

Utjecaj infekcije hipovirusom CHV-1 na aktivnost lakaza u gljive *Cryphonectria parasitica*

Gačar, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:035973>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Gačar

**Utjecaj infekcije hipovirusom CHV-1 na aktivnost lakaza u
gljive *Cryphonectria parasitica***

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen u laboratoriju za virologiju na Zavodu za mikrobiologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković-Perice i pod neposrednim vodstvom mag. oecol. Lucije Nuskern predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvale

Hvala mami i tati na brizi i emocionalnoj i financijskoj potpori tijekom izrade ovog diplomskog rada, preddiplomskog i diplomskog studija te školovanja općenito.

Hvala Ani Bučan na savjetima, podršci i pomoći prilikom pisanja ovog rada.

Hvala kolegama i prijateljima Mateji, Saši, Ani, Ivoni, Zrinku i Danijelu na svakoj pruženoj pomoći, razumijevanju i potpori kada je to bilo najpotrebnije.

Hvala mojim srednjoškolskim prijateljicama, Tari i Nikolini, koje su mi godinama bile velika potpora, osobito u teškim i bolnim životnim trenucima.

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

Posebno hvala pomoćnoj voditeljici Luciji Nuskern na njenom strpljenju, trudu, uloženom vremenu te pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec i izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek što su mi omogućile da dio eksperimenata napravim u Laboratoriju za fiziologiju bilja Botaničkog zavoda.

Martina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj infekcije hipovirusom CHV-1 na aktivnost lakaza u gljive

Cryphonectria parasitica

Martina Gačar

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fitopatogena gljiva *Cryphonectria parasitica* uzrokuje rak kore pitomoga kestena (*Castanea sativa*). U Europi je bolest kontrolirana prisutnošću virusa *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), koji smanjuje virulenciju i sporulaciju gljive, čime uzrokuje fenomen nazvan hipovirulencija. U ovom istraživanju u virulentne gljive unesena su tri izolata virusa CHV-1 koji pripadaju dvama podtipovima. Prisutnost virusa dokazana je izolacijom dsRNA i reverznom transkripcijom te amplifikacijom dvaju otvorenih okvira čitanja virusne cDNA (ORF-A i ORF-B). Uspoređena je aktivnost unutarstanične lakaze LAC-2 i izvanstanične lakaze LAC-1 u virulentnim i hipovirulentnim izolatima gljive. Rezultati su pokazali da virus CHV-1 ne utječe na aktivnost unutarstanične lakaze LAC-2, dok aktivnost izvanstanične lakaze LAC-1 ovisi o izolatu i podtipu virusa, te o genotipu gljive.

(35 stranica, 12 slika, 12 tablica, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: kesten, hipovirulencija, lakaze, podtipovi virusa

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

Neposredni voditelj: mag.oecol. Lucija Nuskern

Ocjenitelji: Dr. sc. Mirna Ćurković-Perica, red. prof.

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Zamjena: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18.02.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effect of hypovirus CHV-1 infection on the activity of laccases in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*

Martina Gačar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* causes blight of chestnut (*Castanea sativa*). In Europe the disease is controlled by the presence of virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), which reduces fungal virulence and sporulation, causing the phenomenon called hypovirulence. In this research three CHV-1 isolates belonging to the two subtypes of the virus were transferred to virulent fungal strains. The presence of virus was confirmed by dsRNA isolation, reverse transcription and amplification of two viral cDNA open reading frames (ORF-A and ORF-B). The activity of intracellular laccase LAC-2 and extracellular laccase LAC-1 in virulent and hypovirulent isolates of the fungus was compared. The results have shown that the virus CHV-1 does not affect the activity of the intracellular laccase LAC-2, whereas the activity of the extracellular laccase LAC-1 depends on the subtype and isolate of the virus and genotype of the fungus.

(35 pages, 12 figures, 12 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: chestnut, hypovirulence, laccases, virus subtypes

Supervisor: Dr. Mirna Čurković-Perica, Prof.

Assistant supervisor: Lucija Nuskern, mag. oecol.

Reviewers: Dr. Mirna Čurković-Perica, Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18.02.2016.

Popis kratica i simbola:

ABTS	2,2'-azino-bis -(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
BSA	goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin)
CBB	Comassie brilliant blue
cDNA	komplementarna DNA (engl. complement DNA)
deH₂O	destilirana voda
diH₂O	deionizirana voda
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
dsRNA	dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. double-stranded ribonucleic acid)
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
K₂HPO₄	kalij hidrogenfosfat
KH₂PO₄	kalij dihidrigenfosfat
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. open reading frame)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
PDA	krumpirov dekstrozni agar (engl. potato dextrose agar)
PDB	krumpirov dekstrozni bujon (engl. potato dextrose broth)
RT	reverzna transkripcija
TBE pufer	Tris-borat-EDTA pufer
T_m	temperatura taljenja (engl. melting temperature)
vc tip	tip vegetativne kompatibilnosti

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak kore pitomoga kestena	1
1.2. <i>Cryphonectria parasitica</i>	2
1.3. <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> (CHV-1)	4
1.4. Lakaze	7
1.5. Ciljevi istraživanja	9
2. MATERIJALI I METODE	10
2.1. Materijali	10
2.1.1. Kemikalije	10
2.1.2. Uređaji	11
2.1.3. Eksperimentalni sojevi gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> i virusa CHV-1	11
2.2. Metode	12
2.2.1. Uzgoj gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> na krutoj hranidbenoj podlozi	12
2.2.2. Uzgoj gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> u tekućoj hranidbenoj podlozi	13
2.2.3. Izolacija dvolančane RNA iz micelija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	14
2.2.4. Elektroforeza dvolančane RNA u agaroznom gelu	15
2.2.5. Reverzna transkripcija dvolančane RNA	15
2.2.6. Umnažanje otvorenih okvira čitanja virusa CHV-1 lančanom reakcijom polimerazom ..	17
2.2.7. Elektroforeza umnožene cDNA u agaroznom gelu	18
2.2.8. Liofilizacija i homogenizacija micelija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	19
2.2.9. Ekstrakcija unutarstaničnih proteina gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	19
2.2.10. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	20
2.2.11. Mjerenje aktivnosti lakaza	21
2.2.12. Statistička obrada podataka dobivenih mjerenjem aktivnosti lakaza	21
3. REZULTATI	22
3.1. Optimizacija uzgoja gljive <i>C. parasitica</i> u tekućoj hranidbenoj podlozi	22
3.2. Prisutnost virusa CHV-1 u izolatima gljive <i>C. parasitica</i>	22
3.3. Aktivnost lakaza u virulentnim i hipovirulentnim izolatima gljive <i>C. parasitica</i>	25
4. RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31
ŽIVOTOPIS	36

1. UVOD

1.1. Rak kore pitomoga kestena

Askomicetna gljiva *Cryphonectria parasitica* uzročnik je raka kore pitomoga kestena (*Castanea sativa*). Autohtona je vrsta u istočnoj Aziji, dok je u Europu i Sjevernu Ameriku slučajno unesena početkom 20. stoljeća sa zaraženim sadnicama kestena (Heiniger i Rigling, 1994). U idućim desetljećima bolest se proširila po sjeveroistoku SAD-a, gdje je gotovo uništila šume američkog kestena (*Castanea dentata*). Smatra se da je *C. parasitica* u Europu unesena više puta - direktno iz Azije, ali i iz Sjeverne Amerike, prvo preko Italije, a kasnije preko Francuske i Španjolske (Dutech i sur. 2010). Bolest je u Hrvatskoj prvi put primijećena 1955. godine u okolici Opatije, kamo je vjerojatno stigla iz Slovenije (Krstin i sur. 2008). Za razliku od američkog i europskog kestena, japanski (*Castanea crenata*) i kineski (*Castanea mollissima*) su rezistentni na infekciju, što je vjerojatno posljedica koevolucije s ovom fitopatogenom gljivom (Anagnostakis 1992).

Iako je *C. parasitica* uspješno kolonizirala nasade europskog pitomoga kestena, primijećeno je zarastanje rak rana i oporavak inficiranih stabala. Fenomen prirodne biološke kontrole, koji štiti europski kesten od raka kore, nazvan je hipovirulencija (Heiniger i Rigling 1994). Uzročnik hipovirulencije je virus *Cryphonectria hypovirus-1* (CHV-1), koji inficira gljivu *C. parasitica* i smanjuje njezinu virulenciju. CHV-1 ne uništava gljivu, nego smanjuje oštećenje kestena uzrokovano zarazom tom gljivom.

Kada se bolest pojavila u Europi, aktivno se započelo s biološkom kontrolom na principu hipovirulencije. Oboljela stabla s aktivnim rakom kore tretirana su hipovirulentnim sojevima *C. parasitica*, što je potaknulo stvaranje kalusnog tkiva i zacjeljivanje rana. Velik broj tretiranih stabala i visoka stopa hipovirulencije pridonijeli su uspješnosti biološke kontrole u Europi (Heiniger i Rigling 1994). Osim toga, prirodna prisutnost CHV-1 u europskim populacijama *C. parasitica* u početku je usporila širenje bolesti, dok je mala raznolikost vrst tipova olakšala horizontalno širenje hipovirulencije.

1.2. *Cryphonectria parasitica*

Cryphonectria parasitica Murril Barr je askomicetna, nitasta gljiva s razvijenim micelijem kojeg čini nakupina hifa. Hife su septama podijeljene na pojedinačne stanice, no pore u septama omogućuju strujanje citoplazme između stanica. Pomoću haustorija gljiva prodire u stanicu domaćina i na njemu parazitira crpeći hranjive tvari.

C. parasitica razmnožava se nespolnim i spolnim sporama. Konidije ili piknospore su nespolnog porijekla. One nastaju mitozom unutar piknida na diferenciranim dijelovima micelija - konidioforima. Na vrhu piknide nalazi se ostiola kroz koju se oslobađaju konidije. Kako su uronjene u ljepljivi matriks, kapljicama vode i kišom prenose se na manje udaljenosti, no mogu se zalijepiti za tijelo kukca ili ptice i prenijeti na veće udaljenosti (Griffin i sur. 1986). Tijekom spolnog razmnožavanja gljive stvaraju se haploidne muške (anteridij) i ženske (askogonij) spolne strukture. Prilikom spajanja askogonija i anteridija (plazmogamija) ne dolazi odmah do fuzije jezgara, nego prvo nastaje stanica s dvije haploidne jezgre. Iz takve dikarionske stanice razvija se askogeni micelij s askusima. U askusima dolazi do kariogamije čime nastaje jedna diploidna jezgra. Iz diploidne jezgre mejozom i mitozom nastaje 8 haploidnih jezgara, koje se obaviju opnom i postaju askospore. Askospore su smještene unutar askusa na askokarpu, koji se sužava na gornjem djelu gdje se nalazi ostiola. Kroz ostiolu se oslobađaju askospore. Kada se nađu u zraku, vjetrom i zračnim strujama prenose se na velike udaljenosti (Griffin i sur. 1986).

C. parasitica jedna je od rijetkih gljiva koja se u prirodi spolno razmnožava i samooplodnjom i stranooplodnjom (Milgroom i sur. 1993). U laboratorijskim uvjetima samooplodnja se gotovo uopće ne događa zbog inkompatibilnosti gameta. Spolna kompatibilnost kontrolirana je jednim bialelnim lokusom MAT, na kojemu mogu biti aleli MAT1-1 ili MAT1-2 (Marra i Milgroom 2001). Oplodnja je moguća samo između gameta s različitim MAT alelima.

