Slika 5. Usporedba organizacije genoma vrsta roda *Hypovirus*. Preuzeto iz Dawe i Nuss (2013).

2. 2. 4. Biološka kontrola raka kore kestena

Kao što je već rečeno, infekcija virusom CHV1 dovodi do smanjene virulentnosti gljive *C. parasitica* prema kestenu, zbog čega se već dugi niz godina koristi u biološkoj kontroli raka kore kestena. U Francuskoj je Ministarstvo poljoprivrede započelo s programom biološke kontrole u nasadima kestena 1974. godine (Robin i sur. 2000) po protokolu Grentea i Berthelay-Saureta (Grente i Berthelay-Sauret 1978). Prema protokolu, na svakom području se procijeni zastupljenost vc tipova gljive i na temelju toga se proizvodi pasta s mješavinom do osam različitih hipovirulentnih izolata gljive koji pripadaju najzastupljenijim vc tipovima. Pasta se nanosi u rupe na kori izbušene na rubovima raka, te se svake godine novonastali rakovi tretiraju istom mješavinom. Hipovirulentni micelij gljive *C. parasitica* ne uzrokuje pojavu teškog oblika bolesti, nego samo površinsku nekrozu lokaliziranu na koru stabla, te ima preventivni učinak jer služi kao izvor virusa kod sekundarne zaraze virulentnom gljivom. Ukoliko je na stablu već prisutna infekcija agresivnim virulentnim oblikom gljive, kojega sekundarno inficira CHV1 horizontalnim prijenosom iz hipovirulentne gljive, agresivni oblik raka kore prelazi u blaži – prodiranje micelija kroz drvo se usporava te stablo na to može reagirati stvaranjem kalusa koji postupno zatvara ranu (EPPO 2005; Robin i sur. 2010) (Slika 6).

Slika 6. Oštećenja na kori pitomog kestena zaraženog virulentnim (lijevo) i hipovirulentnim sojem gljive *C. parasitica* (sredina). Desno – zarasla rak rana (kalus) nastala nakon infekcije gljive *C. parasitica* virusom CHV1.

U Europi je zastupljenost prirodne hipovirulentnosti i uspješnost antropogenog unosa virusa dosta visoka, dok to u Sjevernoj Americi nije slučaj. Glavni razlog tome je velika raznolikost vc tipova gljive u sjevernoameričkim populacijama koja priječi prirodno horizontalno širenje virusa (Robin i sur. 2000). Važnu ulogu u uspješnosti antropogene biološke kontrole ima i odabir korištenog virusnog soja. Virusni sojevi francuskog F1 podtipa jače smanjuju virulentnost gljive nego sojevi talijanskog podtipa I, ali samim time imaju i manji ekološki fitnes. Takvi jaki sojevi koji brzo dovode do oporavka stabla su dobar odabir za biološku kontrolu u nasadima kestena gdje je moguće tretirati pojedinačne rakove i unositi virus u više navrata, te je takav trud i ekonomski isplativ. S druge strane, oni oslabljuju gljivu i onemogućuju joj sporulaciju u toj mjeri da onemogućuju i vlastito širenje, zbog čega je i potreban višestruki unos. U šumama je ponovljeni i učestali unos virusa teško izvediv, te je za biološku kontrolu u takvim staništima povoljniji slabiji virusni soj koji će u populaciji biti samoodrživ. Dakle, idealan virusni soj bi trebao imati optimalan hipovirulentni učinak na domaćina i dovoljno veliku sposobnost širenja unutar populacije (Robin i sur. 2010; Krstin i sur. 2017). Simultani unos više sojeva virusa (umjereno jakih i jakih) u više gljiva različitog vc tipa bi mogla biti dobra strategija za optimalnu biološku kontrolu raka kore kestena u šumskim populacijama (Krstin i sur. 2017). Nedavni uspjeh u genetičkom inženjerstvu gljive koja može biti univerzalni donator virusa zahvaljujući supresiji *vic* gena bi mogao dodatno olakšati buduće pokušaje biološke kontrole (Zhang i Nuss 2016).

2. 3. UTJECAJ VIRUSA CHV1 NA FIZIOLOŠKE PROMJENE U GLJIVE *C. parasitica*

Prvi pokušaji definiranja mehanizama koji dovode do pojave hipovirulentnosti u gljive *C. parasitica* temeljili su se na analizama nakupljanja mRNA pojedinačnih gena gljive (Powell i sur. 1997). Tako su Rigling i Van Alfen (1991) te Choi i sur. (1992) pokazali da infekcija virusom CHV1 smanjuje akumulaciju mRNA gena za izvanstaničnu lakazu što dovodi do prethodno opažene smanjene aktivnosti ovog enzima u hipovirulentnim izolatima gljive (Rigling i sur. 1989). Također se pokazalo da infekcija virusom CHV1 dovodi do smanjene akumulacije mRNA za gene feromonskih prekursora *Mf2/1* i *Mf2/2,* čime je objašnjen jedan od simptoma hipovirulentnosti – smanjena ženska fertilnost u gljive *C. parasitica* (Zhang i sur. 1998). Uz to je uočena smanjena akumulacija mRNA gena gljive *C. parasitica* za celobiohidrolazu, enzim koji sudjeluje u razgradnji biljne stanične stjenke, i kriparin, hidrofobin stanične stjenke gljive (Kazmierczak i sur. 1996). Chen i sur. (1996) su metodom mRNA razlikovnog prikaza identificirali više od 400 produkata koji su osjetljivi na infekciju virusom CHV1, dok su Kang i sur. (2000) koristeći sličnu metodu procijenili da je oko 20 % gena gljive *C. parasitica* pod utjecajem infekcije virusom.

S razvojem visokoprotočnih metoda za analizu ekspresije gena i formiranjem EST baze podataka za gene gljive *C. parasitica* (Dawe i sur. 2003) omogućen je još dublji uvid u promjene transkriptoma gljive pod utjecajem virusa CHV1. EST baza obuhvaća oko 2200 gena, što čini 20 % ukupnih gena gljive *C. parasitica* (Dawe i Nuss 2013). Allen i sur. (2003) su među tih 2200 gena identificirali 295 gena (oko 13%) čija ekspresija je promijenjena pod utjecajem infekcije virusom CHV1. Od toga je oko 45 % gena pokazalo povećanu, a oko 55 % smanjenu razinu nakupljanja mRNA. Diferencijalno eksprimirani geni obuhvaćali su širok spektar bioloških funkcija – metabolizam aminokiselina, ugljikohidrata, proteina, nukleinskih kiselina i lipida, rast i razvoj, transport elektrona, odgovor na stres i sekundarni metabolizam. Daljnja istraživanja su se većinom usmjerila na rasvjetljavanje uloge virusa CHV1 u ometanju signalnih i regulatornih putova u metabolizmu gljive, dok o proteinima odgovora na stres nije bilo konkretnih istraživanja. Tako su Larson i sur. (1992) pokazali da je supresija ekspresije gena za lakazu posljedica virusnog narušavanja regulatornog puta kalcij/kalmodulin/inozitol trifosfat u gljive *C. parasitica.* Također je utvrđeno da CHV1 dovodi do modifikacija signalnih putova GTP-vezujućih proteina (Chen i sur. 1996) i proteinskih kinaza (Kim i sur.

2002; Park i sur. 2012; Turina i sur. 2015), te do smanjene sinteze nekih transkripcijskih faktora (Dawe i Nuss 2013).

Utjecaj infekcije virusom CHV1 na proteine stresa u gljivi *C. parasitica* naknadno je pokazan i analizom proteoma (Kim i sur. 2012) i analizom sekretoma gljive (Wang i sur. 2016). Oko 16 % akumuliranih proteina pokazivalo je različitu akumulaciju pod utjecajem infekcije virusom CHV1; od toga je 47 % proteina pokazalo povećanu, a 53 % smanjenu akumulaciju u gljivi inficiranoj jakim sojem virusa EP713 (Kim i sur. 2012), slično prethodnim istraživanjima transkriptoma. Postotak izlučenih protein osjetljivih na infekciju virusom bio je nešto veći, oko 25 % (Wang i sur. 2016). I ovdje su identificirani proteini pripadali u različite skupine bioloških procesa.

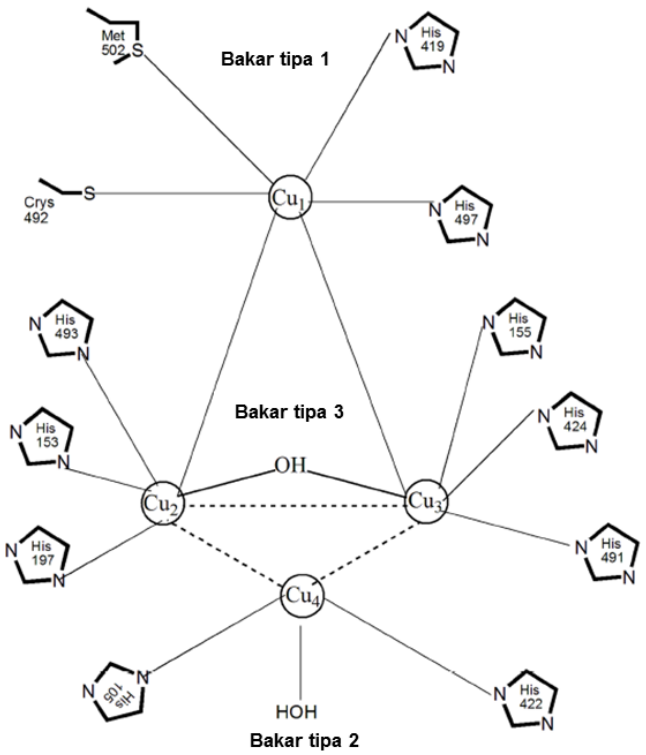
Infekcija prototipnim jakim sojem virusa CHV1 francuskog F1 podtipa (EP713) dovela je do povećane akumulacije mRNA proteina toplotnog šoka 70 (HSP70) i glutation-S-transferaze (GST), ali nije dovela do aktivacije brojnih dodatnih gena uključenih u opći odgovor na stres, kao što su katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) (Allen i sur. 2003). S druge strane, infekcija slabim virusnim sojem Euro7 dovela je do smanjene akumulacije mRNA za GST (Allen i Nuss 2004). U drugom istraživanju u kojem se koristio jaki soj EP713 virusa CHV1 akumulacija proteina toplotnog šoka CpHSP24 u uvjetima toplotnog šoka je bila smanjena (Baek i sur. 2014). Također, iako su postotci gena, odnosno proteina koji su reagirali na infekciju jakim virusnim sojem EP713 u transkriptomskim i proteomskim istraživanjima slični, ipak su među njima postojala određena neslaganja. Tako su Allen i sur. (2003) pokazali povećanje akumulacije mRNA za enzim GST, dok su Kim i sur. (2012) utvrdili da je akumulacija sintetiziranog GST smanjena u zaraženim izolatima gljive. Također, i Wang i sur. (2016) su pokazali da korelacija između količine nakupljene mRNA i izlučenih proteina nije uvijek pozitivna: u sekretomu gljive inficirane sojem EP713 su uočili povećanu količinu enzima SOD, dok je količina mRNA za taj isti enzim bila smanjena.

Iz svega navedenog je vidljivo da postoje složeni međuodnosi između regulacije procesa transkripcije, akumulacije sintetiziranih proteina i regulacije sekrecije, koji imaju važnu ulogu u konačnoj sudbini proteina. Poznato je da aktivnost proteina ovisi i o post-translacijskim modifikacijama, kao što su glikozilacija, lipidacija, fosforilacija i formiranje disulfidnih veza (Deribe i sur. 2010), te činjenica da su proteini sintetizirani ne znači nužno i da su oni funkcionalni, tj. aktivni. Stresni proteini gljive *C. parasitica* do danas su istraživani samo na razini transkripcije pretpostavljenih gena, te akumulacije i izlučivanja eksprimiranih proteina,

međutim njihova aktivnost nije istražena. Kako konačna biološka funkcionalnost proteina ovisi o njihovoj aktivnosti, podaci o učinku infekcije virusom CHV1 na aktivnost stresnih enzima gljive *C. parasitica* su od velike važnosti za bolje razumijevanje interakcija između ovog mikovirusa i njegovog domaćina. Uz to valja napomenuti da su sva spomenuta istraživanja provedena na modelnom sustavu kojeg su činili virulentni izolat gljive EP155 i njezin izogeni soj inficiran virusnim sojem EP713 (EP155/EP713), uz iznimku istraživanja Allena i Nussa (2004) gdje se uz virusni soj EP713 koristio i soj Euro7. Međutim, kako je već spomenuto, između virusnih podtipova ali i između virusnih sojeva unutar podtipa postoje značajne razlike u virulentnosti, te je potrebno istražiti postoji li razlika u njihovom utjecaju na razini aktivnosti stresnih enzima gljive *C. parasitica.*

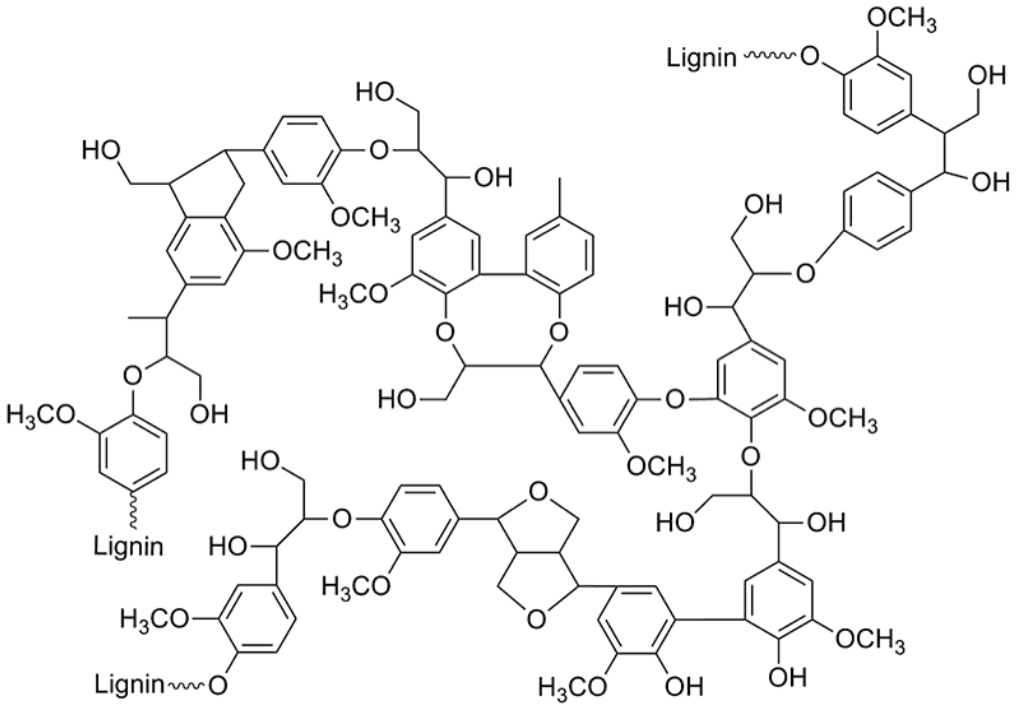
Smanjenje aktivnosti nekog od enzima gljive *C. parasitica* pod utjecajem infekcije virusom CHV1 je pokazano za lakazu (Rigling i sur. 1989; Choi i sur. 1992), kutinazu (Varley i sur. 1992) i poligalakturonazu (Gao i Shain 1995), enzime koji razgrađuju staničnu stjenku i povezani su s patogenezom raka kore kestena. Nedavno je pokazano da i dsRNA virusi povezani s hipovirulentnošću izolata BLH-1 gljive *Sclerotium rolfsii* dovode do smanjene aktivnosti lakaza u ovoj fitopatogenoj gljivi (Zhong i sur. 2016). Uz navedene enzime gljive luče i oksalnu kiselinu za koju se pretpostavlja da također sudjeluje u izvanstaničnim reakcijama razgradnje lignoceluloze (Breitenbach i sur. 2015), a Havir i Anagnostakis (1985) su pokazali da hipovirulentni izolati gljive *C. parasitica* ne luče ovu kiselinu.

Lakaze (LAC; benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2.) su polifenol oksidaze koje sadrže bakar (Slika 7) i kataliziraju redukciju kisika do vode uz paralelnu oksidaciju supstrata, najčešće fenolnih spojeva.



Slika 7. Struktura aktivnog mjesta lakaze s četiri atoma bakra. Preuzeto iz Christopher i sur. (2014).

Ovi enzimi su vrlo varijabilni – ovisno o vrsti iz koje su izolirani razlikuju se u veličini, s rasponom od 60 do 80 kD, uglavnom su monomerni i u obliku glikoproteina. Pretpostavlja se da je glavna uloga lakaza u gljiva sudjelovanje u razgradnji lignina (Slika 8), gdje razgrađuju C-C veze u fenilpropanoidnim podjedinicama i na taj način cijepaju makromolekulu lignina na manje, lakše razgradive molekule. Međutim, u gljiva su izolirani i unutarstanični oblici lakaza, za koje se smatra da sudjeluju i u drugim staničnim procesima kao što su morfogeneza, sinteza pigmenata, interakcije patogena i domaćina ili razvoj plodnih tijela (Thurston 1994; Baldrian 2006). Često ih se nalazi u gljivama iz odjeljka Basidiomycota koje uzrokuju trulež drveta i korijena, te u saprotrofnim i fitopatogenim gljivama, dakle vrstama kojima je za opstanak nužna razgradnja lignina. Feng i sur. (2015) su bioinformatičkom analizom 20 dostupnih potpunih genoma fitopatogenih gljiva pronašli 101 pretpostavljeni gen za lakaze, od čega 16 u gljivi *C. parasitica.* Postojanje tako velikog broja izoenzima potvrđuje pretpostavljenu važnu ulogu lakaza u fitopatogenih gljiva.



Slika 8. Pretpostavljena struktura dijela polimera lignina. Preuzeto s: http://www.chem.cmu.edu/groups/washburn/res-lignin.html

Od 16 pretpostavljenih lakaza u gljivi *C. parasitica*, tri su do danas izolirane i karakterizirane: LAC1 (izvanstanična), LAC2 (unutarstanična) i LAC3 (izvanstanična, inducibilna dodatkom tanične kiseline), sve tri suprimirane u prisutnosti virusa CHV1 (Rigling i Van Alfen 1991; Rigling i Van Alfen 1993; Kim i sur. 1995; Chung i sur. 2008). I u analizama lakaze, kao i kod stresnih enzima, se pokazalo da postoji neslaganje između rezultata dobivenih različitim metodama. Naime, iako su Rigling i Van Alfen (1991, 1993) pokazali smanjenu aktivnost LAC1 pod utjecajem infekcije jakim CHV1 sojem EP713, Allen i sur. (2003) nisu pokazali diferencijalno nakupljanje *lac1* mRNA, dok su Wang i sur. (2016) uočili povećano nakupljanje *lac1* mRNA i smanjeno izlučivanje LAC1.

Sva dosadašnja istraživanja utjecaja virusa CHV1 na aktivnost lakaza u gljivi *C. parasitica*, uz iznimku onoga Riglinga i sur. (1989), provedena su na modelnom sustavu EP155/EP713. Međutim, s obzirom na pretpostavljenu ulogu lakaza u patogenezi raka kestenove kore, potrebno je utvrditi kako različiti virusni sojevi prisutni u lokalnim populacijama gljive utječu na njihovu aktivnost.

2. 4. BIOTIČKI STRES, OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI

2. 4. 1. Biotički stres

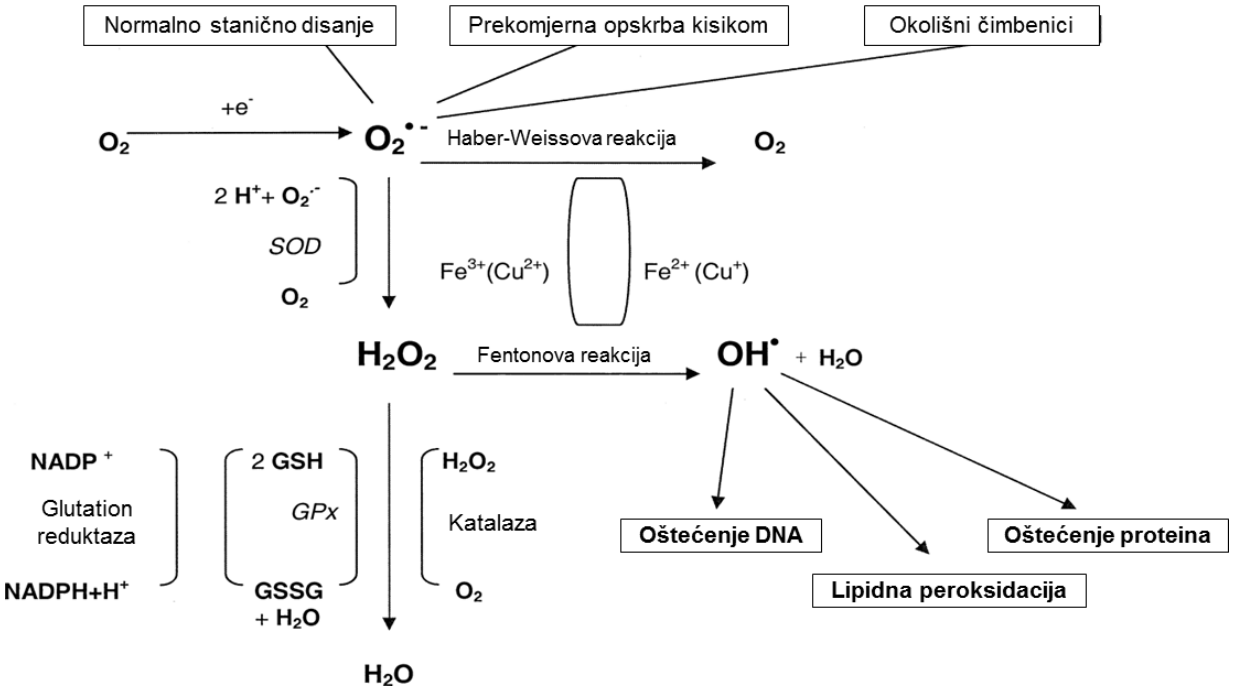
Stresom se smatra svaka fiziološka reakcija stanice na stresni čimbenik koja dovodi do smanjenog rasta ili preživljavanja organizma. Stresnim čimbenicima se mogu smatrati sve nagle promjene – kemijske, fizikalne ili biološke – u okolišu i/ili u samom organizmu koje potiču obrambenu reakciju organizma (Vorob'eva 2004). Biotički stres proizlazi iz štetnog djelovanja drugih organizama i bioloških agensa na neki organizam, pa su tako čimbenici biotičkog stresa u biljaka patogeni mikroorganizmi (bakterije i gljive) i agensi (virusi i subvirusni patogeni), herbivorni organizmi i parazitske biljke. Virusi kao čimbenici biotičkog stresa u biljaka su vrlo dobro istraženi (Soosaar i sur. 2005; Pieterse i sur. 2009; Anand i sur. 2013; Wieczorek i Obrepalska-Steplowska 2014; Zhu i sur. 2014), dok se o reakcijama obrane gljiva prilikom infekcije mikovirusima jako malo zna.

2. 4. 2. Oksidacijski stres

Kao i drugi stresni čimbenici, biotički stres uzrokovan virusnom infekcijom biljaka dovodi do oksidacijskog stresa (Camejo i sur. 2016). Oksidacijski stres nastupa kad se u stanici akutno ili kronično poremeti homeostaza reaktivnih oblika kisika (ROS, od engl. reactive oxygene species), što dovodi do oksidacijskih promjena u staničnim sastavnicama i u konačnici do štetnih promjena u staničnom metabolizmu i regulacijskim putovima (Lushchak 2011). Tijekom respiracije u stanicama svih aerobnih organizama kisik se progresivno reducira do vode uz kontrolirani dodatak četiri elektrona (Slika 9), ali u slučaju nepotpune oksidacije stvaraju se ROS molekule. U normalnom metabolizmu ROS molekule imaju korisne uloge kao signalne ili zaštitne molekule, ali u previsokim koncentracijama mogu imati toksičan učinak (Breitenbach i sur. 2015; Camejo i sur. 2016). ROS molekule u stanicama dovode do oksidacijskog oštećenja DNA i nukleoproteina – oštećenja baza i šećera u DNA, gubitka baza i lomova lanaca DNA te do unakrsnog povezivanja DNA i proteina, ali dovode i do oštećenja lipida (lipidna peroksidacija), ugljikohidrata i malih metabolita (Moradas-Ferreira i sur. 1996;

Breitenbach i sur. 2015). ROS molekule su vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1O_2$) i slobodni radikali – superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$) i hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$).

Kod nefotosintetskih aerobnih eukariotskih mikroorganizama superoksidni anion se u stanicama stvara u transportnim lancima elektrona na mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu, gdje elektroni mogu „curiti“ s elektronskih transportera na molekularni kisik. Procjenjuje se da se 90 % molekularnog kisika u aerobnim organizmima troši na procese respiracije u mitohondrijima, a glavna mjesta stvaranja superoksidnog aniona su NADH: ubikvinon oksidoreduktaza (kompleks I) i ubikvinol: citokrom oksidoreduktaza (kompleks III). Iako je slobodni radikal, superoksidni anion nije toliko reaktivan kao drugi oblici ROS-a zbog svoje selektivne reaktivnosti. Njegov glavni značaj je u tome što spontanim kemijskim dismutacijama u stanici prelazi u vodikov peroksid, a u kiselim uvjetima može prijeći u reaktivniji hidroperoksil radikal ($HOO^{\bullet}$). Za razliku od superoksidnog aniona, hidroksilni radikal je ekstremno reaktivan i nespecifično reagira s biomolekulama, oštećujući polisaharide, proteine i nukleinske kiseline unutar nekoliko nanometara od mjesta nastanka. Smatra se da u stanicama nastaje Fentonovom reakcijom – izravnom reakcijom između H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$ u prisutnosti Fe^{2+} ili Cu^{+} iona u tragovima (Slika 9). Vodikov peroksid je jaki oksidans ali nije slobodni radikal. U neutralnim ili kiselim uvjetima je pretežno potpuno protoniran te slobodno prolazi kroz biološke membrane ali sam po sebi ima malu reaktivnost. Vjerojatno je zbog tih svojstava H_2O_2 glavni spoj zadužen za prijenos signala u stanicama, te postoje specijalni enzimi za njegovo generiranje, kao primjerice NADPH oksidaze (Breitenbach i sur. 2015). Glavni značaj kao oksidans H_2O_2 ima u generiranju hidroksilnog radikala. Singletni kisik, visokoenergetski oblik kisika, također nije slobodni radikal ali ga se ubraja u ROS molekule zbog velike reaktivnosti (Bai i sur. 2003).



Slika 9. Reaktivni oblici kisika i stanični enzimski antioksidacijski mehanizmi. SOD – superoksid dismutaza, GPx – glutation peroksidaza, GSH – reducirani glutation, GSSG – oksidirani glutation. Preuzeto iz Bai i sur. (2003).

2. 4. 3. Antioksidacijski mehanizmi

Iako štetne ROS molekule nastaju i u normalnim fiziološkim uvjetima redukcijom kisika, njihove koncentracije ostaju niske jer ih antioksidacijski mehanizmi stanica uspješno uklanjaju. Antioksidacijski mehanizmi funkcioniraju na dva glavna principa: i) sprječavanjem nastanka kisikovih radikala i ii) uklanjanjem već nastalih radikala. Mehanizmi zaduženi za uklanjanje radikala dijele se u dvije skupine i) enzimski antioksidansi i ii) neenzimski antioksidansi. Neenzimski antioksidansi su uglavnom male molekule koje su topive u vodi ili u lipidima i reagiraju izravno s ROS molekulama, pri čemu se same oksidiraju. Glutation (GSH), tripeptid γ-L-glutamil-L-cisteinglicin, je najzastupljeniji i najvažniji neenzimski antioksidans u stanicama (Jamieson 1998; Birben i sur. 2012; Aquilano i sur. 2014). On stupa u reakciju sa slobodnim radikalima preko redoks-aktivne sulfhidrilne skupine, pri čemu se sam oksidira do glutation sulfhidrila (GSSG), ali može biti i elektron-donor za glutation peroksidaze (GPx) u reakciji uklanjanja H_2O_2. U metabolizmu mikroorganizama prevladavaju tri skupine antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i GPx

(Jamieson 1998; Bai i sur. 2003). U skupinu antioksidacijskih enzima ubrajaju se i neki drugi enzimi koji ne ulaze direktno u reakcije s ROS molekulama, već imaju indirektne uloge kao što su nadomjestak reduciranog GSH iz oksidiranog GSSG pomoću GSSG reduktaza ili detoksifikacija i transport drugih štetnih i reaktivnih spojeva pomoću glutation S-transferaza (GST) (Bai i sur. 2003; Birben i sur. 2012). Slika 9 prikazuje međuodnose između ROS molekula i glavne stanične enzimske antioksidacijske mehanizme.

Superoksid dismutaze (SOD; superoksid: superoksid oksidoreduktaza, EC 1.15.1.1) su metaloproteini koji kataliziraju reakciju dismutacije dvaju superoksidnih aniona do molekularnog kisika i vodikovog peroksida (1). Prema metalnom ionu koji se nalazi u aktivnom mjestu superoksid dismutaze se tradicionalno dijele na Fe-SOD, Mn-SOD i CuZn-SOD, a u nekih bakterijskih vrsta reda Actinomycetales otkriveno je postojanje i Ni-SOD (Wuerges i sur. 2004). Smatra se da prokariotski organizmi imaju Fe- i Mn-SOD, dok eukariotski imaju Mn-SOD u mitohondrijima i CuZn-SOD u citosolu (Angelova i sur. 2005). Izloženost stanice povišenim koncentracijama ROS dovodi do snažne indukcije ovog enzima (Angelova i sur. 2005).

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (1)$$

Katalaze (CAT; vodikov peroksid: vodikov peroksid oksidoreduktaza, EC 1.11.1.6) su hemoproteini koji kataliziraju razgradnju vodikovog peroksida do kisika i vode (2). Najčešće su smještene u peroksisomima ali može ih se naći i slobodne u citoplazmi. Kao i u slučaju SOD, izloženost stanice povišenim koncentracijama ROS dovodi do snažne indukcije ovog enzima (Angelova i sur. 2005).

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O \qquad (2)$$

Glutation S-transferaze (GST; RX:glutation R-transferaza, EC 2.5.1.18) su raznolika skupina enzima prisutna u svim skupinama organizama koji kataliziraju konjugaciju GSH s ksenobiotskim supstratima koje na taj način detoksificiraju (3). Uz ovu primarnu ulogu, također mogu djelovati i kao tiol transferaze i peroksidaze, zbog čega bi mogli i izravno sudjelovati u reakciji stanica na oksidacijski stres (Thuillier i sur. 2011). Indukcija GST u prisutnosti ksenobiotika odvija se na transkripcijskoj razini (Eaton i Bammler 1999).

$$RX + GSH = HX + GS\text{-}R \quad (3)$$

R = aromatska, alifatska ili heterociklička skupina, X = sulfatna, nitrilna ili halidna skupina

2. 4. 4. Antioksidacijski enzimi u gljiva

U gljiva izloženih oksidacijskom stresu može doći do značajnih morfoloških promjena, kao što su sljepljivanje hifa i promjene u izgledu kultura (Bai i sur. 2003). Kao i u životinja i biljaka, u gljiva postoje brojni antioksidacijski enzimi čija aktivnost se mijenja uslijed izloženosti oksidacijskom stresu. Primjerice u kvasaca je pronađeno više od 100 enzima koji sudjeluju u redoks procesima uklanjanja ROS, od kojih su najzastupljeniji peroksiredoksini (Breitenbach i sur. 2015). SOD, CAT, GPx i glutation reduktaza, kao i GSH potvrđeno imaju važnu ulogu u borbi protiv oksidacijskog oštećenja u gljiva (Jamieson 1998; Bai i sur. 2003). SOD u stanicama gljiva postoji u obliku Mn-SOD u mitohondrijima i CuZn-SOD u citoplazmi (Bai i sur. 2003; Angelova i sur. 2005). Mnoga istraživanja su pokazala postojanje SOD u raznim gljivama: u entomopatogenoj gljivi *Cordyceps militaris,* u oportunističkim patogenima *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans,* u tri vrste roda *Aspergillus,* u modelnim organizmima *Saccharomyces cerevisiae* i *Neurospora crassa,* te u fitopatogenim gljivama *S. sclerotiorum* i *B. cinerea* (Montibus i sur. 2015). Katalaze gljiva su dosta manje istražene u usporedbi s katalazama sisavaca. Neke od gljiva u kojima su detektirane katalaze i određena im je struktura su: *N. crassa* (CAT-1 i CAT-3) (Hansberg i sur. 2012), *Aspergillus nidulans* (CatA, CatB, CatC) (Kawasaki i Aguirre 2001), *A. niger* (catC, catD i catR) (Bai i sur. 2003), *S. cerevisiae* (CTA1 u peroksisomima i CTT1 u citosolu) (Jamieson 1998). Koncentracije CAT i SOD u stanicama gljiva koje nisu izložene stresu značajno variraju između različitih vrsta i unutar iste vrste uzgajane u različitim hranidbenim medijima (Gil-ad i sur. 2000; Bai i sur. 2003; Angelova i sur. 2005). GST gljiva su također puno manje istražene u usporedbi s GST bakterija i sisavaca, ali s dostupnošću sve većeg broja genskih sekvenci različitih gljiva uočeno je da su GST gljiva iznimno raznolike i po strukturi i po funkcionalnosti (McGoldrick i sur. 2005; Mathieu i sur. 2012). Smatralo se da je glavni značaj GST u gljiva u metabolizmu fungicida i u razvoju otpornosti na njih (Hamed i sur. 2005). Međutim, pokazalo se da zastupljenost izoformi GST u pojedinih vrsta ovisi o njihovom načinu života, pa tako saprotrofne gljive koje razgrađuju drvo imaju puno veći broj gena za ove enzime od simbiotskih ili biotrofnih gljiva, što sugerira njihovu funkcionalnu raznolikost i

uključenost u procese razgradnje drva (Morel i sur. 2009; Thuillier i sur. 2011; Mathieu i sur. 2013; Deroy i sur. 2015).

