

Tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* i analiza ORFA regije virusa *Cryphonectria hypovirus 1* kontinentalne Hrvatske

Škegro, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:016104>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivan Škegro

**Tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive
Cryphonectria parasitica i analiza ORFA
regije virusa *Cryphonectria hypovirus 1*
kontinentalne Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ivan Škegro

**Vegetative compatibility types of
Cryphonectria parasitica and analysis of
Cryphonectria hypovirus 1 ORFA region
from continental Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Marina Ježića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Tipovi vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* i analiza ORFA regije virusa *Cryphonectria hypovirus 1* kontinentalne Hrvatske Ivan Škegro

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gljiva mješinarica *Cryphonectria parasitica* uzročnik je bolesti raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa*), a infekcija te gljive virusom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) joj smanjuje virulenciju, te tako omogućava prirodnu biološku kontrolu spomenute bolesti. Virus CHV1 je najbolje proučena vrsta hipovirusa i jedina prisutna u Europi, gdje postoji njegovih pet podtipova. Horizontalni prijenos virusa CHV1 ograničen je sustavom vegetativne (ne)kompatibilnosti gljive *C. parasitica*, tzv. vc-tipom gljive. U tri proučavane populacije kontinentalne Hrvatske utvrđeno je 12 različitih vc-tipova, među 54 izolata gljive *C. parasitica*. U populaciji Hrvatske Kostajnice najzastupljeniji vc-tipovi su EU-1 (22%), te EU-2 i EU-26 (17%), u populaciji Požege to su vc-tipovi EU-2 (58%) i EU-1 (19%), te konačno u populaciji Slunja to je vc-tip EU-2 (40%). Prisutnost hipovirusa dokazana je izolacijom ukupne RNA, reverznom transkripcijom, te amplifikacijom dijela genomske regije ORFA. Prevalencija virusa CHV1 na području Hrvatske Kostajnice iznosi 61%, a u Požegi 23%. Nakon sekvenciranja umnoženih fragmenata potvrđeno je da izolati virusa CHV1 pripadaju talijanskom podtipu, te su najsirodniji izolatima iz Slovenije, Italije i Švicarske.

Ključne riječi: rak kore kestena, RNA virus, molekularna filogenija
(68 stranica, 17 slika, 17 tablica, 92 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: doc. dr. sc. Marin Ježić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Marin Ježić
Prof. dr. sc. Goran Klobučar
Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and analysis of *Cryphonectria hypovirus 1* ORFA region from continental Croatia Ivan Škegro

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Sac fungus *Cryphonectria parasitica* is a causal agent of the chestnut blight, a disease of sweet chestnut (*Castanea sativa*). Infection of the fungus with *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) reduces its virulence, acting as a natural biocontrol agent of the chestnut blight. CHV1 is the best studied species of hypoviruses and the only one present in Europe, where five subtypes of this virus have been identified. Its horizontal transmission is limited by a vegetative (in)compatibility (vc-type) system of the fungus. Twelve different vc-types were identified among 54 isolates of *C. parasitica* from three populations of continental Croatia. The most abundant vc-type in Hrvatska Kostajnica was EU-1 (22%), followed by EU-2 and EU-26 (17%), in Požega it was EU-2 (58%), followed by EU-1 (19%). Finally, the most widespread vc-type in Slunj was EU-2 (40%). CHV1 presence was determined by isolation of total RNA, reverse transcription and amplification of a part of ORFA genomic region. The prevalence of CHV1 is 61% in Hrvatska Kostajnica and 23% in Požega. After sequencing of the amplified fragments, all virus strains have been confirmed to belong to the same, Italian subtype, and are closely related to strains from Slovenia, Italy and Switzerland.

Keywords: chestnut blight, RNA virus, molecular phylogeny
(68 page, 17 figures, 17 tables, 92 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Asst. Prof. Marin Ježić, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Marin Ježić, PhD
Prof. Goran Klobučar, PhD
Prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. <i>Cryphonectria parasitica</i> uzročnik raka kore kestena	1
1.2. Gljiva mješinarica <i>Cryphonectria parasitica</i> i vegetativna kompatibilnost (vc)	3
1.3. <i>Cryphonectria</i> hipovirus 1 (CHV1) i fenomen hipovirulentnosti	5
1.4. Pitomi kesten (<i>Castanea sativa</i>)	9
2. Ciljevi istraživanja	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Područje istraživanja i uzorkovanje kore pitomog kestena	12
3.2. Nasađivanje gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> na hranjivi medij i dobivanje čistih kultura	13
3.3. Određivanje morfologije izolata gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	14
3.4. Test vegetativne kompatibilnosti izolata gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	15
3.5. Izolacija DNA	17
3.6. Izolacija ukupne RNA iz kultura gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	19
3.7. Reverzna transkripcija (RT)	20
3.8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	21
3.9. Umnažanje dijela ORFA genomske regije virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom	24
3.10. Agarozna elektroforeza umnoženih fragmenata DNA	25
3.11. Sekvenciranje ORFA genomske regije virusa CHV1	26
3.12. Analiza raznolikosti virusnih izolata CHV1 populacija Hrvatske Kostajnice i Požege ..	27
3.13. Statistička analiza raznolikosti istraživanih izolata gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	27
4. Rezultati	29
4.1. Morfologija kolonija <i>Cryphonectria parasitica</i> u populacijama Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja	29
4.2. Koncentracije izolirane genomske DNA i ukupne RNA populacija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i>	30
4.3. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> u populacijama Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja	33

4.4. Potvrda prisutnosti virusa CHV1 u populacijama gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> bijele ili prijelazne morfologije, na području Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja	39
4.5. Usporedba raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti populacija gljive <i>Cryphonectria parasitica</i> iz Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja s podacima iz 2008. i 2014. godine	42
4.6. Karakteristike i raznolikost populacija virusnih izolata CHV1 Hrvatske Kostajnice i Požege	44
5. Rasprava	48
6. Zaključci	57
7. Literatura	58