Tijekom vegetativne faze filamentoznih gljiva često dolazi do anastomoze hifa, odnosno kontakta i fuzije hifa, miješanja citoplazmi i stvaranja heterokariona. U *C. parasitica* sustav heterokarionske ili vegetativne inkompatibilnosti (engl. *vegetative incompatibility - vic*) je antivirusni obrambeni mehanizam na razini populacije (Choi i sur. 2012). Kontroliran je nevezanim genima na multiplim *vic* lokusima. Jedinke s različitim

alelima na jednom ili više *vic* lokusa su vegetativno inkompatibilne. Nakon anastomoze hifa takvih jedinki, dolazi do programirane stanične smrti i nemogućnosti stvaranja stabilnih heterokariona (Glass i Kaneko 2003). Do danas je otkriveno šest *vic* lokusa, svaki s dva alela, što omogućava veliku raznolikost *vic* genotipova ($2^6 = 64$). Nakon pronalaska izolata koji nisu kompatibilni ni sa jednim od 64 *vc* tipa, pretpostavlja se da postoji barem jedan dodatni *vic* gen ili alel (Robin i sur. 2000). U južnoj i istočnoj Europi dominantan je EU-12 *vc* tip, dok je u zapadnoj Europi dominantan EU-2 *vc* tip (Robin i Heiniger 2001).

Stablo kestena inficira se ulaskom askospore ili konidije kroz oštećenja kore pri bazi, uzduž debla ili na granama. Klijanjem spore nastaje narančasti micelij koji intenzivno raste ispod kore stvarajući ulegnuće. Kako se hife šire, tako proizvode različite štetne spojeve. Najznačajnija je oksalna kiselina koja snižava pH vrijednost inficiranog tkiva s 5,5 na 2,8, (McCarroll i Thor 1978) čime djeluje toksično na biljne stanice. Virulentni soj gljive uzrokuje promjenu boje i uzdužno pucanje kore, pri čemu se ona odvaja od stabla na kojemu se stvara aktivni rak (Slika 1a). Kada aktivni rak prodre do kambija, zaustavlja se transport vode i hranjivih tvari, što dovodi do sušenja i odumiranja stabla iznad mjesta zaraze (Robin i sur. 2009). Micelij hipovirulentne gljive uzrokuje površinske nekroze (Slika 1b) karakterizirane hrapavom korom i zadebljanjem debla na mjestu zaraze. Kako je nekroza površinska, micelij gljive sporo napreduje i ne prodire do kambija (Novak-Agbaba i sur. 2000). Kalusirajući rak nastaje kada se virulentni soj gljive inficira hipovirusom. Rana zacjeljuje stvaranjem kalusnog tkiva i stablo se oporavlja. Mikroflora tla antagonistički djeluje na gljivu, tako da zaraza ne zahvaća korijen kestena (Weidlich 1978), što omogućuje stvaranje novih izdanaka.

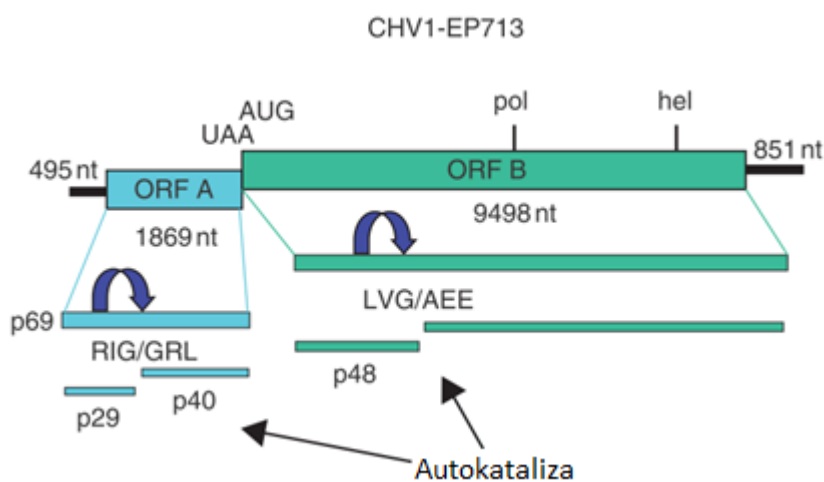


Slika 1. a) Aktivni rak (lijevo) i b) površinska nekroza (desno)
(preuzeto iz Rigling i sur. 2014)

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

Porodica *Hypoviridae* je prva opisana virusna porodica čiji članovi ne sadrže strukturne proteine ni kapsidu, ne stvaraju virione, niti imaju ekstracelularnu fazu životnog ciklusa. Linearna dvolančana RNA (dsRNA) nalazi se unutar membranskih vezikula veličine 50 - 80 nm u citoplazmi stanice gljive. To su sekretorne vezikule koje potječu iz trans-Golgijeve mreže.

Hipovirusna dsRNA ima 40-tak nukleotida dug poliadenilirani 3` kraj kodirajućeg lanca, koji je bazno sparen s poliuridiliranim 5` krajem nekodirajućeg lanca (Tartaglia i sur. 1986). Analizom dsRNA prototipskog virusa CHV-1/EP713 razjašnjena je organizacija genoma i strategija ekspresije proteina (Nuss i sur. 1991). Nukleotidna sekvenca dugačka je 12,7 kb (L-dsRNA), no ponekad se javljaju i kraći oblici dsRNA (M-dsRNA i S-dsRNA) koji sadrže samo dio genoma (Shapira i sur. 1991). Na kodirajućem lancu između 5` i 3` netranslatirane regije (engl. *untranslated region*, 5`UTR i 3`UTR) nalaze se dva uzastopna okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF-A i ORF-B) razdvojena pentanukleotidom 5`-UAAUG-3`, u kojemu UAA predstavlja terminacijski kodon ORF-A, dok AUG predstavlja inicijacijski kodon ORF-B (Slika 2). Prilikom ekspresije proteina dolazi do proteolitičkog procesiranja. Autokatalitičkim cijepanjem poliproteina p69 nastaju dva polipeptida p29 i p40, u čemu sudjeluje proteazna domena unutar polipeptida p29 (Choi i sur. 1991). Slična domena smještena u N-terminalnom dijelu ORF-B autokatalitički cijepa sekvencu koja kodira RNA polimerazu ovisnu o RNA i RNA helikazu, čime nastaje protein p48.



Slika 2. Strategija ekspresije proteina prototipskog hipovirusa CHV-1/EP713 (preuzeto iz Dawe i Nuss 2001)

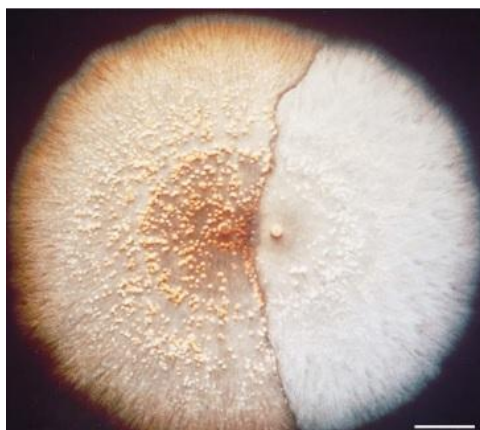
Istraživane su funkcionalne domene CHV-1 koje omogućuju virusu da poveća svoj fitness i mijenja fenotip domaćina (Dawe i Nuss 2001). Pokazano je da p29 ima važnu ulogu u interakciji između virusa i gljive te da utječe na pigmentaciju, nespolnu sporulaciju i smanjenu aktivnost lakaza (Crawen i sur 1993). Delecija p29 donekle smanjuje supresiju aktivnosti lakaza, dok delecija p40 nema nikakvog utjecaja na lakaze (Suzuki i Nuss 2002). Osim toga, p29 pojačava replikaciju RNA i vertikalni prijenos virusa u konidije (Suzuki i sur 2003). Akumulacija RNA ovisi o proteinu p40 (Suzuki i Nuss, 2002). Domene u ORF-B su odgovorne za veličinu i morfologiju raka, rast gljive (Chen i sur. 2000) te promjenu staničnih signalnih puteva (Parsley i sur. 2002).

Kako CHV-1 nema izvanstaničnu fazu i ne može napustiti svog domaćina, prijenos virusa između gljiva odvija se unutarstaničnim načinom (Hillman 2001). Virus CHV-1 horizontalno se širi anastomozom hifa, no ovaj način prijenosa često je inhibiran vegetativnom inkompatibilnošću. Inhibicija nije potpuna, ona ovisi o broju i tipu lokusa *vic*. Virus se može prenijeti i između vegetativno inkompatibilnih izolata, no to se događa s mnogo manjom učestalošću (Cortesi i sur. 2001). Vertikalno širenje virusa moguće je konidijama, koje su u hipovirulentnim sojevima prisutne u mnogo manjem broju, no ne i askosporama (Prospero i sur. 2006). Konidije se najčešće prenose na male udaljenosti, osim ako u prijenos nisu uključeni vektori, među njima i čovjek. Spolno razmnožavanje negativno utječe na širenje hipovirulencije, jer osim što askospore ne sadrže virus, rekombinacijom gena *vic* povećava se raznolikost tipova *vc* (Cortesi i Milgroom 1998).

Rod *Hypovirus* jedini je rod unutar porodice *Hypoviridae*. Do danas su opisane četiri vrste (CHV-1, CHV-2, CHV-3 i CHV-4). Sve vrste inficiraju gljivu *C. parasitica*. Nazvane su redosljedom kojim su otkrivene njihove nukleotidne sekvence, a međusobno se razlikuju u organizaciji genoma, utjecaju na domaćina i prostornoj rasprostranjenosti. Virus CHV-1 najbolje je proučavana vrsta hipovirusa i jedini pronađen u Europi (Milgroom i Cortesi 2004). Prisutan je i u Aziji, odakle i potječe, no nije pronađen u Sjevernoj Americi, osim na nekoliko mjesta gdje je uveden radi biološke kontrole (Peever i sur. 1997). U Europi je zastupljen u velikom broju genotipova, stoga je dodatno klasificiran u pet podtipova: španjolski (CHV-1-E), njemački (CHV-1-D), talijanski (CHV-1-I) i dva francuska (CHV-1-F1 i CHV-1-F2) (Gobbin et al. 2003). Najrašireniji je talijanski podtip (CHV-1-I), koji dominira na području Švicarske, Italije i jugoistočne Europe, uključujući i Hrvatsku.

Osim u rasprostranjenosti, podtipovi CHV-1 razlikuju se i u virulenciji. Francuski podtipovi su najvirulentiji (drastično smanjuju sporulaciju gljive i rast raka), dok je talijanski podtip najmanje virulentan (Chen i Nuss 1999). Zbog smanjene mogućnosti prijenosa i održavanja u populacijama gljive *C. parasitica*, najvirulentniji sojevi CHV-1 virusa jako su rijetki u prirodi. Osim o genotipu virusa, smanjenje virulencije gljive u slučaju infekcije virusom CHV-1 ovisi i o genotipu gljive.