Kako su stresori koji dovode do oksidacijskog stresa, bilo endogeni ili egzogeni, raznoliki, tako su i odgovori gljiva na oksidacijski stres raznoliki, iako su još uvijek dosta slabo istraženi. Najviše se zna o antioksidacijskom odgovoru kvasaca, dok su od nitastih gljiva najbolje istražene *N. crassa* i *A. niger* (Moradas-Ferreira i sur. 1996; Jamieson 1998; Angelova i sur. 2005). Većina dosadašnjih istraživanja fokusirala se na egzogene abiotičke oksidacijske stresore, dok su podaci o biotički uzrokovanom oksidacijskom stresu u gljiva, pogotovo onom uzrokovanom mikovirusima, ograničeni. Tako su Emri i sur. (1997) pokazali da tretiranje egzogenim H_2O_2 dovodi do povećane aktivnosti CAT i GPx u vrste *Penicillium chrysogenum*, Angelova i sur. (2005) su pokazali povećanu aktivnost SOD i CAT u 12 vrsta gljiva pod utjecajem H_2O_2 i parakvata, te Azevedo i sur. (2007) da je CAT imala značajniju ulogu nego SOD u smanjenju oksidacijskog stresa uzrokovanog bakrom i cinkom u gljiva *Varicosporium elodeae* i *Heliscus submersus.* S druge strane, izloženost arsenu i kadmiju je smanjila aktivnost GST ali nije utjecala na aktivnosti CAT i SOD u oportunističkog patogenog kvasca *Trichosporon asahii* (Ilyas i sur. 2014). Izloženost H_2O_2 značajnije utječe na povećanje aktivnosti CAT nego na aktivnost SOD (Angelova i sur. 2005), dok je povećana aeracija ili izloženost parakvatu dovela do značajnog porasta SOD aktivnosti, vjerojatno zbog povećane stope disanja prilikom koje je dolazilo i do povećanog generiranja superoksidnog aniona (Bai i sur. 2003; Angelova i sur. 2005). Odgovor CAT na oksidacijski stres je složeniji jer u stanicama postoji više peroksidaza zaduženih za uklanjanje H_2O_2. U kulturi patogene gljive *C. albicans* aktivnost CAT i GPx je porasla nakon tretmana s egzogenim H_2O_2, s time da je indukcija CAT bila 5,25 puta jača nego indukcija GPx. Izloženost povišenim temperaturama u kulturi *A. niger* dovodi do stvaranja većih koncentracija superoksidnog aniona ali i do povišene aktivnosti CAT (Bai i sur. 2003). Flattery-O'Brien i sur. (1993) su pokazali da izloženost kvasca *S. cerevisiae* peroksidu, superoksidu ili toplinskom šoku inducira povišenu ekspresiju raznih unutarstaničnih polipeptida. Ova opažanja sugeriraju da različiti stresori u stanicama gljiva dovode do zajedničkih fizioloških i molekularnih odgovora, što je poznato i u biljaka i bakterija (Jamieson 1998; Bai i sur. 2003; Pandey i sur. 2015).

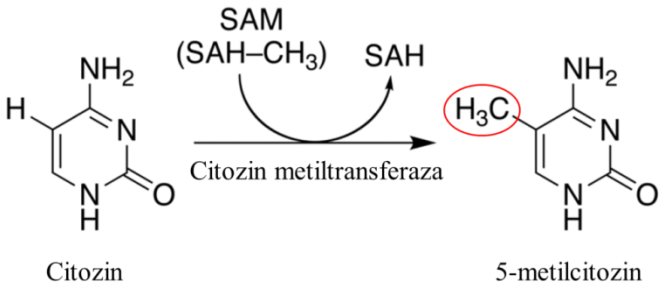
Prilikom infekcije patogene gljive se sreću s aktivnom obranom domaćina. Zbog toga su razvile razne mehanizme napada i obrane. Povišena otpornost na stres uočena je u patogene gljive *C. albicans* u usporedbi s modelnim kvascima. *C. albicans* parazitira u različitim

nišama unutar organizma domaćina u kojem je izložena vrlo promjenjivim uvjetima, od čega je izloženost oksidacijskom stresu dobro dokumentirana. Ova gljiva je izuzetno otporna na izloženost ROS molekulama, i smatra se da je to svojstvo nužno za njezinu uspješnu patogenost. Važnost antioksidacijske obrane u vrste *C. albicans* potvrđuje postojanje čak šest gena za SOD pronađenih u njezinom genomu (Brown i sur. 2014). Slično je uočeno i kod nekrotrofne fitopatogene gljive *Alternaria brassicicola* koja je prilikom invazije na domaćine iz porodice Brassicaceae izložena njihovim obrambenima spojevima, izotiocijanatima. Ova gljiva ima barem šest gena za GST koji se pojačano eksprimiraju tijekom infekcije, te se smatra da aktivnost GST štiti patogena od obrambenih spojeva domaćina (Calmes i sur. 2015). Jakupović i sur. (2006) su pokazali da se u fitopatogene gljive *Uromyces fabae* velik broj gena uključenih u razne metaboličke putove pojačano eksprimira tijekom parazitskog rasta, među kojima su bili i geni uključeni u odgovor na stres – dva za pretpostavljene metalotioneine, jedan za Mn-SOD i tri za peroksidaze.

2. 5. EPIGENOM I METILACIJSKE PROMJENE

Epigenom nekog organizma čine sve mitotički i/ili mejotički nasljedne promjene u funkciji gena koje nisu nastale promjenom u sekvenci DNA molekule (Russo i sur. 1996). Metilacija citozina u molekuli DNA je najčešća epigenetička modifikacija genoma koja modulira i kontrolira ekspresiju gena u svim skupinama organizama, pa tako i u gljiva (Reyna-López i sur. 1997; Martienssen i Colot 2001; Bird 2002; Wu i Zhang 2014). Metilacijska regulacija transkripcije u stanicama sudjeluje u diferencijalnoj ekspresiji gena, tvorbi neaktivnog kromatina, tempiranju replikacije kromosoma, inaktivaciji X kromosoma, genskom imprintingu i karcinogenezi (Reyna-López i sur. 1997). Enzimi citozin metiltransferaze kataliziraju prijenos aktivirane metilne skupine sa S-adenozil metionina (SAM) na C5 atom citozinskog prstena u sintetiziranoj DNA molekuli (Slika 10), tvoreći tako 5-metilcitozin (5mC). Geni koji su metilirani su utišani jer metilna skupna onemogućuje vezanje transkripcijskih faktora ili omogućuje vezanje proteina supresora transkripcije; s druge strane nemetilirani geni ili geni koji izgube metilaciju su transkripcijski aktivni (Martienssen i Colot 2001; Bird 2002).

.



Slika 10. Metilacija citozina do 5-metilcitozina pomoću citozin metiltransferaze uz S-adenozil metionin (SAM) kao donator metilne skupine. SAH – S-adenozil homocistein.

Genomi kralješnjaka imaju najveći udio metilacija, i one su u genomu manje-više ravnomjerno raspodijeljene, što se naziva globalnom metilacijom (Bird 2002). U genomima biljaka i nitastih gljiva metilacije su uglavnom ograničene na transpozone i regije bogate ponavljanjima (Martienssen i Colot 2001). Najviše metiliranog citozina u genomima životinja i gljiva nalazi se u sekvencama CpG (5'-C-fosfat-G-3'; sekvenca baza C i G na jednom lancu DNA, za razliku od GC komplementarnog sparivanja lanaca). U gljiva je povećani udio metilacija povezan s dormancijom, dok je u fazama aktivnog rasta udio metilacija bio vrlo malen. Također, dimorfne gljive *Mucor rouxii, Yarrowia lipolytica* i *Ustilago maydis* su imale drugačije obrasce metilacije kad su rasle u obliku kvasca, a drugačije u obliku micelija. U modelnih gljiva *Ascobolus immersus* i *N. crassa* stupanj DNA metilacije je korelirao s aktivnošću gena (Reyna-López i sur. 1997).

U biljaka, RNA virusi koji se repliciraju u citoplazmi mogu utjecati na ekspresiju, točnije utišavanje nuklearnih gena biljke na temelju komplementarnosti s dijelom sekvence biljnog genoma. Kada je ovaj fenomen otkriven točan mehanizam djelovanja nije bilo poznat, ali pretpostavljalo se da u njemu sudjeluju promjene kromatina i metilacije DNA prouzrokovane specijaliziranim RNA produktima (Jamieson 1998). Danas se navedeni fenomen naziva RNA-upravljana DNA metilacija (RdDM, od engl. RNA-directed DNA methylation), jedan je od mehanizama transkripcijskog utišavanja gena (TGS, od engl. transcriptional gene silencing) i poznata je pojava u biljaka zaraženih virusima i subvirusnim patogenima. Glavni medijator RdDM su dsRNA molekule, koje ili čine virusni genom ili se javljaju kao replikacijski intermedijeri ssRNA virusa. Veliku virusnu dsRNA enzimi slični Dicer enzimima (ribonukleaze tipa III) razgrađuju u male interferirajuće RNA (siRNA, od engl. short interfering RNA) veličine oko 23 nukleotida. Te siRNA tvore kompleks s proteinima iz

porodice argonauta, služe kao vodiči za prepoznavanje homolognih regija genoma i navode DNA metiltransferaze do tih regija. Na ovaj način mehanizam TGS povećava otpornost biljke na infekciju virusom (Mette i sur. 2000; Bond i Baulcombe 2015; Huang i sur. 2016). Kathiria i sur. (2010) su pokazali da epigenetičke promjene, točnije hipermetilacija genoma, nastale pod utjecajem infekcije virusom mogu biti nasljedne i povećati otpornost potomstva na biotički stres. Nadalje, metilacija kao obrambeni mehanizam biljke može biti usmjerena prema genomu virusa, što je pokazano na geminivirusima koji inficiraju vrstu *Arabidopsis sp* (Raja i sur. 2008). S druge strane virusi su razvili mehanizme za borbu protiv obrambenih mehanizama biljaka. Tako su proteini AL2 i L2 geminivirusa, supresori RNA utišavanja, također u stanju inhibirati adenozin kinazu, enzim nužan za proizvodnju SAM, što u konačnici dovodi do smanjene metilacije genoma domaćina (Wang i sur. 2003). Slično tome, protein βC1 betasatelita begamovirusa interferira s metilacijom jer inhibira enzim S-adenozilhomocistein hidrolazu (SAHH) (Yang i sur. 2011). S druge strane, metilacijske promjene u stanicama koje uzrokuju neki virusi sisavaca, kao što su Epstein-Barrov virus (EBV), humani herpes virus 8 i virus hepatitisa B, dovode do složenih epigenetičkih promjena u zaraženim stanicama na štetu domaćina i često rezultiraju malignim oboljenjima (Paschos i Allday 2010). Sličnih podataka o utjecaju infekcije mikovirusima na metilacijske promjene u genomu gljiva u dostupnoj literaturi nema, a najbolje su istražene promjene u enzimima metilacijskog metabolizma u gljive *C. parasitica* inficirane virusom CHV1.

Infekcija i jakim sojem CHV1-EP713 i slabim sojem Euro 7 dovela je do povećane ekspresije gena za S-adenozilmetionin sintetazu (SAMS) i SAHH (Allen i sur. 2003; Allen i Nuss 2004). Ova dva enzima su nužna u staničnim metilacijskim procesima jer SAMS katalizira stvaranje primarnog donatora metilne skupine SAM iz L-metionina, a SAHH hidrolizira uklanjanje SAH generiranog u reakcijama transmetilacije (Slika 10). Promijenjena ravnoteža unutarstaničnog SAH i SAM utječe na sve reakcije metilacije ovisne o SAM. Smanjena aktivnost SAHH dovodi do gomilanja SAH čime se inhibiraju reakcije SAM-ovisne metilacije, što u konačnici može dovesti do hipometilacije genoma. Na temelju opažene promjene u ekspresiji ovih dvaju enzima Allen i Nuss (2004) su iznijeli hipotezu da bi kronična infekcija ovim RNA virusom mogla djelovati na stabilnost genoma domaćina. Kasnije su Liao i sur. (2012) eksperimentalno potvrdili funkciju SAHH u gljive *C. parasitica* u regulaciji koncentracije SAH. Također, *Δsahh* mutante su pokazivale fenotip sličan hipovirulentnom i smanjenu virulentnost gljive. Povećanje ekspresije *sahh* prilikom infekcije virusom CHV1 je kontradiktorno s pojavom fenotipa sličnog hipovirulentnom u *Δsahh*

mutanti. Liao i sur. (2012) su predložili mehanizam u kojem hipovirus djeluje u dva odvojena koraka – prvo dovodi do povećane transkripcije *sahh*, a naknadno inhibira aktivnost SAHH. Također su za razjašnjavanje uloge virusa u procesima metilacije predložili daljnje analize metilacije genoma gljive i globalne ekspresije gena.

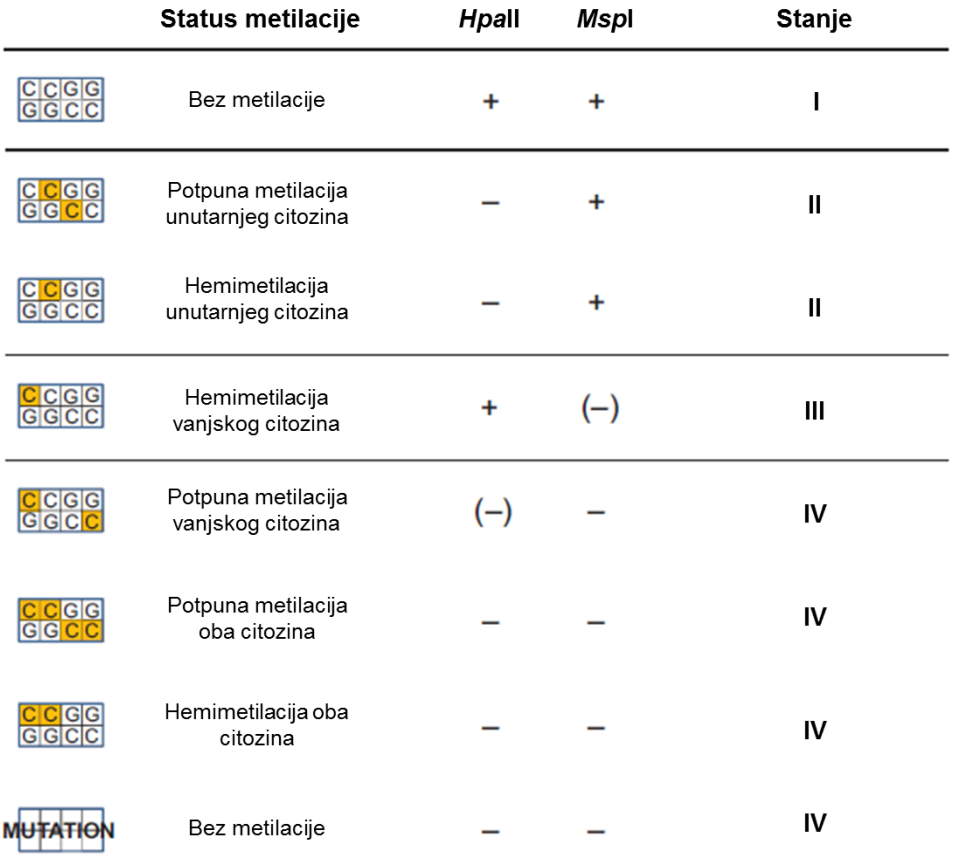
2. 5. 1. Istraživanje metilacije genoma metodom polimorfizma duljine DNA odsječaka osjetljivog na metilaciju (MSAP)

Obzirom da se u životinja i gljiva većina metiliranog citozina nalazi u CpG sekvencama, određivanje stupnja metilacije tih sekvenci može biti dobar pokazatelj ukupne metiliranosti genoma. Jedna od metoda za određivanje metiliranosti u CpG sekvencama je određivanje polimorfizma duljine DNA odsječaka osjetljivog na metilaciju (MSAP, od engl. methylation-sensitive amplified polymorphism) (Reyna-López i sur. 1997). Ova metoda je između ostalog korištena za proučavanje biljnih genoma i metilacijskih promjena uključenih u razne razvojne stadije (Baurens i sur. 2008; Mason i sur. 2008), ali i za proučavanje metilacijskih stanja dimorfnih gljiva (Reyna-López i sur. 1997), i za utvrđivanje utjecaja virusa na metilacijski status genoma rajčice (Mason i sur. 2008).

MSAP je modifikacija standardne metode polimorfizma dužine PCR umnoženih DNA odsječaka (AFLP, od engl. amplified fragment length polymorphism) (Vos i sur. 1995). MSAP se provodi u dvije paralelne reakcije s dva seta restrikcijskih endonukleaza: *Eco*RI zajedno s jednom od endonukleaza osjetljivih na metilaciju – *Msp*I ili *Hpa*II. *Eco*RI je rijetki rezač, restrikcijski enzim čija restrikcijska mjesta (5'-GAATTC) se u genomu javljaju rijetko pa njegovim djelovanjem nastaje manji broj odsječaka veće molekularne težine. *Msp*I i *Hpa*II su česti rezači te njihovim djelovanjem nastaje veći broj odsječaka manje molekularne težine. *Msp*I i *Hpa*II su izoshizomeri koji prepoznaju isti tetranukleotid 5'-CCGG, ali su različito osjetljivi na metilaciju na unutarnjem i vanjskom citozinu. Oba enzima prepoznaju i režu 5'-CCGG sekvencu ako nije metilirana. Uz to, *Msp*I prepoznaje i reže u slučaju potpune ili hemimetilacije na unutarnjem citozinu (C^{Me}**C**GG ili C^{HMe}**C**GG), dok *Hpa*II prepoznaje mjesta koja su hemimetilirana na vanjskom citozinu (^{HMe}**C**CGG) (Slika 11). Mjesta koja su potpuno metilirana na vanjskom citozinu (^{Me}**C**CGG) ili hemi- ili potpuno metilirana na oba citozina (^{HMe}**C**^{HMe}**C**GG ili ^{Me}**C**^{Me}**C**GG) ne reže niti jedan od ova dva enzima (Schulz i sur. 2013). Usporedbom profila fragmenata dobivenih razgradnjom pomoću *Eco*RI/*Msp*I i

*Eco*RI/*Hpa*II dobivaju se podaci o metilacijskom statusu genoma (Herrera i Bazaga 2010; Schulz i sur. 2013). Za svaki pojedinačni fragment moguća su četiri stanja (Slika 11):

stanje I = fragmenti prisutni u oba profila – nemetilirano stanje,
stanje II = fragmenti prisutni samo u *Eco*RI/*Msp*I – hemimetilacija ili potpuna metilacija unutarnjeg citozina,
stanje III = fragmenti prisutni samo u *Eco*RI/*Hpa*II – hemimetilacija vanjskog citozina
stanje IV = nema fragmenta – neinformativno stanje.



Slika 11. Osjetljivost izoshizomera *Msp*I i *Hpa*II na različite metilacijske statuse sekvence 5'-CCGG; + = enzim reže, - = enzim ne reže, ( ) = kontradiktorni podaci iz literature; žutom bojom su označeni metilirani citozini. Prilagođeno prema Schulz i sur. (2013).

Metoda MSAP se provodi u tri uzastopne reakcije: i) restrikcija i ligacija, ii) predumnažanje i iii) umnažanje. Prilikom restrikcije i ligacije se uzorak DNA cijepa restrikcijskim endonukleazama *Eco*RI/*Msp*I u jednoj i *Eco*RI/*Hpa*II u drugoj reakcijskoj smjesi, te se na

dobivene ljepljive krajeve DNA lanaca vežu dvolančani oligonukleotidni adapteri (ligacija) pomoću T4 ligaze. Tako dobiveni DNA fragmenti služe kao kalup za lančanu reakciju polimerazom (PCR) u koraku ii). Sekvence adaptera i restrikcijskog mjesta služe kao mjesto vezanja početnica za reakciju predumnažanja restrikcijskih fragmenata. Ove početnice mogu imati jedan ili više selektivnih nukleotida čime se umnaža samo podskup fragmenata i pojednostavljuje analiza. Također, samo fragmenti koji imaju adapter vezan na oba kraja će se umnožiti eksponencijalno i na taj način će se ciljani fragmenti „pročistiti“ od sekvenci kojima se adapter vezao samo na jedan kraj (koje se umnažaju linearno). Treći korak, selektivna amplifikacija se provodi kako bi se dodatno smanjila složenost smjese i omogućila se vizualizacija PCR fragmenata. U reakciji se koriste početnice sa selektivnim nukleotidima, od kojih je početnica za *Eco*RI obilježena fluorescencijskom bojom na 5' kraju, a početnica za *Msp*I/*Hpa*II nije obilježena. Kako je *Eco*RI rijetki rezač, fragmenata koji na oba kraja imaju *Eco*RI restrikcijsko mjesto je malo te se ne umnažaju dobro i nalaze se ispod razine detekcije (Vos i sur. 1995). Fragmenti koji na oba kraja imaju *Msp*I/*Hpa*II restrikcijsko mjesto se ne mogu vizualizirati jer nisu fluorescencijski obilježeni, te stoga u analizi sudjeluju samo fragmenti koji na jednom kraju imaju *Eco*RI, a na drugom *Msp*I/*Hpa*II restrikcijsko mjesto.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Izolati gljive *C. parasitica* i sojevi virusa CHV1 korišteni u istraživanju

Prilikom prethodnih istraživanja sakupljeni su uzorci gljive *C. parasitica* s područja Hrvatske i Slovenije (Krstin i sur. 2008; Krstin i sur. 2011; Ježić i sur. 2014). Uzorci su karakterizirani kao žuti (virulentni) i bijeli (hipovirulentni), određen im je vc i MAT tip (spol gljive), te je prisutnost hipovirusa potvrđena izolacijom dsRNA. Uzorci su pohranjeni u mikroepruvetama u sterilnom 22%-tnom glicerolu (22 mL glicerola pomiješano s 88 mL dH_2O te autoklavirano u Schott boci) na -80 °C. Za obnavljanje kultura površinu smrznutih uzoraka sam sastrugala sterilnim nožićem i nasadila na krutu hranidbenu podlogu PDA (krumpirov dekstrozni agar, od engl. potatoe dextrose agar).

Uzorci gljive *C. parasitica* koje sam koristila u ovom istraživanju prikazani su u Tablici 1. Iz kolekcije sam odabrala tri virulentna izolata porijeklom iz okolice Lovrana: L14, D7 i D9, vc tipa EU-1. Na temelju prethodnog istraživanja kojim je utvrđen intenzitet učinka pojedinih virusnih sojeva na rast gljive *C. parasitica* na hranidbenoj podlozi i na dormantnim grančicama kestena (Krstin i sur. 2017) odabrala sam četiri hipovirulentna (bijela) izolata koji su bili nositelji različitih sojeva virusa. Originalni izolati gljiva imali su oznake CR23, M56-1, HK27 i B11, a potjecali su iz populacija Cres, Markuševac, Hrvatska Kostajnica (Hrvatska) i Brežice (Slovenija). Iste oznake sam u ovom istraživanju koristila za virusne sojeve koji su potjecali iz navedenih hipovirulentnih izolata gljive. Navedeni sojevi virusa su u prethodnim istraživanjima bili svrstani u talijanski podtip I (Krstin i sur. 2008; Krstin i sur. 2011). U istraživanju sam također koristila prototipni jaki soj virusa EP713 (Anagnostakis 1981a) francuskog F1 podtipa i virusni soj SHE30 porijeklom iz Gruzije (ustupio dr. Daniel Rigling). Za soj SHE30 pretpostavlja se da je srodan s europskim podtipovima CHV1-I i CHV1-F1 (Rigling, osobna komunikacija).

Tablica 1. Izolati gljive *Cryphonectria parasitica* korišteni u istraživanju.

Izolat gljive *C. parasitica*	Virulentan ili hipovirulentan	vc tip[a]	Podtip CHV1[b]	Država/populacija	Pretpostavljena jačina virusa	Referenca
L14	Virulentan	EU-1	-[c]	Hrvatska/Lovran	-	Ježić i sur. (2014)
D7	Virulentan	EU-1	-	Hrvatska/Lovran	-	Ježić i sur. (2014)
D9	Virulentan	EU-1	-	Hrvatska/Lovran	-	Ježić i sur. (2014)
EP713	Hipovirulentan	EU-5	F1	Francuska/Collobrières	Jaki	Chen i Nuss (1999)
M56-1	Hipovirulentan	EU-1	I	Hrvatska/Markuševac	Slabi	Krstin i sur. (2008)
CR23	Hipovirulentan	EU-1	I	Hrvatska/Cres	Jaki	Krstin i sur. (2008)
HK27	Hipovirulentan	EU-3	I	Hrvatska/Hrvatska Kostajnica	Slabi	Krstin i sur. (2008)
B11	Hipovirulentan	ND[d]	I	Slovenija/Brežice	Slabi	Krstin i sur. (2011)
SHE30	Hipovirulentan	EU-1	F1/I	Gruzija/Shemoqmedi	Srednje jaki	Neobjavljeno

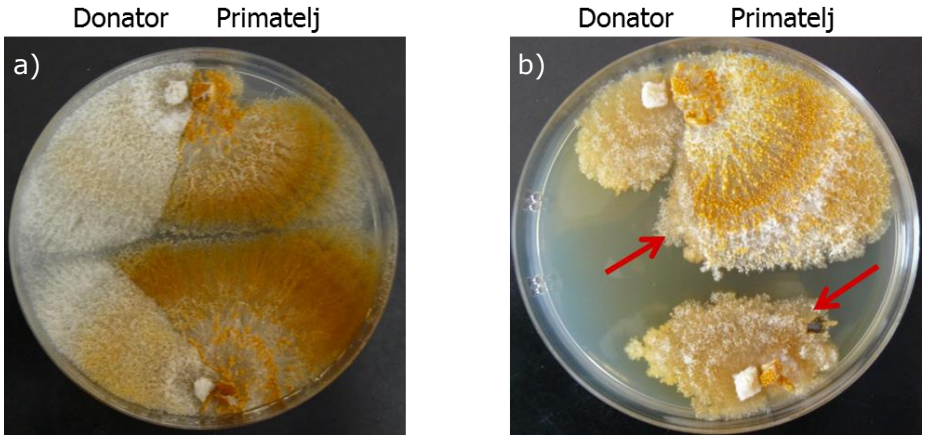
[a] Europski sustav vc klasifikacije prema Cortesi i Milgroom (1998)
[b] Podtipovi virusa CHV1 prema Allemann i sur. (1999); I – talijanski, F1 – francuski1
[c] (-) – virulentni sojevi gljive ne sadrže virus CHV1
[d] ND – nije određeno

3. 2. Laboratorijski uzgoj kultura gljive *C. parasitica*

Laboratorijske kulture gljive *C. parasitica* sam održavala na krutoj hranidbenoj podlozi PDA. Hranidbenu podlogu sam pripremala prema uputi proizvođača, otapanjem 39 g praha PDA u 1 L deionizirane vode, autoklavirala 20 minuta na 121 °C te sterilno ulila oko 10 mL podloge u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm. Kulture sam inkubirala sedam dana u fitotronu (Pol-eko aparatura) u potpunom mraku, pri 24 °C i 70% vlage, te sedam dana na danjem svjetlu i pri sobnim uvjetima temperature i vlage zraka. Kulture sam presađivala svakih 14 dana tako da sam s rubnog dijela micelija izrezala komadić agara veličine (3 × 3 × 3) mm, prenijela ga u novu Petrijevu zdjelicu okrenutog tkivom prema dolje i inkubirala kako je navedeno. Tako dobivene čiste kulture gljive koristila sam u daljnjim pokusima.

3. 3. Unos virusa CHV1 u micelij gljive *C. parasitica*

Svaki od šest virusnih sojeva trebalo je prenijeti iz originalnih hipovirulentnih izolata gljive u kojima su pronađeni (donatori virusa) u svaki od tri različita virulentna izolata gljive odabrana za istraživanje: L14, D7 i D9 (primatelji virusa). Prijenos virusa između različitih izolata gljive radila sam u Petrijevim zdjelicama promjera 90 mm, u kojima je bilo oko 15 mL PDA podloge. Iz najmlađeg dijela micelija gljive donatora izrezala sam komadić agara veličine (2 × 2 × 2) mm i položila ga u novu Petrijevu zdjelicu s tkivom prema dolje. Do njega sam na isti način postavila komadić micelija bez virusa (primatelj). Izolati su bili međusobno udaljeni 1 – 2 mm i oko 5 mm od ruba zdjelice. U svakoj zdjelici sam postavila istu kombinaciju izolata dva puta, a svaku zdjelicu sam postavila u duplikatu. Petrijeve zdjelice s postavljenim prijenosom virusa inkubirala sam sedam dana u fitotronu u potpunom mraku, pri 24 °C i 70% vlage, te sedam dana na danjem svjetlu i pri sobnim uvjetima temperature i vlage zraka. Nakon 14 dana procjenjivala sam je li došlo do prijelaza virusa iz hipovirulentnog u virulentni soj. U slučaju neuspješnog unosa virusa miceliji donatora i primatelja su bili jasno razgraničeni baražnom linijom i nije došlo do nikakve promjene u morfologiji micelija primatelja (Slika 12 a). Kod uspješnog prijelaza virusa dolazilo je do promjene morfologije primatelja, što je bilo vidljivo kao smanjenje pigmentacije i/ili kao deformiran rast micelija. (Slika 12 b).



Slika 12. Unos virusa CHV1 iz hipovirulentnog izolata gljive *Cryphonectria parasitica* (donator) u virulentni izolat (primatelj); a) neuspješni unos; b) uspješan unos; strelice pokazuju promjene u morfologiji micelija primatelja.

Kako bih potvrdila uspješnost unosa virusa u virulentni soj gljive, iz dijela transformiranog micelija sam izrezala komadić agara s tkivom veličine između (1 × 1 × 1) mm i (2 × 2 × 2) mm, postavila ga na novu Petrijevu zdjelicu promjera 60 mm i inkubirala u fitotronu u mraku, pri 24 °C i 70 % vlage, 2 – 3 dana, koliko je bilo potrebno da mladi micelij počne rasti i dosegne oko 5 mm u promjeru. Ovaj korak je bio nužan kako bih bila sigurna da tkivo u kojem dokazujem prisutnost virusne dsRNA i tkivo s kojim radim pokuse potječu iz iste linije. Nakon 2 – 3 dana sam komadić mladog micelija precijepila u Petrijevu zdjelicu s PDA podlogom prekrivenom sterilnim celofanom, promjera 90 mm. Te kulture inkubirala sam sedam dana u fitotronu u potpunom mraku, pri 24 °C i 70 % vlage, nakon čega sam prisutnost virusa u miceliju dokazivala izolacijom virusne dsRNA.