1. Uvod

1.1. *Cryphonectria parasitica* uzročnik raka kore kestena

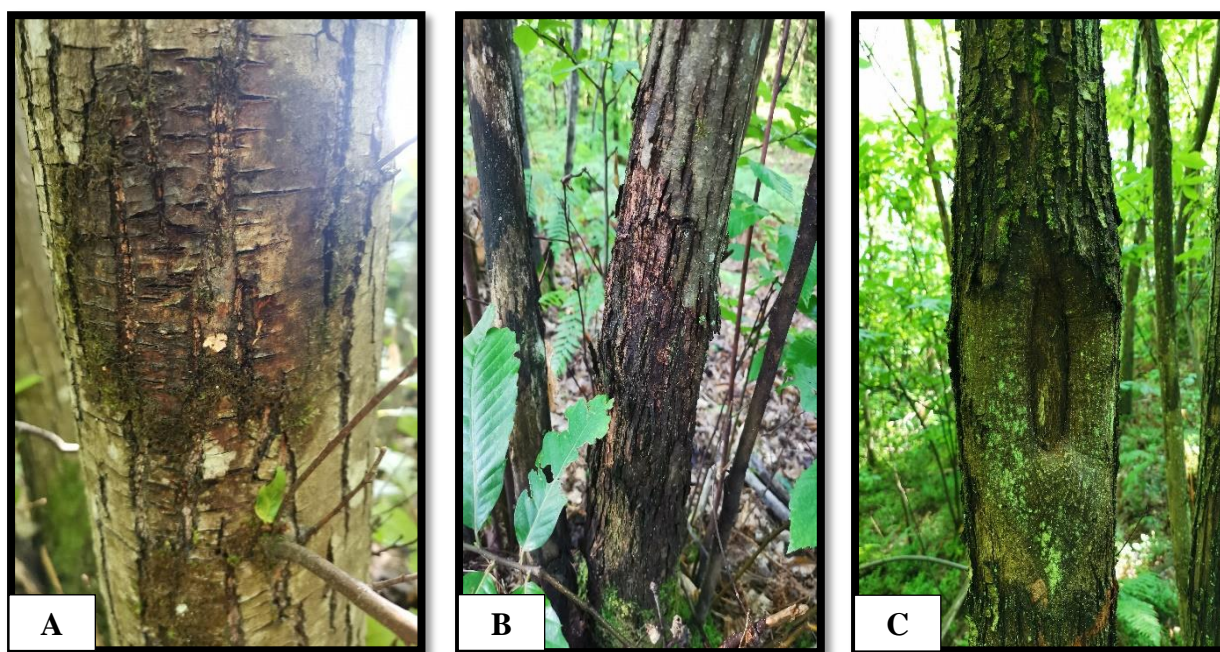
Šume kestena Europe i Sjeverne Amerike su tijekom XX. st. počele obolijevati od nepoznate bolesti, koja se manifestirala promjenama na kori – rakastim tvorbama, promjenom boje i odumiranjem tkiva. Kasnije je utvrđeno da je uzrok bolesti patogena gljiva mješinarica *Cryphonectria parasitica*. Bolest je prvi puta registrirana na američkom kestenu (*Castanea dentata* (Marshall) Borkh.), u zoološkom vrtu u New Yorku, 1904. godine (Merkel 1905). Kako se bolest tamo po prvi put pojavila je i dan danas predmetom rasprave. Danas se smatra da su inficirana stabla kestena unesena s područja Azije (Anagnostakis 1987). Treba imati na umu da je gljiva *C. parasitica* već ranije zabilježena kao parazit na kestenima koji obitavaju na području Kine i Japana (Shear i Stevens 1913). Iz zoološkog vrta u New Yorku se bolest dalje počela širiti na više načina, među kojima valja istaknuti širenje samih spora vjetrom i direktnim širenjem dijelova zaraženih stabala kestena posredovano čovjekom, životinjama i sl.

Do kraja Drugog svjetskog rata, 1945. godine, načinjena šteta je bila drastičnih razmjera – naime uništene su gotovo sve populacije *C. dentata* u Sjevernoj Americi. Bilo je potrebno svega 50-ak godina od prve zabilježene pojave bolesti da nastane šteta koja se mjerila u milijunima uništenih stabala, osobito na području između Apalačkog gorja od sjevera i rijeke Mississippi na jugu Sjeverne Amerike (Anagnostakis 1987).

U Europi je bolest prvi puta zabilježena na pitomom kestenu (*Castanea sativa* Mill.) u Italiji, 1938. godine, u Toskani (Biraghi 1946). Gljiva *C. parasitica* se sljedećih 30-ak godina širila kroz populacije kestena unutar Apeninskog poluotoka, nakon čega se proširila kroz cijeli europski kontinent – izuzev Ujedinjenog Kraljevstva, Nizozemske i sjeverne Francuske (Robin i Heiniger 2001). U Republici Hrvatskoj bolest je prvi puta zabilježena 1955. godine (Kišpatić 1956), u blizini Opatije. Od tada se moglo sustavno pratiti širenje bolesti i gljive *C. parasitica* kroz populacije pitomog kestena u Hrvatskoj (Halambek 1986, Krstin i sur. 2008).

Micelij gljive *C. parasitica* hifama učinkovito prodire kroz koru, postupno razarajući vaskulaturu kestena, te na taj način uzrokuje odumiranje distalnih dijelova biljke. Golim okom se mogu zamijetiti razne morfološke promjene nastale kao posljedica zaraze, poput raspucale ili uleknute kore, promjene njezine boje i sporulacija gljive *C. parasitica* na njenoj površini (**Slika 1**). Micelij svojom penetracijom uništava tkivo kestena, najviše zahvaljujući enzimima – celulazama i lakazama – koji razgrađuju komponente staničnih stijenki (Rigling i Prospero 2018).

Gljiva *C. parasitica* nije selektivna, te zbog toga može zaraziti sva stabla kestena, bez obzira na njihovu starost i prirodni imunitet (Glavaš 1999), no uočeno je da bolest brže napreduje kod kestena u razvoju.



Slika 1. Prikazani su različiti tipovi lezija na kori pitomog kestena, zaraženoga gljivom *C. parasitica*. A) Nekroza – karakterizira ju spororastući, površinski rak kore uzrokovan hipovirulentnom gljivom. B) Aktivni rak – izazvan je virulentnim izolatom gljive *C. parasitica*. C) Kalus – predstavlja postupno zacjeljivanje rane, a nastaje nakon infekcije gljive *C. parasitica* virusom CHV1. Fotografije snimio doc. dr. sc. Marin Ježić.