Širenje virusa ovisi o domaćinu, stoga CHV-1 ne ubija svog domaćina, ali utječe na njegovu adaptacijsku vrijednost. Prototipski virus CHV-1/EP713 (francuski podtip) smanjuje virulenciju gljive i mijenja njezine razvojne procese. Hipovirulentne sojeve karakterizira inhibirana spolna reprodukcija, značajno smanjenja nespolna sporulacija i slabija pigmentacija (Milgroom i Cortesi 2004). Virulente kolonije proizvode narančasti ili žuti pigment, dok hipovirulentne kolonije proizvode gotovo bijeli pigment (Slika 3), što predstavlja koristan vidljivi marker za prepoznavanje inficiranih kolonija (McCabe i sur. 1999).



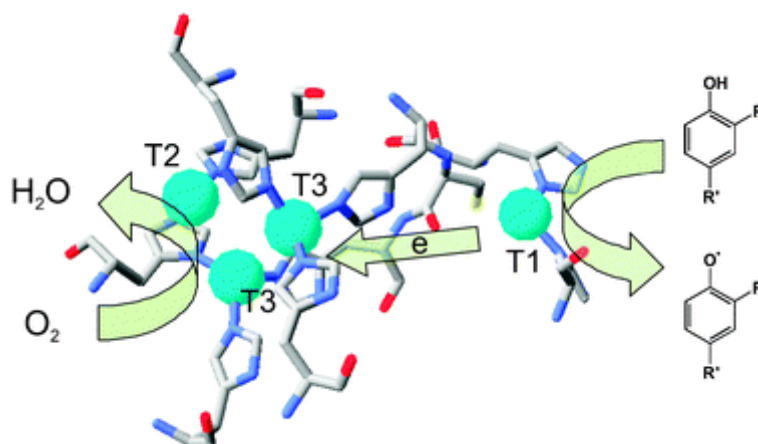
Slika 3. Utjecaj CHV-1 na fenotip gljive *Cryphonectria parasitica*
Virulentni soj ima narančastu pigmentaciju i proizvodi mnoštvo spora (lijevo),
izogeni hipovirulentni soj nije pigmentiran i proizvodi mnogo manje spora (desno).
(preuzeto iz McCabe i sur. 1999).

U hipovirulentnim sojevima uočeno je manje nakupljanje oksalne kiseline, što možda objašnjava nemogućnost gljive da kolonizira dublje slojeve kore. Osim toga, primjećena je smanjena aktivnost lakaza (Milgroom i Cortesi 2004). Neki istraživači pretpostavljaju da lakaze razgrađujući lignin ometaju proces lignifikacije i olakšavaju prodor hifa kroz lignificirano tkivo kestena.

1.4. Lakaze

Lakaze (benzendiol:kisik oksidoreduktaze) su enzimi koji pripadaju skupini oksidaza plavog bakra. Po strukturi su dimerni ili tetramerni glikoproteini u kojima ugljikohidratni dio čini 10 - 25% mase enzima. Molekularna masa monomera iznosi 60 - 90 kDa. N-vezani glikani većinom sadrže arabinozu, manozu, ksilozu, galaktozu i glukozu (Zouari i sur 1987), a osim što imaju strukturnu ulogu, oni štite enzim od proteolitičke razgradnje.

U aktivnom mjestu lakaze nalaze se četiri iona bakra koji se međusobno razlikuju u spektroskopskim svojstvima: paramagnetski "plavi" bakar (T1), paramagnetski "ne plavi" bakar (T2) i dijamagnetski par bakar-bakar (T3) (Slika 4). Bočni ogranci histidina koordiniraju ione bakra. Lakaze kataliziraju oksidaciju supstrata pri čemu elektroni prelaze na bakar T1, zatim na trinuklearni centar kojeg čine bakar T2 i T3, gdje dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastanka vode (Solomon i sur. 1996).



Slika 4. Struktura aktivnog mjesta lakaze iz gljive *Trametes hirsuta* (preuzeto iz Bartlett, 2010)

Lakaze nisu specifične prema određenom supstratu, već mogu katalizirati oksidaciju različitih spojeva: difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina i raznih nefenolnih supstrata, stoga sudjeluju u velikom broju kemijskih reakcija (Claus 2004). Iako sudjeluju u biorazgradnji lignina, lakaze nisu isključivo izvanstanični enzimi. Većina gljiva sintetizira i unutarstanične lakaze (Blaich i Esser 1975). Lakaze gljiva pokazuju najveću aktivnost u kiselom pH. Aktivnost se određuje spektrofotometrijski koristeći supstrate 2,6 - dimetoksifenol ili ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina]). Afinitet za ABTS je veći nego za 2,6 - dimetoksifenol (Baldrian 2005).

Lakaze su karakteristične za više biljke i gljive. Osim što kataliziraju biorazgradnju lignina, one sudjeluju i u biosintezi lignina. Gljive koje sintetiziraju lakaze u prirodi su najčešće prisutne na uginulom drveću, no mogu se naći i u tlu. Najveći broj lakaza izoliran je iz gljiva bijelog truljenja koje su poznate kao dobri razlagači lignina.

Gljiva *C. parasitica* sintetizira tri lakaze: LAC-1 i LAC-3 su izvanstanični, a LAC-2 je unutarstanični enzim. Sva tri enzima kodirana su različitim genima. Geni *lac-1* i *lac-2* su konstitutivno eksprimirani, dok je ekspresija *lac-3* inducirana taninskom kiselinom. Prisutnost CHV-1 poništava indukciju *lac-3* gena. Ekspresija lakaza ovisi o okolišnim uvjetima: hranidbenoj podlozi, starosti kulture i količini svjetlosti (Larson i sur. 1992).

Utjecaj infekcije hipovirusom CHV-1 na prijenos signala i ekspresiju gena u gljive *C. parasitica* proučava se na virulentnim i izogenim hipovirulentnim sojevima gljive. Smatra se da CHV-1 inducira fenotipske promjene tako što modulira stanične signalne puteve - signalne kaskade koje idu preko G proteina i cAMP-a te preko kalcija/kalmodulina/IP3-a (Larson i Nuss 1993). Kako je signalni put kalcij/kalmodulin/IP3 pozitivan regulator transkripcije lakaza, utjecaj virusa CHV-1 proučava se pomoću reporter gena *lac-1*.

Eksperimenti su pokazali da infekcija CHV-1 utječe na aktivnost izvanstanične lakaze LAC-1 i unutarstanične lakaze LAC-2 (Rigling i Van Alfen 1993), stoga se lakaza koristi kao molekularni marker za praćenje infekcije. Smatra se da CHV-1 regulira biosintezu lakaze smanjujući akumulaciju mRNA, odnosno da dolazi do degradacije transkripata. Nije primijećen utjecaj na translaciju i sekreciju lakaze iz stanice. U početnim istraživanjima uočeno je 75%-tno smanjenje aktivnosti izvanstanične lakaze LAC-1 u hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica* bez smanjenja biomase gljive (Rigling i Van Alfen 1991). U kasnijim istraživanjima otkriveno je kako hipovirulentni izolati inficirani virusom CHV-1/EP713 imaju mnogo manju aktivnost lakaza od onih inficiranih virusom CHV-1/Euro7 (Parsley i sur. 2002). Očito je da se različiti podtipovi virusa, unatoč velikoj sličnosti sekvenci, ipak razlikuju u virulenciji i utjecaju na fenotip domaćina.

Iako uloga lakaza u gljive *C. parasitica* nije potpuno razjašnjena, njihova aktivnost povezuje se s degradacijom lignina, stvaranjem rasplodnih tjelešaca i proizvodnjom pigmenta (Rigling i sur. 1993). Kako gljiva parazitira na kori kestena koja obiluje taninima, pretpostavlja se da lakaze pomažu u adaptaciji gljive na ovu specifičnu nišu.

1.5. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja su:

- optimizirati tehniku uzgoja gljive *C. parasitica* u tekućoj kulturi u podlozi PDB (potato dextrose broth, krumpirov dekstrozni bujon)
- detektirati virus u hipovirulentnim izolatima
- kvantificirati aktivnost unutarstanične i izvanstanične lakaze
- usporediti rezultate izmjerene za virulentne i hipovirulentne gljive istog soja
- usporediti rezultate između hipovirulentnih gljiva istog soja inficiranih različitim podtipovima i izolatima virusa CHV-1

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

U Tablici 1. prikazane su osnovne kemikalije i komercijalni kompleti korišteni u izvedbi eksperimenata.

Tablica 1. Osnovne kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
2,2'-azino-bis -(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), ABTS	Sigma-Aldrich
Agaroz	Sigma-Aldrich
Goveđi serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Commasie brilliant blue (CBB) G 250	Sigma-Aldrich
Dekontaminacijski reagens DNA away	Thermo Scientific
Etanol 96%	Kemika d.d.
Etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA)	Kemika d.d.
Fluorescentna boja GelStar Nucleic Acid Gel Stain	Lonza
Hranidbene podloge	
Krumpirov dekstrozni agar (PDA)	Difco
Krumpirov dekstrozni bujon (PDB)	Difco
Kalijev hidrogenfosfat	Lach-ner
Kalijev dihidrogenfosfat	Lach-ner
Komercijalni kompleti	
Double-RNA Viral dsRNA Extraction Kit	iNtRON Biotechnology
GoScript Reverse Transcription System	Promega
GoTaq DNA Polymerase	Promega
Markeri molekularnih masa	
100 bp DNA Step Ladder	Promega
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Natrijev acetat	Sigma-Aldrich
Pufer 10x TBE AccuGENE	Lonza

2.1.2. Uređaji

U tablici 2. prikazani su uređaji i aparature korišteni u izvedbi eksperimenata.

Tablica 2. Uređaji

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ
Centrifuga Multi-spin	Biosan
Centrifuga Mikro220R	Hettich Zentrifugen
Deionizator vode Simplicity	Millipore
Kalup i uređaj za vodoravnu elektroforezu	Bio-Rad
Komora za uzgoj	Pol-eko aparatura
Liofilizator Alpha 1-2/LD	Christ
Magnetska miješalica BioVortex V1	Kisker
Mikrovolumenski spektrofotometar Nanodrop 2000 C	Thermo Scientific
Napajanje za elektroforezu PowerPac HC	Bio-Rad
PCR uređaj 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Spektrofotometar Specord 40	Analytic Jena
Transiluminator	Syngene
Tresilica Orbital shaker OS-20	Biosan

2.1.3. Eksperimentalni sojevi gljive *Cryphonectria parasitica* i virusa CHV-1

U ovom eksperimentu korištene su laboratorijske kulture gljive *C. parasitica* i virusa CHV-1 prikupljene u prethodnim istraživanjima (Ježić i sur. 2014; Krstin i sur. 2008; Robin i sur. 2010; Shapira i sur. 1991). Svi izolati gljive sakupljeni su u blizini Lovrana. Uzorci L14, DOB G, DOB I su virulentni izolati (bez virusa) i pripadaju EU-1 tipu vegetativne kompatibilnosti (vc). Hipovirulentne uzorke čine iste gljive s unesenim izolatima virusa CHV-1 (Tablica 3.). Virus oznake F je prototipski jaki izolat EP713 francuskog podtipa, a virusi oznaka CR23 i HK27 su izolati talijanskog podtipa nađeni na otoku Cresu i na području Hrvatske Kostajnice.