3. 4. Dokazivanje prisutnost virusa CHV1 u tkivu gljive *C. parasitica*

3. 4. 1. Izolacija virusne dsRNA

Virusnu dsRNA iz micelija uzgojenog na PDA podlozi prekrivenoj sterilnim celofanom sam izolirala pomoću komercijalnog paketa Double-RNA Viral dsRNA extraction mini kit po prilagođenom protokolu proizvođača. U ledenom sterilnom tarioniku sam usitnila 50 – 100 mg tkiva *C. parasitica* uz dodatak 100 µL Pre-buffer otopine. Nakon usitnjavanja sam dodala 1 mL otopine Lysis Buffer, prebacila tkivo u mikroepruvetu od 2 mL, promiješala na

vrtložnoj miješalici 10 sekundi (40 Hz) i ostavila na sobnoj temperaturi 5 minuta. U smjesu sam zatim dodala 200 µL kloroforma i promiješala na vrtložnoj miješalici 10 sekundi (40 Hz) te ostavila 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega sam uzorke centrifugirala pri 16438 g (Hettich Zentrifugen Mikro 220 R) 10 minuta na 4 °C. Vodenu fazu (400 µL) sam prenijela u praznu mikroepruvetu od 1,5 mL, dodala joj 400 µL otopine Binding Buffer, nježno protresla rukom 2 – 3 puta i ostavila 1 minutu na sobnoj temperaturi. Cijeli uzorak sam prenijela u mikrokolonu za centrifugu koju sam prethodno pripremila ispiranjem 2 × s 500 µL otopine Washing Buffer, te ju centrifugirala pri 16438 g 1 minutu na 4 °C. Nakon centrifugiranja filtrat sam bacila i mikrokolonu isprala 2 × s 500 µL otopine Washing Buffer, uz centrifugiranje pri 16438 g 1 minutu na 4 °C. Zatim sam membranu na mikrokoloni osušila centrifugiranjem pri 16438 g 2 minute na 4 °C. Vezanu virusnu dsRNA sam isprala s membrane dodavanjem 40 µL otopine Elution Buffer izravno na membranu i centrifugiranjem pri 16438 g 1 minutu na 4 °C. Čistoću i koncentraciju izolirane dsRNA provjeravala sam mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

3. 4. 2. Elektroforeza virusne dsRNA u agaroznom gelu

Elektroforezu izolirane genomske dsRNA virusa CHV1 sam radila u 0,7%-tnom agaroznom gelu u 0,5 × TBE puferu kroz 90 minuta pri 5,3 V/cm. Za bojanje nukleinske kiseline u gel sam dodala 0,5 × GelStar™ nucleic acid gel stain boje. Virusnu dsRNA sam vizualizirala pod UV svijetlom na transiluminatoru (Syngene). Ukoliko je na gelu bio vidljiv fragment veličine oko 12 kbp, smatrala sam da je izolat gljive uspješno inficiran željenim sojem virusa CHV1. U slučajevima u kojima takvog fragmenta nije bilo smatrala sam da nije došlo do prijelaza virusa ili da mu je koncentracija u tkivu gljive premala, te sam u tim uzorcima prisutnost virusa dokazivala reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR).

3. 4. 3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR)

Sintezu prvog lanca komplementarne cDNA virusa radila sam pomoću komercijalnog paketa GoScript™ Reverse Transcription System prema uputama proizvođača. Pomiješala sam 4 µL uzorka izolirane dsRNA i 1 µL nasumičnih početnica (0,5 µg početnica/reakciji). Smjesu sam

grijala u PCR termobloku (Applied Biosistems 2720 Thermal Cycler) 5 minuta na 70 °C nakon čega sam je prenijela u ledenu vodu na 5 minuta. Tu smjesu, ukupnog volumena 5 µL, sam pomiješala s 15 µL reakcijske smjese za RT (Tablica 2). RT reakciju sam provela u termobloku pri sljedećim uvjetima: 5 minuta na 25 °C, 60 minuta na 42 °C, 15 minuta na 70 °C, nakon čega su uzorci pohranjeni na 4 °C.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju (RT) virusne dsRNA.

Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 RT smjesu (µL)**	**Konačna koncentracija u 20 µL**
GoScript reakcijski pufer	5×	4	1×
$MgCl_2$	25 mM	4	5 mM
dNTP mix	10 mM	1	0,5 mM
Rekombinantni RNazin	40 U/µL	0,5	1 U/µL
GoScript reverzna transkriptaza	20×	1	1×
dH_2O	-	4,5	-

Prisutnost virusa sam dokazivala umnažanjem njegovih dvaju otvorenih okvira čitanja (ORF A i ORF B) reakcijom PCR prema protokolu Alleman i sur. (1999). U Tablici 3 je prikazan sastav reakcijske smjese za jednu PCR reakciju u konačnom volumenu od 25 µL. Za ORF A korištene su početnice EP713-5 i R2280, a za ORF B početnice EP713-6 i EP713-7 (Tablica 4). PCR reakciju sam provela u termobloku pri sljedećim uvjetima:

1 ×	94 °C	2:00 minute
35 ×		
	94 °C	1:00 minuta
	55 °C	1:30 minuta
	72 °C	2:00 minute
1 ×	72 °C	10:00 minuta

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom za umnažanje dvaju otvorenih okvira čitanja (ORF A i ORF B) virusa CHV1.

Sastojak	Početna koncentracija	Volumen za 1 PCR smjesu (µL)	Konačna koncentracija u 25 µL
Green GoTaq Flexi pufer	5×	5	1×
$MgCl_2$	25 mM	1,5	1,5 mM
dNTP mix	10 mM	0,5	0,2 mM
Početnica 1	10 pmol/µL	0,5	0,2 µM
Početnica 2	10 pmol/µL	0,5	0,2 µM
GoTaq DNA polimeraza	5 U/µL	0,5	0,1U/µL
Uzorak cDNA	-	1	-
dH_2O	-	15,5	-

Tablica 4. Parovi početnica za umnažanje otvorenih okvira čitanja ORF A i ORF B virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom prema Alleman i sur. (1999).

Regija DNA	Početnice	Sekvenca početnice (5'-3')	Duljina fragmenta
ORF-A	EP 713-5	TTGGATTCCCGATTCCTTCA	1439 nt
	R2280	CTTACCATCTCGCTTGACAAA	
ORF-B	EP 713-6	GCCACTTCGTGGGACAATAC	1702 nt
	EP 713-7	GGGAAGAAAGTGGACTTACC	

Nakon PCR reakcije uzorke sam čuvala na 4 °C. Umnožene PCR produkte razdvajala sam elelektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u 0,5 × TBE puferu kroz 60 minuta pri 5,3 V/cm. Za bojanje nukleinske kiseline u gel sam dodala 0,5 × GelStar^{TM} nucleic acid gel stain boje. Fragmente DNA sam vizualizirala pod UV svjetlom na transiluminatoru (Syngene). U slučaju da na gelu nisu bili vidljivi fragmenti očekivanih veličina pretpostavila sam da prijenos virusa nije bio uspješan te sam ponovila cijeli postupak unosa virusnog soja u izolat gljive. Za kontrolne virulentne izolate gljive L14, D7 i D9 također sam provela postupak izolacije i RT-PCR amplifikacije dsRNA kako bih potvrdila da u njima nema virusa. U svim PCR pokusima sam koristila odgovarajuću pozitivnu (originalni izolat gljive EP713), negativnu (virulentni izolat gljive L14) i vodenu kontrolu.

U konačnici sam dobila 21 eksperimentalnu kulturu: tri kontrolna virulentna izolata gljive L14, D7 i D9 i 18 gljiva s unesenim virusima koje sam označila „izolat gljive/soj virusa“, npr. L14/EP713.

3. 5. Trajno pohranjivanje uzoraka gljive

Kako bi uzorci gljiva s unesenim virusima bili dostupni za daljnja istraživanja pohranjivala sam ih u kolekciju uzoraka. Kulture gljive koje su rasle 14 dana na hranidbenoj PDA podlozi, od čega sedam dana na svjetlu kako bi se potaknula sporulacija, sam razrezala (zajedno s podlogom) u sterilnim uvjetima na komadiće veličine (2 × 2 × 2) mm. Komadiće sam nožićem prebacila u sterilne mikroepruvete, prekrila ih sterilnim 22%-tnim glicerolom i dobro protresla. Takve uzorke sam pohranila na -80 °C.

3. 6. Određivanje biokemijskih parametara gljive *C. parasitica*

3. 6. 1. Uzgoj eksperimentalnih kultura gljive *C. parasitica* za određivanje biokemijskih parametara i mjerenje prirasta gljive *in vitro*

Za mjerenje biokemijskih parametara gljivu sam uzgajala u Petrijevim zdjelicama promjera 90 mm s 20 mL PDA podloge prekrivene sterilnim celofanom. Prethodno sam na dnu Petrijeve zdjelice flomasterom označila osi x i y kao dva najveća međusobno okomita promjera. Komadić agara s micelijem veličine (3 × 3 × 3) mm nasadila sam u centar zdjelice na sjecište osi, s tkivom prema dolje. Svaki uzorak sam nasadila u triplikatu, a pokus sam provela dva puta. Uzorke sam inkubirala 10 dana u fitotronu u potpunom mraku, pri 24 °C i 70% vlage.

Prirast gljive sam mjerila svakih (48 ± 1) sati. Na osima x i y na dnu Petrijeve zdjelice označila sam zonu rasta gljive te joj izmjerila duljinu običnim ravnalom. Površinu micelija računala sam pomoću formule za površinu elipse $A = \pi ab$, gdje su a i b duljine poluosi elipse. Prirast gljive kroz 10 dana sam izražavala kao indeks rasta pomoću formule

$$\frac{A_{10\ dana} - A_{2\ dana}}{A_{2\ dana}}$$

Nakon 10 dana uzgoja micelij sam sastrugala s celofana u plastičnu epruvetu od 15 mL i smrznula na -80 °C preko noći. Uzorke sam zatim liofilizirala na -50 °C (liofilizator Alpha 1-2 Freeze Dryer, Christ) 24 sata. Liofilizirane uzorke sam prebacila u prethodno izvagane mikroepruvete od 2 mL i usitnila pomoću čeličnih kuglica u uređaju TissueLyser (Qiagen) protresanjem 2 minute na frekvenciji 30 Hz. Nakon usitnjavanja sam mikroepruvete s uzorkom ponovno izvagala i izračunala masu uzoraka (suha biomasa). Usitnjeno tkivo sam pohranila na -20 °C do korištenja u mjerenjima.

3. 6. 2. Ekstrakcija ukupnih proteina iz tkiva gljive *C. parasitica*

Ukupne proteine iz tkiva gljive sam ekstrahirala u hladnom ekstrakcijskom, kalij-fosfatnom puferu (100 mM s 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Na usitnjeno liofilizirano tkivo sam dodala po 1,5 mL hladnog ekstrakcijskog pufera, kratko promiješala mikro-tučkom te promiješala na vrtložnoj miješalici dok se sav prah tkiva nije disperzirao u puferu. Zatim sam uzorke centrifugirala 20 minuta na 20000 g i 4 °C. Supernatante s ekstrahiranim proteinima sam dekantirala u nove mikroepruvete i pohranila na 4 °C.

3. 6. 3. Mjerenje koncentracije ukupnih proteina

U proteinskim ekstraktima sam odredila koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu (1976). U plastičnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm stavila sam 1 mL Bradford radne otopine (Tablica 5) i 50 µL proteinskog ekstrakta, smjesu sam kratko promiješala na vrtložnoj miješalici i inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega sam mjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 595 nm (spektrofotometar Specord 40, Analytik Jena). Za nuliranje instrumenta umjesto uzorka sam koristila jednak volumen ekstrakcijskog pufera. Obzirom da je mjereni intenzitet plavog obojenja proporcionalan koncentraciji proteina potrebno je napraviti kalibracijski pravac koristeći kao standard goveđi serumski albumin (BSA, od engl. bovine serum albumin). Napravila sam niz standardnih otopina BSA koncentracija: 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL i 1,2 mg/mL, te izmjerila njihovu apsorbanciju jednako kao i za uzorke. Svaku koncentraciju BSA pripremila sam u dvije replike. Iz dobivenih apsorbancija i podataka o masenim

koncentracijama BSA standarda izračunala sam kalibracijsku krivulju koju sam koristila za računanje masene koncentracije proteina u uzorcima proteinskih ekstrakata.

Tablica 5. Sastav matične i radne otopine reagensa za mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.

Bradford matična otopina (300 mL)	
	Količina/300 mL
96%-tni etanol	100 mL
88%-tna H_3PO_4	200 mL
CBB G 250	350 mg
Bradford radna otopina (500 mL)	
	V (mL)
96%-tni etanol	15
88%-tna H_3PO_4	30
Bradford matična otopina	30
dH_2O	425

3. 6. 4. Mjerenje aktivnosti stresnih enzima

3. 6. 4. 1. Mjerenje aktivnosti glutation S-transferaze

Aktivnost GST sam mjerila spektrofotometrijski po metodi Bochettija i Regolija (2006). Metoda se temelji na konjugaciji tiolne skupine reduciranog glutationa (GSH) na supstrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) pri čemu nastaje GS-DNB konjugat (ε = 9,6 mM^{-1} cm^{-1}), što sam mjerila kao povećanje apsorbancije na 340 nm kroz 10 ciklusa po 15 sekundi. U kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm sam pipetirala 955 µL GST reakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer s 1 mM CDNB, pH 6,4), 25 µL 100 mM GSH (konačna koncentracija u reakciji 2,5 mM) i 20 µL uzorka, brzo promiješala i stavila u spektrofotometar. Za nuliranje instrumenta sam umjesto uzorka koristila 20 µL ekstrakcijskog pufera. Aktivnost GST sam računala po formuli (4), a izražavala u nmol nastalog GS-DNB u minuti po miligramu suhe biomase (sbm) [nmol GS-DNB min^{-1} mg^{-1} sbm].

$$\frac{\overline{\Delta A}(15'') \times 4 \times V_{rs} \times V_{eks}}{V_{uz} \times \varepsilon \times l \times sbm} \quad (4)$$

$\overline{\Delta A}$ (15′′) - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 sekundi

4 - faktor korekcije za izražavanje rezultata po minuti

V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1000 µl)

V_{eks} – volumen proteinskog ekstrakta (1,5 mL)

V_{uz} - volumen uzorka (20 µl)

ε - ekstinkcijski koeficijent (9,6 mM^{-1} cm^{-1})

l - duljina optičkog puta (1 cm)

sbm – suha biomasa (mg)

3. 6. 4. 2. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT sam mjerila spektrofotometrijski po metodi Aebija (1984). Metoda se temelji na razgradnji vodikovog peroksida (ε = 40 M^{-1} cm^{-1}), što sam mjerila kao smanjenje apsorbancije na 240 nm kroz 10 ciklusa po 10 sekundi. U kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm sam pipetirala 950 µL CAT reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatni pufer s 0,03%-tnim H_2O_2, pH 7,0) i 50 µL uzorka, brzo promiješala i stavila u spektrofotometar. Za nuliranje instrumenta sam koristila 950 µL reakcijskog pufera prije dodatka H_2O_2 i 50 µL ekstrakcijskog pufera umjesto uzorka. Aktivnost CAT sam računala po formuli (5), a izražavala u nmol razgrađenog H_2O_2 u minuti po miligramu suhe biomase [nmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1} sbm].

$$\frac{\overline{\Delta A}(10'') \times 6 \times V_{rs} \times V_{eks}}{V_{uz} \times \varepsilon \times l \times sbm} \quad (5)$$

$\overline{\Delta A}$ (10′′) - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi

6 - faktor korekcije za izražavanje rezultata po minuti

V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1000 µl)

V_{eks} – volumen proteinskog ekstrakta (1,5 mL)

V_{uz} - volumen uzorka (50 µl)

ε - ekstinkcijski koeficijent (40 M^{-1} cm^{-1})

l - duljina optičkog puta (1 cm)

sbm – suha biomasa (mg)

3. 6. 4. 3. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD sam mjerila spektrofotometrijski po metodi Beauchampa i Fridovicha (1971). Superoksidni ioni, koje generira sustav ksantin-ksantin oksidaza (XOD), reduciraju supstrat nitro blue tetrazolium klorid (NBT) u NBT-diformazan koji apsorbira svjetlost valne duljine 560 nm. SOD smanjuje koncentraciju superoksidnih iona i tako smanjuje količinu nastalog NBT-difomazana, što dovodi do smanjenog porasta apsorbancije. Dakle, u odsutnost SOD reakcija nastanka NBT-diformazana teče maksimalnom brzinom. Apsorbanciju sam mjerila na 560 nm kroz 7 ciklusa po 30 sekundi. U plastičnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm sam pipetirala 825 µL SOD reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatni pufer sa 75 µM NBT i 0,1 mM EDTA, pH 7,8), 75 µL 10,8 mM ksantina (konačna koncentracija u reakciji 2,5 mM), 45 µL ekstrakcijskog pufera, 50 µL 0,05 U/mL XOD (konačna koncentracija u reakciji 2,5 mU/mL) i 5 µL uzorka, brzo promiješala i stavila u spektrofotometar. Za nuliranje instrumenta sam koristila 825 µL SOD reakcijskog pufera, 75 µL 10,8 mM ksantina, 50 µL ekstrakcijskog pufera i 50 µL dH_2O. Za određivanje maksimalne brzine redukcije NBT-a u NBT-diformazan sam koristila 825 µL SOD reakcijskog pufera, 75 µL 10,8 mM ksantina, 50 µL ekstrakcijskog pufera i 50 µL 0,05 U/mL XOD.

Aktivnost SOD određivala sam preko kalibracijske krivulje koju sam dobila pomoću različitih koncentracija goveđeg SOD kao standarda (0,005 U/µL, 0,01 U/µL, 0,02 U/µL, 0,025 U/µL, 0,05 U/µL, 0,08 U/µL, 0,2 U/µL i 0,5 U/µL). Reakcija se sastojala od 825 µL SOD reakcijskog pufera, 75 µL 10,8 mM ksantina, 45 µL ekstrakcijskog pufera, 50 µL 0,05 U/mL XOD i 5 µL SOD standardne otopine. Podatke za srednju vrijednost apsorbancije u minuti sam linearizirala računajući recipročnu vrijednost $\frac{1}{\overline{\Delta A}\, min^{-1}}$, iscrtala ih u ovisnosti o koncentraciji SOD u U/µL te izračunala kalibracijski pravac. Vrijednosti za srednju vrijednost apsorbancije u minuti mjerene u uzorcima proteinskih ekstrakata sam također pretvorila u recipročne vrijednosti $\frac{1}{\overline{\Delta A}\, min^{-1}}$ te iz kalibracijske krivulje izračunala njihovu enzimsku aktivnost u U/µL. Dobivene vrijednosti sam množila s volumenom uzorka (5 µL) i podijelila sa suhom biomasom te u konačnici aktivnost SOD izrazila u mU po mg suhe biomase [mU mg^{-1} sbm].

3. 6. 5. Mjerenje ukupne aktivnosti lakaze

Aktivnost LAC sam mjerila spektrofotometrijski po metodi Bourbonnaisa i sur. (1998). Metoda se temelji na oksidaciji supstrata 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) do kationskog radikala $ABTS^{\bullet+}$ (ε = 36 mM^{-1} cm^{-1}), što sam mjerila kao povećanje apsorbancije na 418 nm kroz 10 ciklusa po 20 sekundi. U plastičnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm sam pipetirala 850 µL ABTS reakcijskog pufera (100 mM natrij-acetatni pufer, pH 3,5), 50 µL 50 mM ABTS (konačna koncentracija u reakciji 2,5 mM) i 100 µL uzorka, brzo promiješala i stavila u spektrofotometar. Za nuliranje instrumenta sam umjesto uzorka koristila 100 µL ekstrakcijskog pufera. Aktivnost LAC sam računala po formuli (6), a izražavala u nmol nastalog $ABTS^{\bullet+}$ u minuti po miligramu suhe biomase [nmol $ABTS^{\bullet+}$ min^{-1} mg^{-1} sbm].

$$\frac{\overline{\Delta A}(20'') \times 3 \times V_{rs} \times V_{eks}}{V_{uz} \times \varepsilon \times l \times sbm} \quad (6)$$

$\overline{\Delta A}\,(20'')$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 20 sekundi
3 - faktor korekcije za izražavanje rezultata po minuti
V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1000 µl)
V_{eks} – volumen proteinskog ekstrakta (1,5 mL)
V_{uz} - volumen uzorka (100 µl)
ε - ekstinkcijski koeficijent (36 mM^{-1} cm^{-1})
l - duljina optičkog puta (1 cm)
sbm – suha biomasa (mg)

3. 6. 6. Statistička obrada podataka o aktivnosti enzima

Statističku obradu podataka provela sam u računalnom programu Statistica 13 (StatSoft Inc., USA). Prvo sam testirala zadovoljavaju li podaci parametrijske kriterije normalne raspodijele (Shapiro-Wilks-ovim testom) i homogenosti varijance (Levaneovim testom). Obzirom da parametrijski kriteriji nisu bili zadovoljeni provela sam transformaciju podataka korjenovanjem. Podaci o aktivnosti SOD su nakon transformacije zadovoljavali parametrijske kriterije te sam provela jednosmjernu analizu varijance (ANOVA), nakon koje sam statističku

značajnost testirala post-hoc Newman-Keuls-ovim testom. Obzirom da podaci za ostale parametre (prirast, aktivnost GST, CAT i LAC) nisu zadovoljavali parametrijske kriterije niti nakon transformacije, analizirala sam netransformirane podatke neparametrijskim metodama i testirala neparametrijskim Kruskal-Wallis-ovim testom. Sve statističke testove sam provodila na razini značajnosti $p < 0,05$.

Podatke sam grupirala i analizirala tako da mogu procijeniti i) utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive, te ii) utjecaj istog virusnog soja na razne izolate gljive. U analizama pod i) sam uspoređivala vrijednosti dobivene za hipovirulentne kulture jednog izolata gljive s vrijednostima dobivenim za kontrolne virulentne kulture istog izolata gljive. U analizama pod ii) sam uspoređivala vrijednosti kontrolnih virulentnih izolata međusobno, te međusobno vrijednosti hipovirulentnih kultura inficiranih istim virusnim sojem. Podatke sam prikazala kao srednju vrijednost šest mjerenja s pripadajućim standardnim pogreškama. Kako bih odredila opći utjecaj pojedinog virusnog soja bez obzira na izolat gljive kojeg inficira, podatke za sve izolate gljiva inficirane istim virusnim sojem (npr. L14/CR23, D7/CR23 i D9/CR23) sam grupirala zajedno te usporedila virusne sojeve međusobno. U ovom slučaju podatke sam prikazala kao srednju vrijednost 18 mjerenja s pripadajućim standardnim pogreškama i standardnim devijacijama. Kako bih utvrdila postoji li korelacija između prirasta gljive i aktivnosti GST, CAT i SOD, te između aktivnosti enzima međusobno izračunala sam neparametrijski Spearmanov R (RS) koeficijent korelacije.

3. 6. 7. Razdvajanje i detekcija proteina nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

Sastav izoenzima GST, CAT, SOD i LAC određivala sam razdvajanjem proteina iz proteinskih ekstrakata gljive *C. parasitica* vertikalnom diskontinuiranom nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu – PAGE (Laemmli 1970). Proteine sam razdvajala pomoću sustava za elektroforezu Protean II xi Cell (Bio-Rad), s dimenzijama gela 16 cm × 20 cm. Koristila sam 5%-tni gel za sabijanje, te 8%-tni (GST i CAT) i 12%-tni gel za razdvajanje (SOD i LAC). Sastav matičnih otopina korištenih za pripremu gelova za sabijanje i razdvajanje prikazan je u Tablici 6. U gelu za sabijanje maseni udio akrilamida (m/v) je bio 5%, maseni udio bis-akrilamida (w/v) 2,6%, a sadržavao je još 25% (v/v) 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1%-tni (m/v) amonijev persulfat (APS) i 0,1%-tni (v/v) tetrametiletilendiamin

(TEMED). U 8%-tnom gelu za razdvajanje maseni udio akrilamida (m/v) je bio 8%, maseni udio bis-akrilamida (w/v) 2,6%, a sadržavao je još 25% (v/v) 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1%-tni (m/v) APS i 0,06%-tni (v/v) TEMED. U 12%-tnom gelu za razdvajanje maseni udio akrilamida (m/v) je bio 12%, maseni udio bis-akrilamida (w/v) 2,6%, a sadržavao je još 25% (v/v) 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1%-tni (m/v) APS i 0,04%-tni (v/v) TEMED. Tablica 7 prikazuje točan sastav gelova za sabijanje i razdvajanje. Elektrodni pufer (pH 8,3) je dobiven razrjeđivanjem 10 × elektrodnog pufera (Tablica 7) 10 puta, i u konačnici je sadržavao 20 mM Tris i 150 mM glicin.

Tablica 6. Matične otopine potrebne za pripremu gelova za sabijanje i razdvajanje za nedenaturirajuću elektroforezu u poliakrilamidnom gelu.

30% (m/v) akrilamid/bis-akrilamid (AA/Bis)	
	Količina/100 mL
Akrilamid	29,2 g
Bis-akrilamid	0,8 g
dH_2O	do 100 mL
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	
	Količina/100 mL
Tris	18,2 g
6,0 M HCl	Titrirati do pH 8,8
dH_2O	do 100 mL
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	
	Količina/100 mL
Tris	6,0 g
6,0 M HCl	Titrirati do pH 6,8
dH_2O	do 100 mL
10% (m/v) amonijev peroksodisulfat (APS)	
	Količina/5 mL
APS	500 mg
dH_2O	do 5 mL

Tablica 7. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje, te 10 × elektrodnog pufera za nedenaturirajuću elektroforezu u poliakrilamidnom gelu.

Gel za sabijanje (5%)	
	mL/10 mL
30% AA/Bis	1,7
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	2,5
10% APS	0,1
TEMED	0,01
dH_2O	5,8
Gel za razdvajanje (8%)	
	mL/50 mL
30% AA/Bis	13,4
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5
10% APS	0,5
TEMED	0,03
dH_2O	23,2
Gel za razdvajanje (12%)	
	mL/50 mL
30% AA/Bis	20,0
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5
10% APS	0,5
TEMED	0,02
dH_2O	16,4
10 × Elektrodni pufer; pH 8,3	
	g/1000 mL
Tris (200 mM)	24,0
Glicin (1,5 M)	114,0
6,0 M HCl	Titrirati do pH 8,3
dH_2O	Do 1000 mL

U jažice gela sam pomoću „Hamilton“ igle nanosila odgovarajući volumen proteinskog ekstrakta potreban da u svakoj jažici bude po 70 μg proteina. Obzirom da su proteinski ekstrakti bili viskozni i lagano žuto obojeni, prilikom nanošenja uzoraka nisam koristila pufer za nanošenje uzorka. U srednju jažicu sam nanijela 15 μL proteinskog markera ColorBurst Electrophoresis Marker, molekularne mase 8-220 kDa. Elektroforezu sam provodila na 4 °C, prvo na 100 V 1 sat, a zatim na 200 V oko 3 sata (izvor napajanja PowerPac 1000, Bio-Rad). Nakon elektroforeze gelove sam inkubirala na sobnoj temperaturi u odgovarajućem puferu (ili puferima) kako bih vizualizirala tražene enzime.

3. 6. 7. 1. Bojenje izoenzima u gelu

Izoenzime GST sam bojila po metodi Riccija i sur. (1984). Gel sam kondicionirala u (1) 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 6,5) 10 minuta na sobnoj temperaturi, odlila pufer i inkubirala gel u (2) kalij-fosfatnom reakcijskom puferu (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 6,5; 4,5 mM GSH; 1 mM CDNB; 1 mM NBT) 10 minuta na sobnoj temperaturi, odlila pufer i inkubirala gel u (3) Tris/HCl reakcijskom puferu [100 mM Tris/HCl, pH 9,6; 3 mM fenazin metosulfat (PMS)] do pojave zadovoljavajućeg kontrasta bezbojnih linija GST aktivnosti u odnosu na tamno plavu pozadinu.

Izoenzime CAT sam bojila po metodi Woodburya i sur. (1971). Gel sam isprala 3 × 15 minuta u dH_2O. Zatim sam ga inkubirala 10 minuta u (1) 5 mM otopini H_2O_2, kratko isprala gel u dH_2O i inkubirala ga u (2) otopini 1% $K_3[Fe(CN)_6)]$/1% $FeCl_3$ (m/v) do pojave zadovoljavajućeg kontrasta žutih linija CAT aktivnosti u odnosu na tamno zelenu pozadinu.

Izoenzime SOD sam bojila po metodi Beauchampa i Fridovicha (1971). Gel sam inkubirala 25 minuta na sobnoj temperaturi u (1) 50 mM kalij-fosfatnom puferu s 2,45 mM NBT (pH 7,8). Zatim sam odlila pufer (1) i inkubirala gel u (2) kalij-fosfatnom reakcijskom puferu (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,8; 28 μM riboflavin; 28 mM TEMED) 15 minuta u mraku, te do 20 minuta na jakom svjetlu, do pojave zadovoljavajućeg kontrasta bezbojnih linija SOD aktivnosti u odnosu na plavu pozadinu.

Izoenzime LAC sam bojila po metodi Patela i sur. (2014). Gel sam prvo kratko isprala u dH_2O. Zatim sam ga inkubirala u 100 mM natrij-acetatnom puferu s 2,5 mM ABTS (pH 3,5), 20-30 minuta na sobnoj temperaturi do zadovoljavajuće vidljivosti zelenih linija LAC aktivnosti na prozirnom gelu.

3. 6. 7. 2. Obrada rezultata nedenaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu

Sve gelove nakon bojenja sam digitalizirala pomoću skenera HP Scanjet G2410. Dobivene slike gelova sam analizirala u programu GelAnalyzer10, koji određuje prisutnost linija na gelu te računa njihovo relativno retencijsko vrijeme (Rf vrijednost; omjer između puta koji je prešla tražena linija u odnosu na frontu uzorka) i intenzitet obojenja (osvjetljenja) za svaku liniju. Intenzitet obojenja nam daje podatke o relativnom odnosu između aktivnosti enzima u

različitim uzorcima, ali apsolutnu vrijednost aktivnosti nisam mogla odrediti s obzirom da nisam imala kontrolne vrijednosti čistih enzima pomoću kojih bi se mogla napraviti kalibracija.

3. 7. Analiza metilacije genoma gljive *C. parasitica* metodom MSAP

3. 7. 1. Uzgoj eksperimentalnih kultura gljive *C. parasitica* za MSAP

Za izolaciju genomske DNA iz tkiva *C. parasitica* gljivu sam uzgajala u Petrijevim zdjelicama promjera 60 mm s 10 mL PDA podloge prekrivene sterilnim celofanom. Svaki uzorak sam nasadila u četiri replike. Uzorke sam inkubirala 10 dana u fitotronu u potpunom mraku, pri 24 °C i 70% vlage. Nakon 10 dana uzgoja micelij sam sastrugala s celofana u plastičnu epruvetu od 15 mL i smrznula na -80 °C preko noći. Uzorke sam zatim liofilizirala na -50 °C (liofilizator Alpha 1-2 Freeze Dryer, Christ) 24 sata. Liofilizirane uzorke sam prebacila u mikroepruvete od 2 mL i usitnila pomoću čeličnih kuglica u uređaju TissueLyser (Qiagen) protresanjem 2 minute na frekvenciji 30 Hz. Do izolacije genomske DNA usitnjeno tkivo sam pohranila na -20 °C.