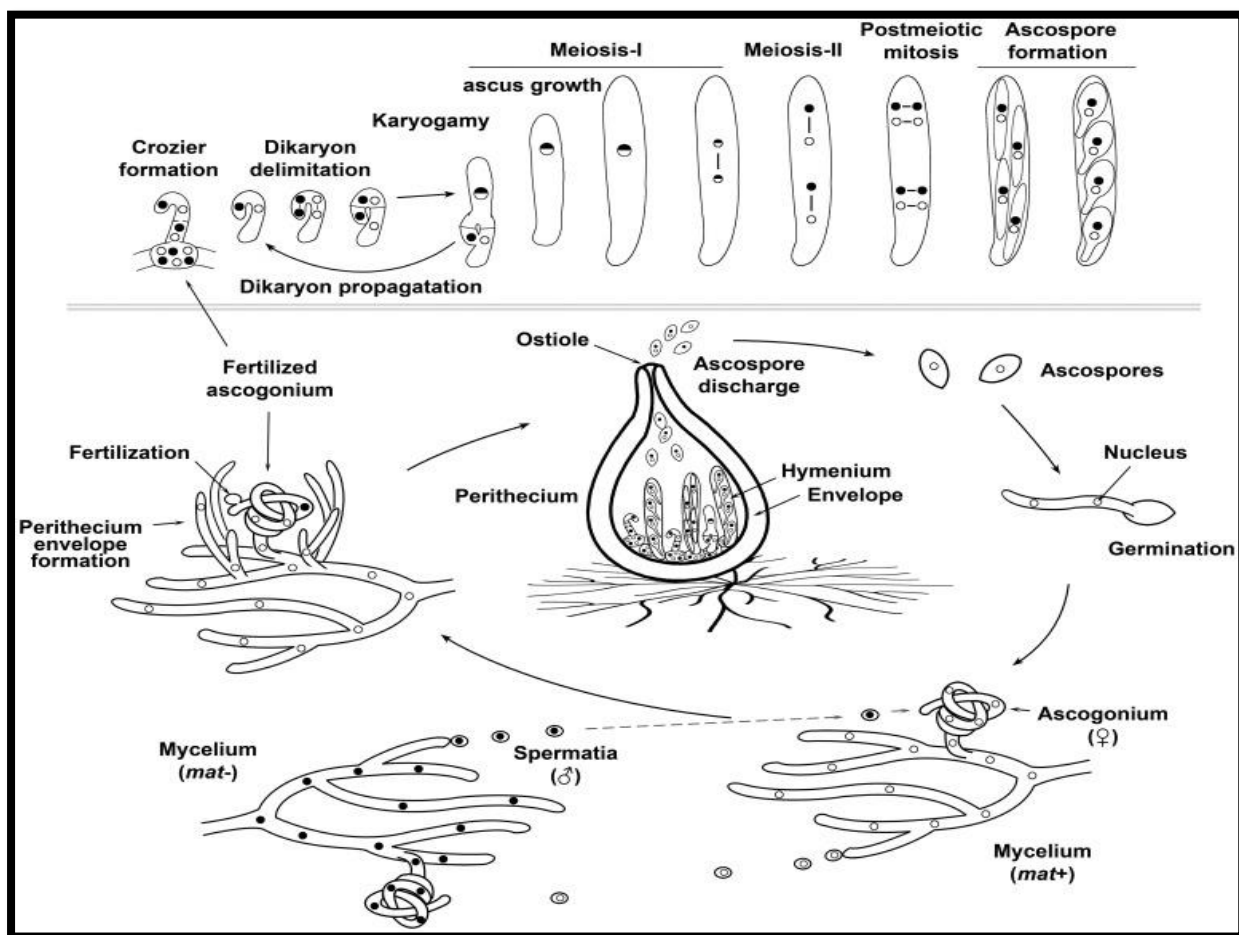
1.2. Gljiva mješinaraka *Cryphonectria parasitica* i vegetativna kompatibilnost (vc)

Gljiva *C. parasitica* spada u odjeljak mješinarke (Ascomycota), koje predstavljaju najveću skupinu carstva gljiva (Fungi) (Deacon 1980). U gljive mješinarke spadaju mnoge vrste interesantne za čovjeka. Neke od njih su jestive, poput smrčaka (*Morchella* spp.) i tartufa (*Tuber* spp.) (Mello i sur. 2006). Pekarski ili pivski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) je fermentator, tj. može provoditi alkoholno vrenje zbog čega se i koristi i u prehrambenoj industriji (Deacon 1980). Od medicinskog značaja važna vrsta je *Penicillium chrysogenum*, iz koje je izoliran prvi poznati prirodni antibiotik – penicilin. Neke se vrste roda *Penicillium* koriste u proizvodnji specifičnih vrsta sireva, poput roqueforta ili camemberta. Neke gljive proizvode otrovne spojeve, npr. gljiva *Aspergillus flavus* proizvodi hepatotoksični i kancerogeni spoj aflatoksin, dok je ražena glavica (*Claviceps purpurea*) također od medicinskog značaja, pošto sadrži otrovne ergot-alkaloide, koji uzrokuju ergotizam, no u malim dozama se koriste kao lijekovi, primjerice kao analgetici (Deacon 1980).

Gljiva *C. parasitica* se, kao i većina drugih mješinarke, može razmnožavati na dva načina – spolno (putem askospora) i nespolno (putem konidiospora ili fragmentacijom micelija). Spolne strukture gljiva mješinarke nazivaju se mješinice (odnosno askusi), te je po njima odjeljak ujedno i dobio naziv (Deacon 1980). Pomoću njih se vrši spolno razmnožavanje (**Slika 2**), na način da askogonij – odnosno ženska rasplodna struktura – fuzionira s mikrokonidijom (nespolnom sporom koja može preuzeti funkciju muške spolne stanice) ili anteridijem, tj. muškom hifom. Pošto dolazi do spajanja hifa bez istovremenog fuzioniranja jezgri, takav proces zovemo plazmogamija. Daljnjim rastom i razvitkom dolazi do nastanka askogenih hifa, na kojima će nastati rasplodne strukture – askusi (Read i Beckett 1996). U završnom stadiju spolnog razmnožavanja dolazi do formiranja tzv. kuke, u kojoj dolazi do spajanja roditeljskih jezgara (kariogamije), mejoze i formiranja spolnih spora. One se nazivaju askospore, a kod gljive *C. parasitica* su dvostanične, te ih je prisutno po osam unutar jednog askusa. Spolni način razmnožavanja je pod kontrolom dialelnog *MAT* lokusa, a zadužen je za kontrolu i regulaciju procesa oplodnje, odnosno interakciju između specifičnih feromona i feromonskih receptora (Kües i Casselton 1992).

Osim spolnog načina, gljiva *C. parasitica* se može razmnožavati i nespolnim putem, konidiosporama (nespolnim sporama) i fragmentacijom micelija (Milgroom i Cortesi 1999).