Tablica 3. Sojevi gljive *C. parasitica* i sojevi virusa CHV-1 korišteni u eksperimentima

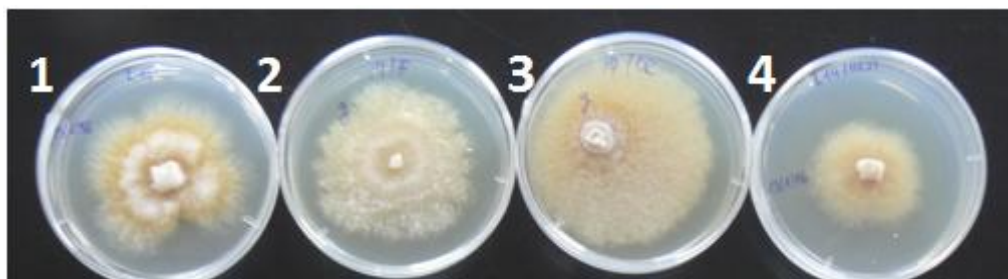
VIRULENTNI IZOLATI (naziv soja gljive)	HIPOVIRULENTNI IZOLATI (naziv soja gljive/naziv soja virusa)		
	L14/CR23	L14/F	L14/HK27
DOB G	DOB G/CR23	DOB G/F	DOB G/HK27
DOB I	DOB I/CR23	DOB I/F	DOB I/HK27

2.2. Metode

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

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

Izolati gljive *C. parasitica* nasađeni su na krutu hranidbenu podlogu PDA u Petrijevim zdjelicama promjera 6 cm. Svaki od 12 izolata gljive nasađen je u tri replike. Skalpelom je izrezan komadić agara s micelijem veličine 5×5 mm te je nasađen u središte Petrijeve zdjelice s tkivom okrenutim prema dolje. Skalpel je između obrade uzoraka dezinficiran 70%-tnim etanolom i spaljen na plameniku, a sve je rađeno u laminaru zbog osiguranja sterilnosti. Presađeni uzorci pohranjeni su u komoru za uzgoj (fitotron), gdje su rasli 7 dana u mraku pri temp. od 24 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 70% (Slika 5.). Laboratorijske kulture svakih 14 dana presađuju se na nove podloge PDA.



Slika 5. Uzorci gljive *C. parasitica* uzgojeni na krutoj hranidbenoj podlozi Redoslijed uzoraka u Petrijevim zdjelicama: **1** - L14, **2** - L14/F, **3** - L14/CR23, **4** - L14/HK27
L14 - soj gljive; F, CR23, HK27 - sojevi virusa

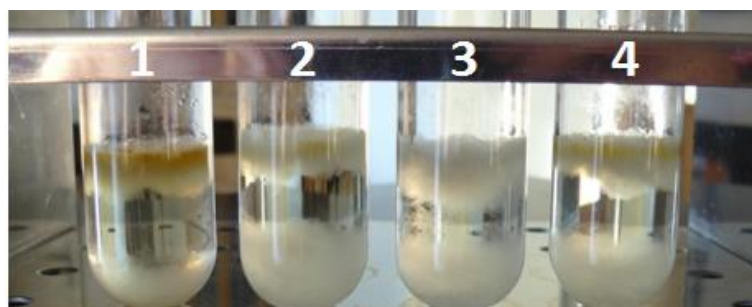
2.2.2. Uzgoj gljive *Cryphonectria parasitica* u tekućoj hranidbenoj podlozi

Nakon 7 dana uzgoja u mraku na krutoj hranidbenoj podlozi PDA, uzorci su nasađeni na tekuću hranidbenu podlogu PDB (potato dextrose broth, krumpirov dekstrozni bujon). Hranidbena podloga PDB pripravljena je prema uputi proizvođača: 24 g praha PDB otopljeno je u 1 L deionizirane vode uz zagrijavanje i povremeno miješanje kako ne bi došlo do stvaranja taloga na dnu staklene tikvice. Pomoću menzure po 10 mL tekuće hranidbene podloge PDB raspoređeno je u staklene epruvete. Epruvete su zatvorene vatenim čepovima i aluminijskom folijom, autoklavirane 20 min pri temp. od 121 °C i tlaku od 1,5 bar, nakon čega su pohranjene u hladnu komoru na temperaturu od 4 °C.

Bilo je potrebno optimizirati tehniku presađivanja izolata gljive *C. parasitica* s krute PDA na tekuću PDB hranidbenu podlogu. Isprobano je više metoda. Na tekuću hranidbenu podlogu PDB presađivani su:

1. intaktni komadi agara s micelijem veličine 10×10 mm i 2×2 mm
2. komad agara s micelijem veličine 10×10 mm usitnjen skalpelom na satnom stakalcu
3. komad agara s micelijem veličine 10×10 mm usitnjen mikrotučkom u mikroepruveti
4. micelij sastrugan skalpelom s PDA podloge prekrivene celofanom
5. konidijska suspenzija - po 1 mL sterilne deionizirane vode nanoseno je na krutu hranidbenu podlogu PDA i skalpelom je sastrugana površina agara. Mikropipetom sa sterilnim nastavkom s filtrom sakupljena je konidijska suspenzija i inokulirana u staklenu epruvetu s tekućom podlogom PDB (10 mL).

Uzorci nasađeni na tekuću hranidbenu podlogu pohranjeni su u komoru za uzgoj gdje su rasli 5 dana na tresilici u mraku pri temperaturi od 24 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 70% (Slika 6.).



Slika 6. Uzorci gljive *C. parasitica* uzgojeni na tekućoj hranidbenoj podlozi
Redoslijed uzoraka u epruvetama: **1** - L14, **2** - L14/F, **3** - L14/CR23, **4** - L14/HK27

2.2.3. Izolacija dvolančane RNA iz micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

Virusna dvolančana RNA (dsRNA) izolirana je prema protokolu kompleta *Double-RNA viral dsRNA extraction mini kit*. Postupak izolacije izvodi se pri sobnoj temperaturi, a pribor i kemikalije moraju biti sterilni i bez RNaza.

Svježe tkivo (cca 500 mg) pohranjeno je u mikroepreveti i smrznuto u tekućem dušiku. Koristeći mikrotučak tkivo je usitnjeno u 100 μ L pred-puferu. Nakon dodavanja 1 mL pufera za lizu, uzorak je promiješan 10-tak sekundi na vrtložnoj miješalici i ostavljeno 5 min na sobnoj temperaturi. Isto je napravljeno nakon dodavanja 200 μ L kloroforma. Uzorci su centrifugirani 10 min na 16438 g pri temp. od 4 °C te je 400 μ L gornjeg sloja otpipetirano u praznu mikroeprevetu od 1,5 mL. U 400 μ L gornjeg sloja dodan je jednaki volumen pufera za vezanje, nježno je promiješano 2-3 puta i ostavljeno 1 min pri sobnoj temperaturi. Mikroepreveta za centrifugu dva puta je isprana s 500 μ L pufera za ispiranje, centrifugirana 1 min na 16438 g pri temp. od 4 °C, nakon čega je filtrat bačen. Cijeli uzorak prenesen je u mikroeprevetu za centrifugu, centrifugiran je 1 min na 16438 g, nakon čega je filtrat bačen. U mikroeprevetu za centrifugu dva puta je dodano po 500 μ L pufera za ispiranje, centrifugirano je 1 min na 16438 g, nakon čega je filtrat bačen. Prazna mikroepreveta za centrifugu centrifugirana je 2 min na 16438 g kako bi se membrana osušila, a onda je prebačena u novu mikroeprevetu od 1,5 mL. Na membranu je dodano 40 μ L pufera za eluiranje te je centrifugirano 1 min na 16438 g kako bi se eluirala dsRNA.

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

2.2.4. Elektroforeza dvolančane RNA u agaroznom gelu

Izolirana dsRNA analizirana je elektroforezom u 0,5%-tnom agaroznom gelu u 0,5× TBE (Tris-borat-EDTA) puferu. 0,5× TBE pufer dobiven je razrjeđivanjem 10× TBE pufera (0,89 M Tris-borat, 0,02 M EDTA, pH 8.3). Gel je pripremljen otapanjem 250 mg agaroze u 50 mL 0,5× TBE pufera u mikrovalnoj pećnici. Ohlađenom gelu dodano je 1,5 µL boje *GelStar nucleic acid gel stain*, nakon čega je preliven u kalup za izlivanje gela dimenzija 15×10 cm. Nakon polimerizacije gel je stavljen u kadicu za elektroforezu u koju je naliven 0,5× TBE pufer. Za određivanje veličina razdvojenih vrpca u prvu jažicu je otpipetirano 3,5 µL markera molekularnih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

U ostale jažice otpipetirana je smjesa 16 µL uzorka i 2 µL pufera za nanošenje uzoraka nukleinskih kiselina na gel (engl. loading buffer, Tablica 4.). Elektroforeza se odvijala 90 min pod stalnim naponom od 80 V na uređaju PowerPac HC. Praćenje tijeka elektroforeze omogućile su boje dodane u pufer za nanošenje uzoraka nukleinskih kiselina na gel: ksilencijanol putuje jednakom pokretljivošću kao fragmenti nukleinske kiseline veličine 4kb, dok bromfenol plavo putuje jednakom pokretljivošću kao fragmenti veličine 300 pb. Gel je vizualiziran pomoću UV-transiluminatora i fotografiran digitalnom kamerom.

Tablica 4. Sastav pufera za nanošenje uzoraka nukleinskih kiselina na gel (engl. loading buffer)

Pufer za nanošenje uzoraka nukleinskih kiselina na gel	
Bromfenol plavo	0,25%
Ksilencijanol	0,25%
Glicerol	30%
Deionizirana H ₂ O	ostatak do 100%

2.2.5. Reverzna transkripcija dvolančane RNA

Izolirana dsRNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije (RT) prema protokolu *GoScript reverse transcription system*. Prvo je u mikroepruvete za PCR otpipetirano 4 µL izolirane dsRNA i 1 µL nasumičnih početnica. Smjesa je inkubirana 5 min pri temp. od 70 °C kako bi se denaturirala dsRNA, nakon čega je odmah pohranjena na led. Kao negativna kontrola reverzne transkripcije umjesto uzorka dodan je pufer za ispiranje.

U međuvremenu je pripremljena reakcijska smjesa za reverznu transkripciju (Tablica 5.), tako da je ukupni volumen smjese za svaku reakciju bio 15 μL . Svi sastojci su prethodno promiješani na vrtložnoj miješalici nekoliko sekundi, a pripremljena reakcijska smjesa pohranjena je na ledu.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za jednu reakciju reverzne transkripcije dsRNA virusa CHV-1 pomoću nasumičnih početnica

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	_*	1	-
Sterilna voda	-	4,5	-
Ukupno	-	15	-
dsRNA + nasumične početnice	-	5	-
Konačno	-	20	-

* Proizvođač nije definirao koncentraciju, već samo navodi da je za jednu reakciju od 20 μL potrebno dodati 1 μL enzima.

U mikroeprovete za PCR otpipetirano je 15 μL reakcijske smjese i 5 μL smjese denaturirane dsRNA i nasumičnih početnica. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se u uređaju 2720 *Thermal Cycler* prema uvjetima u Tablici 6. Sve je napravljeno pazeći na sterilnost.

Tablica 6. Uvjeti reverzne transkripcije dsRNA virusa CHV-1 pomoću nasumičnih početnica

Denaturacija RNA	Sljepljivanje početnica	Ekstenzija DNA	Inaktivacija reverzne transkriptaze
70 °C / 5 min	25 °C / 5 min	42 °C / 60 min	70 °C / 15 min

2.2.6. Umnažanje otvorenih okvira čitanja virusa CHV-1 lančanom reakcijom polimerazom

Komplementarna DNA dobivena reverznom transkripcijom umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Kako su umnoženi fragmenti dviju regija virusne DNA (ORF-A i ORF-B), korištena su dva seta genski specifičnih početnica (Tablica 7).