3. 7. 2. Izolacija genomske DNA iz tkiva gljive

Izolaciju genomske DNA iz tkiva gljive *C. parasitica* radila sam po modificiranom protokolu Allemanna i sur. (1999). Sastav svih otopina korištenih pri izolaciji prikazan je u Tablici 8. U mikroepruvetu od 2 mL sam odvagala 3-5 mg liofiliziranog tkiva, dodala mu 800 µL 2×STE/10% SDS pufera (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0, 10% m/v SDS) kratko promiješala na vrtložnoj miješalici te dodala 800 µL smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol (12:12:1) (v/v). Smjesu sam snažno miješala na vrtložnoj mješalici 3 × 10 sekundi pa centrifugirala pri 5000 g 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 350 µL vodene faze sam otpipetirala u novu mikroepruvetu od 2 mL i dodala joj jednak volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol (24:1) (v/v), mikroepruvetu snažno promiješala rukom i centrifugirala pri 5000 g 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 300 µL vodene faze sam otpipetirala u novu mikroepruvetu od 2 mL, dodala jednak volumen

izopropanola, snažno promiješala rukom i centrifugirala pri 15000 g 20 minuta na 4 °C. Zatim sam supernatant pažljivo odlila, a talog DNA isprala s 500 µL 70%-tnog ledeno hladnog etanola, lagano promućkala, pa centrifugirala pri 15000 g 3 minute na 4 °C. Supernatant sam odlila, a talog osušila u termo-bloku Thermomixer comfort (Eppendorf) 10 minuta na 60 °C. Osušeni talog sam otopila u 50 µL sterilne deionizirane vode i ostavila na 4 °C preko noći kako bi se nukleinske kiseline u potpunosti otopile. Idući dan sam mjerila koncentraciju izolirane genomske DNA spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

Tablica 8. Sastav otopina korištenih pri izolaciji genomske DNA iz tkiva gljive *Cryphonectria parasitica.*

10 × STE pufer; pH 8,0 (0,1 M Tris, 1 M NaCl, 10 mM EDTA)	
	g/1000 mL
Tris	12,114
NaCl	58,442
EDTA	2,92
HCl	Titrirati do pH 8,0
dH_2O	do 1000 mL
2×STE/10% SDS pufer	
	Količina/100 mL
SDS	10 g
10 × STE pufer	20 mL
dH_2O	do 100 mL
Fenol/kloroform/izoamilni alkohol (12:12:1) (v/v)	
	mL/100 mL
Fenol (pH 7,0)	48
Kloroform	48
Izoamilni alkohol	4
Kloroform/izoamilni alkohol (24:1) (v/v)	
	mL/100 mL
Kloroform	96
Izoamilni alkohol	4

3. 7. 3. Provedba metode MSAP

i) Restrikcija i ligacija

Obzirom da uzvodni i nizvodni lanac adaptera dolaze u odvojenim otopinama, prvo sam provela reakciju sparivanja lanaca adaptera na temelju komplementarnosti (Slika 13), i to posebno za *Eco*RI adapter i posebno za *Msp*I/*Hpa*II adapter. Konačna koncentracija svakog lanca adaptera u smjesi za *Eco*RI adapter je bila 2,5 μM, a u smjesi za *Msp*I/*Hpa*II adapter 25 μM. Smjesu sam grijala na 95 °C, 7 minuta, te ohladila na sobnu temperaturu kroz 10 minuta. Tako pripremljene adaptere sam koristila u restrikcijsko-ligacijskoj smjesi (Tablica 9, 2a i 2b).

a) *Eco*RI adapter

```
5'  C  T  C  G  T  A  G  A  C  T  G  C  G  T  A  C  C              3'
3'              C  A  T  C  T  G  A  C  G  C  A  T  G  G  T  T  A  A  5'
```

b) *Msp*I/*Hpa*II adapter

```
5'  G  A  T  C  A  T  G  A  G  T  C  C  T  G  C  T        3'
3'        A  G  T  A  C  T  C  A  G  G  A  C  G  A  G  C  5'
```

Slika 13. Adapteri koji se vežu na ljepljive krajeve DNA dobivene restrikcijskim endonukleazama *Eco*RI (a) i *Msp*I/*Hpa*II (b).

Nakon pripreme adaptera pripremila sam smjesu restrikcijskih enzima *Eco*RI-*Msp*I (Tablica 9, 1a) i *Eco*RI-*Hpa*II (Tablica 9, 1b), te restrikcijsko-ligacijsku smjesu za *Eco*RI-*Msp*I (Tablica 9, 2a) i *Eco*RI-*Hpa*II (Tablica 9, 2b). Konačne koncentracije u restrikcijsko-ligacijskim smjesama 2a i 2b, nakon dodavanja smjesa 1a, odnosno 1b, su bile: 1 × T4 pufer, 50 mM NaCl, 0,05 mg/mL BSA, 0,45 U/μL *Eco*RI, 0,18 U/μL *Msp*I (odnosno *Hpa*II), 0,091 U/μL T4 ligaza, 0,23 μM *Eco*RI adapter i 2,27 μM *Msp*I/*Hpa*II adapter. Konačni volumen restrikcijsko-ligacijske smjese je bio 33 μL, od čega je 16,5 μL bio uzorak genomske DNA koji je sadržavao 100 ng/μL DNA. Sve reakcije sam radila u PCR pločicama s 96 jažica. Unutar svake pločice sam imala dvije negativne vodene kontrole, tri ponovljena uzorka kao pozitivnu kontrolu ponovljivosti reakcija unutar pločice, te još tri ponovljena uzorka kao pozitivnu kontrolu ponovljivosti reakcija između pločica. Nakon miješanja uzorka i

restrikcijsko-ligacijske smjese pločice sam centrifugirala pri 5000 g, 1 minutu na sobnoj temperaturi (centrifuga Sigma 4-16 KS), te provela reakciju restrikcije i ligacije u PCR termobloku (Applied Biosistems 2720 Thermal Cycler), inkubirajući pločicu 2 sata na 37 °C i 14 sati na 23 °C.

Tablica 9. Sastav reakcijskih smjesa korištenih u prvom koraku MSAP reakcije, reakciji restrikcije i ligacije.

(1a) Smjesa restrikcijskih enzima *Eco*RI-*Msp*I			
Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 restrikcijsko-ligacijsku reakciju (µL)**	**Konačna koncentracija u 3 µL**
10 × T4 pufer	10 ×	0,3	1 ×
NaCl	500 mM	0,3	50 mM
BSA	1 mg/mL	0,15	0,05 mg/mL
*Eco*RI	50 U/µL	0,3	5 U/µL
*Msp*I	100 U/µL	0,06	2 U/µL
T4 ligaza	30 U/µL	0,1	1 U/µL
dH_2O	-	1,79	-
(1b) Smjesa restrikcijskih enzima *Eco*RI-*Hpa*II			
Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 restrikcijsko-ligacijsku reakciju (µL)**	**Konačna koncentracija u 3 µL**
10 × T4 pufer	10 ×	0,3	1 ×
NaCl	500 mM	0,3	50 mM
BSA	1 mg/mL	0,15	0,05 mg/mL
*Eco*RI	50 U/µL	0,3	5 U/µL
*Hpa*II	50 U/µL	0,12	2 U/µL
T4 ligaza	30 U/µL	0,1	1 U/µL
dH_2O	-	1,73	-

Tablica 9. – nastavak

(2a) Restrikcijsko-ligacijska smjesa za *Eco*RI-*Msp*I			
Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 reakciju (µL)**	**Konačna koncentracija u 33 µL**
10 × T4 pufer	10 ×	3	0,91 ×
NaCl	500 mM	3	45,45 mM
BSA	1 mg/mL	1,5	0,045 mg/mL
*Eco*RI adapter	2,5 µM	3	0,23 µM
*Msp*I/*Hpa*II adapter	25 µM	3	2,27 µM
Smjesa restrikcijskih enzima s *Msp*I (1a)	-	3	-
Uzorak DNA	100 ng	16,5	50 ng
dH_2O	-	1,73	-
(2b) Restrikcijsko-ligacijska smjesa za *Eco*RI-*Hpa*II			
Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 reakciju (µL)**	**Konačna koncentracija u 33 µL**
10 × T4 pufer	10 ×	3	0,91 ×
NaCl	500 mM	3	45,45 mM
BSA	1 mg/mL	1,5	0,045 mg/mL
*Eco*RI adapter	2,5 µM	3	0,23 µM
*Msp*I/*Hpa*II adapter	25 µM	3	2,27 µM
Smjesa restrikcijskih enzima s *Hpa*II (1b)	-	3	-
Uzorak DNA	100 ng	16,5	50 ng

ii) Predselektivna amplifikacija

Nakon reakcije restrikcije i ligacije uzorke sam razrijedila destiliranom vodom 12 ×, lagano promiješala na vrtložnoj miješalici i centrifugirala pri 5000 g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Po 4 µL tako razrijeđenog uzorka sam pipetirala u 16 µL smjese za predselektivnu amplifikaciju (Tablica 10), tako da je ukupni volumen reakcije predselektivne amplifikacije bio 20 µL. Koristila sam par početnica bez selektivnih nukleotida: *Eco*RI (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') i *Msp*I/*Hpa*II (5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3'). Nakon miješanja uzorka i smjese za predselektivnu amplifikaciju pločice sam centrifugirala pri 5000

g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Predselektivnu PCR reakciju provela sam pri sljedećim uvjetima:

1 ×	94 °C	2:00 minute
20 ×		
	94 °C	0:20 minuta
	56 °C	0:30 minuta
	72 °C	2:00 minute
1 ×	60 °C	30:00 minuta

Tablica 10. Sastav reakcijskih smjesa korištenih u drugom koraku MSAP reakcije, predselektivnoj amplifikaciji.

Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za 1 PCR smjesu (µL)**	**Konačna koncentracija u 20 µL**
10 × PCR pufer	10 ×	2	1 ×
dNTP mix	2,5 mM	1,6	0,2 mM
Početnica 1	10 pmol/µL	1,2	0,6 µM
Početnica 2	10 pmol/µL	1,2	0,6 µM
HotStart Taq polimeraza	5 U/µL	0,1	0,025 U/µL
Uzorak	-	4	-
dH_2O	-	9,9	-

iii) Selektivna amplifikacija

Nakon predselektivne amplifikacije uzorke sam razrijedila destiliranom vodom 24 ×, lagano promiješala na vrtložnoj miješalici i centrifugirala pri 5000 g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Po 4 µL tako razrijeđenog uzorka sam pipetirala u 16 µL smjese za selektivnu amplifikaciju (Tablica 11), tako da je ukupni volumen reakcije selektivne amplifikacije bio 20 µL. Koristila sam četiri početnice za *Eco*RI označene fluorescencijskim bojama, te jednu početnicu za *Msp*I/*Hpa*II koja nije bila fluorescencijski označena. Nakon miješanja uzorka i smjese za selektivnu amplifikaciju pločice sam centrifugirala pri 5000 g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Selektivnu PCR reakciju provela sam pri sljedećim uvjetima:

1 ×	94 °C	2:00 minute
10 ×		
	94 °C	0:20 minuta
	66 °C	0:30 minuta (spuštanje po 1 °C u svakom ciklusu)
	72 °C	2:00 minute
20 ×		
	94 °C	0:20 minuta
	56 °C	0:30 minuta
	72 °C	2:00 minute
1 ×	60 °C	30:00 minuta

Tablica 11. Sastav reakcijskih smjesa korištenih u trećem koraku MSAP reakcije, selektivnoj amplifikaciji.

Sastojak	Početna koncentracija	Volumen za 1 PCR smjesu (µL)	Konačna koncentracija u 20 µL
10 × PCR pufer	10 ×	2	1 ×
dNTP mix	2,5 mM	1,6	0,2 mM
FAM-*Eco*RI + AT (plava)	5 pmol/µL	1,1	0,275 µM
NED-*Eco*RI + AC (žuta)	5 pmol/µL	1,1	0,275 µM
VIC-*Eco*RI + AAG (zelena)	5 pmol/µL	1,1	0,275 µM
PET-*Eco*RI + ACC (crvena)	5 pmol/µL	1,1	0,275 µM
*Msp*I/*Hpa*II + CTG	10 pmol/µL	1,1	0,55 µM
HotStart Taq polimeraza	5 U/µL	0,1	0,025 U/µL
Uzorak	-	4	-
dH_2O	-	6,8	-

3. 7. 4. Analiza epigenetičkih podataka dobivenih metodom MSAP

Za određivanje veličine dobivenih fragmenata koristila sam komercijalnu uslugu GenScan u Macrogenu (Koreja), koja se provodi kapilarnom elektroforezom na DNA analizatoru ABI3730 xl (Applied Biosystems). Podatke o prisutnosti/odsutnosti fragmenata određenih veličina, dobivene od Macrogena, sam analizirala programskim paketom GeneMapper 5.0 (Applied Biosytems). Donju graničnu vrijednost visine fragmenta (peak) postavila sam na 100

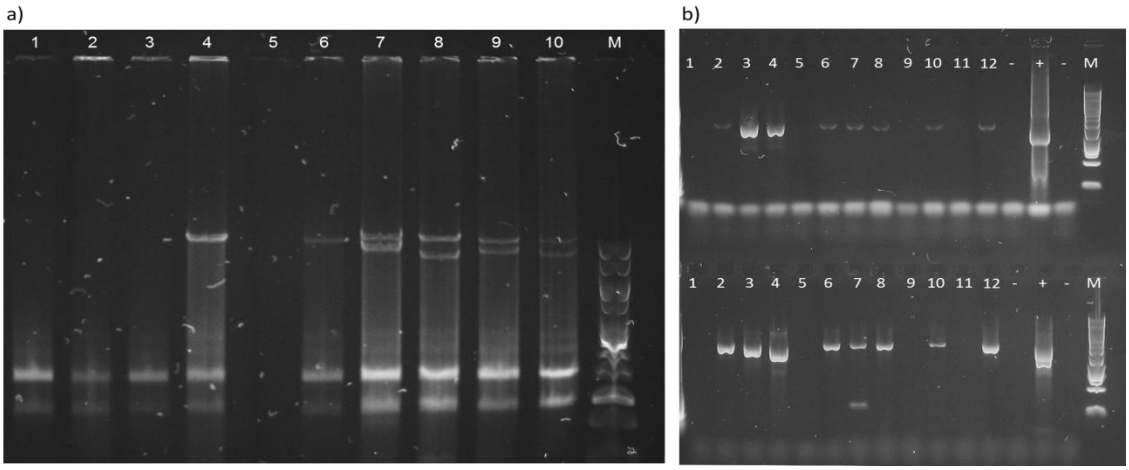
rfu (relativnih fluorescencijskih jedinica). GenMapper automatski prisutnost MSAP fragmenta određene duljine prevodi u 1, odnosno odsutnost u 0, te tako formira binarne tablice (matrice). Tako dobivene matrice sam dalje obradila programskim alatima scanAFLPv1-2.r (Herrmann i sur. 2010) i MSAP_calc.r (Schulz i sur. 2013) baziranim na računalnom jeziku R (R Developement Core Team 2009). Programski alat scanAFLPv1-2.r određuje stopu pogreške dobivenih fragmenata po paru početnica. MSAP_calc.r transformira primarne MSAP podatke u binarne epigenetičke lokuse i računa deskriptivne parametre epigenetičke varijabilnosti (postotak ukupnih i privatnih markera, postotak polimorfnih markera i srednju vrijednost Shannonovog informacijskog indeksa *H'*). U programu MSAP_calc.r koristila sam pristup mješovitog vrednovanja fragmenata („Mixed scoring 2“) prema Schulzu i sur. (2013), koji razlikuje metilirane (m), hemi-metilirane (h) i nemetilirane (u) subepilokuse.

Kako bih mogla utvrditi statističku značajnost u razlikama između Shannonovih informacijskih indeksa prvo sam u Excelu (Microsoft, USA) izračunala *H'* za svaki pojedini marker unutar populacije (populacijom sam smatrala pojedinu kombinaciju gljiva/virus), te s dobivenim vrijednostima provela statističku analizu u programu Statistica 13 (StatSoft Inc., USA). Podatke sam grupirala i analizirala tako da mogu procijeniti i) utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive, te ii) utjecaj istog virusnog soja na razne izolate gljive. U analizama pod i) sam uspoređivala vrijednosti dobivene za hipovirulentne kulture jednog izolata gljive s vrijednostima dobivenim za kontrolne virulentne kulture istog izolata gljive. U analizama pod ii) sam uspoređivala vrijednosti kontrolnih virulentnih izolata međusobno, te međusobno vrijednosti hipovirulentnih kultura inficiranih istim virusnim sojem. Koristila sam opći linearni model (GLM, od engl. general linear model) i jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) nakon koje sam statističku značajnost testirala post-hoc Bonferronijevim testom na razini značajnosti $p < 0,05$. Odnose među individualnim uzorcima sam prikazala pomoću analize glavnih koordinata (PCoA, od engl. proncipal coordinates analysis) u programu Past3 (Hammer i sur. 2001). Koristila sam Dice indeks sličnosti i transformacijski eksponent $c = 2$.

4. REZULTATI

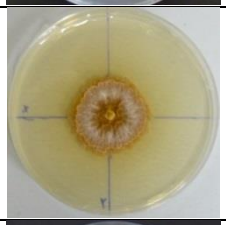
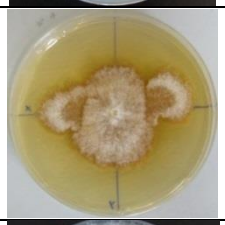
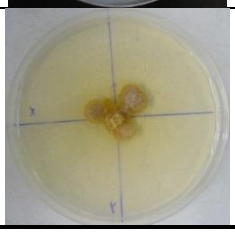
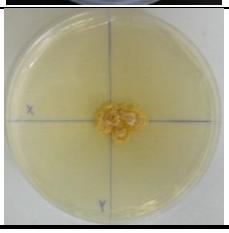
4. 1. Uspješnost prijenosa virusa i morfologija hipovirulentnih kultura gljive *C. parasitica*

Metodom anastomoze hifa svih šest istraživanih sojeva virusa CHV1 inficiralo je sva tri virulentna izolata gljive *C. parasitica*. Uspješnost prijenosa virusa potvrđena je izolacijom virusne dvolančane RNA (Slika 14 a) i/ili umnožavanjem virusnih ORF-a A i B lančanom reakcijom polimerazom (Slika 14 b). U konačnici je dobivena 21 eksperimentalna kultura: tri kontrolna virulentna izolata gljive bez virusa (L14, D7 i D9), te 18 kombinacija gljiva s unesenim virusima, označenih kao „izolat gljive/soj virusa“, npr. L14/EP713. Dobivene eksperimentalne kulture s unesenim virusima imale su hipovirulentni fenotip, a njihova morfologija prikazana je u Tablici 12.



Slika 14. Dokazivanje prisutnosti virusa CHV1 u miceliju gljive *Cryphonectria parasitica* nakon prijenosa virusa iz hipovirulentnog u virulentni izolat gljive. **M** = standard za određivanje molekularne mase GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); **a)** Elektroforeza virusne dsRNA u 0,7%-tnom agaroznom gelu u uzorcima: **1** = L14, **2** = D7, **3** = D9, **4** = L14/CR23, **5** = D7/CR23, **6** = D9/CR23, **7** = L14/HK27, **8** = D7/HK27, **9** = D9/HK27, **10** = L14/M56-1; **b)** Elektroforeza PCR produkata ORF A (gore) i ORF B (dolje) virusa CHV1 u 1%-tnom agaroznom gelu u uzorcima: **1** = L14, **2** = L14/CR23, **3** = L14/EP713, **4** = L14/HK27, **5** = D7, **6** = D7/CR23, **7** = D7/EP713, **8** = D7/HK27, **9** = D9, **10** = D9/CR23, **11** = D9/EP713 (replika u kojoj je prijenos virusa bio neuspješan), **12** = D9/HK27, **(-)** = negativna kontrola reverzne transkripcije, **(+)** = pozitivna kontrola za PCR (originalni izolat gljive EP713), **(-)** = vodena kontrola za PCR.

Tablica 12. Morfologija eksperimentalnih kultura gljive *Cryphonectria parasitica* nakon 10 dana rasta na hranidbenoj podlozi PDA prekrivenoj sterilnim celofanom.

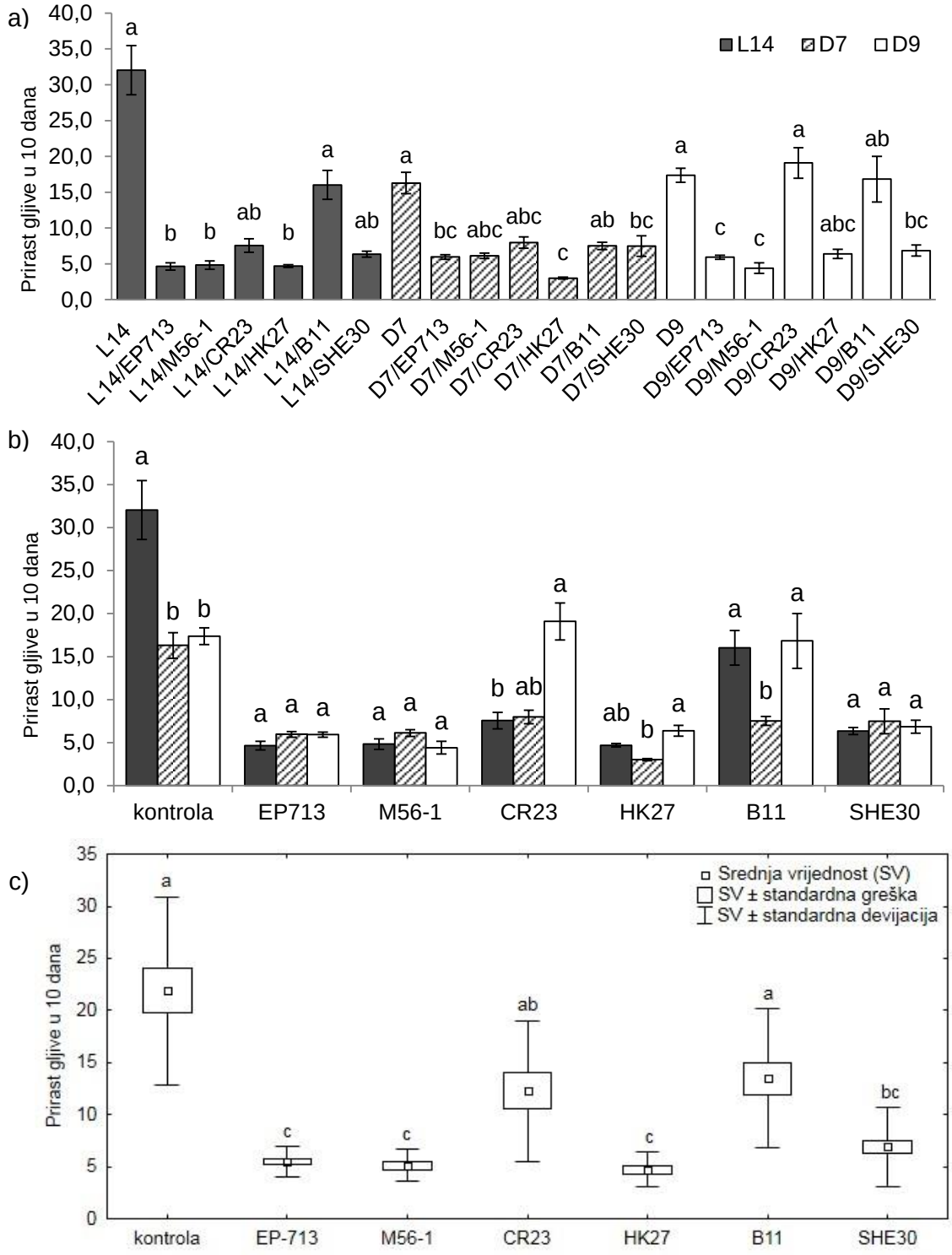
GLJIVA / VIRUS	L14	D7	D9
Kontrola (bez virusa)			
EP713			
M56-1			
CR23			
HK27			
B11			
SHE30			

4. 2. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na prirast kultura gljive *C. parasitica in vitro*

U većini izolata gljive s unesenim različitim sojevima virusa, osim u uzorcima L14/B11, D9/CR23 i D9/B11, bio je vidljiv učinak infekcije virusom CHV1 na smanjenje stope prirasta kultura gljive *C. parasitica* (Tablica 12, Slika 15 a). I sami kontrolni izolati gljive su se međusobno statistički značajno razlikovali: izolat L14 je rastao skoro dva puta brže od izolata D7 i D9 koji su imali podjednake stope prirasta (Slika 15 b). Međutim, sva tri izolata gljive su imala podjednake stope prirasta kada su bili inficirani virusnim sojevima EP713, M56-1 i SHE30, što upućuje na to da je izolat gljive L14 dvostruko osjetljiviji na infekciju tim virusnim sojevima nego izolati D7 i D9. Različita osjetljivost izolata gljive na infekciju istim virusnim sojevima može se primijetiti i kod utjecaja virusnog soja B11 na izolate gljive D7 i D9: stope prirasta uzoraka D7/B11 i D9/B11 su se statistički značajno razlikovale upućujući na veću osjetljivost izolata D7 na infekciju ovim virusnim sojem (Slika 15 b).

Analiza rezultata za svaki pojedinačni izolat gljive pokazuje da niti jedan virusni soj nije u svim izolatima gljive konzistentno imao najjači učinak (Slika 15 a). Iako je virusni soj HK27 imao najsnažniji učinak u izolatima L14 (L14/HK27) i D7 (D7/HK27), statistički gledano taj učinak nije bio jači nego onaj nekih drugih sojeva (npr. EP713 u L14/EP713 ili D7/EP713). U izolatu D9 najjači utjecaj na smanjenje prirasta su imali sojevi M56-1 (D9/M56-1) i EP713 (D9/EP713). Virusni sojevi B11 i CR23 su imali najblaži učinak na smanjenje prirasta koji nije niti bio statistički značajan. Taj blagi učinak ovih sojeva je posebno vidljiv na izolatu gljive D9 gdje su kulture gljive zaražene tim sojevima (D9/CR23 i D9/B11) imale podjednaku stopu prirasta kao i kontrolne kulture.

Analiza općeg utjecaja pojedinog virusnog soja, dobivena grupiranjem podataka za sve izolate gljiva inficirane istim virusnim sojem, daje sliku o snazi utjecaja pojedinog virusnog soja bez obzira na to u kojem izolatu gljive se nalazi. Rezultati pokazuju da su virusni sojevi EP713, M56-1, HK27 i SHE30 značajno smanjivali prirast gljive *C. parasitica*, dok za virusne sojeve CR23 i B11 taj učinak nije bio statistički značajan (Slika 15 c).



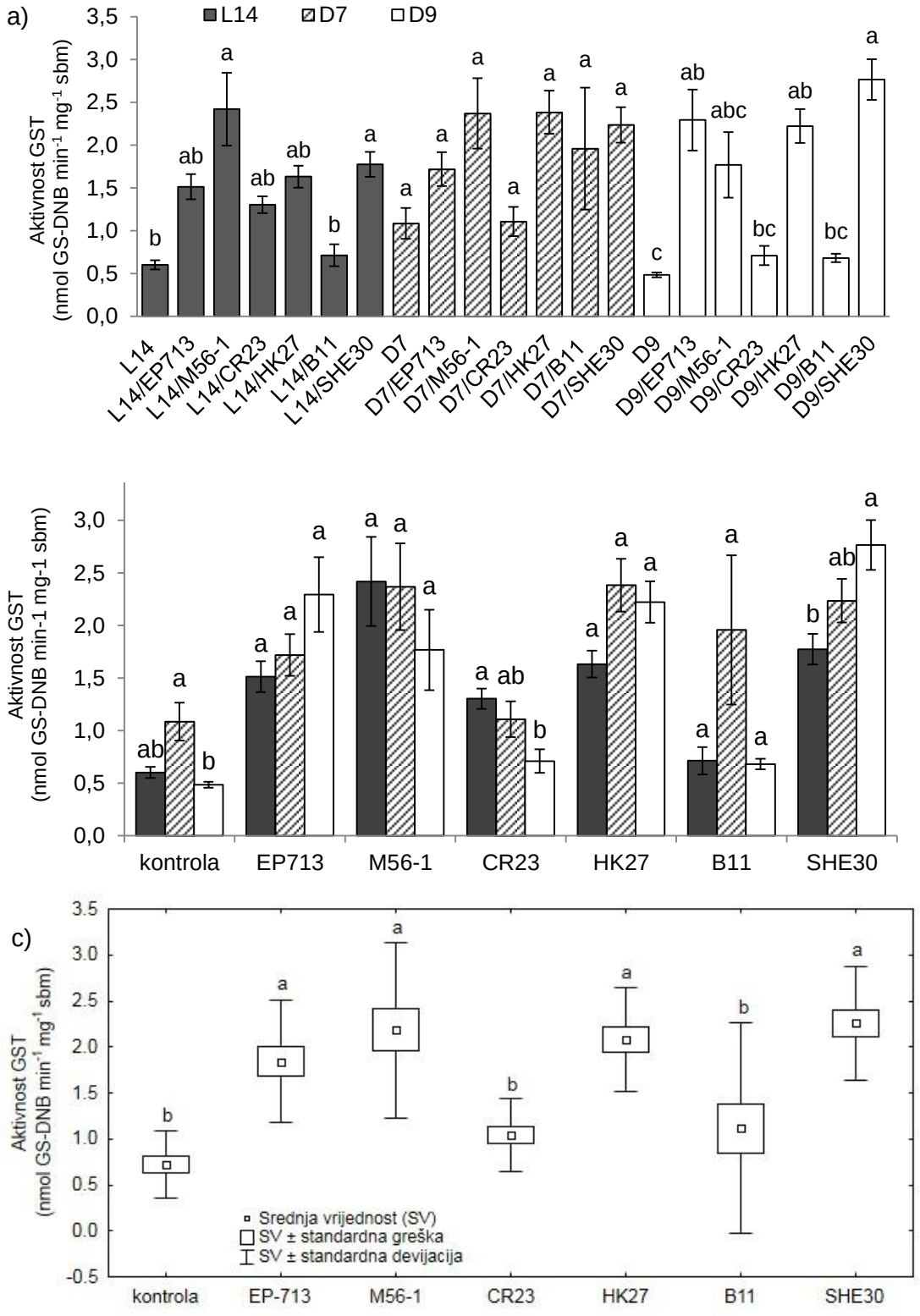
Slika 15. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na rast kultura gljive *Cryphonectria parasitica in vitro;* **a)** Utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive – različita slova označavaju statističku značajnost gledajući zasebno sve uzorke izolata gljive L14, zasebno D7 i zasebno D9; **b)** Utjecaj pojedinačnih virusnih sojeva na različite izolate gljive – različita slova označavaju statističku značajnost gledajući uzorke svih triju izolata gljive inficiranih

svakim pojedinačnim sojem virusa; **c)** Objedinjeni utjecaj svakog pojedinačnog virusnog soja na rast svih triju izolata gljive. U **a)** i **b)** stupci različitih ispuna predstavljaju različite izolate gljive, a podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 6, dok je u **c)** prikazana srednja vrijednost s pripadajućim standardnim pogreškama i standardnim devijacijama, n = 18. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

4. 3. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost stresnih enzima gljive *C. parasitica*

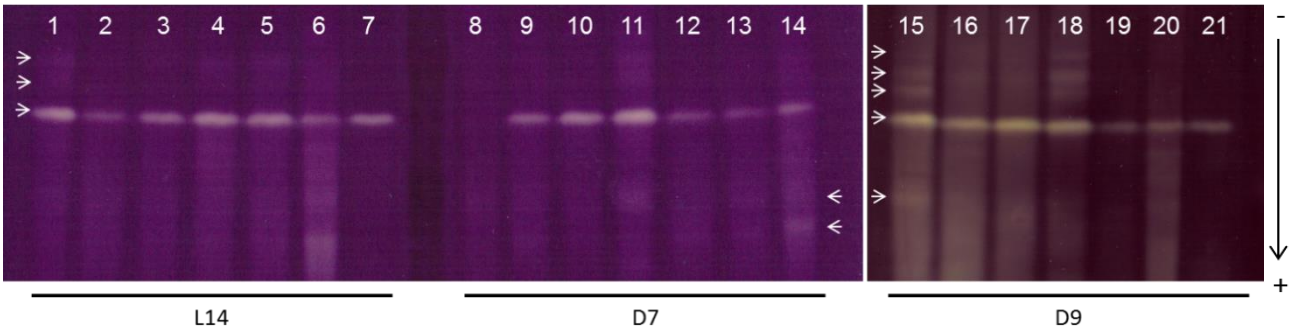
4. 3. 1. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost glutation S-transferaze (GST)

U većini izolata gljive s unesenim različitim sojevima virusa infekcija virusom CHV1 je dovela do porasta aktivnosti GST u usporedbi s kontrolnim virulentnim izolatima gljive *C. parasitica* (Slika 16 a). Kao i kod prirasta, virusni sojevi koji su imali najjači utjecaj na porast aktivnosti GST su bili različiti u različitim izolatima gljive: u izolatu L14 najjači porast aktivnosti GST inducirali su virusni sojevi M56-1 i SHE30, a u izolatu D9 virusni sojevi SHE30, EP713 i HK27, dok u izolatu D7 nije došlo do statistički značajnog porasta aktivnosti GST. Uz utjecaj virusnih sojeva na porast aktivnosti GST, treba napomenuti da su se i virulentni izolati gljive D7 i D9 međusobno statistički značajno razlikovali u aktivnosti GST (Slika 16 b). Također, izolati gljive L14 i D9 su bili različito osjetljivi na infekciju virusnim sojevima CR23 i SHE30 – izolat L14 je bio značajno osjetljiviji na infekciju virusnim sojem CR23, dok je izolat D9 bio znčajno osjetljiviji na infekciju sojem SHE30 (Slika 16 b). Analiza općeg utjecaja pojedinog virusnog soja na sve izolate gljive (Slika 16 c) pokazala je da su virusni sojevi HK27, SHE30, M56-1 i EP713 značajno povisili aktivnost GST u inficiranim izolatima gljive *C. parasitica.*



Slika 16. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na aktivnost glutation S-tranferaze (GST) gljive *Cryphonectria parasitica;* **a)** Utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive; **b)** Utjecaj pojedinačnih virusnih sojeva na različite izolate gljive; **c)** Objedinjeni utjecaj svakog pojedinačnog virusnog soja na rast svih triju izolata gljive. Oznake na grafičkim prikazima iste su kao na Slici 15. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

Prisutnost i aktivnost izoenzima GST u tkivu gljive *C. parasitica* dokazana je i nedenaturirajućom PAGE elektroforezom u svim uzorcima osim u kontrolnom izolatu D7 (Slika 17). Izoenzim GST4 s Rf vrijednost 0,36 bio je vidljiv u svim uzorcima osim D7. U većini uzoraka bila su prisutna još dva ili tri dodatna izoenzima (GST1 – GST3) vrlo slabog intenziteta s manjim Rf vrijednostima (0,20, 0,24 i 0,29). Također, u uzorcima L14/B11, D7/CR23, D7/SHE30 i D9 bio je vidljiv jedan ili dva dodatna izoenzima (GST5 i GST6) s većim Rf vrijednostima (0,51 i 0,60).