Prilikom nastanka konidiospora ne dolazi do mejoze, stoga se ovim načinom razmnožavanja ne povećava genska raznolikost populacije gljive. Konidiospore su male, jednostanične spore, koje se oslobađaju za kišovito vreme, a nastaju unutar piknida na specijalnim hifama koje nazivamo konidioforima (Prospero i sur. 2006).



Slika 2. Životni ciklus gljiva mješinariki. Prema Peraza-Reyes i Berteaux-Lecellier (2013).

Rasprostranje spora (spolnih ili nespolnih) se najviše odvija vjetrom (Heald 1926), no i putem životinja, od kojih su kukci i ptice najznačajniji vektori. Osim navedenih načina, jedan dio

rasprostiranja se vrši i antropogeno. Domet rasprostiranja askospora može dosegnuti izuzetno velike udaljenosti, čak i do 40 kilometara, dok se konidije uglavnom prenose lokalno – najviše ispiranjem vodom sa zaraženih stabala tijekom vlažnog vremena. Učestalost zaraze dostiže maksimum tijekom svibnja, jer tada pitomi kesten intenzivno raste, te je izuzetno osjetljiv. Vremenski uvjeti kasnog proljeća također idu u prilog širenju infekcije ovom gljivom (Griffin 1986).

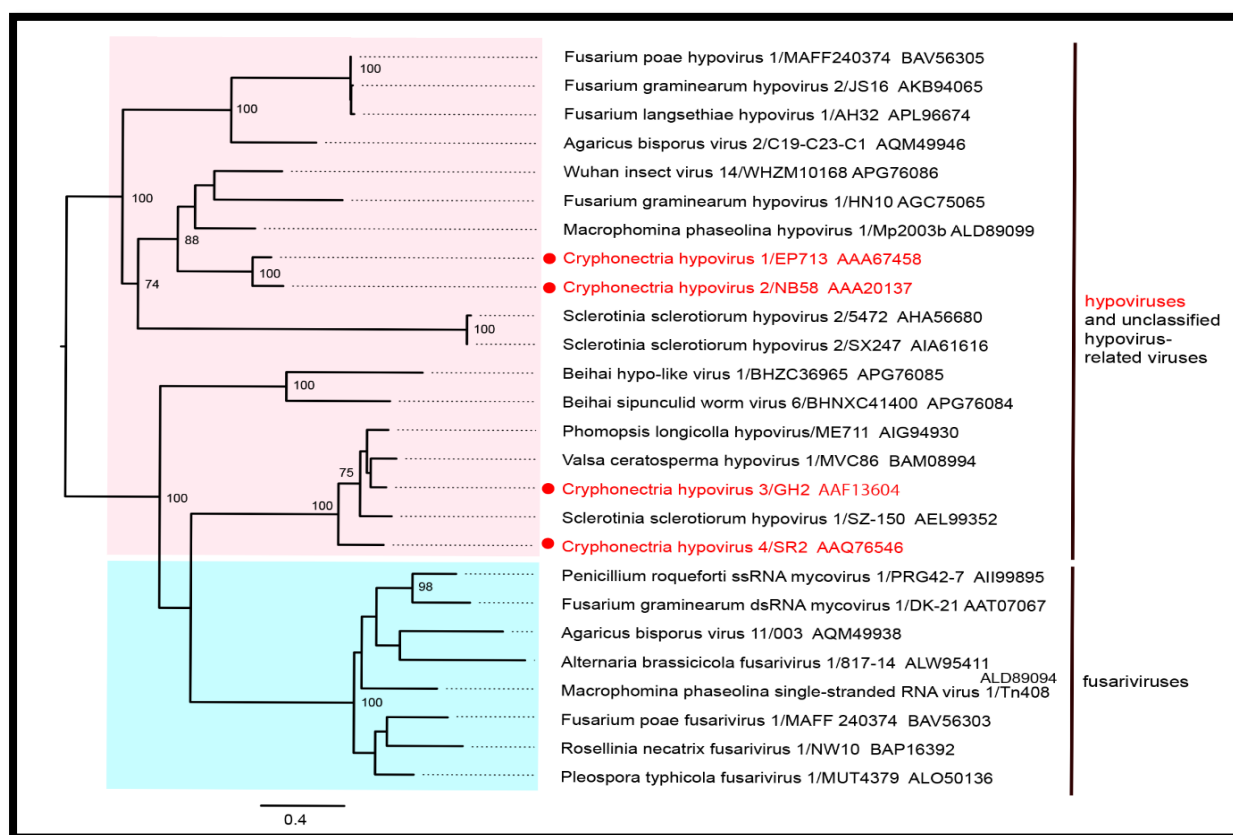
Kod filamentoznih gljiva mješinarki, u koje ubrajamo gljivu *C. parasitica*, poznat je fenomen koji nazivamo vegetativna (ne)kompatibilnost (Glass i Kaneko 2003). Hife gljiva tijekom rasta mogu doći u kontakt te fuzionirati, tvoreći vijabilne heterokarione (Glass i sur. 2000). Ukoliko anastomoziraju hife kompatibilnih micelija (istog tipa vegetativne kompatibilnosti, odnosno vc-tipa), tada je proces stabilan, te dolazi do formiranja heterokariona, odnosno heterokarionskog micelija. Drugim riječima, unutar fuzioniranih hifa nalaze se jezgre porijeklom od različitih jedinki gljiva. U suprotnom, ukoliko dođe do kontakta među hifama nekompatibilnih micelija, dolazi do apoptoze – tj. programirane smrti hifa. Apoptoza u ovom slučaju može biti korisna za gljivu, jer je bez stabilnih anastomoza među hifama prijenos mikovirusa i drugih potencijalno štetnih citoplazmatskih elemenata otežan. Vegetativna (ne)kompatibilnost kod gljive *C. parasitica* je posredovana genima koji se nalaze na najmanje šest dialelnih lokusa: *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6* i *vic7* (Milgroom i Cortesi 1999).

1.3. Cryphonectria hipovirus 1 (CHV1) i fenomen hipovirulentnosti

Viruse koji inficiraju gljive nazivamo mikovirusima. Prvi objavljeni nalaz mikovirusa zabilježen je 1962. godine, a virus nazvan La France isometric virus (LIV) izolirao je virolog Hollings iz plemenite pečurke (Kumar i Chandel 2016). Tijekom posljednjih 50-ak godina otkriveno je da su mikovirusi prisutni u svim taksonomskim skupinama gljiva, no mnogi od njih nisu detaljno okarakterizirani (Abid i sur. 2018).