Tablica 7. Početnice za amplifikaciju dvaju otvorenih okvira čitanja u genomu virusa CHV-1 lančanom reakcijom polimerazom

Regija DNA	Početnice	Sekvenca početnice u smjeru 5`-3`	Udio CG/%	Tm/°C
ORF-A	EP 713-5	TTGGATTCCCGATTCTTCA	45	54
	R2280	CTTACCATCTCGCTTGACAAA	42,86	52,7
ORF-B	EP 713-6	GCCACTTCGTGGGACAATAC	55	56,7
	EP 713-7	GGGAAGAAAGTGGACTTACC	50	53,1

Pripremljene su dvije reakcijske smjese (jedna za ORF-A, druga za ORF-B) prema Tablici 8., tako da je ukupni volumen smjese za svaku reakciju bio 24 µL. Prethodno su svi sastojci promiješani nekoliko sekundi na vrtložnoj miješalici. Pripremljene reakcijske smjese pohranjene su na ledu.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za jednu lančanu reakciju polimerazom dvaju otvorenih okvira čitanja u genomu virusa CHV-1

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 µM	0,5	0,2 µM
Početnica 2	10 µM	0,5	0,2 µM
GoTaq DNA polimeraza	5 u/µL	0,5	0,1u/µL
Sterilna voda	-	15,5	-
Ukupno	-	24	-
Uzorak cDNA	-	1	-
Konačno	-	25	-

U mikroeprovete za PCR otpipetirano je 24 μL reakcijske smjese i 1 μL uzorka. Kao negativna kontrola PCR-a umjesto uzorka dodana je sterilna voda. Kao pozitivna kontrola PCR-a dodana je cDNA soja EURO-7 virusa CHV-1. Sve je napravljeno u sterilnim uvjetima. PCR reakcija odvijala se u uređaju 2720 Thermal Cycler prema uvjetima u Tablici 9., nakon čega su uzorci pohranjeni pri temp. od 4 °C.

Tablica 9. Uvjeti lančane reakcije polimerazom dvaju otvorenih okvira čitanja u genomu virusa CHV-1

Pred-denaturacija	Denaturacija	Sljepljivanje početnica	Ekstenzija	Dodatna ekstenzija
90 °C / 2 min	94 °C / 1 min	55 °C / 1,5 min	72 °C / 2 min	72 °C / 10 min
35 ciklusa				

2.2.7. Elektroforeza umnožene cDNA u agaroznom gelu

Umnožena cDNA analizirana je elektroforezom u 1% agaroznom gelu u 0,5× TBE puferu. Gel je pripremljen otapanjem 500 mg agaroze u 50 mL 0,5× TBE pufera. Ohlađenom gelu dodano je 1,5 μL boje *GelStar nucleic acid gel stain*. Kako su analizirane dvije umnožene regije DNA (ORF-A i ORF-B), uzorci su naneseni u dva reda jažica. Za određivanje veličina razdvojenih vrpca korišteni su markeri molekularnih masa: u prvu jažicu otpipetirano je 3,5 μL markera 100 bp *DNA step ladder*, a u zadnju jažicu 3,5 μL markera *GeneRuler 1 kb DNA ladder*. U ostale jažice otpipetirano je po 5 μL uzorka umnožene cDNA.

Elektroforeza se odvijala 30 min pod stalnim naponom od 80 V na uređaju PowerPac HC. Gel je vizualiziran pomoću UV-transiluminatora i fotografiran digitalnom kamerom.

2.2.8. Liofilizacija i homogenizacija micelija gljive *Cryphonectria parasitica*

Nakon 5 dana uzgoja u hranidbenoj podlozi PDB, tekuće podloge su odlivene u plastične epruvete od 15 mL, pohranjene na led i korištene kao uzorci za mjerenje koncentracije izvanstaničnih proteina. Miceliji su staklenim štapićem prebačeni u plastične mikroeprovete od 2 mL i centrifugirani 15 min na 25000 g pri temp. od 4 °C. Masa svake mikroeprovete prethodno je izmjerena na analitičkoj vagi. Istaloženi miceliji gljiva zatim su dva puta isprani s po 1 ml sterilne deionizirane vode, promiješani na vrtložnoj miješalici nekoliko sekundi i istaloženi centrifugiranjem 10 min na 20000 g pri temp. od 4 °C. Nakon posljednjeg centrifugiranja istaloženi miceliji pohranjeni su na led.

Zamrznuti miceliji liofilizirani su u otvorenim mikroeprevetama 24 h pod vakuumom pri temperaturi od -70 °C u liofilizatoru. Liofilizacijom se uklanja voda, čime se uzorci suše i koncentriraju uz očuvanje integriteta i aktivnosti svih bioloških komponenti. Izvagani liofilizirani uzorci usitnjeni su pomoću metalnih kuglica u uređaju za usitnjavanje tkiva na frekvenciji od 30 Hz tijekom 2 min. Mikroeprovete s usitnjenim liofiliziranim micelijima gljive ponovno su izvagane na analitičkoj vagi kako bi se odredila masa suhe tvari.

2.2.9. Ekstrakcija unutarstaničnih proteina gljive *Cryphonectria parasitica*

Usitnjenim liofiliziranim uzorcima dodano je 500 µL hladnog ekstrakcijskog pufera (Tablica 10). Staklenim štapićem sastrugani su talozi sa stijenke mikroeprovete, uzorci su nakratko promiješani na vrtložnoj miješalici, nakon čega su centrifugirani 20 min na 20000 g pri temp od 4 °C. Supernatanti s ekstrahiranim proteinima preliveni su u nove mikroeprovete i pohranjeni na temperaturu od 4 °C.

Tablica 10. Sastav ekstrakcijskog pufera i matičnih otopina

EKSTRAKCIJSKI PUFER		
0,1 M kalij-fosfatni pufer, pH 7		
	mL/100 mL	
1 M K ₂ HPO ₄	6,15	
1 M KH ₂ PO ₄	3,85	
10 mM EDTA	1	
deH ₂ O	do 100	
MATIČNE OTOPINE		
	m (tvar)/g	V (deH ₂ O)/mL
1 M K ₂ HPO ₄	8,709	50
1 M KH ₂ PO ₄	6,804	50
10 mM EDTA	0,186	50

2.2.10. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Ova metoda temelji se na vezanju *Comassie brilliant blue* (CBB) boje na proteine pri čemu se razvija plavo obojenje (Bradford 1976). Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina i određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 595 nm. Za mjerenje aktivnosti proteina korištene su plastične kivete duljine optičkog puta 1 cm.

U 1 mL Bradford radne otopine (Tablica 11.) dodano je 50 μ L uzorka, smjesa je nakratko promiješana na vrtložnoj miješalici i inkubirana 10 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija. Koncentracije unutarstaničnih proteina izmjerene su u staničnim ekstraktima. Kao slijepa proba umjesto staničnog ekstrakta dodan je jednaki volumen ekstrakcijskog pufera. Koncentracije izvanstaničnih proteina izmjerene su u PDB podlozi u kojoj je rasla gljiva. Kao slijepa proba korištena je PDB podloga u kojoj ništa nije raslo.

Koncentracije proteina u uzorcima izračunate su pomoću dviju baždarnih krivulja dobivenih mjerenjem apsorbancije otopina goveđeg serumskog albumina (*bovine serum albumin*, BSA). Serijskim razrjeđenjima matične otopine BSA pripravljene su standardne otopine BSA visokih koncentracija (1,4 mg/mL, 1,2 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL), iz kojih je dobivena jednadžba pravca potrebna za računanje visokih koncentracija unutarstaničnih proteina. Standardne otopine BSA niskih koncentracija (0,3 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL) služile su za dobivanje jednadžbe pravca i računanje niskih koncentracija izvanstaničnih proteina.

Tablica 11. Sastav matične i radne otopine za mjerenje koncentracije proteina po Bradfordu

Bradford matična otopina	
	V (mL)
96%-tni etanol	100
88%-tna H ₃ PO ₄	200
CBB G 250	350 mg
Bradford radna otopina	
	V (mL)
96%-tni etanol	15
88%-tna H ₃ PO ₄	30
Bradford matična otopina	30
deH ₂ O	425

2.2.11. Mjerenje aktivnosti lakaza

Lakaze u proteinskom ekstraktu oksidiraju ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina]) reagens pri čemu se razvija zeleno obojenje. Aktivnost lakaza izmjerena je spektrofotometrijski kao porast apsorbancije kroz 10 ciklusa u trajanju po 20 sekundi na valnoj duljini od 418 nm. Za mjerenje aktivnosti lakaza korištene su plastične kivete duljine optičkog puta 1 cm.

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti unutarstanične lakaze sastojala se od 900 μL reakcijskog pufera za detekciju lakaza (Tablica 12.), 50 μL otopine ABTS-a (Tablica 12.) i 50 μL proteinskog ekstrakta. Kao slijepa proba umjesto proteinskog ekstrakta dodan je jednaki volumen ekstrakcijskog pufera.

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti izvanstanične lakaze sastojala se od 850 μL podloge PDB u kojoj je uzgajana gljiva i 150 μL otopine ABTS-a. Kao slijepa proba korištena je podloga PDB u kojoj ništa nije uzgajano. Porast apsorbancije izvanstanične lakaze izmjeren je nakon 10 min.

Tablica 12. Sastav reagensa za mjerenje aktivnosti lakaza

REAKCIJSKI PUFER ZA DETEKCIJU LAKAZA	
0,1 M natrij-acetatni pufer, pH 3,5	
natrijev acetat (otopljen u deH ₂ O, pH podešen na 3,5 pomoću 45%-tne octene kiseline)	2,722 g
deH ₂ O	do 200 mL
50 mM otopina ABTS	
reagens ABTS*	27,43 mg
0,1 M natrij-acetatni pufer	do 1 mL

*ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

2.2.12. Statistička obrada podataka dobivenih mjerenjem aktivnosti lakaza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm standardna pogreška. T test analizom u računalnom programu Microsoft Office Excel 2007 uspoređene su aktivnosti unutarstanične lakaze između virulentnih i hipovirulentnih izolata gljive istog soja. Duncan's new multiple range test-om (DMRT) u računalnom programu STATISTICA 12.0 uspoređene su aktivnosti izvanstanične lakaze izmjerene u svim virulentnim i hipovirulentnim izolatima. Statistički značajne razlike iskazane su na razini $p \leq 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Optimizacija uzgoja gljive *C. parasitica* u tekućoj hranidbenoj podlozi

Za presađivanje uzoraka gljive *C. parasitica* s krute PDA na tekuću hranidbenu podlogu PDB odabrana je metoda konidijske suspenzije. Ostale metode pokazale su se nepraktičnima, sklone zagađenjima, nedovoljnog prinosa tkiva, ili su ostaci agara smetali u daljnjim manipulacijama. Uzorke je potrebno inkubirati barem 3 dana, a optimalno 5 dana u komori za uzgoj kako bi se dobila dovoljna količina tkiva. Preporučljiv je uzgoj na rotacijskoj tresilici, jer se micelij gljive taloži na dnu epruvete.