Slika 17. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na negativno nabijene izoenzime glutation S-transferaze gljive *C. parasitica* razdvojene nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Uzorci: **1** = L14, **2** = L14/EP713, **3** = L14/M56-1, **4** = L14/CR23, **5** = L14/HK27, **6** = L14/B11, **7** = L14/SHE30, **8** = D7, **9** = D7/EP713, **10** = D7/M56-1, **11** = D7/CR23, **12** = D7/HK27, **13** = D7/B11, **14** = D7/SHE30, **15** = D9, **16** = D9/EP713, **17** = D9/M56-1, **18** = D9/CR23, **19** = D9/HK27, **20** = D9/B11, **21** = D9/SHE30. Strelice označavaju izoenzime GST1 – GST6 s različitim Rf vrijednostima.

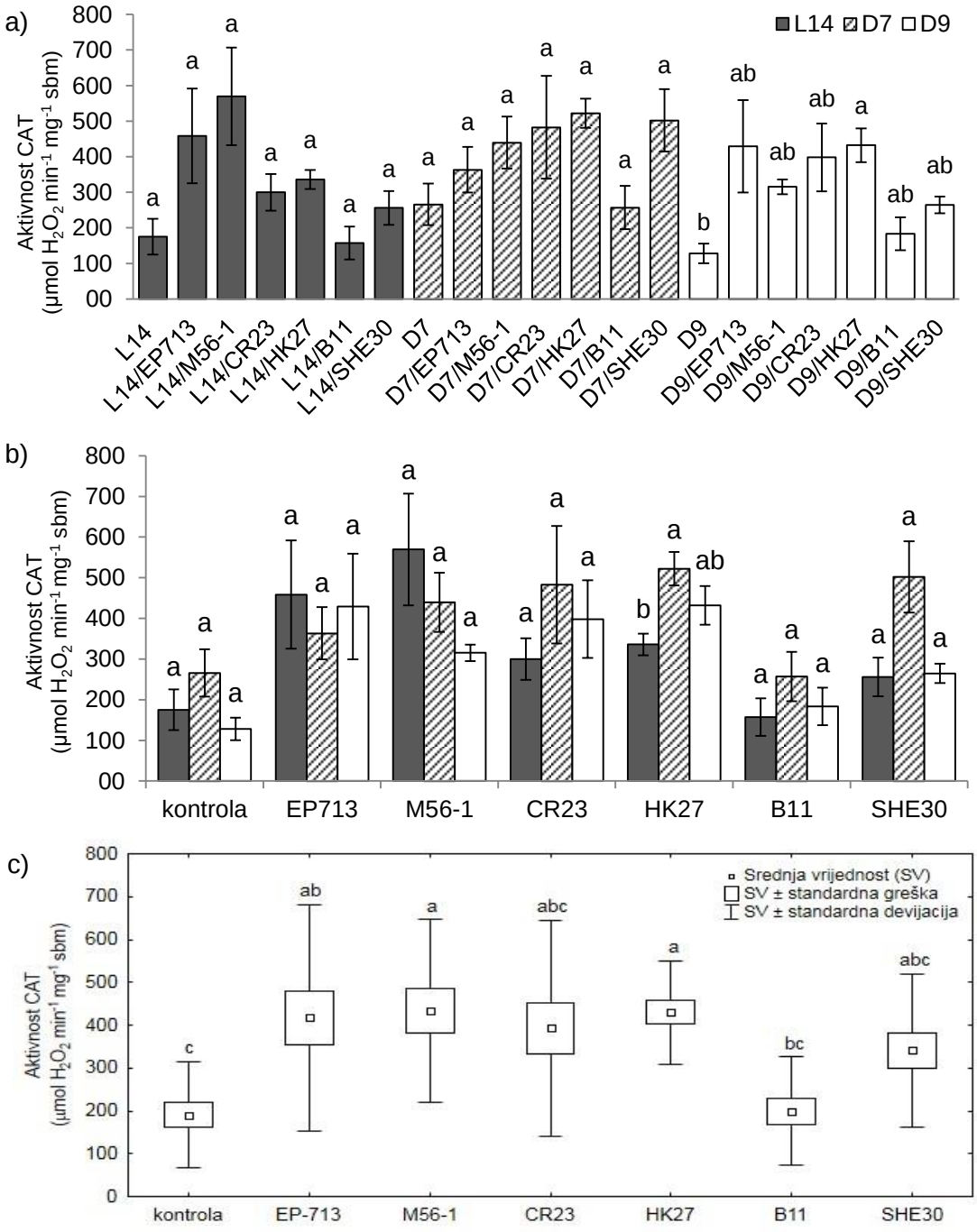
Uspoređujući intenzitet izoenzima GST4 (Rf = 0,36) između kontrolnih i inficiranih uzoraka (Tablica 13) pokazalo se da je u svim uzorcima izolata D7 došlo do aktiviranja ovog izoenzima, s time da je najveću aktivnost imao uzorak D7/CR23, a najmanju D7/B11. U svim uzorcima izolata D9 aktivnost GST se smanjila u usporedbi s kontrolnim uzorkom (najveći pad intenziteta zabilježen je u uzorku D9/HK27). U većini uzoraka izolata L14, osim u uzorcima L14/CR23 i L14/HK27 aktivnost GST se također smanjila u usporedbi s kontrolnim uzorkom.

Tablica 13. Intenzitet izoenzima glutation S-transferaze GST4 s Rf vrijednosti 0,36 u kontrolnim uzorcima izolata gljive *C. parasitica* (L14, D7 i D9) i u uzorcima istih izolata zaraženih sa šest sojeva virusa CHV1. Rezultati su prikazani kao intenzitet osvjetljenja pojedine linije i kao relativni intenzitet u odnosu na uzorak s najvećim intenzitetom. Crvenim brojevima su označeni uzorci u kojima je aktivnost GST4 bila manja, a podebljanim oni u kojima je bila veća nego u kontrolnom uzorku.

Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)
L14	3132	92	**D7**	0	0	**D9**	1615	100
L14/EP713	1935	57	**D7/EP713**	2337	**61**	**D9/EP713**	1577	98
L14/M56-1	2582	76	**D7/M56-1**	2981	**77**	**D9/M56-1**	1508	93
L14/CR23	3371	**99**	**D7/CR23**	3861	**100**	**D9/CR23**	1450	90
L14/HK27	3418	**100**	**D7/HK27**	2026	**52**	**D9/HK27**	640	40
L14/B11	2424	71	**D7/B11**	1515	**39**	**D9/B11**	839	52
L14/SHE30	2568	75	**D7/SHE30**	2386	**62**	**D9/SHE30**	658	41

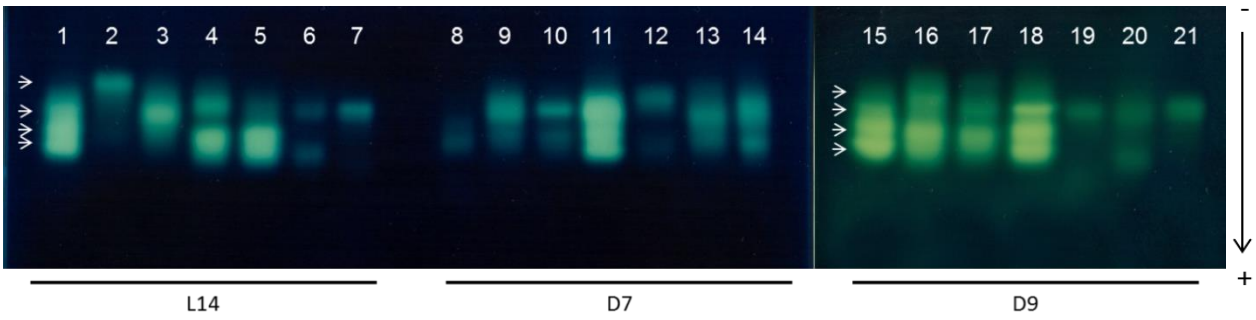
4. 3. 2. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost katalaze (CAT)

Gledano pojedinačno za svaki izolat gljive, uspoređujući inficirane i kontrolne uzorke, aktivnost CAT je bila povećana u virusom inficiranim uzorcima, ali porast nije bio statistički značajan osim u uzorku D9/HK27 (Slika 18 a). Također, niti kontrolni izolati gljive se nisu međusobno statistički značajno razlikovali (Slika 18 b). Jedini virusni soj koji je pokazao različit utjecaj na aktivnost CAT u različitim izolatima gljive bio je HK27, dok su drugi virusi imali podjednak utjecaj na različite izolate gljive (Slika 18 b). Analiza općeg utjecaja pojedinog virusnog soja na sve izolate gljive (Slika 18 c) pokazala je da su virusni sojevi HK27, M56-1 i EP713 značajno povisili aktivnost CAT u inficiranim izolatima gljive *C. parasitica.*



Slika 18. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na aktivnost katalaze (CAT) gljive *Cryphonectria parasitica;* **a)** Utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive; **b)** Utjecaj pojedinačnih virusnih sojeva na različite izolate gljive; **c)** Objedinjeni utjecaj svakog pojedinačnog virusnog soja na rast svih triju izolata gljive. Oznake na grafičkim prikazima iste su kao na Slici 15. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

Nedenaturirajućom PAGE elektroforezom je u uzorcima gljive *C. parasitica* pokazana prisutnost i aktivnost ukupno četiriju izoenzima CAT (CAT1-CAT4), s time da nisu svi izoenzimi bili prisutni u svim uzorcima (Slika 19). Za razliku od izoenzima GST, kod CAT nije postojao jedan, najintenzivniji izoenzim, već su sva četiri bila podjednako izražena ovisno o uzorku. U kontrolnim virulentnim izolatima gljive L14 i D9 bili su aktivni izoenzimi CAT2 – CAT4 s Rf vrijednostima 0,28, 0,34 i 0,37, dok je u uzorku D7 postojao samo izoenzim CAT4. U uzorcima L14/EP713 i D9/EP713 javio se i izoenzim CAT1 s najmanjom Rf vrijednošću, 0,21.



Slika 19. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na negativno nabijene izoenzime katalaze gljive *C. parasitica* razdvojene nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Uzorci: **1** = L14, **2** = L14/EP713, **3** = L14/M56-1, **4** = L14/CR23, **5** = L14/HK27, **6** = L14/B11, **7** = L14/SHE30, **8** = D7, **9** = D7/EP713, **10** = D7/M56-1, **11** = D7/CR23, **12** = D7/HK27, **13** = D7/B11, **14** = D7/SHE30, **15** = D9, **16** = D9/EP713, **17** = D9/M56-1, **18** = D9/CR23, **19** = D9/HK27, **20** = D9/B11, **21** = D9/SHE30. Strelice označavaju izoenzime CAT1 – CAT4 s različitim Rf vrijednostima.

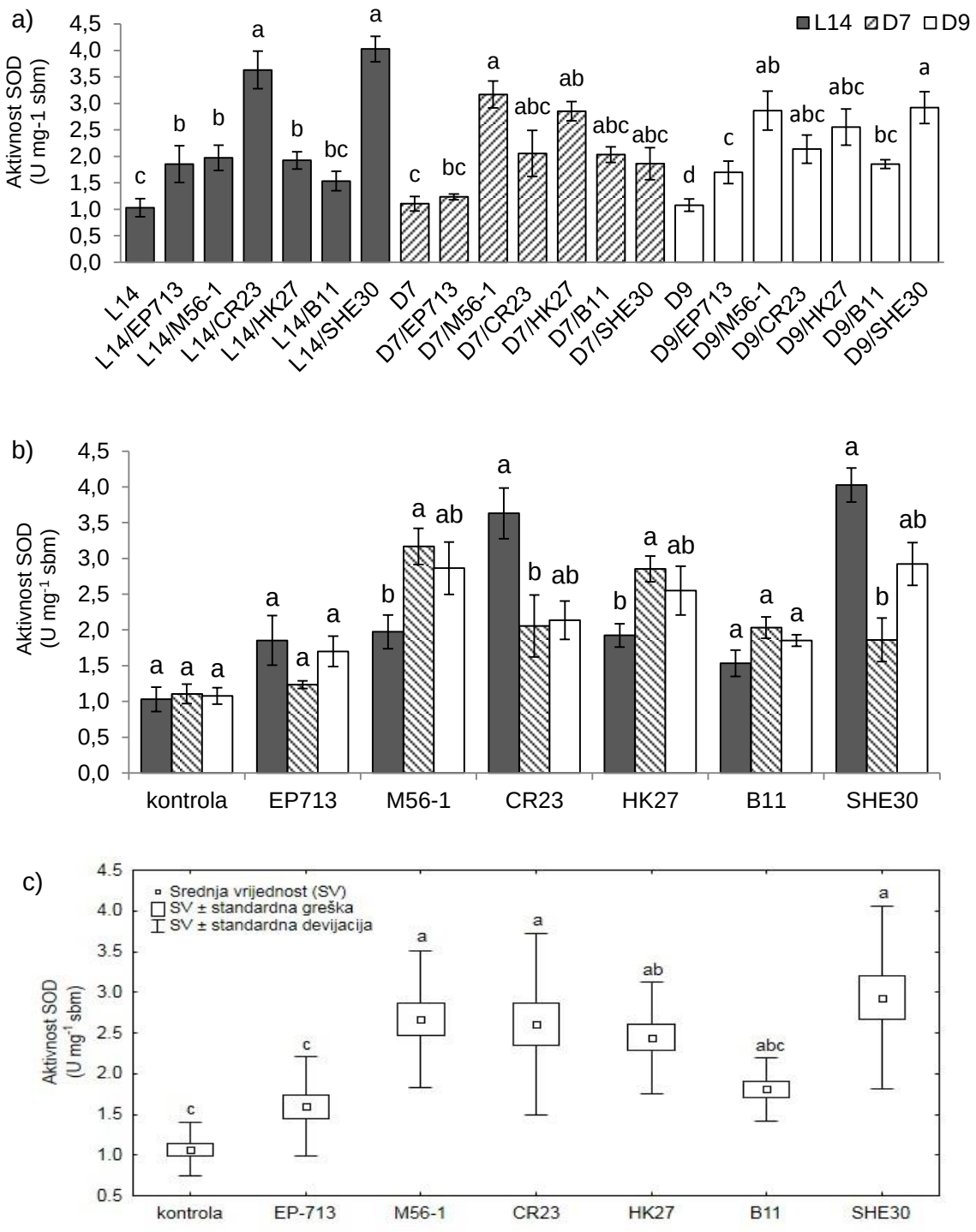
Infekcija virusom CHV1 je u uzorcima izolata gljive L14 i D9 uglavnom dovela do smanjenja broja izoenzima i/ili do smanjenja njihovog intenziteta, osim u uzorku D9/CR23 koji je imao isti broj izoenzima i veći intenzitet nego kontrolni uzorak D9 (Tablica 14). U uzorcima izolata gljive D7 došlo je do porasta broja i intenziteta izoenzima CAT pod utjecajem infekcije virusom CHV1.

Tablica 14. Intenzitet izoenzima katalaze (CAT1 – CAT4) u kontrolnim uzorcima izolata gljive *C. parasitica* (L14, D7 i D9) i u uzorcima istih izolata zaraženih sa šest sojeva virusa CHV1. Rezultati su prikazani kao intenzitet osvjetljenja pojedine linije i kao relativni intenzitet u odnosu na uzorak s najvećim intenzitetom. Crvenim brojevima su označeni uzorci u kojima je aktivnost CAT bila manja, a podebljanim oni u kojima je bila veća nego u kontrolnom uzorku.

Uzorak	Int. linije CAT1	Rel. int. (%)	Int. linije CAT2	Rel. int. (%)	Int. linije CAT3	Rel. int. (%)	Int. linije CAT4	Rel. int. (%)
L14	0	0	3146	100	3288	54	3012	61
L14/EP713	0	0	0	0	0	0	0	0
L14/M56-1	0	0	0	0	6124	**100**	0	0
L14/CR23	0	0	2844	90	0	0	4902	**100**
L14/HK27	2739	**100**	1247	40	3420	**56**	2389	49
L14/B11	0	0	997	32	0	0	1009	21
L14/SHE30	0	0	1656	53	0	0	0	0
D7	0	0	0	0	0	0	1513	57
D7/EP713	0	0	3372	**54**	1162	**51**	0	0
D7/M56-1	0	0	2042	**33**	1399	**61**	0	0
D7/CR23	0	0	6249	**100**	2288	**100**	2673	**100**
D7/HK27	0	0	2010	**32**	0	0	912	34
D7/B11	0	0	3542	**57**	1254	**55**	0	0
D7/SHE30	0	0	3264	**52**	1737	**76**	0	0
D9	0	0	1417	68	1457	59	2311	100
D9/EP713	1747	**64**	0	0	2135	**87**	1437	62
D9/M56-1	0	0	1431	**69**	2459	**100**	0	0
D9/CR23	0	0	2089	**100**	1827	**74**	1993	86
D9/HK27	0	0	1063	51	0	0	0	0
D9/B11	0	0	1448	**69**	0	0	1076	47
D9/SHE30	0	0	1317	63	0	0	0	0

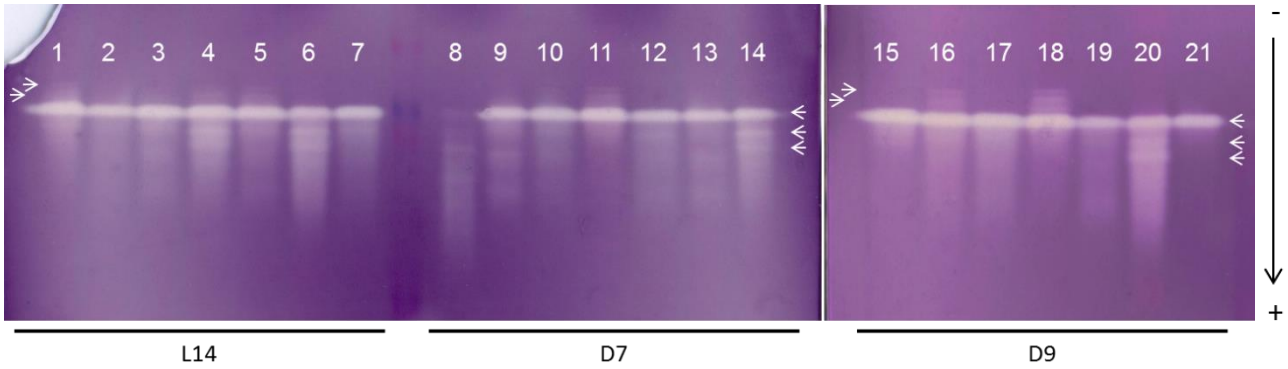
4. 3. 3. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Infekcija virusom CHV1 je dovela do povećanja aktivnosti SOD u većini proučavanih izolata gljive zaraženih različitim sojevima virusa (Slika 20 a). U izolatu gljive L14 statistički značajan učinak na porast aktivnosti SOD imali su virusni sojevi SHE30 i CR23, a u izolatu D7 virusni sojevi M56-1 i HK27. U izolatu gljive D9 svi istraživani virusni sojevi su doveli do statistički značajnog porasta aktivnosti SOD, a soj SHE30 je imao najjači učinak. Također, rezultati ukazuju na različitu osjetljivost istraživanih izolata gljive na infekciju istim virusnim sojem (Slika 20 b). Naime, kontrolni izolati gljive *C. parasitica* se nisu razlikovali u aktivnosti SOD, ali su različito reagirali na infekciju istim virusnim sojevima. Primjerice, u uzorcima L14/CR23 i L14/SHE30 došlo je do skoro četverostrukog porasta u aktivnosti SOD u usporedbi s kontrolom, dok je u uzorcima D7/CR23 i D7/SHE30 taj porast bio samo dvostruk, dakle izolat L14 je jače reagirao na infekciju ovim virusnim sojevima. S druge strane, uspoređujući uzorak L14/M56-1 s uzorkom D7/M56-1, te L14/HK27 s D7/HK27, vidi se da je na infekciju ovim virusnim sojevima jače reagirao izolat gljive D7. Analiza općeg utjecaja pojedinog virusnog soja na sve izolate gljive (Slika 20 c) pokazala je da su virusni sojevi SHE30, M56-1, CR23 i HK27 značajno povisili aktivnost SOD u inficiranim izolatima gljive *C. parasitica.*



Slika 20. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) gljive *Cryphonectria parasitica;* **a)** Utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive; **b)** Utjecaj pojedinačnih virusnih sojeva na različite izolate gljive; **c)** Objedinjeni utjecaj svakog pojedinačnog virusnog soja na rast svih triju izolata gljive. Oznake na grafičkim prikazima iste su kao na Slici 15. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

Nedenaturirajućom PAGE elektroforezom je u uzorcima gljive *C. parasitica* pokazana prisutnost i aktivnost ukupno pet izoenzima SOD (SOD1 – SOD5), s time da nisu svi izoenzimi bili prisutni u svim uzorcima (Slika 21). Kao i GST, i kod SOD je postojalo jedan najintenzivniji izoenzim, SOD3 s Rf vrijednosti 0,48. U uzorcima L14, L14/CR23, L14/HK27, D7/CR23, D9/EP713 i D9/CR23 bili su vidljivi jedan ili dva slabije aktivna izoenzima (SOD1 i SOD2) na manjim Rf vrijednostima (0,39 i 0,45), a u većini uzoraka i jedan ili dva slabije aktivna izoenzima (SOD4 i SOD5) na većim Rf vrijednostima (0,55 i 0,60). Uzorak D7 je pokazivao najmanju enzimsku aktivnost, posebno izoenzim SOD3.



Slika 21. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na negativno nabijene izoenzime superoksid dismutaze gljive *C. parasitica* razdvojene nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Uzorci: **1** – L14, **2** – L14/EP713, **3** – L14/M56-1, **4** – L14/CR23, **5** – L14/HK27, **6** – L14/B11, **7** – L14/SHE30, **8** – D7, **9** – D7/EP713, **10** – D7/M56-1, **11** – D7/CR23, **12** – D7/HK27, **13** – D7/B11, **14** – D7/SHE30, **15** – D9, **16** – D9/EP713, **17** – D9/M56-1, **18** – D9/CR23, **19** – D9/HK27, **20** – D9/B11, **21** – D9/SHE30. Strelice označavaju izoenzime SOD1 – SOD5 s različitim Rf vrijednostima.

Infekcija virusom CHV1 je u dijelu uzoraka izolata gljive L14 i D9 dovela do pojave dodatnih izoenzima u odnosu na kontrolne uzorke L14 i D9, ali i do raznolikih promjena intenziteta najaktivnijeg izoenzima, SOD3, dok je u svim uzorcima izolata D7 došlo do porasta aktivosti navedenog izoenzima (Tablica 15). U izolatima L14 i D9 najveći je porast aktivnosti SOD inducirao virusni soj M56-1, a u izolatu D7 virusni soj EP713. Virusni sojevi SHE30 (u L14/SHE30) i HK27 (u D9/HK27) imali su najjači učinak na smanjenje aktivnosti izoenzima SOD3.

Tablica 15. Intenzitet izoenzima superoksid dismutaze SOD3 s Rf vrijednosti 0,48 u kontrolnim uzorcima izolata gljive *C. parasitica* (L14, D7 i D9) i u uzorcima istih izolata zaraženih sa šest sojeva virusa CHV1. Rezultati su prikazani kao intenzitet osvjetljenja pojedine linije i kao relativni intenzitet u odnosu na uzorak s najvećim intenzitetom. Crvenim brojevima su označeni uzorci u kojima je aktivnost SOD3 bila manja, a podebljanim oni u kojima je bila veća nego u kontrolnom uzorku.

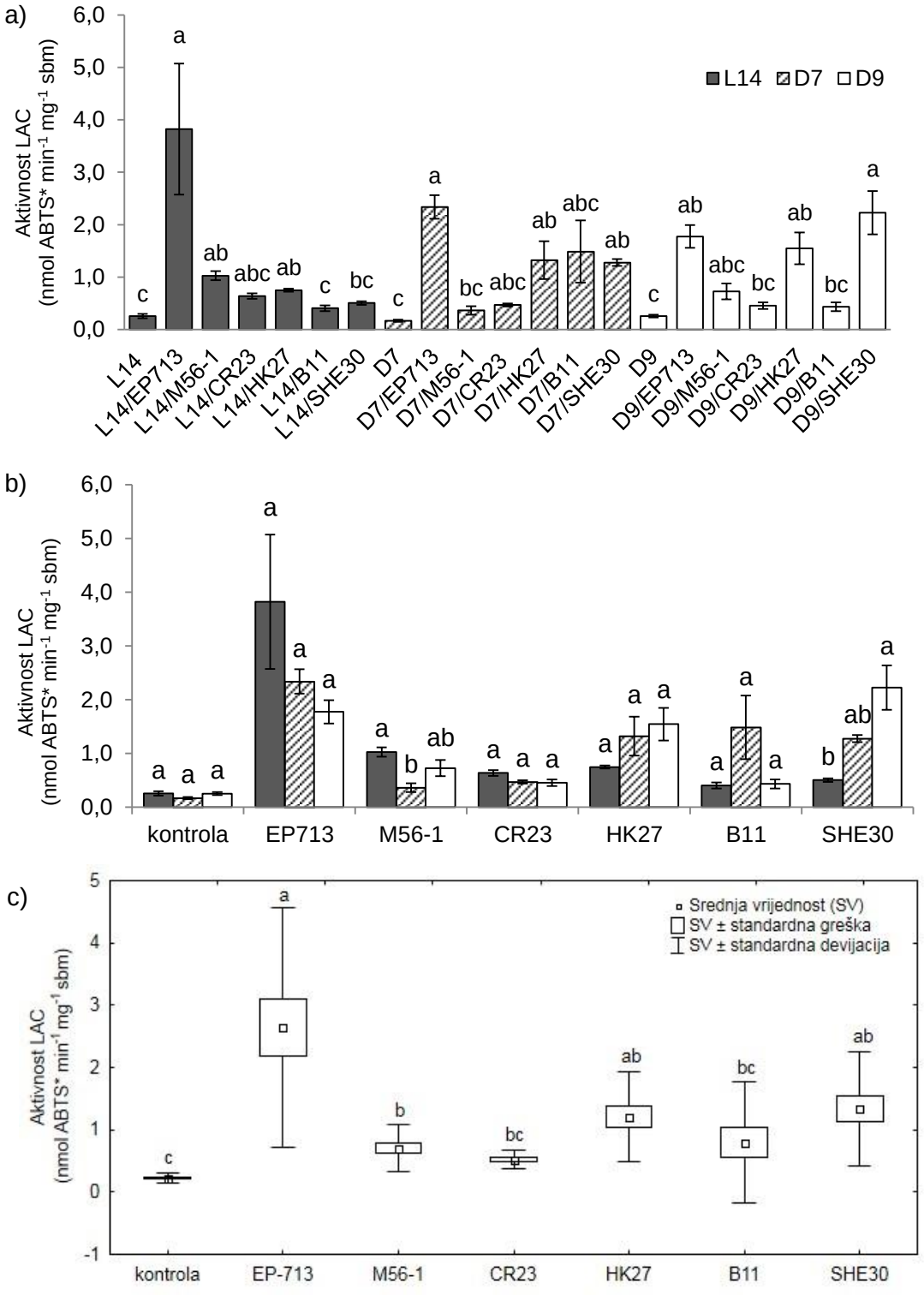
Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)
L14	2239	44	**D7**	1312	36	**D9**	3566	83
L14/EP713	2474	**48**	**D7/EP713**	3686	**100**	**D9/EP713**	3598	**84**
L14/M56-1	5103	**100**	**D7/M56-1**	2808	**76**	**D9/M56-1**	4288	**100**
L14/CR23	2370	**46**	**D7/CR23**	2324	**63**	**D9/CR23**	3467	81
L14/HK27	2395	**47**	**D7/HK27**	2244	**61**	**D9/HK27**	2238	52
L14/B11	2101	41	**D7/B11**	2351	**64**	**D9/B11**	2666	62
L14/SHE30	1957	38	**D7/SHE30**	1984	**54**	**D9/SHE30**	2810	66

4. 3. 4. Korelacije između mjernih parametara: prirasta gljive, te aktivnosti CAT, GST i SOD

Između prirasta gljive i aktivnosti stresnih enzima postojala je značajna negativna korelacija. Spearmanov R koeficijent korelacije (RS) između prirasta i aktivnosti GST iznosio je -0,64, između prirasta i aktivnosti SOD -0,38 i između prirasta i aktivnosti CAT -0,27. Također, postojala je i neznatna, ali statistički značajna, pozitivna korelacija između aktivnosti GST i SOD (RS = 0,40) i između aktivnosti GST i CAT (RS = 0,35). Između aktivnosti SOD i CAT nije bilo statistički značajne korelacije.