Unutar porodice *Hypoviridae* opisano je više vrsta mikovirusa (**Slika 3**), no četiri najznačajnije vrste virusa su patogeni gljive *C. parasitica*: *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), 2 (CHV2), 3 (CHV3) i 4 (CHV4). Navedena porodica uključuje i neke mikoviruse koji uzrokuju tzv. hipovirulentni efekt kod gljiva koje su njima zaražene. Unatoč tome što pripadaju istom taksonu,

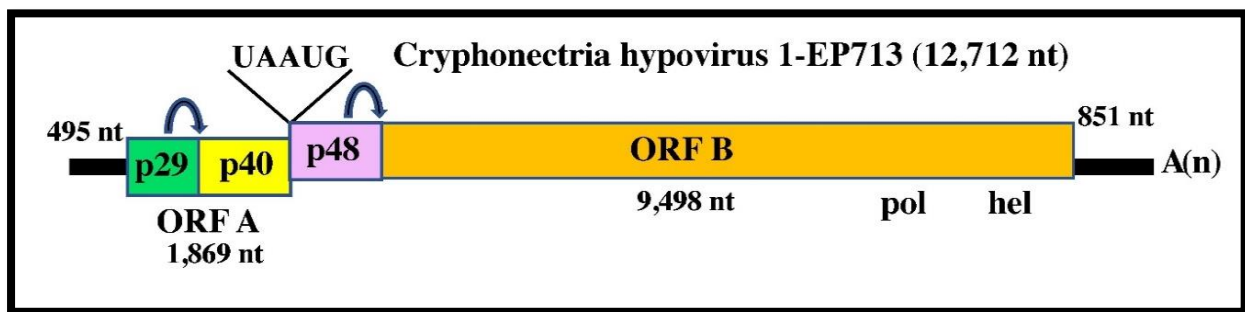
organizacija njihovih genoma je različita – primjerice virusi CHV1 i CHV2 su međusobno najsirodniji, posjeduju dva otvorena okvira čitanja (ORF) i grupirani su zajedno u rod *Alphahypovirus*, dok su virusi CHV3 i CHV4 evolucijski udaljeniji, posjeduju samo po jedan ORF, te su smješteni u rod *Betahypovirus* (Suzuki i sur. 2018). Virus koji ima najizraženiji efekt na gljivu *C. parasitica* je CHV1, koji je ujedno najbolje proučen. On se također može pronaći u Japanu i Kini, ali ne i u Sjevernoj Americi (Heiniger i Rigling 1994). Tamo su pak nađena preostala tri spomenuta mikovirusa – CHV2 (Hillman i sur. 1994), CHV3 (Smart i sur. 1999) i CHV4 (Linder-Basso i sur. 2005).



Slika 3. Molekularna filogenijska analiza porodice *Hypoviridae* i srodnih virusa. Prema Suzuki i sur. (2018).

Genom virusa CHV1 je +ssRNA, veličine 12712 nt (nukleotida), te se obično nalazi u citoplazmi stanica domaćina kao dvolančana molekula RNA (dsRNA), koja predstavlja replikativnu formu

ovog virusa. Virus CHV1 sadrži dva kontinuirana okvira čitanja: ORFA i ORFB, koji su odvojeni specifičnim nukleotidnim slijedom UAAUG. UAA predstavlja STOP kodon ORFA regije, dok AUG predstavlja START kodon ORFB regije (**Slika 4**). Protein kodiran ORFA regijom nazivamo poliprotein p69, te posjeduje autoproteolitičku aktivnost. Njegovim cijepanjem se oslobađaju dva manja proteina, naziva p29 i p40. Protein kodiran ORFB posjeduje domenu RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*, RNA polimeraza ovisna o RNA). Taj protein je ujedno i enzim – RNA replikaza, koji katalizira replikaciju virusnog genoma. Spomenuti proteini utječu na regulaciju mnogih gena domaćina, te se smatra da na taj način mogu modulirati tijek bolesti (Dawe i Nuss 2001).



Slika 4. ORFA i ORFB regije *Cryphonectria hypovirus 1*. Prilagođeno prema Suzuki i sur. (2018).

Infekcija gljive *C. parasitica* virusom CHV1 ima kao posljedicu smanjenje ženske fertilitnosti (Rigling i sur. 1989) i redukciju broja nastalih spora (Zhang i sur. 1998). Tako zaražena hipovirulentna jedinka gljive ne uzrokuje pojavu teškog oblika bolesti raka kore kestena, već se infekcija manifestira kao blagi oblik nekroze, koji je lokaliziran na površini stabla. Ukoliko je na stablu bio prisutan agresivni oblik raka kore, uzrokovan virulentnom jedinkom *C. parasitica*, te ako dođe do naknadne infekcije virulentnog izolata gljive *C. parasitica* virusom CHV1, agresivan tip raka kore će prijeći u blaži, odnosno prodiranje micelija kroz drvo se usporava, te stablo kestena može zatvoriti ranu stvaranjem kalusa. Sličan utjecaj na domaćina ima i virus CHV2 (Hillman i sur. 1992), dok je utjecaj virusa CHV3 na domaćina slabije izražen (Smart i sur. 1999). Posljednji od navedenih hipovirusa – CHV4 – ima zanemariv utjecaj na virulentnost gljive *C. parasitica* (Linder-Basso i sur. 2005).

Izolati virusa CHV1 iz Europe su prema razlikama u sekvencama podijeljeni na pet podtipova – I, F1, F2, D i E (Gobbin i sur. 2003). Podtip I je raširen u južnoj i jugoistočnoj Europi – od Francuske, preko Italije do Turske (Sotirovski i sur. 2006). U Francuskoj su originalno opisana dva podtipa: F1 i F2, koji se javljaju uglavnom sporadično u populacijama gljive *C. parasitica* u Francuskoj i Španjolskoj (Zamora i sur. 2012). Osim ova tri najznačajnija podtipa virusa CHV1, u Njemačkoj je identificiran podtip D, a u Španjolskoj podtip E. Filogenija podtipova virusa CHV1 upućuje da su se evolucijski razdvojili prije više stoljeća, te su naknadno uneseni u Europu, zajedno s gljivom *C. parasitica* (Feau i sur. 2014).