3.2. Prisutnost virusa CHV-1 u izolatima gljive *C. parasitica*

Iz micelija gljive *C. parasitica* izolirana je dsRNA kako bi se potvrdila prisutnost virusa CHV-1 u hipovirulentnim izolatima nakon uzgoja u tekućoj hranidbenoj podlozi PDB. Nakon izolacije dsRNA i elektroforeze u agaroznom gelu, nisu jasno vidljive elektroforetske pruge koje bi potvrdile prisutnost virusa u uzorcima (Slika 7). Difuzne pruge vjerojatno su posljedica degradacije ili nedovoljne čistoće izolirane dsRNA. Negativni rezultati ne znače nužno da virus nije prisutan. Moguće je da je količina izolirane dsRNA premala za vizualizaciju na gelu, stoga je prisutnost virusa dodatno potvrđena metodom reverzne transkripcije i PCR-a.

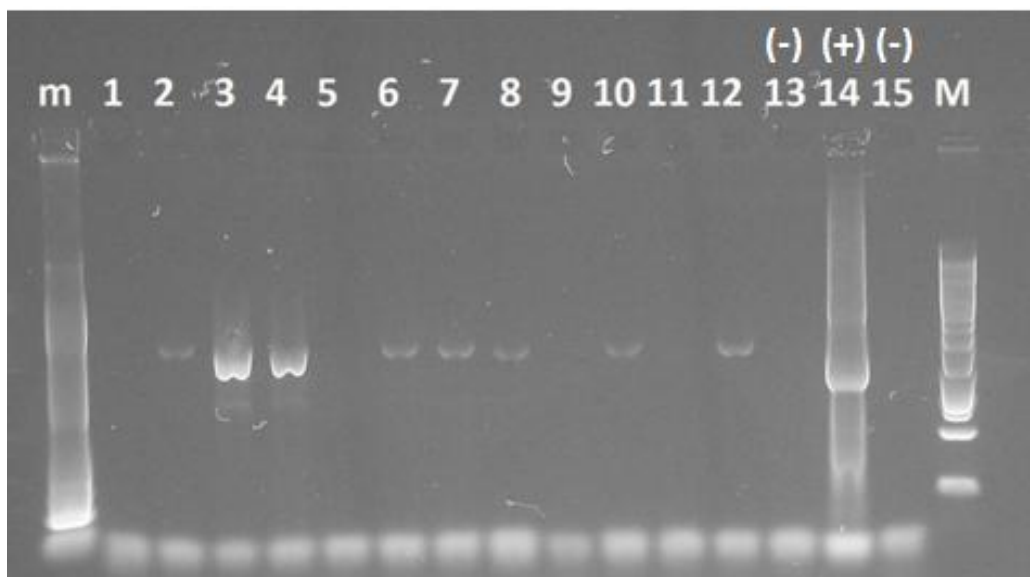


Slika 7. Elektroforeza dsRNA izolirane iz micelija gljive *C. parasitica* u 0,5%-tnom agaroznom gelu.

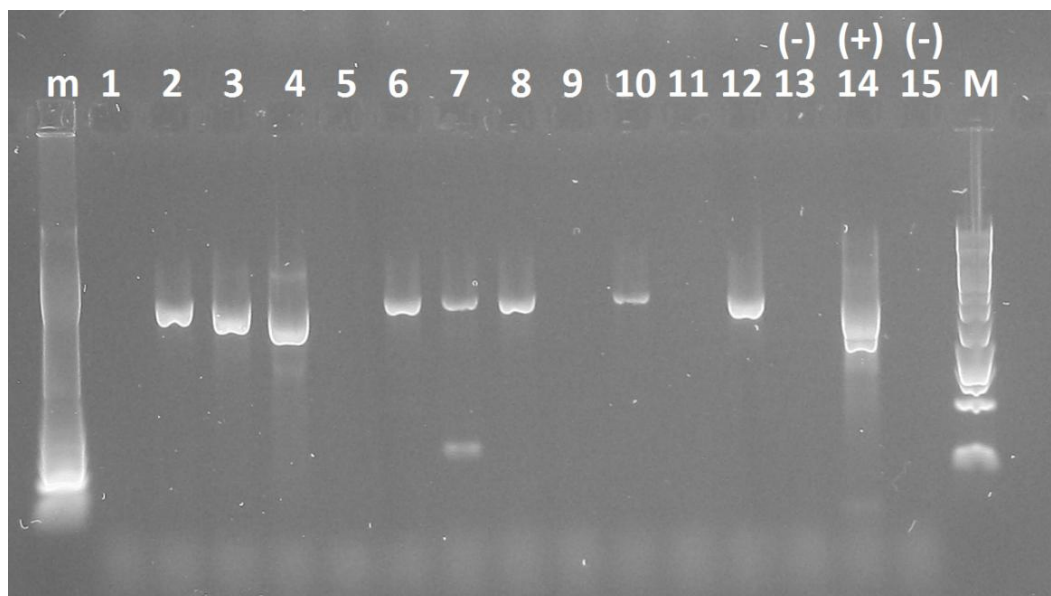
Redoslijed uzoraka: **m** - marker *DNA Step Ladder*, **1** - L14, **2** - L14/CR23, **3** - L14/F, **4** - L14/HK27, **5** - DOB G, **6** - DOB G/CR23, **7** - DOB G/F, **8** - DOB G/HK27, **9** - DOB I, **10** - DOB I/CR23, **11** - DOB I/F, **12** - DOB I/HK27. L14, DOB G, DOB I - sojevi gljive; CR23, F, HK27 - sojevi virusa

Metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom korištena je za detekciju dsRNA virusa CHV-1 u hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica*. Fragmenti dviju regija virusne DNA (ORF-A i ORF-B) umnoženi su pomoću dva seta početnica.

Rezultati dobiveni nakon elektroforeze u agaroznom gelu prikazani su na Slikama 8. i 9. U virulentnim izolatima L14, DOB G i DOB I nije detektirana dsRNA virusa CHV-1 (uzorci 1, 5, 9). Virusna dsRNA detektirana je u svim hipovirulentnim izolatima osim u izolatu DOB I/F (uzorak 11). Nakon ponovljene reverzne transkripcije i PCR-a, u izolatu DOB I/F nije detektirana dsRNA. Zbog negativnog rezultata, koji je vjerojatno posljedica male koncentracije virusa u trenutku izolacije, ponovljena je izolacija dsRNA iz izolata DOB I/F. Nakon elektroforeze u agaroznom gelu detektirana je dsRNA virusa CHV-1 (Slika 10.), čime je potvrđena hipovirulentnost izolata DOB I/F.

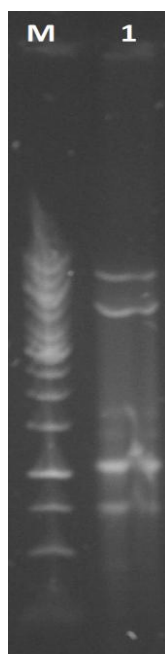


Slika 8. Elektroforeza ORF-A regije virusne cDNA umnožene početnicama EP 713-5 i R2280 u 1%-tnom agaroznom gelu
 Redosljed uzoraka: **m** - marker *DNA Step Ladder*, **1** - L14, **2** - L14/CR23, **3** - L14/F, **4** - L14/HK27, **5** - DOB G, **6** - DOB G/CR23, **7** - DOB G/F, **8** - DOB G/HK27, **9** - DOB I, **10** - DOB I/CR23, **11** - DOB I/F, **12** - DOB I/HK27, **13** - elucijski pufer (negativna kontrola reverzne transkripcije), **14** - E7 cDNA (pozitivna kontrola PCR-a), **15** -sterilna voda (negativna kontrola PCR-a), **M** - marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. L14, DOB G, DOB I - sojevi gljive; CR23, F, HK27 - sojevi virusa



Slika 9. Elektroforeza ORF-B regije virusne cDNA umnožene početnicama EP 713-6 i EP 713-7 u 1%-tnom agaroznom gelu

Redosljed uzoraka: **m** - marker *DNA Step Ladder*, **1** - L14, **2** - L14/CR23, **3** - L14/F, **4** - L14/HK27, **5** - DOB G, **6** - DOB G/CR23, **7** - DOB G/F, **8** - DOB G/HK27, **9** - DOB I, **10** - DOB I/CR23, **11** - DOB I/F, **12** - DOB I/HK27, **13** - elucijski pufer (negativna kontrola reverzne transkripcije), **14** - E7 cDNA (pozitivna kontrola PCR-a), **15** - sterilna voda (negativna kontrola PCR-a), **M** - marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. L14, DOB G, DOB I - sojevi gljive; CR23, F, HK27 - sojevi virusa



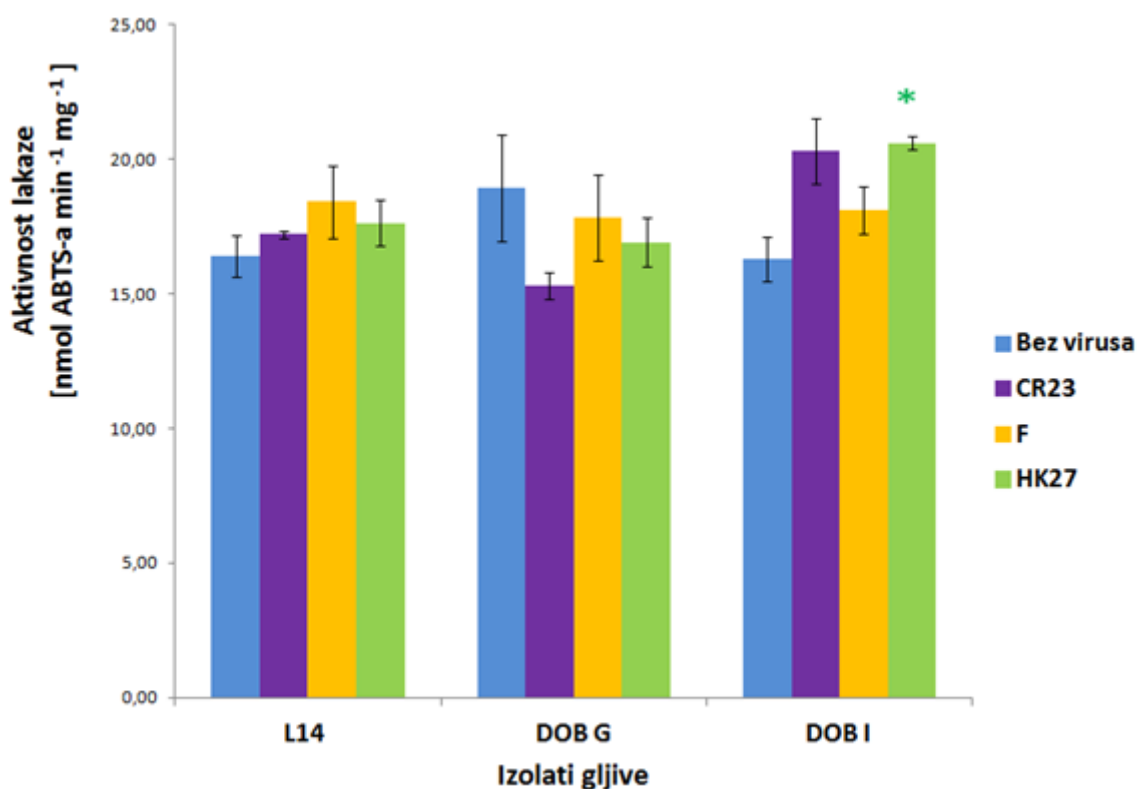
Slika 10. Elektroforeza dsRNA izolirane iz micelija gljive *C. parasitica* u 0,5%-tnom agaroznom gelu
Redosljed uzoraka: **M** - marker *DNA Step Ladder*, **1** - DOB I/F
DOB I - soj gljive, F - soj virusa

3.3. Aktivnost lakaza u virulentnim i hipovirulentnim izolatima gljive

C. parasitica

Izmjerena je aktivnost unutarstanične lakaze u proteinskom ekstraktu uzoraka gljive *C. parasitica* i izvanstanične lakaze u hranidbenoj podlozi PDB. Aktivnost lakaze izražena je kao množina oksidiranog ABTS reagensa u jedinici vremena po masi proteina.