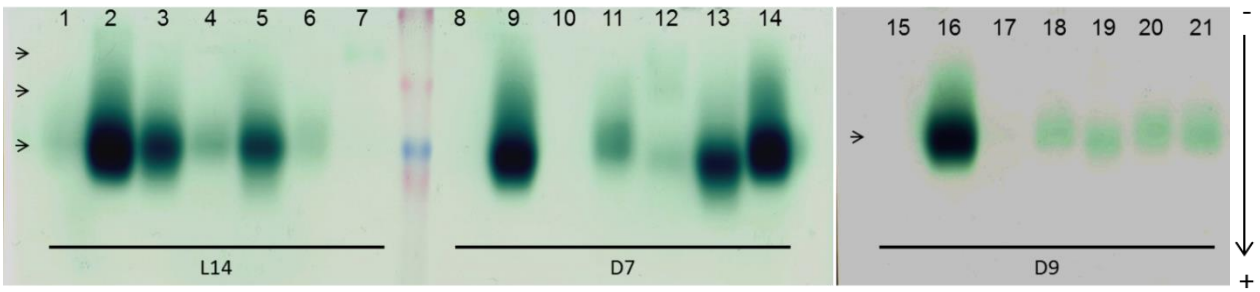
4. 4. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost lakaza gljive *C. parasitica*

Infekcija virusom CHV1 je dovela do povećanja aktivnosti LAC u većini proučavanih izolata gljive zaraženih različitim sojevima virusa, međutim samo je u manjem dijelu uzoraka to povećanje bilo statistički značajno (Slika 22 a). U izolatu gljive L14 statistički značajan učinak na porast aktivnosti LAC imali su virusni sojevi EP713, M56-1 i HK27, a u izolatima D7 i D9 virusni sojevi EP713, HK27 i SHE30. Također, kontrolni izolati gljive *C. parasitica* se nisu razlikovali u aktivnosti LAC, ali su bili različito osjetljivi na infekciju virusnim sojevima M56-1 i SHE30 (Slika 22 b). Primjerice, aktivnost LAC u izolatu gljive L14 nije bila promijenjena u slučaju infekcije virusnim sojem SHE30, dok je isti izolat imao trostruko povećanu aktivnost LAC kad je bio zaražen virusnim sojem M56-1. Suprotno od toga, izolati D7 i D9 nisu bili osjetljivi na infekciju virusnim sojem M56-1, ali su u slučaju infekcije sojem SHE30 imali višestruko povećanu aktivnost LAC (6,5 puta u izolatu D7 i 7 puta u izolatu D9). Analiza općeg utjecaja pojedinog virusnog soja na sve izolate gljive (Slika 22 c) pokazala je da su virusni sojevi EP713, SHE30, HK27 i M56-1 značajno povisili aktivnost LAC u inficiranim izolatima gljive *C. parasitica.*



Slika 22. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na aktivnost lakaze (LAC) gljive *Cryphonectria parasitica;* **a)** Utjecaj raznih virusnih sojeva na isti izolat gljive; **b)** Utjecaj pojedinačnih virusnih sojeva na različite izolate gljive; **c)** Objedinjeni utjecaj svakog pojedinačnog virusnog soja na rast svih triju izolata gljive. Oznake na grafičkim prikazima iste su kao na Slici 15. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

Prisutnost i aktivnost izoenzima lakaze u uzorcima gljive *C. parasitica* pokazana je i nedenaturirajućom PAGE elektroforezom, osim u uzorcima D7, D7/M56-1, D9 i D9/M56-1 (Slika 23). U većini uzoraka (osim u L14/SHE30 i D7/HK27) postojao je samo jedan izoenzim, LAC3, s Rf vrijednosti 0,49. Uzorak L14/SHE30 imao je još jedan aktivni izoenzim (LAC1) s Rf vrijednosti 0,17, dok je u uzorku D7/HK27 bio prisutan izoenzim LAC2 s Rf vrijednost 0,29.



Slika 23. Utjecaj različitih sojeva virusa CHV1 na negativno nabijene izoenzime lakaze gljive *C. parasitica* razdvojene nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Uzorci: **1** = L14, **2** = L14/EP713, **3** = L14/M56-1, **4** = L14/CR23, **5** = L14/HK27, **6** = L14/B11, **7** = L14/SHE30, **8** = D7, **9** = D7/EP713, **10** = D7/M56-1, **11** = D7/CR23, **12** = D7/HK27, **13** = D7/B11, **14** = D7/SHE30, **15** = D9, **16** = D9/EP713, **17** = D9/M56-1, **18** = D9/CR23, **19** = D9/HK27, **20** = D9/B11, **21** = D9/SHE30. Strelice označavaju izoenzime LAC1 – LAC3 s različitim Rf vrijednostima.

Kontrolni virulentni uzorci D7 i D9 nisu pokazivali lakaznu aktivnost, dok je u uzorku L14 ona bila vrlo mala. U odnosu na kontrolne uzorke D7 i D9, u svim uzorcima tih izolata gljive koji su bili zaraženi virusom CHV1 došlo je do porasta aktivnosti LAC, osim u D7/M56-1 i D9/M56-1 gdje nije bilo nikakve enzimske aktivnosti. Infekcija virusom CHV1 povećala je aktivnost LAC i u uzorcima izolata L14, osim virusnog soja B11 i SHE30 (Tablica 16). Najveći učinak na porast aktivnosti LAC imalo je virusni soj EP713 u sva tri izolata gljive, dok su u izolatu L14 snažan utjecaj imali i sojevi M56-1 i HK27, a u izolatu D7 sojevi SHE30 i B11.

Tablica 16. Intenzitet izoenzima lakaze LAC3 s Rf vrijednosti 0,49 u kontrolnim uzorcima izolata gljive *C. parasitica* (L14, D7 i D9) i u uzorcima istih izolata zaraženih sa šest sojeva virusa CHV1. Rezultati su prikazani kao intenzitet obojenja pojedine linije i kao relativni intenzitet u odnosu na uzorak s najvećim intenzitetom. Crvenim brojevima su označeni uzorci u kojima je aktivnost LAC3 bila manja, a podebljanim oni u kojima je bila veća nego u kontrolnom uzorku.

Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)	Uzorak	Int. linije	Rel. int. (%)
L14	68085	29	**D7**	0	0	**D9**	0	0
L14/EP713	238789	**100**	**D7/EP713**	223211	**100**	**D9/EP713**	79669	**100**
L14/M56-1	167335	**70**	**D7/M56-1**	0	0	**D9/M56-1**	0	0
L14/CR23	69922	29	**D7/CR23**	88205	**40**	**D9/CR23**	23110	**29**
L14/HK27	152201	**64**	**D7/HK27**	51900	**23**	**D9/HK27**	22952	**29**
L14/B11	48499	20	**D7/B11**	164767	**74**	**D9/B11**	22637	**28**
L14/SHE30	24013	10	**D7/SHE30**	218253	**98**	**D9/SHE30**	23463	**29**

4. 5. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na metilacijske promjene u genomu gljive *C. parasitica*

Analiza MSAP fragmenata pokazala je da infekcija virusom CHV1 utječe na metilacijske promjene u genomu gljive *C. parasitica*. Analizom svih uzoraka dobiveno je 127 epigenetičkih markera: 51 metiliran (m), 46 hemi-metiliranih (h) i 30 nemetiliranih (u) subepilokusa. Deskriptivni parametri epigenetičke varijabilnosti u svim eksperimentalnim kulturama prikazani su u Tablici 17.

U većini uzoraka, osim u D9/CR23, L14/CR23 i L14/SHE30, došlo je do porasta broja ukupnih MSAP markera uslijed infekcije virusom. Taj porast je u izolatu gljive L14 varirao između 2 % (L14/B11) i 27 % (L14/EP713), u izolatu D7 između 22 % (D7/B11) i 42 % (D7/HK27), a u izolatu D9 između 11 % (D9/SHE30) i 35 % (D9/B11). Gledano po tipu metilacije, broj m-subepilokusa je porastao ili ostao nepromijenjen u svim inficiranim izolatima gljive u usporedbi s kontrolnim izolatima, osim u uzorku L14/SHE30 gdje je došlo do pada broja m-subepilokusa. Broj h-subepilokusa je porastao u izolatima gljive D7 inficiranim sa svih šest virusnih sojeva, dok u izolatima D9 i L14 infekcija virusom CHV1 nije pokazala tako konzistentan učinak. Također, infekcija virusom CHV1 nije imala uniforman učinak na promjenu broja u-subepilokusa u inficiranim izolatima gljive.

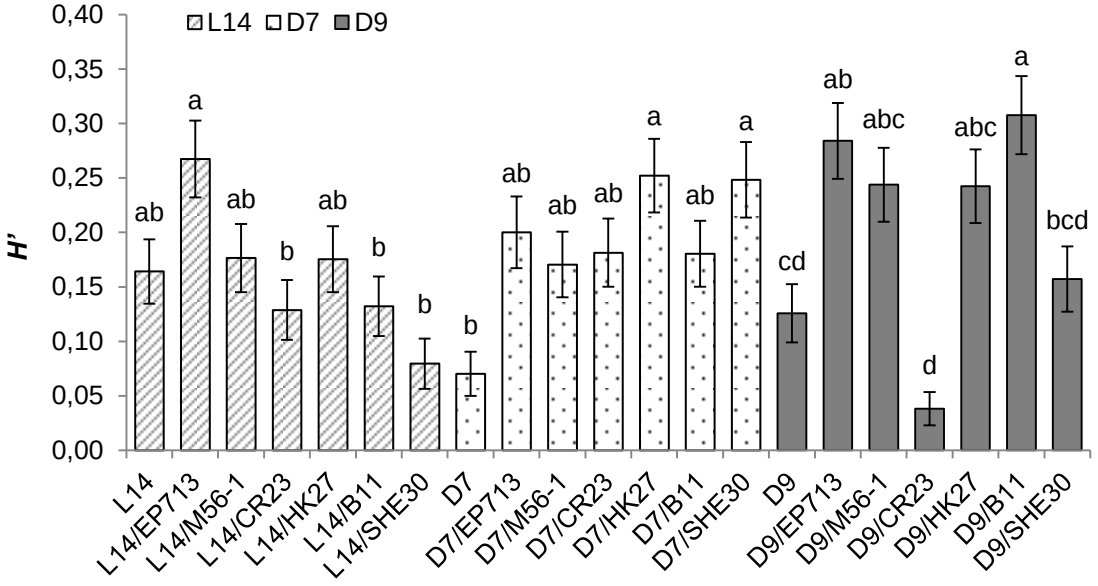
Infekcija virusom CHV1 je također dovela do konzistentnog porasta postotka polimorfnih markera, ukupnih i po svakom tipu metilacije, u izolatu gljive D7 i u većini inficiranih kultura izolata D9. S druge strane, u inficiranim kulturama izolata L14 nije bilo takvog konzistentnog porasta (Tablica 17). Što se tiče privatnih markera, istraživani uzorci su se međusobno razlikovali u njihovom broju i sastavu, ali nije uočena nikakva pravilnost u njihovoj raspodjeli između inficiranih i kontrolnih izolata gljiva (Tablica 17). Najveći broj privatnih markera – dva m-, dva h- i jedan u-subepilokus – nađen je u uzorku D9/HK27. Virulentni izolati gljive su se također razlikovali po broju i sastavu privatnih markera: izolat D9 ih je imao tri (dva h- i jedan u-subepilokus), L14 dva (jedan m- i jedan h-subepilokus), a D7 nije imao privatnih markera.

U svakom od tri izolata gljive *C. parasitica* drugi virusni soj je doveo do pojave najvećeg postotka ukupnih i polimorfnih markera: EP713 u izolatu L14, HK27 u izolatu D7 i B11 u izolatu D9. Niti virusni sojevi s najmanjim učinkom nisu bili isti za svaki izolat gljive: u izolatima L14 i D9 virusni soj SHE30 je imao najmanji utjecaj na postotak ukupnih i polimorfnih markera, dok je u izolatu D7 virusni soj B11 imao najmanji utjecaj na postotak ukupnih, a soj M56-1 na postotak polimorfnih markera.

Tablica 17. Deskriptivni parametri epigenetičke varijabilnosti u izolatima gljive *Cryphonectria parasitica* inficiranim različitim sojevima virusa CHV1. Metilirani (m), hemi-metlirani (h) i nemetilirani (u) subepilokusi prema mješovitom vrednovanju fragmenata ("Mixed scoring 2") opisanom u Schulz i sur. (2013).

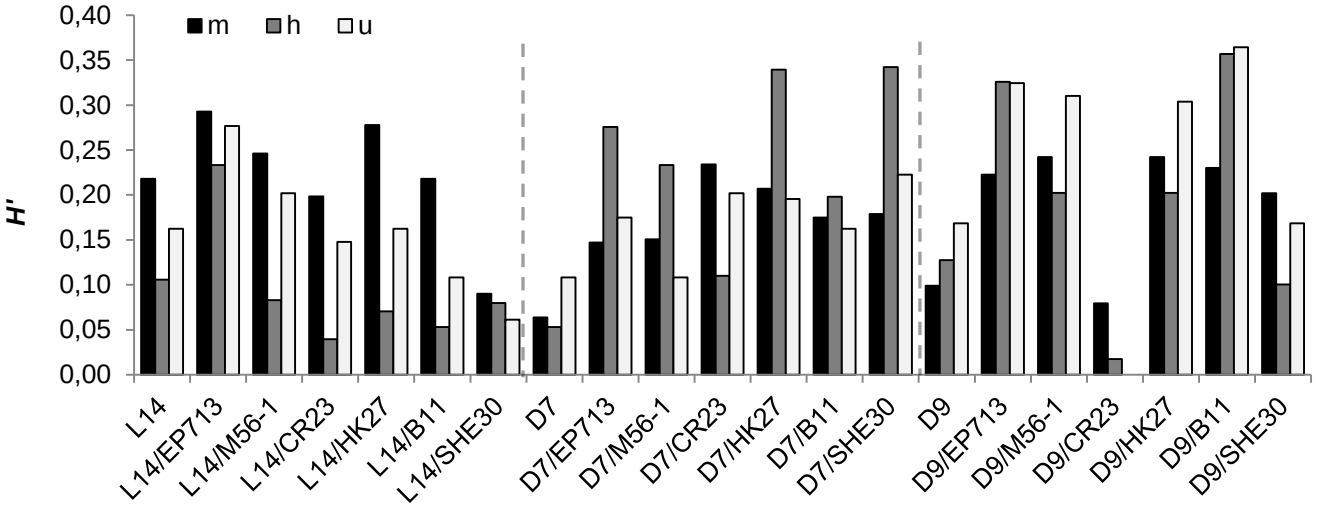
	% markera po uzorku				% privatnih markera po uzorku				% polimorfnih markera po uzorku			
Uzorak	**Ukupno**	**m**	**h**	**u**	**Ukupno**	**m**	**h**	**u**	**Ukupno**	**m**	**h**	**u**
L14	40.2	41.2	32.6	50.0	1.6	2.0	2.2	0.0	19.7	25.5	13.0	20.0
L14/EP713	51.2	49.0	45.7	63.3	0.0	0.0	0.0	0.0	31.5	33.3	28.3	33.3
L14/M56-1	44.9	41.2	30.4	73.3	0.8	0.0	0.0	3.3	20.5	29.4	8.7	23.3
L14/CR23	38.6	43.1	26.1	50.0	0.8	2.0	0.0	0.0	15.0	23.5	4.4	16.7
L14/HK27	44.9	52.9	28.3	56.7	0.0	0.0	0.0	0.0	21.3	33.3	8.7	20.0
L14/B11	40.9	43.1	26.1	60.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.8	25.5	6.5	13.3
L14/SHE30	36.2	35.3	30.4	46.7	1.6	0.0	4.3	0.0	8.7	9.8	8.7	6.7
D7	33.9	25.5	26.1	60.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.7	7.8	6.5	13.3
D7/EP713	44.1	31.4	45.7	63.3	1.6	2.0	0.0	3.3	22.8	17.7	30.4	20.0
D7/M56-1	43.3	37.3	43.5	53.3	0.0	0.0	0.0	0.0	20.5	17.7	28.3	13.3
D7/CR23	44.1	43.1	34.8	60.0	0.0	0.0	0.0	0.0	21.3	27.5	13.0	23.3
D7/HK27	48.0	41.2	50.0	56.7	0.8	0.0	2.2	0.0	30.7	25.5	41.3	23.3
D7/B11	41.7	35.3	34.8	63.3	0.0	0.0	0.0	0.0	22.1	21.6	23.9	20.0
D7/SHE30	47.2	39.2	47.8	60.0	0.8	0.0	2.2	0.0	29.1	21.6	39.1	26.7
D9	36.2	25.5	34.8	56.7	2.4	0.0	4.3	3.3	15.0	11.8	15.2	20.0
D9/EP713	47.2	35.3	47.8	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0	34.7	27.5	39.1	40.0
D9/M56-1	46.5	41.2	43.5	60.0	0.8	0.0	0.0	3.3	29.1	29.4	23.9	36.7
D9/CR23	30.7	31.4	23.9	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	9.8	2.2	0.0
D9/HK27	47.2	39.2	43.5	66.7	3.9	3.9	4.3	3.3	29.1	29.4	23.9	36.7
D9/B11	48.8	41.2	45.7	66.7	2.4	2.0	4.3	0.0	37.0	27.5	43.5	43.3
D9/SHE30	40.2	37.3	32.6	56.7	0.8	2.0	0.0	0.0	18.1	23.5	10.9	20.0

Ukupne srednje vrijednosti Shannonovog informacijskog indeksa *H'* pokazuju da je infekcija virusom CHV1 utjecala na raznolikost metilacijskih događaja u zaraženim izolatima gljive *C. parasitica* u usporedbi s kontrolnim izolatima (Slika 24). U svim inficiranim uzorcima izolata D7 i u većini inficiranih uzoraka izolata D9 *H'* vrijednosti su porasle, iako ne nužno statistički značajno. U inficiranim uzorcima izolata L14 *H'* vrijednosti su bile uglavnom nepromijenjene ili čak i niže nego u kontrolnom izolatu. Statistički značajne razlike uočene su, dakle, između kontrolnih i inficiranih uzoraka istog izolata gljive (D7/HK27 i D7/SHE30 u usporedbi s D7; D9/EP713 i D9/B11 u usporedbi s D9), ali i između uzoraka istog izolata gljive inficiranih različitim sojevima virusa (L14/CR23, L14/B11 i L14/SHE30 u usporedbi s L14/EP713; D9/EP713, D9/M56-1, D9/HK27, D9/B11 u usporedbi s D9/CR23; D9/SHE30 u usporedbi s D9/B11). Također, i virulentni izolati gljive su se međusobno statistički značajno razlikovali, konkretno izolati L14 i D7 ($p = 0,03$).



Slika 24. Učinak različitih sojeva virusa CHV1 na raznolikost metilacijskih događaja u gljive *Cryphonectria parasitica*, izražen preko ukupnog Shannonovog informacijskog indeksa *H'*. Stupci različitih ispuna predstavljaju različite izolate gljive, a podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Različita slova označavaju statističku značajnost gledajući zasebno sve uzorke izolata gljive L14, zasebno D7 i zasebno D9. Sve statističke procjene provedene su na razini značajnosti $p < 0,05$.

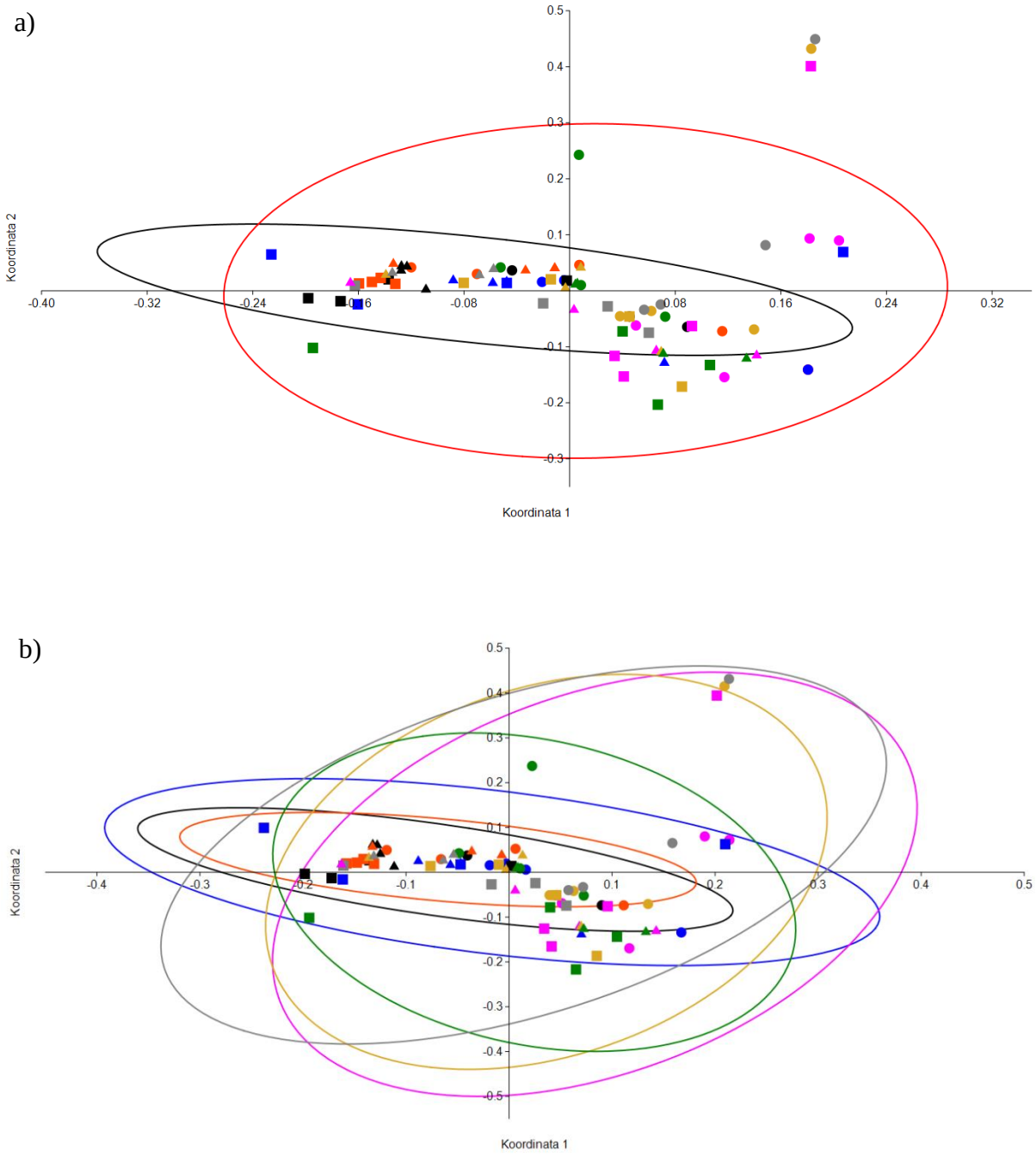
Raspodjela *H'* vrijednosti za svaki od tipova metilacije (m, h i u) slijedila je isti obrazac kao i ukupne *H'* vrijednosti (Slika 25). Zanimljivo, u izolatu gljive L14 sveukupnoj raznolikosti metilacijskih događaja su najviše doprinosili m-subepilokusi, u izolatu D7 h-subepilokusi, a u izolatu D9 u-subepilokusi.



Slika 25. Učinak različitih sojeva virusa CHV1 na raznolikost metilacijskih događaja u gljive *Cryphonectria parasitica*, izražen preko Shannonovog informacijskog indeksa *H'* za metilirane (m), hemi-metilirane (h) i nemetilirane (u) subepilokuse. Stupci različitih ispuna predstavljaju različite tipove metilacijskih događaja, a podatci su prikazani kao srednja vrijednost.

Analizu epigenetičke diferencijacije kontrolnih virulentnih gljiva i gljiva zaraženih virusom CHV1 sam provela metodom PCoA na dva načina. Prvo sam grupirala sve virulentne uzorke u jednu skupinu, i sve inficirane uzorke u drugu skupinu, bez obzira na izolat gljive i virusni soj. Uzorci se nisu grupirali u jasno odijeljene klastere, ali se učinak infekcije virusom CHV1 očitovao u povećanom rasapu inficiranih uzoraka u odnosu na virulentne uzorke (Slika 26 a). Uzorke sam zatim grupirala po soju virusa CHV1, dakle zajedno sve uzorke svih triju izolata gljive inficiranih istim sojem virusa, te sam tako dobila sedam skupina – jednu kontrolnu i po jednu za svaki virusni soj (Slika 26 b). Na ovaj način se mogao vidjeti učinak pojedinačnog virusnog soja na epigenetičku diferencijaciju uzoraka. Obzirom da virusni soj CR23 nije doveo do povećanog rasapa u odnosu na virulentne uzorke, može se zaključiti da nije utjecao

na povećanje epigenetičke diferencijacije, dok ostali virusni sojevi jesu, a najizraženiji učinak imali su sojevi EP713 i SHE30 (Slika 26 b).



Slika 26. Analiza glavnih koordinata (PCoA) epigenetičkih odnosa između virulentnih i hipovirulentnih uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica*; izolati gljive su prikazani različitim simbolima (trokut = L14, krug = D7, kvadrat = D9), a boje označavaju različite sojeve virusa CHV1 koji ih inficiraju (crna = kontrola bez virusa, ružičasta = EP713, zelena = M56-1,

narančasta = CR23, žuta = HK27, plava = B11, siva = SHE30) **a)** utjecaj infekcije virusom CHV1 na epigenetičku diferencijaciju inficiranih uzoraka (crvena elipsa) u odnosu na virulentne (crna elipsa). Prva os opisuje 24,3 %, a druga 15,2 % ukupne epigenetičke raznolikosti; **b)** utjecaj pojedinačnog virusnog soja na epigenetičku diferencijaciju uzoraka. Prva os opisuje 24,2 %, a druga 15,3 % ukupne epigenetičke raznolikosti.

5. RASPRAVA

Prethodna istraživanja utjecaja virusa CHV1 na transkripcijske promjene u gljive *C. parasitica* pokazala su da virus deregulira transkripciju gena za proteine odgovora na stres i enzime metilacijskog metabolizma u gljive (Allen i sur. 2003; Allen i Nuss 2004). Unatoč tome, konkretna istraživanja aktivnosti tih dereguliranih proteina stresa, te stvarne metilacijske promjene u genomu gljive do sada nisu bile utvrđene. Stoga sam u ovom istraživanju odredila utjecaj virusa CHV1 na aktivnost glutation S-transferaze, enzima stresa čija je deregulacija pod utjecajem virusa prethodno pokazana (Allen i Nuss 2004), ali i katalaze i superoksid dismutaze, enzima koji su često uključeni u odgovor na oksidacijski stres. Općenito gledano, utvrdila sam da je infekcija raznim sojevima virusa CHV1 smanjila *in vitro* stopu prirasta zaraženih kultura gljive *C. parasitica* i povećala aktivnost njezinih stresnih enzima GST, CAT i SOD, u većini gljiva zaraženih različitim sojevima virusa. Uz to, utvrdila sam da infekcija virusom CHV1 dovodi do povećanja broja metiliranih citozina u CpG regijama genoma gljive *C. parasitica*. Dodatna prednost je što sam u ovom istraživanju koristila više sojeva virusa i izolata gljive, i njihovih kombinacija, u usporedbi s prethodnim istraživanjima u kojima su korišteni samo sojevi virusa EP713 i Euro7 te pripadajući izolati gljive. Na taj način sam mogla dobiti širu i vjerodostojniju sliku o utjecaju virusa na gljivu, što je bitno u prirodnim populacijama u kojima postoji velika genetička raznolikost obaju članova ovog sustava (Breuillin i sur. 2006; Krstin i sur. 2008; Peters i sur. 2014). Utvrdila sam da je intenzitet učinka virusa na promatrane parametre gljive ovisio o virusnom soju, ali i o izolatu gljive te o njihovoj kombinaciji.

Infekcija virusom CHV1 u ovom istraživanju je ili povećala aktivnost GST gljive *C. parasitica* ili nije utjecala na aktivnost ovog enzima. Zanimljivo, među virusnim sojevima s najvećim utjecajem na aktivnost GST bili su zastupljeni sojevi svih istraživanih podtipova virusa CHV1: F1 (EP713), I (M56-1 i HK27) i specifični gruzijski soj mješovitog podtipa F1/I (SHE30), što je donekle u suprotnosti s prethodnim istraživanjima. Naime, analize transkriptoma gljive pokazale su da infekcija snažnim sojem virusa CHV1-EP713 (podtip F1) dovodi do povećane ekspresije pretpostavljenog gena za GST, dok infekcija istog izolata gljive slabim sojem CHV1-Euro7 (podtip I) dovodi do smanjene ekspresije tog gena (Allen i sur. 2003; Allen i Nuss 2004). Međutim, unatoč tome što je infekcija gljive virusnim sojem CHV1-EP713 dovela do povećane ekspresije gena za GST (Allen i sur. 2003), analize proteoma gljive inficirane istim sojem virusa su pokazale smanjenu akumulaciju ovog

proteina (Kim i sur. 2012). I istraživanje sekretoma gljive inficirane istim sojem virusa (EP713) pokazalo je da postoji neslaganje između akumulacije mRNA i količine izlučenih proteina za pojedinačne gene (Wang i sur. 2016). U drugim sustavima, smanjena ekspresija gena za GST u gljive inficirane mikovirusom, slično kao i u gljive *C. parasitica* inficirane sojem virusa CHV1-Euro7, pronađena je i u vrste *S. sclerotiorum* inficirane virusom SsDRV (Li i sur. 2008). Lee i sur. (2014) su proučavali profile ekspresije gena gljive *F. graminearum* pod utjecajem četiriju različitih virusa, FgV1 – FgV4, od kojih su FgV1 i FgV2 uzrokovali jače promjene fenotipa domaćina. Pokazali su da gljive inficirane različitim virusima imaju različite, jedinstvene, profile ekspresije, te da promjene transkriptoma uzrokovane različitim mikovirusima ne koreliraju nužno s intenzitetom fenotipskih promjena. Rezultati koje sam dobila u ovom istraživanju, stavljeni u kontekst druge objavljene literature, potvrđuju složene odnose između regulacije transkripcije, postranskripcijskih modifikacija i aktivnosti proteina u gljiva zaraženih mikovirusima. Također, pokazuju da nije dovoljno provesti samo analize nakupljanja mRNA ili proteina, već je nužno potrebno utvrditi kakva je aktivnost sintetiziranih proteina, da bi se moglo govoriti o stvarnom metaboličkom učinku infekcije virusom.

Iako se zna da gljive izložene različitim stresnim uvjetima u okolišu mogu vrlo uspješno prilagođavati spektar aktivnosti svojih antioksidacijskih enzima (Gil-ad i sur. 2000; Kawasaki i Aguirre 2001; Angelova i sur. 2005; Azevedo i sur. 2007), o antioksidacijskoj obrani gljiva induciranoj biotičkim stresom, pogotovo infekcijom mikovirusima, se vrlo malo zna. Iako prethodna istraživanja transkriptoma i proteoma gljive *C. parasitica* inficirane virusom CHV1 nisu pokazala postojanje općeg odgovora na stres (Allen i sur. 2003; Kim i sur. 2012), rezultati ovog istraživanja pokazuju povećanje aktivnosti i CAT i SOD, koje je pozitivno koreliralo s aktivnošću GST. Također, postojala je negativna korelacija između prirasta gljive i aktivnosti stresnih enzima, posebno GST: virusni sojevi koji su jako inducirali aktivnost GST ujedno su i najviše smanjivali stopu rasta gljive. Ovo opažanje se slaže s pretpostavkom koju su iznijeli Allen i sur. (2003), da indukcija transkripcije gena za GST pod utjecajem virusa CHV1 nije obrambeni mehanizam gljive, već mehanizam kojim virus oslabljuje gljivu domaćina i olakšava svoje umnažanje. Indukcija aktivnosti GST može dovesti do smanjenja i, u konačnici, nedostatka unutarstaničnog GSH, što dovodi do povećanja ukupnog oksidacijskog stresa u gljive (Aquilano i sur. 2014; Calmes i sur. 2015). Tako izazvan oksidacijski stres mogao je dovesti do indukcije antioksidacijskih enzima CAT i SOD, čime bi se objasnila povećana aktivnost tih enzima u ovom istraživanju. Virusni soj B11 nije imao

skoro nikakvog utjecaja na aktivnost CAT i SOD, kao ni na prirast gljive, dok su ostali sojevi, koji su jače inducirali aktivnost enzima i značajno smanjivali prirast. Hipoteza koju su predložili Angelova i sur. (2005) mogla bi objasniti ovo opažanje – iako je u gljive *C. parasitica* bila aktivna antioksidacijska obrana inducirana infekcijom virusom CHV1, čini se da su oksidacijska oštećenja bila prevelika, te su dovela do slabljenja gljive i posljedično do smanjenog rasta.