U istraživanjima gljive *C. parasitica* na području Hrvatske, virus CHV1 je detektiran u svim proučavanim populacijama, no njegova prevalencija u spomenutim populacijama je vrlo različita: od svega 12% u Istri, do 50% u Hrvatskoj Kostajnici (Krstin i sur. 2008). Ovi podatci su dobar orijentir za potencijalnu primjenu virusa CHV1 u biološkoj kontroli raka kore kestena.

Širenje bolesti raka kore kestena se može donekle kontrolirati, ako se u populaciju gljive *C. parasitica* namjerno unese virus CHV1. Treba napomenuti da oporavak populacija kestena nije uvijek siguran, vjerojatno zbog činjenice da virus CHV1 negativno utječe na sposobnost razmnožavanja hipovirulentih izolata gljive *C. parasitica*, a samim time i efikasnost vlastitog širenja kroz populaciju (Robin i sur. 2010). U samom procesu postoje i drugi problemi, kao primjerice efikasna primjena hipovirulentnog inokuluma na velikoj površini kestenovih šuma, kao i vremenski odmak između primjene virusa i početka oporavka stabala kestena (Rigling i Prospero 2018).

Prijenos virusa može biti vertikalni – zaraženim konidiosporama (Chen i Nuss 1999), ili horizontalni – anastomozama između zaraženog i nezaraženog micelija. Efikasnost horizontalnog prijenosa je uvjetovana vegetativnom (ne)kompatibilnošću (Cortesi i sur. 2001). Horizontalno širenje virusa CHV1 je efikasno samo između micelija gljive koje pripadaju istom tipu vegetativne kompatibilnosti (vc-tipu), dok je širenje među različitim vc-tipovima otežano (Robin i sur. 2010). Ovo nam ukazuje da veća raznolikost vc-tipova potencijalno negativno djeluje na mogućnost biološke kontrole bolesti (Krstin i sur. 2011).

1.4. Pitomi kesten (*Castanea sativa*)

Palinološka istraživanja ukazuju da je rod *Castanea* na području Europe i jugozapadne Azije bio prisutan tijekom cijelog tercijara (od kraja krede prije 65 milijuna godina, do početka kvartarskog perioda prije 1,6 milijuna godina), no tijekom perioda glacijacija u pleistocenu dolazi do značajnog smanjenja njegovog areala (od prije 2,58 milijuna godina do prije 11700 godina) (Huntley i Birks 1983). Tijekom posljednjeg ledenog doba, pitomi kesten se zadržao u nekoliko refugija – uz južnu obalu Crnog mora, na širem području srednjeg i južnog Apeninskog poluotoka, u sjevernoj Italiji na južnim obroncima Alpa, na sjevernom dijelu Pirinejskog poluotoka, na Balkanskom poluotoku na području južne Grčke, Sjeverne Makedonije i Bugarske, te na bliskom istoku uz Mediteransku obalu (Krebs i sur. 2004).

Smatra se da se uzgoj pitomog kestena značajno proširio tijekom vladavine Rimskog carstva, te da su njegovi stanovnici najzaslužniji za širenje kestena kroz Europu (Konstantinidis i sur. 2008, Zohary i Hopf 1988). Na teritoriju Hrvatske, pitomi kesten je najvećim dijelom rasprostranjen u središnjoj Hrvatskoj, od Slovenske granice do granice s Bosnom i Hercegovinom, u submediteranskom području u Istri, te na otocima Cresu i Krku (Medak 2009).

Pitomi kesten je vrsta toplih krajeva i pripada skupini heliofilnih biljaka (za uspješan rast i razvoj mu je potrebno mnogo svjetlosti). Najviše mu odgovara umjerena kontinentalna, umjerena submediteranska i mediteranska klima.

Pitomi kesten je listopadno stablo iz porodice bukvi (Fagaceae), koje može dosegnuti visinu do 30 metara, promjer stabla do 3 metra i starost od 500 godina. Juvenilne jedinice imaju maslinasto zelenu koru sa svijetlim lenticelama; kora je inicijalno glatka, no s godinama dolazi do promjene u njenom izgledu. Naime, osim što postaje deblja, također dobiva sivo-smeđu boju i uzdužne pukotine. Stabla pitomoga kestena imaju relativno veliku krošnju, koja je okruglasta i bujna. Listovi su naizmjenično raspoređeni, kopljasto izduženi, zašiljenog vrha, nazubljenog ruba i donekle kožastog karaktera. Pitomi kesten ima dobro razvijen i diferenciran korijenski sustav. Pripada acidofilnim vrstama, te najbolje raste na srednje dubokim, plodnim, rastresitim, umjereno vlažnim ili suhim, te kiselijim tlima (pH 4-5) (Zavišić i sur. 2014).

Cvate poslije listanja početkom lipnja, tijekom 20-tak dana. Biljke su jednodomne, a cvatovi mogu biti jednospolni muški ili dvopolni. Muški cvatovi sastoje se od 40-tak segmenata, koji imaju po sedam muških cvjetova i formiraju rese. Dvospolni cvatovi su složenije građe – ženski cvatovi su skupljeni po 3-4 i smješteni su pri bazi muških cvatova (Piccoli 1922).

Plodovi su tamnosmeđe obojeni orasi, zaštićeni bodljikavom kupulom. U nekultiviranih kestena kupula je promjera 5 do 6 cm, dok je kod kultiviranih i do 10 cm u promjeru. Nakon sazrijevanja kupula se otvara s četiri poklopca, a unutar nje se nalaze do tri ploda. Pitomi kesten počinje donositi plodove kada dosegne starost od 25 do 35 godina. Plodovi dozrijevaju početkom listopada, a jedno stablo može godišnje roditi i do 200 kg plodova. Plodove raznose uglavnom glodavci i ptice (Schütt i sur. 2006).

Od svih orašastih plodova kesten ima najmanji udio masti, pri čemu prevladavaju nezasićene masne kiseline, te je ujedno i odličan izvor kalija, željeza i kalcija. Plod također sadrži i manje količine mangana, bakra i cinka (Borges i sur. 2008). Od vitamina su najzastupljeniji vitamini A, B1, B2, C te vitamin K (Pérez-Jiménez i sur. 2010). To je ujedno i jedino orašasto voće s vitaminom C. Kesten obiluje i ugljikohidratima, osobito monosaharidima i disaharidima, poput: glukoze, saharoze, fruktoze i rafinoze. Izuzetno je bogat i škrobom (Botondi i sur. 2009).