Aktivnost unutarstanične lakaze u uzorcima virulentnih i hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* prikazana je na Slici 11. Virus ne utječe statistički značajno na aktivnost unutarstanične lakaze u uzorcima hipovirulentnih izolata L14/F, L14/CR23 i L14/HK27 te DOB G/F, DOB G/CR23 i DOB G/HK27 u odnosu na uzorke virulentnih izolata L14 i DOB G. U uzorku hipovirulentnog izolata DOB I/HK27 virus dovodi do statistički značajnog porasta aktivnosti unutarstanične lakaze u odnosu na uzorak virulentnog izolata DOB I. U uzorcima hipovirulentnih izolata DOB I/F i DOB I/CR23 utjecaj virusa nije statistički značajan.



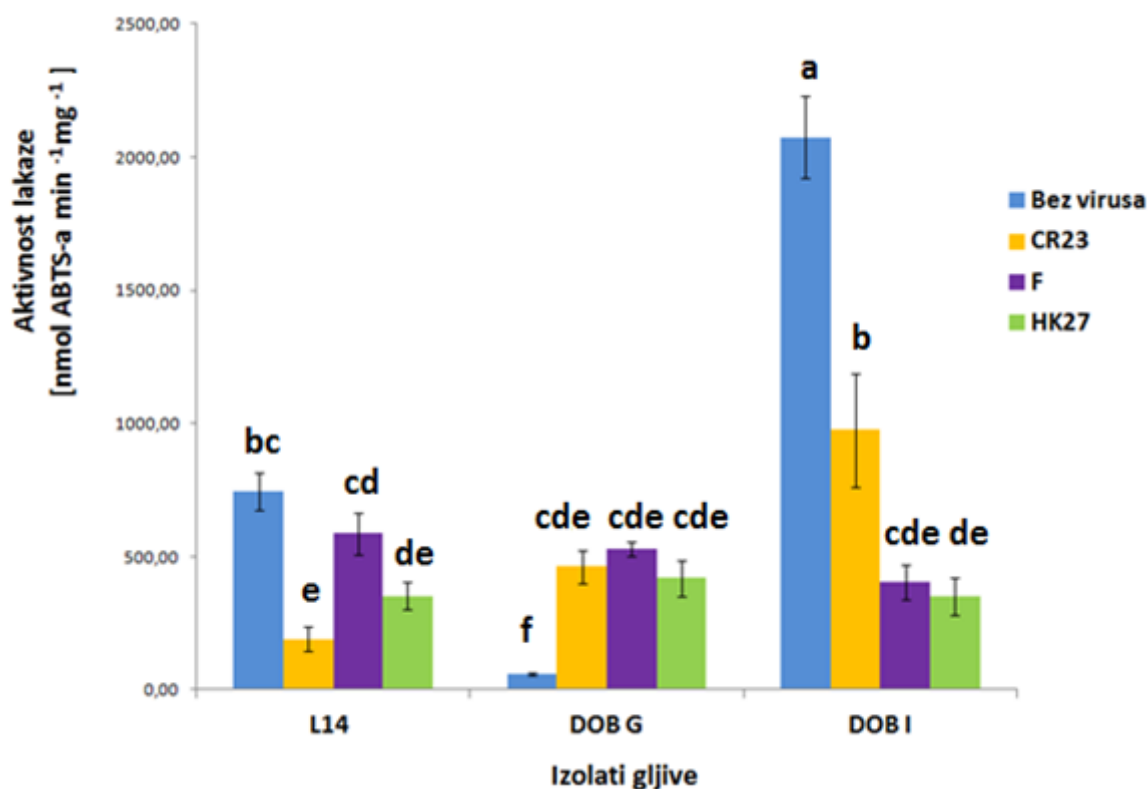
Slika 11. Aktivnost unutarstanične lakaze u uzorcima gljive *C. parasitica*.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajan ($p \leq 0,05$) porast aktivnosti označen je zelenom zvjezdicom (*).

L14, DOB G, DOB I - sojevi gljive; CR23, F, HK27 - sojevi virusa

Aktivnost izvanstanične lakaze u uzorcima virulentnih i hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* prikazana je na Slici 12. Virus uzrokuje statistički značajan pad aktivnosti izvanstanične lakaze u uzorcima hipovirulentnih izolata L14/CR23, L14/HK27 te DOB I/CR23, DOB I/F i DOB I/HK27 u odnosu na uzorke virulentnih izolata L14 i DOB I. U uzorcima hipovirulentnih izolata DOB G/CR23, DOB G/F i DOB G/HK27 virus uzrokuje statistički značajan porast aktivnosti izvanstanične lakaze u odnosu na uzorak virulentnog izolata DOB G. Nije uočen statistički značajan utjecaj virusa na aktivnost izvanstanične lakaze u uzorku hipovirulentnog izolata L14/F u odnosu na uzorak virulentnog izolata L14.

Uzorak hipovirulentnog izolata L14/CR23 ima statistički značajno smanjenu aktivnost izvanstanične lakaze u odnosu na uzorak hipovirulentnog izolata L14/F. Uzorci hipovirulentnih izolata DOB I/F i DOB I/HK27 imaju statistički značajno smanjenu aktivnost izvanstanične lakaze u odnosu na uzorak hipovirulentnog izolata DOB I/CR23. Nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti izvanstanične lakaze između uzoraka hipovirulentnih izolata DOB G/CR23, DOB G/F i DOB G/HK27.



Slika 12. Aktivnost izvanstanične lakaze u uzorcima gljive *C. parasitica*.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima prikazuju vrijednosti koje se međusobno statistički značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$. L14, DOB G, DOB I - sojevi gljive; CR23, F, HK27 - sojevi virusa

4. RASPRAVA

Laboratorijske kulture gljive *C. parasitica* uzgajaju se na krutim hranidbenim podlogama PDA. Uzgoj na krutoj hranidbenoj podlozi olakšava praćenje rasta gljive, uočavanje zagađenja plijesnima i bakterijama te pojednostavljuje postupak presađivanja. Osim toga, takav uzgoj omogućuje testiranje vegetativne kompatibilnosti i prenošenje virusa iz hipovirulentnih u virulente izolate. Ako se radi izolacija nukleinskih kiselina ili ekstrakcija unutarstaničnih proteina, onda se gljiva uzgaja na krutoj hranidbenoj podlozi PDA prekrivenoj celofanom kako ne bi urasla u agar. Za analizu izvanstaničnih proteina gljivu je potrebno uzgajati u tekućoj hranidbenoj podlozi PDB. Tekuća hranidbena podloga pogodna je i za izolaciju nukleinskih kiselina i ekstrakciju unutarstaničnih proteina, no poprilično je nepraktična za održavanje laboratorijskih kultura. Kako bi se poboljšala aeracija i opskrba micelija nutrijentima te kako ne bi došlo do taloženja gljive na dnu epruvete, preporučljivo je uzorke inkubirati na tresilici umjesto na statičnoj čvrstoj podlozi.

Elektroforeza dsRNA u agaroznom gelu često puta nije dovoljno osjetljiva metoda za detekciju male količine dsRNA virusa CHV-1 izolirane iz hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica*. Tada je za detekciju virusne dsRNA preporučljivo koristiti metodu reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (Krstin i sur. 2008). Pritom se koriste dva seta početnica kako bi se umnožili fragmenti dviju regija virusne cDNA (ORF-A i ORF-B) (Alleman i sur. 1999), jer se može dogoditi da se jedna od regija virusne cDNA ne umnoži. Ako se ni metodom reverzne transkripcije i lančane reakcijom polimerazom ne uspije detektirati dsRNA virusa CHV-1, moguće je da je u uzorku preniska koncentracija virusne dsRNA. Osim toga, prilikom uzgoja gljive u kulturi, osobito nakon puno presađivanja, može doći do gubitka virusa CHV-1 u hipovirulentnim izolatima. Spontani gubitak hipovirulencije događa se kada micelij gljive naraste iz spore koja ne prenosi virus. Naime, nespolne spore mogu većom ili manjom učestalošću biti zaražene virusom (Shain i Miller 1992). Zabilježen je i gubitak hipovirulencije prilikom prijenosa virusa između gljiva različitih tipova vc na krutoj hranidbenoj podlozi. Pretpostavlja se da je to posljedica neuspješne adaptacije virusa na domaćina različitog tipa vc (Nuskern i sur. 2015).

Infekcija virusom CHV-1 dovodi do pada aktivnosti izvanstanične lakaze u većini hipovirulentnih izolata u odnosu na virulentne izolate gljive *C. parasitica*. Iznimka su hipovirulentni izolati gljive soja DOB G, u kojima je uočen statistički značajan porast aktivnosti izvanstanične lakaze. Taj porast aktivnosti vjerojatno je samo prividan, tj. posljedica je izrazito niske aktivnosti izvanstanične lakaze u virulentnom izolatu DOB G. Kako bi se dobili pouzdaniji rezultati, trebalo bi ponoviti eksperiment s virulentnim i hipovirulentnim izolatima gljive soja DOB G, po mogućnosti u više od pet replika. Primijećene su značajne razlike u aktivnosti izvanstaničnih lakaza između virulentnih izolata L14, DOB G i DOB I. Moguće je da su one posljedica genotipskih razlika između sojeva gljive *C. parasitica* ili različite ekspresije gena u pojedinim sojevima gljive.

Parsley i sur. (2002) otkrili su da hipovirulentni izolati inficirani francuskim podtipom virusa imaju mnogo manju aktivnost lakaza od onih inficiranih talijanskim podtipom virusa, no u ovom istraživanjem ta hipoteza nije potvrđena. Štoviše, u hipovirulentnom izolatu soja L14 inficiranom francuskim podtipom virusa, uopće nije došlo da statistički značajnog pada aktivnosti lakaze u odnosu na virulentni izolat. S druge strane, u hipovirulentnim izolatima soja L14 inficiranima talijanskim podtipovima virusa, došlo je do statistički značajnog pada aktivnosti lakaze u odnosu na virulentni izolat. Međusobnom usporedbom različitih hipovirulentnih izolata unutar istog soja gljive, primijećeno je kako u soju L14 izolat s francuskim podtipom virusa nema statistički značajno manju aktivnost izvanstanične lakaze od izolata s talijanskim podtipom virusa. Čak što više, aktivnost izvanstanične lakaze u izolatu L14/CR23 statistički je značajno smanjena u odnosu na hipovirulentni uzorak L14/F. S druge strane, u soju DOB I izolat s francuskim podtipom virusa zaista ima statistički značajno manju aktivnost izvanstanične lakaze od jednog izolata s talijanskim podtipom virusa, no ne i od drugoga. U soju DOB G svi hipovirulentni izolati uopće se statistički značajno ne razlikuju. Očito je da na aktivnost izvanstanične lakaze ne utječe samo genotip virusa, nego i genotip gljive.

U hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica* nije uočen statistički značajan pad aktivnosti unutarstanične lakaze u odnosu na virulentne izolate, iako se u literaturi (Rigling i Van Alfen 1993) navodi da virus CHV-1 smanjuje aktivnost i izvanstanične i unutarstanične lakaze za preko 80%. U hipovirulentnom izolatu L14/HK27 primijećen je

statistički značajan porast aktivnosti unutarstanične lakaze u odnosu na virulentni izolat, no također je moguće da je to posljedica izrazito male standardne pogreške.

Rigling i Van Alfen (1993) zabilježili su 5-6 puta veću aktivnost unutarstanične lakaze u odnosu na izvanstaničnu lakazu. U ovom eksperimentu uočeno je obrnuto. U svim virulentnim i hipovirulentnim izolatima aktivnosti izvanstaničnih lakaza višestruko su veće od aktivnosti unutarstaničnih lakaza. Mogući je razlog to što je u ovom istraživanju aktivnost lakaze izražena kao množina oksidiranog ABTS reagensa po masi proteina u jedinici vremena, a u prethodnim istraživanjima (Rigling i Van Alfen 1993) aktivnost lakaze nije izražena po masi proteina, već kao jedna jedinica (1 unit) koja predstavlja porast apsorbancije za 1,0 u minuti.

Nepodudaranje s rezultatima u literaturi možda je posljedica korištenja različitih reagensa kao supstrata lakaza. Trebalo bi ponoviti istraživanje koristeći 2,6-dimetoksifenol ili pak benzidin koji se pokazao kao najosjetljiviji reagens (Käärik 1965). Kako su izvanstanična lakaza LAC-1 i unutarstanična lakaza LAC-2 dva različita enzima, kodirana s dva različita gena (Rigling i Van Alfen, 1993), moguće je i da imaju različite afinitete za isti reagens.

Na interakciju gljive *C. parasitica* kao domaćina i virusa CHV-1 kao parazita, ne utječe samo njihov genotip, nego i mnogi abiotički faktori poput temperature, svjetlosti i prisutnosti hranjivih tvari. Primijećeno je kako virulentni izolati i hipovirulentni izolati inficirani talijanskim podtipom virusa najbrže rastu pri temp. od 24 °C, dok hipovirulentni izolati inficirani francuskim podtipom virusa najbrže rastu pri temp. od 30 °C (Bryner i Rigling 2011). Osim toga, virus ima izraženiji učinak na gljivu ukoliko se ona uzgaja u mraku. Pokazano je i da dodatak slada, ekstrakta kvasca i fenola u hranidbenu podlogu inducira izlučivanje lakaza u medij (Käärik 1965). Iako se gljiva uspješno uzgaja u kulturi u različitim hranidbenim podlogama, ona u prirodi raste na stablu kestena koji obiluje taninima. Tanini djeluju kao prirodna barijera protiv infekcije patogenima. U ovom eksperimentu nismo mogli oponašati prirodne uvjete uzgoja, jer bi dodatak tanina u hranidbenu podlogu inducirao drugu izvanstaničnu lakazu LAC-3 (Kim i sur. 1994). Kako obje izvanstanične lakaze oksidiraju iste reagense, ne bi bilo moguće izmjeriti aktivnost samo konstitutivno eksprimirane lakaze LAC-1.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja učinka različitih podtipova i izolata virusa CHV-1 na aktivnost izvanstanične lakaze LAC-1 i unutarstanične lakaze LAC-2 u hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica* u odnosu na virulentne, ali i i međusobno, može se zaključiti sljedeće:

1. Aktivnost izvanstanične lakaze LAC-1 višestruko je veća od aktivnosti unutarstanične lakaze LAC-2 u svim izolatima.
2. Virus CHV-1 ne uzrokuje stastički značajno smanjenje aktivnosti unutarstanične lakaze LAC-2 ni u jednom hipovirulentnom izolatu.
Virus CHV-1 uzrokuje stastički značajno smanjenje aktivnosti izvanstanične lakaze LAC-1 u hipovirulentnim izolatima nekih sojeva gljive.
3. Aktivnost izvanstanične lakaze LAC-1 u hipovirulentnim izolatima ovisi o genotipu virusa, ali i o genotipu gljive.

6. LITERATURA

- Alleman C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assed using restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 843 - 854.
- Anagnostakis S. L. (1992): Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 568 - 571.
- Baldrian P. (2005): Fungal laccases - occurence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215 - 242.
- Blaich R., Esser K. (1975): Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Archives of Microbiology* 103: 271 - 277.
- Bradford M. M. (1986): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 - 254.
- Bryner S. F, Rigling D. (2011): Temperature-dependant genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. *The American Naturalist* 177: 65 - 74.
- Chen B., Geletka L. M., Nuss D. L. (2000): Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and its plant host. *Journal of Virology* 74: 7562 - 7567.
- Chen B., Nuss D. L. (1999): Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 73: 985 - 992.
- Choi G. H., Dawe A. L., Churbanov A., Smith M. L., Milgroom M. G., & Nuss D. L. (2012): Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 190: 113 – 127.
- Claus H. (2004): Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93 - 96.

- Choi G. H., Larson T. G., Nuss D. L. (1992): Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 5: 119 - 128.
- Choi G. H., Pawlyk D. M., Nuss D. L. (1991): The autocatalytic protease p29 encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus resembles the potyvirus-encoded protease HC-Pro. *Virology* 183: 747 - 752.
- Cortesi P., McCulloch C. E., Song H., Lin H., Milgroom M. G. (2001): Vegetative incompatibility genes restrict horizontal transmission of viruses in the chestnut blight fungus. *Genetics* 159: 107 - 118.
- Cortesi P., Milgroom M. G. (1998): Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2988 – 2994.
- Crawen M. G., Pawlyk D. M., Choi G. H., Nuss D. L. (1993): Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of Virology* 67: 6513 - 6521.
- Dawe A. L., Nuss D. L. (2001): Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35: 1- 2.
- Dutech C., Fabreguettes O., Capdevielle X., Robin C. (2010): Multiple introductions of divergent genetic lineages in an invasive fungal pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in France. *Heredity* 105: 220 - 228.
- Glass N.L., Kaneko I. (2003): Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2: 1 - 8.
- Griffin G. J., Roane M. K., Elkins, J. R. (1986): Chestnut blight, other *Endothia* diseases, and the genus *Endothia* 1 - 53.
- Heiniger U., Rigling D. (1994): Biological Control of Chestnut Blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581 - 599.
- Hillman B. (2001): Biology and evolution of beneficial and detrimental viruses of animals, plants, and fungi. *Biological Invasions* 3: 255 - 262.

- Ježić M., Krstin Lj., Poljak I., Liber Z., Idžojtić M., Jelić M., Meštrović J., Zebec M., Ćurković-Perica M. (2014): *Castanea sativa*: genotype-dependent recovery from chestnut blight. *Tree Genetics & Genomes* 10: 101 - 110.
- Käärik A. (1965): The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Studia Forestalia Suecica* 31. Stockholm
- Kim D. H., Rigling D., Zhang L., Van Alfen N. K. (1994): A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of *Lac*. *Molecular plant-microbe interactions* 8: 259 - 266.
- Krstin L., Novak-Agbaba S., Rigling D., Krajačić M., Ćurković Perica M. (2008): Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. *Plant Pathology* 57: 1086 - 1096.
- Larson T.G., Choi G.H., Nuss, D.L. (1992): Regulatory pathways governing modulation of fungal gene expression by a virulence-attenuating mycovirus. *EMBO Journal* 11: 4539 – 4548.
- Marra R. E., and Milgroom M. G. (2001): The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86: 134 - 143.
- McCabe P.M., Pfeiffer P., Van Alfen N.K. (1999): The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology* 7: 377 - 381.
- McCarroll D. R., Thor E. (1978): The role of oxalic acid in the pathogenesis of *Endothia parasitica*, *Proceedings of the American Chestnut Symposium* 60 - 63.
- Milgroom M. G., Cortesi P. (2004): Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* 42: 311 - 338.
- Milgroom M. G., Lipari S. E., Ennos R. A., Liu Y.C. (1993): Estimation of the outcrossing rate in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Heredity* 70: 385 - 392.
- Novak-Agbaba S., Liović B., Pernek M. (2000): Prikaz sastojina pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj i zastupljenost hipovirulentnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr Rad 35: 91 - 110.

- 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. 12. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Sveti Martin na Muri, pp 129 - 130.
- Parsley T. B., Chen B., Geletka L. M., Nuss D. L. (2002): Differential modulation of cellular signaling pathways by mild and severe hypovirus strains. *Eukaryotic Cell* 1: 401 - 413.
- Peever T. L., Liu Y. C., Milgroom M. G. (1997): Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* 87: 1026 - 1033.
- Prospero S., Conedera M., Heiniger U., Rigling D. (2006): Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forest with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96: 1337 - 1344.
- Rigling, D., Van Alfen N. K. (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 N. K. (1993): Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Applied Environmental Microbiology* 59: 3634 - 3639.
- Robin C., Heiniger U. (2001): Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and 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.
- Robin C., Martin M., Capdeville X., Travers C., Colinas C. (2009) *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58: 527 - 535.
- Shain L., Miller J. B., (1992): Movement of cytoplasmic hypovirulence agents in chestnut blight cankers. *Canadian Journal of Botany* 70: 557 - 561.

Shapira R., Choi G. H., Hillman B. I., Nuss D. L. (1991): The contribution of defective RNAs to the complexity of viral-encoded double-stranded RNA populations present in hypovirulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. The EMBO Journal 10: 741 - 746.

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

Solomon E.I., Sundaram U. M. , Machonkin T. E. (1996): Multicopper oxidases and oxygenases. Chemical Reviews 96: 2563 – 2605.

Suzuki N., Maruyama K., Moriyama M., Nuss D. L. (2003): Hypovirus papain-like protease p29 functions in *trans* to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. Journal of Virology 77: 11697 - 11707.

Suzuki N., Nuss D. L. (2002): The contribution of p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. Journal of Virology 76: 7747 - 7759.

Tartaglia J., Paul C. P., Fulbright D. W., Nuss D. L. (1986): Structural properties of double-stranded RNAs associated with biological control of chestnut blight fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 9109 - 9113.

Weidlich W. H. (1978): A preliminary report on a method of biological control of the chestnut blight not involving the use of a hypovirulent strain of *Endothia parasitica*. Proceedings of the American Chestnut Symposium, Morgantown pp 79 - 83.

Zouari N., Romette J. L., Thomas D. (1987): Purification and properties of 2 laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea*. Applied Biochemistry and Biotechnology 15: 213 –225.

ŽIVOTOPIS

Martina Gačar rođena je 4. studenoga 1988. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Retkovec upisala je VII. gimnaziju koju je završila 2007. godine. Iste godine upisala je preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij molekularne biologije upisala je 2013. godine.

Za vrijeme studija nekoliko puta je sudjelovala na manifestaciji "Noć biologije".

U srpnju i kolovozu 2009. godine volontirala je kao mentor na znanstveno-edukacijskom projektu "Ljetna tvornica znanosti" na Mediteranskom institutu za istraživanje života (MedILS) u Splitu.