Uz općeniti utjecaj virusne infekcije na aktivnost stresnih enzima gljive *C. parasitica*, zanimalo me postoji li razlika u utjecaju između virusnih podtipova i/ili sojeva. Prethodna istraživanja različitih grupa su pokazala da virusni sojevi talijanskog podtipa I manje smanjuju prirast gljive nego sojevi francuskog podtipa F1 (Chen i Nuss 1999; Robin i sur. 2010; Bryner i Rigling 2011). Ja sam istražila utjecaj nekoliko virusnih sojeva podtipa I i jedan rekombinirani F1/I soj u usporedbi s izolatom EP713, u različitim izolatima gljive, i pokazala da postoji velika varijabilnost u njihovom utjecaju na prirast gljive *in vitro*. Virusni sojevi HK27 i M56-1 podtipa I smanjivali su prirast inficiranih izolata gljive *C. parasitica* jednako kao i prototipni virusni soj EP713 u istim izolatima gljive. S druge strane, virusni sojevi koji su imali najmanji utjecaj na smanjenje prirasta, CR23 i B11, također pripadaju podtipu I. Kao i kod *in vitro* prirasta, i kod aktivnosti stresnih enzima gljive učinak infekcije virusom CHV1 ovisio je o konkretnom virusnom soju a ne o podtipu kojemu taj soj pripada. Od istraživanih hrvatskih sojeva virusa, koji su svi podtipa I, neki su imali jednako snažan ili čak snažniji utjecaj na aktivnost stresnih enzima kao i prototipni soj EP713, dok soj B11 uopće nije utjecao na njihovu aktivnost. Takva varijabilnost u utjecaju virusnih sojeva unutar pojedinog podtipa uočena je i u istraživanjima sporulacije gljive *C. parasitica* (Peever i sur. 2000), te istraživanjima veličine lezija koje gljive stvaraju na dormantnim grančicama kestena (Krstin i sur. 2017). Stoga rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je genetička varijabilnost sojeva unutar virusnog podtipa, a ne sam podtip, dominantni čimbenik koji utječe na virulentnost virusa CHV1 i na intenzitet hipovirulentnog učinka na domaćina. Treba napomenuti i da sam uočila i razlike između kontrolnih virulentnih izolata gljive, i to u aktivnosti GST (Slika 16 b), te u osjetljivosti različitih izolata gljive na infekciju istim sojem virusa (kod prirasta – Slika 15 b i kod aktivnosti SOD – Slika 20 b). Iz tog opažanja može se zaključiti da, uz genom virusnog soja, i genom gljive domaćina značajno utječe na intenzitet hipovirulentnog učinka i, u konačnici, na ozbiljnost simptoma raka kore kestena, što se slaže s prethodno objavljenim istraživanjima (Chen i Nuss 1999; Peever i sur. 2000; Bryner i Rigling 2011; Sotirovski i sur. 2011; Bauman 2015; Krstin i sur. 2017).

Analizom aktivnosti enzima nedenaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu potvrdila sam aktivnost stresnih enzima gljive *C. parasitica* te pokazala postojanje izoenzima, pogotovo u slučaju katalaze. Ova metoda se uglavnom koristi za kvalitativne analize aktivnosti i vizualizaciju izoenzima (Gabriel i Gersten 1992), a kvantitativne metode su razvijene u rijetkim slučajevima (Chen i Pan 1996; Rivoal i sur. 2002; Covian i sur. 2012). Usporedba vrijednosti dobivenih spektrofotometrijskim metodama i elektroforezom moguća je samo ako se elektroforeza kalibrira preko spektrofotometrije pomoću poznatih enzimskih standarda. Međutim, u praksi se pokazalo da odnos između apsolutnih vrijednosti aktivnosti enzima dobivenih ovim metodama jako varira ovisno o tipu ekstrakta, odnosno o biljci iz koje je ekstrakt dobiven. Do tih razlika najčešće dolazi zbog prisutnosti interferirajućih tvari ili inhibitora enzima u sirovim proteinskim ekstraktima koje se elektroforezom pročiste (Chen i Pan 1996). Stoga, kako mene u ovom istraživanju nisu toliko zanimale apsolutne vrijednosti enzimske aktivnosti, već odnos između vrijednosti u virulentnim i hipovirulentnim uzorcima gljive, nisam provodila kalibraciju elektroforeze. Prema očekivanju, kvantitativni podaci koje sam dobila spektrofotometrijskim i elektroforetskim mjerenjima nisu se idealno slagali: iako su spektrofotometrijske metode uglavnom pokazivale porast enzimske aktivnosti u hipovirulentnim uzorcima, elektroforeza je davala puno nekonzistentnije rezultate. S obzirom na postojanje vrlo složenih kinetičkih odnosa u matriksu gela i u interakcijama samih enzima sa sastojcima gela i pufera, preporuka je da se za većinu sustava ne donose kvantitativni zaključci na temelju mjerenja intenziteta osvjetljenja/obojenja u gelovima (Gabriel i Gersten 1992). Stoga niti ja nisam donosila zaključke o utjecaju pojedinih virusnih sojeva na aktivnost stresnih enzime gljive *C. parasitica* na temelju mjerenja aktivnosti u PAGE gelovima, već sam tu metodu koristila samo kao potvrdu aktivnosti enzima, te za vizualizaciju izoenzima.

Do sada u gljivi *C. parasitica* nije pokazana prisutnost aktivnih izoformi enzima odgovora na stres. U ovom istraživanju sam jasno pokazala postojanje četiriju izoformi enzima katalaze, iako su linije enzimske aktivnosti bile dosta difuzne, što je očekivano kod nedenaturirajuće PAGE elektroforeze u usporedbi s denaturirajućom (Gabriel i Gersten 1992). Također, pokazala sam da infekcija virusom CHV1 utječe na to koja izoforma će biti prisutna/aktivna, iako je i tu bio vidljiv utjecaj ne samo virusnog soja već i interakcije izolata gljive sa sojem virusa. U biljaka u različitim organima postoji različit broj izoenzima, od kojih ne reagiraju svi jednako na izloženost stresu (Lee i Lee 2000; Lee i sur. 2001), dok su u bakterija različiti izoenzimi prisutni u različitim fazama rasta (Kim i sur. 1994). Četiri izoenzima katalaze, čija aktivnost je također ovisna o razvojnom stadiju i uvjetima okoliša, pronađena su

nedenaturirajućom PAGE elektroforezom u gljive *A. nidulans* (Navarro i sur. 1996; Kawasaki i Aguirre 2001), dok su u gljive *F. graminearum* bile prisutne samo dvije izoforme, također ovisne o razvojnom stadiju (Ponts i sur. 2009). Što se tiče GST i SOD, u svim uzorcima je bio vidljiv jedan najaktivniji izoenzim, dok su samo u nekim uzorcima bili prisutni dosta slabo vidljivi, i u slučaju SOD slabo razlučeni, sekundarni izoenzimi. Sličan uzorak s jednim glavnim i nekoliko slabijih i lošije razlučenih izoenzima vidljiv je za aktivnost SOD u ekstraktima zlatnog graha (*Vigna radiata*) i duhana (Chen i Pan 1996), te za aktivnost GST u ekstraktima parazitskog oblića *Setaria cervi* (Gupta i Rathaur 2005). S druge strane, izoenzimi SOD iz krastavca (Lee i Lee 2000) i iz različitih vrsta gljiva bili su vrlo dobro razdvojeni i imali međusobno podjednaku aktivnost (Angelova i sur. 2005), dok je u gljive *Mucor mucedo* pronađena samo jedna izoforma enzima GST (Hamed i sur. 2005). Stoga je teško s potpunom sigurnošću tvrditi jesam li uistinu detektirala izoforme enzima GST i SOD, ili je došlo do djelomične disocijacije podjedinica enzima, što se moglo očitovati kao pojava slabih sekundarnih linija aktivnosti. Kako bi se sa sigurnošću utvrdilo radi li se o izoenzimima potrebno je provesti detaljniju analiza pojedinih frakcija proteinskog ekstrakta (pojedinačnih linija aktivnosti izoenzima) denaturirajućom elektroforezom, imunodetekcijom i određivanjem kinetičkih parametara.

Analizom CpG sekvenci genoma gljive *C. parasitica* metodom MSAP pokazala sam da infekcija virusom CHV1 značajno utječe na promjene u uzorcima metilacije DNA gljive domaćina. Treba naglasiti da epigenetičke promjene detektirane ovom metodom predstavljaju tek dio ukupnih promjena u cijelom genomu, obzirom da se metodom MSAP: i) mogu utvrditi samo metilacije u CCGG sekvencama, i ii) ne može se razlučiti radi li se o metilaciji ili o odsutnosti fragmenta u slučajevima ^{Me}CCGG, ^{Me}C^{Me}CGG i ^{HMe}C^{HMe}CGG, obzirom da niti *Hpa*II niti *Msp*I ne režu ta mjesta (Schulz i sur. 2013). Također, bitno je napomenuti da, za razliku od nekih drugih mikovirusa kao što su *Botrytis virus F*, *Botrytis virus X* i SsDRV (Howitt i sur. 2001; Howitt i sur. 2006; Xie i sur. 2006), genom virusa CHV1 nema pretpostavljenu domenu za DNA-metiltransferazu (Shapira i sur. 1991). Stoga se sve epigenetičke promjene pronađene u ovom istraživanju mogu pripisati deregulaciji gena za enzime metilacijskog ciklusa gljive *C. parasitica* pod utjecajem infekcije virusom CHV1.

U prethodnim istraživanjima transkriptoma gljive *C. parasitica* opažen je konstitutivni porast akumulacije transkripata SAMS i SAHH homologa nakon infekcije virusom CHV1 (Allen i sur. 2003; Allen i Nuss 2004). Također, porast akumulacije transkripata za SAHH je uočen i nakon infekcije gljive *C. parasitica* reovirusima *Mycoreovirus 1 i Mycoreovirus 2* (Deng i

sur. 2007). I u istraživanjima drugih sustava gljiva i mikovirusa također je pronađena deregulacija staničnih metilacijskih enzima pod utjecajem infekcije mikovirusom. Primjerice, u gljivi *F. graminearum* inficiranoj virusima FgV1 i FgV2 uočen je značajan porast transkripcije gena za hipotetski protein sličan SAM-ovisnoj metiltransferazi, te malo, statistički neznačajno smanjenje transkripcije gena za SAM (Lee i sur. 2014). Nadalje, u gljivi *S. sclerotiorum* inficiranoj virusom SsDRV došlo je do smanjenja transkripcije gena za pretpostavljenu histon-metiltransferazu (Li i sur. 2008). U gljivi *C. parasitica* povećana akumulacija transkripata za SAMS i SAHH (Allen i sur. 2003) ukazuje na brži obrtaj SAM, primarnog donatora metilne skupine u staničnim reakcijama transmetilacije, što je autore navelo da pretpostave promijenjenu transmetilacijsku aktivnost u inficiranoj gljivi. U ovom istraživanju sam pokazala da je u izolatima gljive inficiranim virusom CHV1 došlo do porasta udjela metiliranih i hemimetiliranih markera u odnosu na kontrolne uzorke, što ukazuje na povećanu aktivnost metilacijskih enzima i u skladu je s prethodnim istraživanjima.

Hipermetilacija genoma gljive, odnosno utišavanje gena, mogla bi utjecati na važne fiziološke procese gljive, što u konačnici, u kombinaciji s drugim učincima infekcije virusom dovodi do pojave hipovirulentnog fenotipa. Međutim, zanimljivo je da *Δsahh C. parasitica* mutante pokazuju fenotip sličan hipovirulentnom fenotipu (Liao i sur. 2012), što je oprečno opaženoj povećanoj transkripciji gena *sahh* induciranoj infekcijom virusom CHV1. Autori su iznijeli hipotezu da CHV1 utječe na SAHH gljive na dva neovisna načina: prvo povećavajući transkripciju gena *sahh*, a zatim na post-translacijskoj razini, inhibicijom enzimske funkcije SAHH. Obzirom da sam u ovom istraživanju pokazala porast metilacije genoma u izolatima inficiranim virusom CHV1, što ukazuje na povećanu aktivnost staničnih metilacijskih enzima, ova hipoteza može biti osporena. Može se zaključiti da fenotipska sličnost *Δsahh* mutanti i hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* proizlazi iz deregulacije drugih regulatornih staničnih mehanizama do koje dolazi delecijom gena *sahh*, a na koje ujedno utječe i virus CHV1. Međutim, kako bi se preciznije odredio mehanizam djelovanja virusa CHV1 na enzime metilacijskog ciklusa, bilo bi potrebno izmjeriti *in vivo* aktivnost SAHH, mjereći omjer SAH/SAM u inficiranim i kontrolnim izolatima gljive *C. parasitica*, kao što su predložili Liao i sur. (2012).

Isti virusni sojevi koji su najviše smanjivali *in vitro* prirast gljive (EP713, M56-1, HK27 i SHE30) su ujedno i najviše utjecali na epigenetičku diferencijaciju inficiranih izolata u odnosu na kontrolne, kao što se vidi iz PCoA analize. Iz toga proizlazi da metilacija genoma gljive *C. parasitica* nakon infekcije virusom CHV1 nije obrambeni mehanizam gljive već

čimbenik virulentnosti samog virusa, što je u suprotnosti s opažanjima u biljaka gdje je utišavanje gena metilacijom DNA često obrambeni mehanizam biljke (Zhang i sur. 2015). Primjerice, u duhanu inficiranom virusom mozaika duhana (TMV) hipermetilacija genoma duhana je korelirala s povećanom otpornošću potomstva na naknadne infekcije virusom TMV, fitopatogenom bakterijom *Pseudomonas syringae* i oomicetom *Phytophthora nicotianae* (Kathiria i sur. 2010). U nekim patosustavima biljaka i virusa, virusi mogu kodirati proteine inhibitore biljnih metilacijskih obrambenih mehanizama. Primjerice, proteini AL2 i L2 su čimbenici virulentnosti geminivirusa iz rodova *Begomovirus* i *Curtovirus* koji inaktiviraju adenozin kinazu, enzim koji je nužan u normalnoj sintezi SAM (Wang i sur. 2003). Također, protein βC1 betasatelita begamovirusa interferira s metilacijom DNA putem inhibicije enzima SAHH u inficiranim biljkama *Nicotiana benthamiana* (Yang i sur. 2011). Za razliku od ovih primjera s virusnim inhibitorima biljne obrane u patosustavima biljka-virus, čini se da CHV1 djeluje na razini indukcije transkripcije gena *sams* i *sahh* gljive *C. parasitica*, potiče metilaciju njezinog genoma i dovodi do pojave hipovirulentnog fenotipa. Takav mehanizam je sličniji mehanizmima prisutnim u nekih virusa sisavaca. Primjerice, hipermetilacija CpG sekvenci u stanicama karcinoma nastalim djelovanjem Epstein-Barrovog virusa i humanog papiloma virusa upućuje na zaključak da ti virusi koriste epigenetičke modifikacije genoma domaćina kako bi kontrolirali njihov životni ciklus, što u konačnici nanosi štetu domaćinu (Paschos i Allday 2010; Birdwell i sur. 2014). Je li učinak infekcije i mehanizam djelovanja virusa na epigenom gljive domaćina i u drugim sustavima gljiva-mikovirus isti kao u sustavu *C. parasitica*-CHV1, tek treba istražiti.

Sojevi virusa CHV1 koji su najviše utjecali na promjene u uzorcima metilacije (EP713, M56-1, HK27 i SHE30) pripadaju različitim virusnim podtipovima – F1, I i rekombinantnom F1/I – iz čega proizlazi da učinak virusa na metilacijske promjene u genomu gljive, kao ni na aktivnost stresnih enzima, ne ovisi o virusnom podtipu. Allen i Nuss (2004) su utvrdili da i snažni soj virusa CHV1-EP713 (podtip F1) i slabi soj Euro7 (podtip I) pozitivno reguliraju ekspresiju gena za SAMS i SAHH gljive *C. parasitica*, s time da je EP713 imao dvostruko snažniji učinak. U ovom istraživanju sam potvrdila da soj EP713 ima konzistentno snažan učinak na sve osim jednog istraživanog parametra u svim izolatima gljive (povećanje udjela ukupnih i polimorfnih markera i porast *H'* vrijednosti, dok na broj privatnih markera nije bilo učinka), međutim taj učinak nije bio dvostruko snažniji od učinka sojeva podtipa I. Štoviše, u nekim izolatima gljive virusni sojevi podtipa I su imali jači učinak na istraživane parametre nego soj EP713. Primjerice, u izolatu D7 najjači učinak na porast *H'* vrijednosti imali su

sojevi HK27 (podtip I) i SHE30 (podtip F1/I), dok je u izolatu D9 virusni soj B11 (podtip I) imao nešto jači učinak na postotak polimorfnih markera nego soj EP713. Nasuprot tome, virusni soj CR23, također podtipa I, čak je doveo i do smanjenja postotka ukupnih i polimorfnih markera u izolatima gljive L14 i D9. Slične rezultate dobila sam i PCoA analizom – u usporedbi s kontrolnim izolatima virusni soj CR23 gotovo da i nije utjecao na epigenetičku diferencijaciju, dok su sojevi EP713 i SHE30 imali najjači učinak. Važno je napomenuti i da su se virulentni izolati gljive također međusobno razlikovali i to u broju privatnih markera, *H'* vrijednosti i u doprinosu pojedinačnih tipova metilacije ukupnoj raznolikosti metilacijskih događaja, izraženoj preko *H'* vrijednosti. Opažene razlike ponovno ukazuju na ulogu genoma domaćina u određivanju intenziteta učinka infekcije hipovirusom.

Porast aktivnosti lakaze u izolatima gljive *C. parasitica* zaraženim virusom CHV1 opažen u ovom istraživanju je u potpunoj opreci s dosad objavljenim rezultatima. Smanjena aktivnost lakaze u hipovirulentnim izolatima gljive je bila jedna od prvih biokemijskih parametara koji su dovedeni u vezu s učinkom infekcije virusom CHV1 na gljivu (Rigling i sur. 1989). U navedenom istraživanju korištena su tri virulentna i tri hipovirulentna uzorka gljive s područja Švicarske, te njihove kombinacije. Svi virulentni uzorci pokazivali su snažnu aktivnost lakaze, dok je jedan hipovirulentni uzorak imao upola manju aktivnost, a ostali hipovirulentni uopće nisu pokazivali aktivnost lakaze. S vremenom su identificirane tri izoforme ovog enzima u gljive *C. parasitica:* unutarstanična lakaza LAC2 (Rigling i Van Alfen 1993), izvanstanična lakaza LAC1 veličine oko 77 kDa (Rigling i Van Alfen 1991; Rigling i Van Alfen 1993) i izvanstanična LAC3 koja se inducira u prisutnosti taninske kiseline (Kim i sur. 1995). Infekcija virusom CHV1 smanjuje aktivnost svih triju lakaza, s time da je za LAC1 i LAC3 pokazano da su regulirane virusom CHV1 na razini transkripcije mRNA (Rigling i Van Alfen 1991; Chung i sur. 2008). Glavne razlike između mog i navedenih prijašnjih istraživanja su u korištenim virusnim sojevima i izolatima gljive, u korištenom hranidbenom mediju, te u činjenici da sam ja mjerila aktivnost ukupnih lakaza, a ne posebno unutar- a posebno izvanstanične lakaze. Naime, sva navedena istraživanja, osim onog Riglinga i sur. (1989), su provedena na prototipnom modelnom sustavu EP155/EP713, gdje je virulentni izolat gljive potjecao s područja SAD-a, dok sam u ovom istraživanju koristila različite virusne sojeve s područja Hrvatske, Slovenije i Gruzije, te prototipni soj EP713, ali u izolatima gljive s područja Hrvatske. Neobično je što je virusni soj EP713 u mom istraživanju pokazao najsnažniju indukciju aktivnosti lakaze. Također, u prethodno spomenutim istraživanjima, osim onog Riglinga i sur. (1989), za uzgoj kultura gljive korištene su tekuće

hranidbene podloge, dok sam ja koristila krutu, nutritivno bogatu podlogu PDA. Larson i Nuss (1994) su pokazali da transkripcija gena *lac-1* ovisi o hranidbenoj podlozi u kojoj se uzgaja gljiva, te da u virulentnoj gljivi uzgajanoj na podlogama bogatim aminokiselinama, kao što je krumpirova dekstrozna juha (PDB), nije bilo transkripcije ovog gena, dok je u siromašnijoj podlozi malt ekstrakt (ME) došlo do indukcije ovog gena, no oni nisu mjerili aktivnost sintetiziranog enzima. Suprotno tome, gljive *Phanerochaete chrysosporium* (Dittmer i sur. 1997) i *Trametes multicolor* (Hess i sur. 2002) sintetiziraju lakazu u podlozi bogatoj svim nutrijentima, uz prisutnost bakra kao stimulatora sinteze. Utjecaj hranidbene podloge na intenzitet transkripcije gena za lakazu gljive *C. parasitica* su pokazali i Allen i sur. (2003) koristeći isti eksperimentalni sustav. Oni su gljivu uzgajali na krutoj PDA podlozi s celofanom, te nisu opazili promjene u transkripciji *lac-1* pod utjecajem virusa. Analiza sekretoma gljive *C. parasitica* je također pokazala smanjeno lučenje lakaze u slučaju infekcije virusom CHV1, ali je sinteza mRNA bila pojačana (Wang i sur. 2016), s time da su kulture korištene za analizu izlučenih proteina uzgajane na tekućoj, a za izolaciju mRNA na krutoj hranidbenoj podlozi. Varijabilnost aktivnosti lakaza u različitim hranidbenim podlogama pokazana je i u gljive *B. cinerea* (Gil-ad i sur. 2000). Nadalje, obzirom da sam mjerila aktivnost ukupnih lakaza postoji mogućnost da nisam uspjela sakupiti ukupnu količinu izvanstaničnog enzima, te da je pod utjecajem virusa došlo do porasta aktivnosti unutarstanične izoforme koja je doprinijela povećanoj ukupnoj aktivnosti lakaza u virusom inficiranim izolatima gljive. Uz dosad navedene razlike u eksperimentalnom pristupu, ja sam mjerila aktivnost enzima nakon 10 dana, u usporedbi s prethodnim istraživanjima koja su završavala nakon najviše pet dana (Rigling i Van Alfen 1993), te sam koristila drugi supstrat za lakazu – ABTS (Niku-Paavola i sur. 1990) umjesto 2,6-dimetoksifenola (DMOP).

Pretpostavlja se da izvanstanična lakaza sudjeluje u patogenezi raka kore kestena (Rigling i sur. 1989), i logično je da virus koji slabi stupanj virulentnosti gljive dovodi do smanjenog lučenja ovog enzima. To je pokazano i u fitopatogenih gljiva *Diaporthe ambigua, B. cinerea* i *S. rolfsii* u kojima je prisutnost dsRNA virusa dovela do hipovirulentnosti i smanjene aktivnosti lakaze (Smit i sur. 1996; Castro i sur. 2003; Zhong i sur. 2016). Međutim, virusna vrsta CHV3 koja također uzrokuje hipovirulentnost gljive *C. parasitica*, ne dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti lakaze (Smart i sur. 1999), dok je u hipovirulentnom izolatu gljive *B. cinerea* inficiranom virusom BcMV1 aktivnost lakaze čak i povećana (Zhang i sur. 2010). U gljive *Fusarium circinatum* prisutnost mikovirusa iz porodice *Narnaviridae* dovodi do povećane virulentnosti gljive, ali ne pokazuje nikakav specifičan utjecaj na aktivnost

lakaza (Muñoz-Adalia i sur. 2016b). Iz navedenog je vidljivo da je odgovor lakaza na infekciju mikovirusima u različitih gljiva različit. Sve navedene razlike u pristupu istraživanju između mog i prethodno objavljenih radova su mogle utjecati na promjenu regulacije aktivnosti lakaza pod utjecajem infekcije virusom CHV1 u odnosu na do sada poznate literaturne podatke. Međutim, kao što sam pokazala za aktivnost stresnih enzima i za stupanj metilacije genoma gljive, gdje je utjecaj virusa jako ovisio o kombinaciji genoma izolata gljive i virusnog soja koji ju inficira, moguće je da sam pokazala stvarni utjecaj navedenih virusnih sojeva u istraživanim izolatima gljive. Slično je opaženo i za sintezu oksalata u virulentnim i hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica* – dok su Havir i Anagnostakis (1983) utvrdili da u hipovirulentnih izolata ne dolazi do sinteze oksalata, Bennett i Hindal (1989) su koristeći druge izolate i virusne sojeve pokazali da sinteza oksalata ne ovisi o prisutnosti virusa već o korištenom hranidbenom mediju. Stoga je u sustavu *C. parasitica*-CHV1 potrebno provesti daljnja istraživanja aktivnosti lakaza, posebno unutar- i posebno izvanstaničnih, koristeći više kombinacija gljiva i virusa, kao u ovom istraživanju, u različitim hranidbenim medijima i mijenjajući uvjete uzgoja, kako bi se stekla još potpunija slika o utjecaju infekcije virusom CHV1.

Analizama aktivnosti stresnih proteina (glutation S-transferaze, katalaze i superoksid dismutaze) i lakaze, te analizom metiliranosti genoma triju izolata gljive s unesenih šest sojeva virusa pokazala sam da učinak infekcije virusom CHV1 na intenzitet promjena u metabolizmu gljive *C. parasitica* ovisi o virusnom soju, a ne o virusnom podtipu, te o izolatu gljive domaćina i kombinaciji genoma izolata gljive i soja virusa. Time sam pokazala važnost korištenja više virusnih sojeva i izolata gljive prilikom ovakvih komparativnih istraživanja, kako bi se došlo do što realnijih zaključaka primjenjivih na genetički raznolike prirodne populacije.

6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija gljive *C. parasitica* različitim sojevima virusa CHV1 dovodi do indukcije antioksidacijske obrane u zaraženoj gljivi, odnosno do povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima glutation S-transferaze, katalaze i superoksid dismutaze.
2. Intenzitet promjena aktivnosti antioksidacijskih enzima ovisi o pojedinačnom virusnom soju i izolatu gljive domaćina, odnosno o njihovoj kombinaciji, a ne o podtipu virusa.
3. Utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost lakaza gljive *C. parasitica* također ovisi o pojedinačnom virusnom soju i gljivi domaćinu, odnosno o njihovoj kombinaciji, te se ne može dovesti u vezu s virulentnosti pojedinih virusnih sojeva.
4. Infekcija gljive *C. parasitica* različitim sojevima virusa CHV1 dovodi do epigenetičkih promjena u zaraženoj gljivi, i to do porasta metiliranosti CpG sekvenci genoma gljive. I u ovom slučaju intenzitet učinka infekcije virusom ovisi o virusnom soju, gljivi domaćinu, te o njihovoj kombinaciji.
5. Metilacija genoma gljive *C. parasitica* nakon infekcije virusom CHV1 vjerojatno je čimbenik virulentnosti samog virusa, a ne obrambeni mehanizam gljive.
6. Ovo istraživanje naglašava važnost korištenja više virusnih sojeva i izolata gljive, a ne samo jednog eksperimentalnog sustava, kako bi se dobila realnija slika o učinku virusnih sojeva u genetički raznolikim prirodnim populacijama.
7. Kako je u svim istraživanim parametrima intenzitet učinka virusa ovisio o kombinaciji genoma gljive i virusa, nije moguće odabrati jedan virusni soj koji bi bio optimalan za primjenu u biološkoj kontroli raka kestenove kore. Umjesto toga, trebalo bi koristiti pastu s kombinacijom nekoliko izolata gljive i virusnih sojeva, izoliranih iz populacija u kojima se biološka kontrola namjerava provoditi.

7. LITERATURA

Adamčíková K, Ondrušková E, Kádasi-Horáková M, Botu M, Kobza M, Achim G (2016) Distribution and population structure of the chestnut blight fungus in Romania. Plant Protection Science 51: 141–149.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121–126.

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

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

Allen TD, Nuss DL (2004) Specific and common alterations in host gene transcript accumulation following infection of the chestnut blight fungus by mild and severe hypoviruses. Journal of Virology 78: 4145–4155.

Anagnostakis SL (1978) The Amereican chestnut: new hope for a fallen giant. Connecticut Agricultural Experiment Station 777: 1–9.

Anagnostakis SL (1981a) Hypovirulence, vegetative incompatibility, and the growth of cankers of chestnut blight. Phytopathology 71: 1198-1202.

Anagnostakis SL (1981b) Stability of double-stranded RNA components of *Endothia parasitica* through transfer and subculture. Experimental Mycology 5: 236–242.

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

Anagnostakis SL (1990) Recovery of additional flat mutants of *Cryphonectria parasitica*. Mycologia 82: 515–518.

Anagnostakis SL, Hillman BI (1992) Evolution of the chestnut tree and its blight. Arnoldia Arboretum, Harvard 52: 3–10.

Anand A, Mukherjee SK, Sanan-Mishra N (2013) Tools for pathogenicity: virus encoded

RNA silencing suppressors. U: Mendes-Vilas A (ed.) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technoilogy and education. Badajos, Formatex Research Center, 751–763.

Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. Mycological Research 109: 150–158.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014) Glutathione: new roles in redox signalling for an old antioxidant. Frontiers in Pharmacology 5: 1–12.

Azevedo MM, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cassio F (2007) Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. Science of the Total Environment 377: 233–243.

Baek JH, Park JA, Kim JM, Oh JM, Park SM, Kim DH (2014) Functional analysis of a tannic-acid-inducible and hypoviral-regulated small heat-shock protein Hsp24 from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Molecular Plant-Microbe Interactions 27: 56–65.

Bai Z, Harvey LM, McNeil B (2003) Oxidative stress in submerged cultures of fungi. Critical Reviews in Biotechnology 23: 267–302.

Baldrian P (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews 30: 215–242.

Bauman JM (2015) A comparison of the growth and asexual reproduction by *Cryphonectria parasitica* isolates infected with hypoviruses CHV3-County Line, CHV1-Euro7, and CHV1-Ep713. American Journal of Plant Sciences 6: 73–83.

Baurens FC, Causse S, Legavre T (2008) Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) protocol to assess CpG and CpNpG methylation in the banana genome. Fruits 63: 117–123.

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276–287.

Bennett AR, Hindal DF (1989) Mycelial growth and oxalate production by five strains of *Cryphonectria parasitica* in selected liquid culture media. Mycologia 81: 554–560.

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

Biraghi A (1953) Possible active resistance to *Endothia parasitica* in *Castanea sativa*. Report of the Congress of the International Union Forest Research Organisation,11th, Rome, 643-645.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. WAO Journal 5: 9–19.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & Development 16: 6–21.

Birdwell CE, Queen KJ, Kilgore P, Rollyson P, Trutschl M, Cvek U, Scott RS (2014) Genome-wide DNA methylation as an epigenetic consequence of Epstein-Barr virus infection of immortalized keratinocytes. Journal of Virology 88: 11442–11458.

Bocchetti R, Regoli F (2006) Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere 65: 913–921.

Bond DM, Baulcombe DC (2015) Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112: 201413053.

Bourbonnais R, Leech D, Paice MG (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica et Biophysica Acta 1379: 381–390.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Bochemistry 72: 248–254.

Breitenbach M, Weber M, Rinnerthaler M, Karl T, Breitenbach-Koller L (2015) Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. Biomolecules 5: 318–342.

Breuillin F, Dutech C, Robin C (2006) Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers.

Mycological Research 110: 288–296.

Brown AJP, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene IV, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S, Leach MD (2014) Stress adaptation in a pathogenic fungus. The Journal of Experimental Biology 217: 144–55.

Bryner SF, Rigling D (2011) Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. The American Naturalist 177: 65–74.

Bryner SF, Rigling D (2012) Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in populations of the chestnut blight fungus. Phytopathology 102: 1161–1167.

Cai G, Hillman BI (2013) Phytophthora viruses. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 327-350.

Calmes B, Morel-Rouhier M, Bataillé-Simoneau N, Gelhaye E, Guillemette T, Simoneau P (2015) Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. BMC Microbiology 15:123.

Camejo D, Guzmán-Cedeño Á, Moreno A (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. Plant Physiology and Biochemistry 103: 10–23.

Castro M, Kramer K, Valdivia L, Ortiz S, Castillo A (2003) A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters 228: 87–91.

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

Chen B, Choi GH, Nuss DL (1994) Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. Science 264: 1762–1764.

Chen B, Gao S, Choi GH, Nuss DL (1996) Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated cAMP levels by a virulence-attenuating hypovirus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 7996–8000.

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

Chen CN, Pan SM (1996) Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. Botanical Bulletin of Academia Sinica 37: 107–111.

Cho WK, Lee KM, Yu J, Son M, Kim KH (2013) Insight into mycoviruses infecting *Fusarium* species. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 273-288.

Choi GH, Larson TG, Nuss DL (1992) Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in na isogenic hypovirulent strain. Molecular Plant-Microbe Interactions 5: 119–128.

Christopher LP, Yao B, Ji Y (2014) Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. Frontiers in Energy Research 2: 1–13.

Chu YM, Lim WS, Yea SJ, Cho JD, Lee YW, Kim KH (2004) Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. Virus Genes 28: 135–143.