Ekonomski gledano, kora pitomog kestena se koristi kao taninska sirovina u štavljenju kože, dok je njegov list sastavni dio mnogih farmaceutskih preparata. Drvo posjeduje odlična mehanička svojstva, lako se obrađuje, a proizvodi od kestenova drveta su dugovječni. Zbog odličnih mehaničkih svojstava se koristi u mnogim granama ljudske djelatnosti, poput: građevinarstva (konstrukcije mostova, kuća, skela...), drvne industrije (proizvodnja parketa, stolova, gredica...), bačvarstva (izrada bačvi za čuvanje piva i vina), poljoprivrede (u vinogradarstvu) i dr.

2. Ciljevi istraživanja

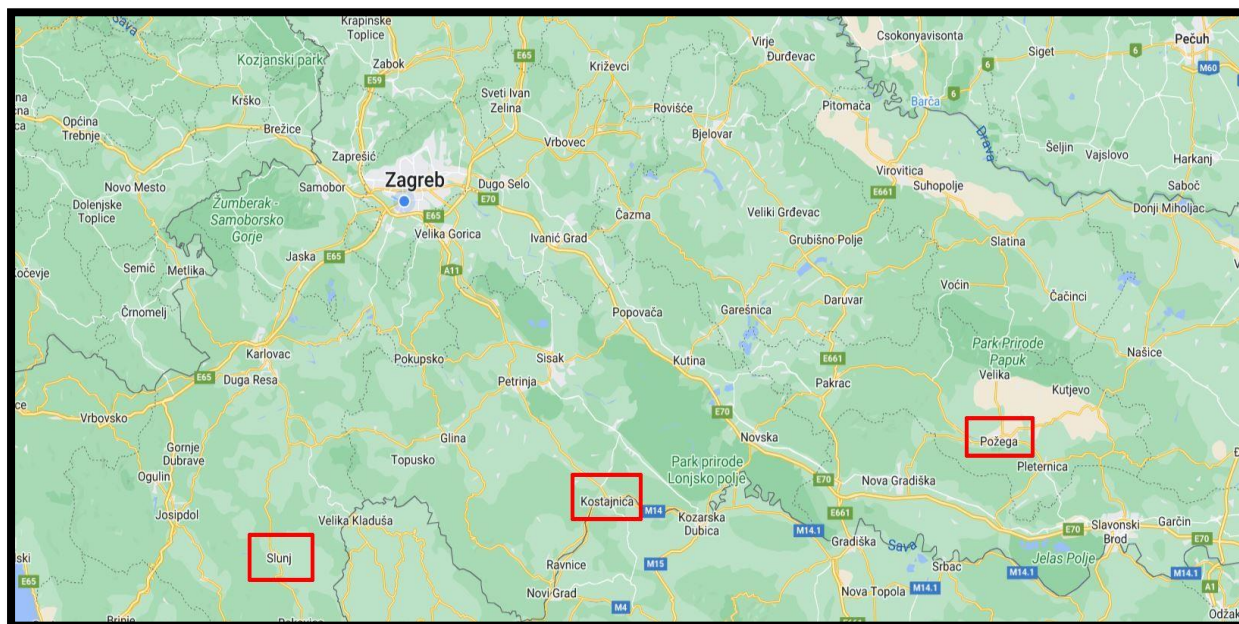
Ciljevi ovog istraživanja su:

- Odrediti raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti (EU-tipova) izolata gljive *C. parasitica*, prikupljenih s područja Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja.
- Odrediti udio hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* zaraženih *Cryphonectria hypovirusom 1* u spomenutim populacijama na temelju morfologije kolonija gljive, te ujedno to potvrditi izolacijom RNA i reverznom transkripcijom s PCR-om.
- Utvrditi nukleotidnu raznolikost virusnih izolata i analizirati virusne populacije.

3. Materijali i metode

3.1. Područje istraživanja i uzorkovanje kore pitomog kestena

Uzorci kore pitomog kestena zaraženi gljivom *C. parasitica* su sakupljeni tijekom 2020. i 2021. godine, na tri lokacije kontinentalne Hrvatske: Hrvatska Kostajnica, Požeга i Slunj (Slika 5). U svakoj populaciji uzorkovano je 50 stabala, osim u Slunju gdje je uzorkovano 10 stabala, pošto je ta populacija pitomog kestena vrlo mala. Sa svakog stabla uzorkovan je rak, te su uzorci označeni dvoslovnom kraticom populacije, te brojevima od 1 do 50 za Hrvatsku Kostajnicu (HK) i Požeга (PŽ), te od 1 do 10 za Slunj (SL). Uzorkovanje je provedeno tako da je komad kore kestena, s vidljivim simptomima bolesti, nožem odrezan sa stabla, te je potom spremljen u plastične vrećice. Nakon svakog uzorkovanja nož je uronjen u 96%-tni etanol, te steriliziran opaljivanjem. Uzorci su čuvani na 4°C u hladnjaku do daljnje obrade.



Slika 5. Područje uzorkovanja gljive *C. parasitica*. Prilagođeno prema: <https://www.google.com/maps/@45.5738262,16.4271322,9z>, 15.08.2022.

Uzorkovanje su napravili mag. ing. silv. Antonio Vidaković, doc. dr. sc. Igor Poljak i prof. dr. sc. Marilena Idžojić s fakulteta Šumarstva i drvne tehnologije, te doc. dr. sc. Marin Ježić i prof. dr. sc. Mirna Čurković-Perica s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

3.2. Nasađivanje gljive *Cryphonectria parasitica* na hranjivi medij i dobivanje čistih kultura

Hranjivu podlogu krumpirov dekstrozni agar (PDA, Potato Dextrose Agar, Difco™, BD) sam pripremio prema uputama proizvođača, te sam ju potom autoklavirao na 120°C tijekom 20 minuta.

U kabinetu s vertikalnim strujanjem sterilnog zraka, u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm, dodao sam ~15 mL sterilne hranjive podloge. Nakon što su se podloge ohladile i očvrsnule, na njih sam nasađivao zaraženu koru pitomog kestena. Uzorke zaražene kore nasađivao sam tako da sam koru kratko uronio u 70%-tni etanol, ostavio sušiti na filter papiru, te ju konačno utisnuo u hranjivu podlogu.

Kroz otprilike tjedan dana rasta u fitotronu, pri uvjetima od 70% vlage i 24°C, micelij gljive *C. parasitica* počinje rasti iz nasađenih dijelova kore. Rubne dijelove poraslih kolonija sam tada izrezao zajedno sa kockicom agara i presadio ih na nove hranjive podloge, kako bih dobio čiste kulture.