Chun SJ, Lee YH (2009) Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiology Letters 148: 159–162.

Chung HJ, Kwon BR, Kim JM, Park SM, Park JK, Cha BJ, Yang MS, Kim DH (2008) A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated Laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI 21: 1582–1590.

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

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

Covian R, Chess D, Balaban RS (2012) Continuous monitoring of enzymatic activity within native electrophoresis gels: Application to mitochondrial oxidative phosphorylation complexes. Analytical Biochemistry 431: 30–39.

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

Dawe AL, Nuss DL (2013) Hypovirus molecular biology. From Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 109-147.

Day PR, Dodds JA, Elliston JE, Jaynes RA, Anagnostakis SL (1977) Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. Phytopathology 67: 1393–1396.

Deng F, Allen TD, Hillman BI, Nuss DL (2007) Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Eukaryotic Cell 6: 1286–1298.

Deribe YL, Pawson T, Dikic I (2010) Post-translational modifications in signal integration. Nature Structural & Molecular Biology 17: 666–72.

Deroy A, Saiag F, Kebbi-Benkeder Z, Touahri N, Hecker A, Morel-Rouhier M, Colin F, Dumarcay S, Gérardin P, Gelhaye E (2015) The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi. PLoS ONE 10: 1–13.

Ding P, Liu F, Xu C, Wang K (2007) Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. Biological Control 40: 9–14.

Dittmer JK, Patel NJ, Dhawale SW, Dhawale SS (1997) Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chryosporium* grown under nutrient sufficiency. FEMS Microbiology Letters 149: 65–70.

Dodds JA (1980) Association of type 1 viral-like dsRNA wth club-shaped particles in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Virology 107: 1–12

Eaton DL, Bammler TK (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicological Sciences 49: 156–164.

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

Emri T, Pocsi I, Szentirmai A (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. Free Radical Biology & Medicine 23: 809– 814.

EPPO (2005) *Cryphonectria parasitica.* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 295-298.

Eusebio-Cope A, Sun L, Tanaka T, Chiba S, Kasahara S, Suzuki N (2015) The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. Virology 477: 164–175.

Feng BZ, Li PQ, Fu L, Yu XM (2015) Exploring laccase genes from plant pathogen genomes: A bioinformatic approach. Genetics and Molecular Research 14: 14019–14036.

Flattery-O'Brien J, Collinson LP, DawesWD (1993) *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. Journal of General Microbiology 139: 501–507.

Gabriel O, Gersten DM (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. Analytical Biochemistry 203: 1–21.

Gao S, Shain L (1995) Activity of polygalacturonase produced by *Cryphonectria parasitica* in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 199-213.

Ghabrial SA, Dunn SE, Li H, Xie J, Baker TS (2013) Viruses of *Helminthosporium* (*Cochlioblus*) *victoriae*. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 289-325.

Gil-ad NL, Bar-Nun N, Noy T, Mayer AM (2000) Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. FEMS Microbiology Letters 190: 121–126.

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

Graves AH (1950) Relative blight resistance in species and hybrids of *Castanea.* Phytopathology 40: 1125-1131.

Grente J (1965) Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. Académie d'Agriculture de France, Extrait du Proces-verbal

de la Séance 51: 1033-1037.

Grente J (1971) Hypovirulence et lutte biologique dans le cas de l'*Endothia parasitica.* Annales de phytopathologie 3: 409-410.

Grente J, Berthelay-Sauret S (1978) Biological control of chestnut blight in France. U: MacDonald W (ed.) American Chestnut Symposium Proceedings. West Wirginia University Agricultural Experiment Station and United States Deparrtment of Agriculture, 30–34.

Gupta S, Rathaur S (2005) Filarial glutathione S-transferase: its induction by xenobiotics and potential as drug target. Acta Biochimica Polonica 52: 493–500.

Hamed RR, Abu-Shady MR, El-Beih FM, Abdalla AM, Afifi OM (2005) Purification and characterization of a glutathione S-transferase from *Mucor mucedo*. Polish Journal of Microbiology 54: 153–160.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Hansberg W, Salas-Lizana R, Domínguez L (2012) Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. Archives of Biochemistry and Biophysics 525: 170–180.

Havir EA, Anagnostakis SL (1983) Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Physiological Plant Pathology 23: 369–376.

Havir EA, Anagnostakis SL (1985) Oxaloacetate acetylhydrolase activity in virulent and hypovirulent strains of *Endothia* (*Cryphonectria*) *parasitica*. Physiological Plant Pathology 26: 1–9.

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

Herrera CM, Bazaga P (2010) Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. New Phytologist 187: 867–76.

Herrmann D, Poncet BN, Manel S, Rioux D, Gielly L, Taberlet P, Gugerli F (2010) Selection

criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. Genome 53: 302–310.

Hess J, Leitner C, Galhaup C, Kulbe KD, Hinterstoisser B, Steinwender M, Haltrich D (2002) Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology 98–100: 229–41.

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

Hillman BI, Fullbright DW, Nuss DL, Van Alfen NK (1995) *Hypoviridae*. U: Murphy FA (ed.) Virus taxonomy. New York, Springer Verlag, 261–264.

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

Hollings M (1962) Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature 196: 962–965.

Howitt RLJ, Beever RE, Pearson MN, Forster RLS (2001) Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant "potex-like" viruses. Journal of General Virology 82: 67–78.

Howitt RLJ, Beever RE, Pearson MN, Forster RLS (2006) Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, Botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant "potex-like" viruses. Archives of Virology 151: 563–579.

Huang J, Yang M, Zhang X (2016) The function of small RNAs in plant biotic stress response. Journal of Integrative Plant Biology 58: 312–327.

Hyder R, Pennanen T, Hamberg L, Vainio EJ, Piri T, Hantula J (2013) Two viruses of *Heterobasidion* confer beneficial, cryptic or detrimental effects to their hosts in different situations. Fungal Ecology 6: 387–396.

Ihrmark K, Johannesson H, Stenström E, Stenlid J (2002) Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. Fungal Genetics and Biology 36: 147–154.

Ihrmark K, Stenström E, Stenlid J (2004) Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. Mycological Research 108: 149–153.

Ilyas S, Rehman A, Varela AC, Sheehan D (2014) Redox proteomics changes in the fungal pathogen *Trichosporon asahii* on arsenic exposure: Identification of protein responses to metal-induced oxidative stress in an environmentally-sampled isolate. PLoS ONE 9: 24–26.

Jacobson DJ, Beurkens K, Klomparens KL (1998) Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at het loci in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology 23: 45–56.

Jakupović M, Heintz M, Reichmann P, Mendgen K, Hahn M (2006) Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. Fungal Genetics and Biology 43: 8–19.

Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14: 1511–1527.

Ježić M, Krstin L, Poljak I, Liber Z, Idžojtić M, Jelić M, Meštrović M, Zebec M, Ćurković-Perica M (2014) *Castanea sativa*: genotype-dependent recovery from chestnut blight. Tree Genetics & Genomes 10: 101–110.

Jiang D, Fu Y, Guoqing L, Ghabrial SA (2013) Viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 215-248.

Kang HS, Choi JW, Park SM, Cha B, Yang MS, Kim DH (2000) Ordered differential display from *Cryphonectria parasitica*. The Plant Pathology Journal 16: 142–146.

Kathiria P, Sidler C, Golubov A, Kalischuk M, Kawchuk LM, Kovalchuk I (2010) Tobacco mosaic virus infection results in an increase in recombination frequency and resistance to viral, bacterial, and fungal pathogens in the progeny of infected tobacco plants. Plant Physiology 153: 1859–1870.

Kawasaki L, Aguirre J (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology 183: 1434–1440.

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

Kim DH, Rigling D, Zhang L, Van Alfen NK (1995) A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of *Lac1*. Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 259–266.

Kim HP, Lee JS, Hah YC, Roe JH (1994) Characterization of the major catalase from Streptomyces coelicolor ATCC 10147. Microbiology 140: 3391-3397.

Kim JM, Park JA, Kim DH (2012) Comparative proteomic analysis of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, under tannic-acid-inducing and hypovirus-regulating conditions. Canadian Journal of Microbiology 58: 863–871.

Kim MJ, Choi JW, Park SM, Cha BJ, Yang MS, Kim DH (2002) Characterization of a fungal protein kinase from *Cryphonectria parasitica* and its transcriptional upregulation by hypovirus. Molecular Microbiology 45: 933–941.

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

Krstin L (2009) Genska varijabilnost hipovirusa na području hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, doktorski rad.

Krstin L, Katanić Z, Ježić M, Poljak I, Nuskern L, Matković I, Idžojtić M, Ćurković-Perica M (2017) Biological control of chestnut 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 L, Novak-Agbaba S, Rigling D, Krajačić M, Ćurković-Perica M (2008) Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. Plant Pathology 57: 1086–1096.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.

Larson TG, Choi GH, Nuss DL (1992) Regulatory pathways governing modulation of fungal gene expression by a virulence-attenuating mycovirus. The EMBO Journal 11: 4539–

4548.

Larson TG, Nuss DL (1994) Altered transcriptional response to nutrient availability in hypovirus-infected chestnut blight fungus. The EMBO Journal 13: 5616–5623.

Lee DH, Kim YS, Lee CB (2001) The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Physiology 158: 737–745.

Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. Plant Science 159: 75–85.

Lee KM, Cho WK, Yu J, Son M, Choi H, Min K, Lee YW, Kim KH (2014) A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. PLoS ONE 9: e100989.

Leslie JF, Zeller KA (1996) Heterokaryon incompatibility in fungi: more than just another way to die. Journal of Genetics 75: 415–424.

Li H, Fu Y, Jiang D, Li G, Ghabrial SA, Yi X (2008) Down-regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* gene expression in response to infection with *Sclerotinia sclerotiorum* debilitation-associated RNA virus. Virus Research 135: 95–106.

Liao S, Li R, Shi L, Wang J, Shang J, Zhu P, Chen B (2012) Functional analysis of an S-adenosylhomocysteine hydrolase homolog of chestnut blight fungus. FEMS Microbiology Letters 336: 64–72.

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

Lushchak VI (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology 153: 175–190.

Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ (2007) A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. Science 315: 513–515.

Martienssen RA, Colot V (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. Science 293: 1070–1074.

Marzano SYL, Hobbs HA, Nelson BD, Hartman GL, Eastburn DM, McCoppin NK, Domier

LL (2015) Transfection of *Sclerotinia sclerotiorum* with *in vitro* transcripts of a naturally occurring interspecific recombinant of *Sclerotinia sclerotiorum* Hypovirus 2 significantly reduces virulence of the fungus. Journal of Virology 89: 5060–5071.

Mason G, Noris E, Lanteri S, Acquadro A, Accotto GP, Portis E (2008) Potentiality of methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) in identifying genes involved in tomato response to tomato yellow leaf curl Sardinia virus. Plant Molecular Biology Reporter 26: 156–173.

Mathieu Y, Prosper P, Buée M, Dumarçay S, Favier F, Gelhaye E, Gérardin P, Harvengt L, Jacquot JP, Lamant T, Meux E, Mathiot S, Didierjean C, Morel M (2012) Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. Journal of Biological Chemistry 287: 39001–39011.

Mathieu Y, Prosper P, Favier F, Harvengt L, Didierjean C, Jacquot JP, Morel-Rouhier M, Gelhaye E (2013) Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. PLoS ONE 8: e80298.

McGoldrick S, O'Sullivan SM, Sheehan D (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. FEMS Microbiology Letters 242: 1–12.

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

Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. The EMBO Journal 19: 5194–5201.

Milgroom MG, Cortesi P (2004) Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annual Review of Phytopathology 42: 311–338.

Montibus M, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Barreau C, Ponts N (2015) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. Critical Reviews in Microbiology 41: 295–308.

Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defences against

reactive oxygen species in yeast. Molecular Microbiology 19: 651–658.

Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot JP, Gelhaye E (2009) The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Cellular and Molecular Life Sciences 66: 3711–3725.

Muñoz-Adalia EJ, Fernández MM, Diez JJ (2016a) The use of mycoviruses in the control of forest diseases. Biocontrol Science and Technology 26: 577–604.

Muñoz-Adalia EJ, Flores-Pacheco JA, Martínez-Álvarez P, Martín-García J, Fernández M, Diez JJ (2016b) Effect of mycoviruses on the virulence of *Fusarium circinatum* and laccase activity. Physiological and Molecular Plant Pathology 94: 8–15.

Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. Current Genetics 29: 352–359.

Niku-Paavola ML, Raaska L, Itävaara M (1990) Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. Mycological Research 94: 27–31.

Nuskern L, Tkalec M, Ježić M, Katanić Z, Krstin L, 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 DL (2005) Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. Nature Reviews. Microbiology 3: 632–642.

Nuss DL (2011) Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. U: Maramorosch K, Shatkin AJ, Murphy FA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 80). San Diego, Academic Press, 25-48.

Nuss DL, Koltin Y (1990) Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 28: 37–58.

Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. Frontiers in Plant Science 6:723.

Park JA, Kim JM, Park SM, Kim DH (2012) Characterization of *CpSte11*, a MAPKKK gene

of *Cryphonectria parasitica*, and initial evidence of its involvement in the pheromone response pathway. Molecular Plant Pathology 13: 240–250.

Paschos K, Allday MJ (2010) Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. Trends in Microbiology 18: 439–447.

Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. 3 Biotech 4: 77–84.

Pearson MN, Bailey AM (2013) Viruses of *Botrytis*. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 249-272.

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

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

Peters FS, 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.

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology 5: 308–316.

Ponts N, Couedelo L, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin MN, Barreau C, Richard-Forget F (2009) *Fusarium* response to oxidative stress by H_2O_2 is trichothecene chemotype-dependent. FEMS Microbiology Letters 293: 255–262.

Powell WA, Van Alfen NK (1987) Differential accumulation of poly(A)$^+$ RNA between virulent and double-stranded RNA-induced hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. Molecular and Cellular Biology 7: 3688–3693.

R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM (2008) Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. Journal of Virology 82: 8997–9007.

Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Molecular and General Genetics 253: 703–710.

Ricci G, Lo Bello M, Caccuri AM, Galiazzo F, Federici G (1984) Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 143: 226–230.

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

Rigling D, Van Alfen NK (1991) Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. Journal of Bacteriology 173: 8000–8003.

Rigling D, Van Alfen NK (1993) Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Applied and Environmental Microbiology 59: 3634–3639.

Rivoal J, Smith CR, Moraes TF, Turpin DH, Plaxton WC (2002) A method for activity staining after native polyacrylamide gel electrophoresis using a coupled enzyme assay and fluorescence detection: Application to the analysis of several glycolytic enzymes. Analytical Biochemistry 300: 94–99.

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 Landscape Research 76: 361–367.

Robin C, Lanz S, Soutrenon A, Rigling D (2010) Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. Biological Control 53: 55–61.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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

Schulz B, Eckstein RL, Durka W (2013) Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. Molecular Ecology Resources 13: 642–653.

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

Shear CL, Stevens NE (1913) The chestnut-blight parasite (*Endothia parasitica*) from China. Science, New Series 38: 295–297.

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

Smit WA, Wingfield BD, Wingfield MJ (1996) Reduction of laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA-containing strains of *Diaporthe ambigua*. Phytopathology 86: 1311-1316.

Son M, Yu J, Kim KH (2015) Five Questions about Mycoviruses. PLoS Pathogens 11: 1–7.

Soosaar JLM, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. Nature Reviews Microbiology 3: 789–798.

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

Tan CMC, Pearson MN, Beever RE, Parkes SL (2007) Why Fungi Have Sex? Abstract: IVth International *Botrytis* Symposium, 21–26 October 2007, Cape Town, South Africa.

Thuillier A, Ngadin AA, Thion C, Billard P, Jacquot JP, Gelhaye E, Morel M (2011) Functional diversification of fungal glutathione transferases from the Ure2p class. International Journal of Evolutionary Biology 2011: 1–9.

Thurston CF (1994) The stucture and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19–26.

Turina M, Rossi M, Moretti M (2015) Investigation on the partial resistance of Cpkk2 knock out strain of *Cryphonectria parasitica* to *Cryphonectria hypovirus 1* infection in presence of Geneticin and Geneticin resistance gene. Virus Research 219: 58–61.

Tziros GT, Nakopoulou ZG, Diamandis S (2015) *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus, causes cankers on *Quercus frainetto* in Greece. Australasian Plant Disease Notes 10:19.

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

van Heerden SW, Geletka LM, Preisig O, Nuss DL, Wingfield BD, Wingfield MJ (2001) Characterization of South African *Cryphonectria cubensis* isolates infected with a *C. parasitica* hypovirus. Phytopathology 91: 628–32.

Varley DA, Podila GK, Hiremath ST (1992) Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: suppression of cutinase gene expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. Molecular and Cellular Biology 12: 4539–4544.

Vorob'eva LI (2004) Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A review. Applied Biochemistry and Microbiology 40: 217–224.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407–4414.

Wach MP, Sriskantha A, Romaine CP (1987) Double-stranded RNAs associated with La France disease of the commercial mushroom. The American Phytopathological Society 77: 1321–1325.

Wang H, Hao L, Shung CY, Sunter G, Bisaro DM (2003) Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. The Plant Cell 15: 3020–3032.

Wang J, Shi L, He X, Lu L, Li X, Chen B (2016) Comparative secretome analysis reveals perturbation of host secretion pathways by a hypovirus. Scientific Reports 6:34308.

Wickner RB, Fujimura T, Esteban R (2013) Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. U: Ghabrial SA (ed.) Advances in Virus Research (Vol. 86). San Diego, Academic Press, 1-31.

Wieczorek P, Obrepalska-Steplowska A (2014) Suppress to survive - implication of plant viruses in PTGS. Plant Molecular Biology Reporter 33: 335–346.

Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. Analytical Biochemistry 44: 301–305.

Wu H, Zhang Y (2014) Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. Cell 156: 45–68.

Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinovic Carugo K (2004) Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 8569–8574.

Xie J, Jiang D (2014) New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. Annual Review of Phytopathology 52: 45–68.

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

Yang X, Xie Y, Raja P, Li S, Wolf JN, Shen Q, Bisaro DM, Zhou X (2011) Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by βc1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. PLoS Pathogens 7: e1002329.

Yu X, Li B, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Yi X, Yi X, Jiang D (2013) Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110: 1452–1457.

Zhang C, Wu Z, Li Y, Wu J (2015) Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. Frontiers in Microbiology 6: 1–12.

Zhang D-X, Nuss DL (2016) Engineering super mycovirus donor strains of chestnut blight fungus by systematic disruption of multilocus vic genes. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America 113: 2062–2067.

Zhang L, Baasiri RA, van Alfen NK (1998) Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. Molecular and Cellular Biology 18: 953–959.

Zhang L, De Wu M, Li GQ, Jiang DH, Huang HC (2010) Effect of *Mitovirus* infection on formation of infection cushions and virulence of *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology 75: 71–80.

Zhong J, Chen D, Zhu HJ, Gao BD, Zhou Q (2016) Hypovirulence of *Sclerotium rolfsii* caused by associated RNA mycovirus. Frontiers in Microbiology 7:1798.

Zhu F, Xi DH, Deng XG, Peng XJ, Tang H, Chen YJ, Jian W, Feng H, Lin HH (2014) The chilli veinal mottle virus regulates expression of the tobacco mosaic virus resistance gene *N* and jasmonic acid/ethylene signaling is essential for systemic resistance against chilli veinal mottle virus in tobacco. Plant Molecular Biology Reporter 32: 382–394.

8. PRILOZI

Prilog 1. Sastav kalij-fosfatnog pufera za ekstrakciju ukupnih proteina i matičnih otopina potrebnih za pripravu ekstrakcijskog pufera.

EKSTRAKCIJSKI PUFER **100 mM kalij-fosfatni pufer; pH 7,0**		
		mL/100 mL
1 M K_2HPO_4		6,15
1 M KH_2PO_4		3,85
10 mM EDTA		1
dH_2O		do 100
Matične otopine		
	m (g)	V dH_2O (mL)
1 M K_2HPO_4	8,709	50
1 M KH_2PO_4	6,804	50
10 mM EDTA	0,186	50

Prilog 2. Sastav reakcijskog pufera i matičnih otopina za mjerenje aktivnosti glutation S-transferaze (GST).

GST REAKCIJSKI PUFER **100 mM kalij-fosfatni pufer s 1 mM CDNB; pH 6,4**		
		mL/100 mL
1 M K_2HPO_4		2,78
1 M KH_2PO_4		7,22
100 mM CDNB		1,00
dH_2O		do 100
Matične otopine		
	m (mg)	V (mL)
100 mM CDNB (1 mL)	20,3	1,0 (96%-tni EtOH)
100 mM GSH (1 mL)	30,7	1,0 (dH_2O)

Prilog 3. Sastav reakcijskog pufera za mjerenje aktivnosti katalaze (CAT).

CAT REAKCIJSKI PUFER **50 mM kalij-fosfatni pufer s 0,03%-tnim H_2O_2; pH 7,0**	
	V/100 mL
1 M K_2HPO_4	3,075 mL
1 M KH_2PO_4	1,925 mL
30%-tni H_2O_2	100 µL
dH_2O	do 100 mL

Prilog 4. Sastav reakcijskog pufera i matičnih otopina za mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).

SOD REAKCIJSKI PUFER **50 mM kalij-fosfatni pufer sa 75 µM NBT i 0,1 mM EDTA; pH 7,8**		
		Količina/100 mL
1 M K_2HPO_4		4,54 mL
1 M KH_2PO_4		0,46 mL
NBT		6,15 mg
10 mM EDTA		1,00 mL
dH_2O		do 100 mL
Matične otopine		
	Količina	V dH_2O (mL)
10,8 mM ksantin (10 mL)	16,4 mg	10,0
0,05 U/mL XOD (1 mL)	5 µL	0,995

Prilog 5. Sastav reakcijskog pufera i matičnih otopina za mjerenje aktivnosti lakaze (LAC).

LAC REAKCIJSKI PUFER **100 mM natrij-acetatni pufer; pH 3,5**		
		Količina/100 mL
Natrijev acetat		1,361 g
45%-tna octena kiselina		Titrirati do pH 3,5
dH_2O		do 100 mL
Matične otopine		
	m (mg)	V dH_2O (mL)
ABTS	27,434	1,0

Prilog 6. Sastav pufera za određivanje aktivnosti GST u poliakrilamidnom gelu.

(1) 100 mM kalij-fosfatni pufer; pH 6,5	
	mL/100 mL
1 M K_2HPO_4	2,78
1 M KH_2PO_4	7,22
dH_2O	do 100 mL
(2) 100 mM kalij-fosfatni pufer s 4,5 mM GSH, 1 mM CDNB i 1 mM NBT; pH 6,5	
	Količina/100 mL
1 M K_2HPO_4	2,78 mL
1 M KH_2PO_4	7,22 mL
GSH	138,3 mg
100 mM CDNB	1,0 mL
NBT	81,8 mg
dH_2O	do 100 mL
(3) 100 mM Tris/HCl s 3 mM PMS; pH 9,6	
	Količina/100 mL
Tris	1,2114 g
4,0 M HCl	Titrirati do pH 9,6
PMS	91,9 mg
dH_2O	do 100 mL

Prilog 7. Sastav otopina za određivanje aktivnosti CAT u poliakrilamidnom gelu.

(1) 5 mM otopina H_2O_2		
30%-tni H_2O_2		51 µL
dH_2O		100 mL
(2) 1% $K_3[Fe(CN)_6]$/1% $FeCl_3$		
		Količina/100 mL
i)	$K_3[Fe(CN)_6]$	1 g
	dH_2O	50 mL
ii)	$FeCl_3$	1 g
	dH_2O	50 mL
Otopine i) i ii) pomiješati neposredno prije bojanja		

Prilog 8. Sastav pufera za određivanje aktivnosti SOD u poliakrilamidnom gelu.

(1) 50 mM kalij-fosfatni pufer s 2,45 mM NBT; pH 7,8	
	Količina /100 mL
1 M K_2HPO_4	4,54 mL
1 M KH_2PO_4	0,46 mL
NBT	0,1 g
dH_2O	do 100 mL
(2) 50 mM kalij-fosfatni reakcijski pufer (28 µM riboflavinom i 28 mM TEMED); pH 7,8	
	mL/100 mL
1 M K_2HPO_4	4,54 mL
1 M KH_2PO_4	0,46 mL
28 mM riboflavin*	0,1 mL
TEMED	0,452 mL
dH_2O	do 100 mL
* 28 mM riboflavin se dobije otapanjem 105,0 mg riboflavina u 10 mL dH_2O	

Prilog 9. Sastav pufera za određivanje aktivnosti LAC u poliakrilamidnom gelu.

100 mM natrij-acetatni pufer s 2,5 mM ABTS; pH 3,5	
	Količina/100 mL
Natrijev acetat	1,361 g
45%-tna octena kiselina	Titrirati do pH 3,5
ABTS	137,17 mg
dH_2O	do 100 mL

9. ŽIVOTOPIS

Lucija Nuskern rođena je 5. prosinca 1988. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu upisala je 2007. godine, a titulu magistre struke Znanosti o okolišu stekla je 2012. obranom diplomskog rada naslova „Uklanjanje fosfata i teških metala pomoću bakterija *Acinetobacter junii* i *Pseudomonas aeruginosa* imobiliziranih na prirodni zeolitni tuf", pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Prvo radno iskustvo Lucija je stekla na mjestu stručne suradnice u Samostalnoj službi za umjerni laboratorij Državnog hidrometeorološkog zavoda, a od siječnja 2015. zaposlena je u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a kao stručna suradnica (kasnije asistentica) za rad na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Raznolikost i interakcije kestena, patogene gljive i virusa (agensa biološke kontrole gljive): učinak na oporavak kestena" pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica. Također je znanstveno sudjelovala i na projektu „Invasive chestnut diseases in the Balkans and Georgia – epidemiological research and management options", financiranom sredstvima Švicarske nacionalne zaklade za znanost, te projektima Sveučilišta u Zagrebu „Molekularna ekologija patogenih mikroba" i „Molekularna epidemiologija gljiva i gljivama sličnih organizama". U nastavi je sudjelovala kao asistentica na vježbama iz kolegija Opća mikrobiologija i kao voditeljica Laboratorijske stručne prakse, te je bila neposredna voditeljica jednog diplomskog rada. Lucija se dodatno usavršavala sudjelovanjem na brojnim radionicama, od kojih bi posebno istaknula edukaciju „Fungal taxonomy and identification using traditional (i.e. not molecular) techniques" u sklopu COST akcije FP1401. Do sad je objavila tri izvorna znanstvena rada u časopisima koje citiraju baze WOS i CC, te 15 sažetaka u zbornicima skupova, od kojih su dva bila u obliku usmenog izlaganja.

Popis publikacija

Izvorni znanstveni radovi u WOS i CC časopisima

1. **Nuskern L**, Ježić M, Liber Z, Mlinarec J, Ćurković-Perrica M (2017) *Cryphonectria hypovirus 1*-induced epigenetic changes in infected phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica.* Microbial Ecology doi: 10.1007/s00248-017-1064-1

2. **Nuskern 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

3. Krstin Lj, Katanić Z, Ježić M, Poljak I, **Nuskern L**, Matković I, Idžojtić M, Ćurković-Perica M (2017) Biological control of chestnut 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

Sažeci u zbornicima skupova

1. Ježić M, Nuskern L, Tkalec M, Liber Z, Krstin Lj, Katanić Z, Mlinarec J, Ćurković-Perica Mirna (2017) Viruses in biocontrol: CHV1-affected epigenetic and biochemical changes in *Cryphonectria parasitica*. Book of Abstracts "Sustainable forestry: Fact or Fiction?": 24, Skopje, Makedonija

2. **Nuskern L**, Tkalec M, Gačar M, Ježić M, Ćurković-Perica M (2017) Laccase activity change in *Cryphonectria hypovirus 1*-infected *Cryphonectria parasitica* is influenced by culture conditions, fungal isolate and virus strain. http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/scientific-information/interactive-programme#.WY1s5lFLe9s, Valencia, Španjolska

3. Ćurković-Perica M, Ježić M, Krstin Lj, Katanić Z, **Nuskern L**, Poljak I, Idžojtić M (2017) Chestnut-fungus-virus interactions for biocontrol of chestnut blight. Programme and Abstracts of the International Conference Plant Nutrition, Growth & Environment Interactions III: 34, Beč, Austrija

4. Ćurković-Perica M, Krstin Lj, Katanić Z, Ježić M, **Nuskern L**, Poljak I, Idžojtić M (2017) Hypovirulent *Cryphonectria parasitica* strains for biocontrol of chestnut blight in nurseries. Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate IOBC-WPRS Bulletin: 238-239, Niagara Falls, Kanada

5. Ćurković-Perica M, Ježić M, Krstin Lj, Katanić Z, **Nuskern L**, Poljak I, Idžojtić M (2016) Biological control of chestnut blight: an interplay between chestnut, fungus *Cryphonectria parasitica* and *Cryphonectria hypovirus 1*. IOBC-WPRS Bulletin,

Preceedings of the Meeting "Biocontrol and Microbial Ecology": 95-97, Berlin, Njemačka

6. Ćurković-Perica M, Ježić M, Krstin Lj, Katanić Z, **Nuskern L**, Poljak I, Idžojtić M (2016) Recovery of chestnut from chestnut blight depends on combination of virus strains used for biocontrol. Power of Microbes in Industry and Environment, Book of Abstracts: 51, Krk, Hrvatska

7. Ježić M, Mlinarec Novosel J, **Nuskern L**, Tkalec M, Katanić Z, Vuković R, Krstin Lj, Poljak I, Idžojtić M, Ćurković-Perica M (2016) Long term (in)stability of vegetative incompatibility type diversity and hypovirulence in *Cryphonectria parasitica* populations. IOBC-WPRS Bulletin, Preceedings of the Meeting "Biocontrol and Microbial Ecology": 211-213, Berlin, Njemačka

8. Ježić M, Mlinarec-Novosel J, **Nuskern L**, Tkalec M, Katanić Z, Vuković R, Krstin Lj, Poljak I, Idžojtić M, Ćurković-Perica M (2016) Promjene u populacijama *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj u posljednjih deset godina. 5. Hrvatski botanički simpozij, Knjiga sažetaka: 111-112, Primošten, Hrvatska

9. Mlinarec J, Ježić M, Vuković R, Katanić Z, Krstin Lj, **Nuskern L**, Poljak I, Idžojtić M, Tkalec M, Ćurković-Perica M (2016) Multilocus PCR assays reveal vegetative incompatibility gene profiles of *Cryphonectria parasitica* in Europe. 6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Book of Abstracts: 49, Sveti Martin na Muri, Hrvatska

10. ***Nuskern L**, Tkalec M, Ježić M, Katanić Z, Krstin Lj, Ćurković-Perica M (2016) In search for optimal virus strain for biological control of chestnut blight. Natural resources green technology & sustainable development/2 Book of abstracts:122, Zagreb, Hrvatska

11. Ježić M, Idžojtić M, Tkalec M, **Nuskern L**, Poljak I, Katanić Z, Vuković R, Krstin Lj, Ćurković-Perica M (2015) Naturally occurring hypovirulence is necessary for the survival of the chestnut. 6th Balkan Botanical Congress, Book of Abstracts: 27, Rijeka, Hrvatska

12. **Nuskern L**, Katanić Z, Krstin Lj, Ježić M, Ćurković-Perica M (2015) Persistence of *Cryphonectria hypovirus 1* in *Cryphonectria parasitica* might be affected by the

transfer between the different vegetative compatibility types of the host. Zbornik sažetaka (Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem): 129-130, Sveti Marrtin na Muri, Hrvatska

13. **Nuskern L**, Tkalec M, Ježić M, Katanić Z, Krstin Lj, Ćurković-Perica M (2015) Genotype by genotype dependence of hypovirus-induced stress in chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. 36th New Phytologist Symposium, Cell biology at the plant-microbe interface, Programme, abstracts and participants: 55, München, Njemačka

14. ***Nuskern L**, Hrenović J (2013) Uklanjanje teških metala i fosfata iz otpadnih voda biočesticama. The 2nd International Symposium "VERA JOHANIDES" Biotechnology in Croatia by 2020: 89-90, Zagreb, Hrvatska

15. **Nuskern L**, Ivanković T, Hrenović J (2013) Removal of phosphate and heavy metals from wastewater by bacteria immobilized on natural zeolitic tuff. FEMS 2013, Leipzig, Njemačka

* - usmeno izlaganje