U svrhu izolacije i analize DNA i RNA, komadić svježe naraslog micelija s ruba kolonije gljive *C. parasitica* sam izrezao i nasadio na PDA podlogu prekrivenu sterilnim celofanom. Kroz tjedan dana micelij preraste čitavu površinu Petrijeve zdjelice, te sam ga tada lako mogao sastrugati s celofana. Takav sastrugani micelij sam dalje koristio prilikom izolacije DNA i RNA.

Ostatak micelija sam izrezao pomoću sterilnog skalpela, zajedno s PDA podlogom na kockice, stavio ih u mikroepruvete i dodao im 1 mL sterilnog, 22%-tnog glicerola. Ovaj dio je napravljen s ciljem trajnog pohranjivanja kolekcije u zamrzivaču na -80°C, gdje se izolati gljive *C. parasitica* tako mogu čuvati do deset godina.

3.3. Određivanje morfologije izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Čistim kulturama gljive *C. parasitica* sam vizualno procijenio morfologiju. Mogli su se razlikovati virulentni izolati narančaste do narančasto-smeđe boje, koji pokazuju intenzivnu sporulaciju, kao i hipovirulentni izolati bijele do blijedo-žute boje, koji gotovo da ne razvijaju spore na miceliju (**Slika 6**). Hipovirulentni izolati su, zbog zaraze virusom, slabije pigmentirani, te se ta činjenica može iskoristiti kao brzi način određivanja morfologije izolata gljive *C. parasitica*. Treba napomenuti da su neki izolati bili prijelazne morfologije (narančasto-bijeli), kojima iz tog razloga nisam sa sigurnošću mogao odrediti morfologiju; njih sam pripremio za dokazivanje prisutnosti/odsutnosti virusa CHV1 pomoću reverzne transkripcije s PCR-om (RT-PCR).



Slika 6. Na slici je vidljiva Petrijeva zdjelica s 12 kolonija. Izolati gljive *C. parasitica* su nasađeni jedni pored drugih, s ciljem morfološkog određivanja vegetativne (ne)kompatibilnosti, koristeći testere poznatog vc-tipa. Na desnoj polovici se mogu vidjeti šest hipovirulentnih kultura bijele morfologije, od kojih su tri testera originalno bili narančasti, te su izgubili boju zbog prelaska virusa sa zaraženih kultura. S obzirom da su te kulture vegetativno kompatibilne, među njima dolazi do sraštanja micelija, bez pojave baražne linije. Na lijevoj polovici se vidi jasna razlika u morfologiji, jer ne dolazi do sraštanja micelija, iz razloga što su testeri i nasađene kulture vegetativno nekompatibilne. Na tu nekompatibilnost dodatno ukazuje prisutnost tri baražne linije među kolonijama. Fotografiju snimio doc. dr. sc. Marin Ježić.

3.4. Test vegetativne kompatibilnosti izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) gljive *C. parasitica* odredio sam tako da sam sojeve poznatog i nepoznatog vc-tipa uzgajao na istoj podlozi u Petrijevoj zdjelici, inokulirajući ih u neposrednoj blizini. Sterilnim skalpelom sam sastrugao svježi micelij porasle kolonije gljive *C.*

parasitica i nacijepio ga uz rub Petrijeve zdjelice, koja sadrži PDA hranjivu podlogu. Pored tako inokuliranog izolata nepoznatog vc-tipa sam, na udaljenosti od nekoliko milimetara, na identičan način inokulirao micelij poznatog vc-tipa, tzv. EU-tester. Svaku sam Petrijevu zdjelicu naknadno zatvorio pomoću parafilma, kako ne bi došlo do kontaminacije. Na pojedinoj Petrijevoj zdjelici (promjera 90mm) sam napravio ukupno 12 inokulacija: šest s izolatima nepoznatog tipa, pored kojih sam u triplikatu inokulirao po tri izolata poznatog vc-tipa (testera) (**Slike 6 i 7**).

Od 74 dostupna testera poznate vegetativne kompatibilnosti, koristio sam četiri: EU-1, EU-2, EU-12 i EU-13, iz razloga što su upravo ta četiri vc-tipa najčešće prisutna u Hrvatskoj. Uzorci koji nisu pripadali niti jednom od spomenutih EU-tipova sam vc-tip odredio molekularno – izolacijom DNA i umnožavanjem specifičnih amplikona *vic* lokusa PCR-om.

Nakon nekoliko dana rasta se može uočiti dolazi li do formiranja baražne linije među naraslim kolonijama testiranih izolata i EU-testera. U slučaju kompatibilnih izolata, miceliji će potpuno prorasti, dok će se između nekompatibilnih izolata pojaviti baražna linija, koja ukazuje na činjenicu da izolati imaju najmanje jedan različiti alel, na barem jednom *vic* lokusu (**Slike 6 i 7**).



Slika 7. Slika prikazuje 12 virulentnih kolonija gljive *C. parasitica*, od kojih je šest nepoznatog vc-tipa i šest testera poznatog vc-tipa. U ovom slučaju nije došlo do promjene u boji kolonija vegetativno kompatibilnih testera, pošto su inokulirani izolati također bili virulentni (nisu bili zaraženi virusom CHV1). Fotografiju snimio doc. dr. sc. Marin Ježić.

Testom vegetativne kompatibilnosti na Petrijevim zdjelicama sam odredio EU-tip dva uzorka iz Slunja, pošto njihov EU-tip nisam uspio odrediti molekularnom genotipizacijom koristeći PCR. Kod uzorka SL-1-A2 nisam mogao odrediti genotip na *vic1* lokusu, te za SL-11-C1 na *vic1* i *vic6* lokusima. S obzirom da su mi bili poznati svi ostali lokusi, koristio sam jedino testere EU-3, EU-4 i EU-30, pomoću kojih sam mogao odrediti o kojem vc-tipu navedeni uzorci pripadaju.

3.5. Izolacija DNA

Izolaciju DNA iz čistih kultura gljive *C. parasitica* sam radio pomoću komercijalnog paketa OmniPrep™ for Fungi (G-Biosciences®), prema protokolu proizvođača, uz neke modifikacije.

Oko 50 mg micelija gljive *C. parasitica* sam sastrugao s celofana, dodao u mikroeprevetu, te prelio tekućim dušikom. Smrznuto tkivo sam potom usitnio pomoću malog plastičnog tučka. Nakon usitnjavanja sam dodao 500 μ L litičkog pufera (Genomic Lysis Buffer), kojem sam prethodno dodao 1 μ L enzima proteinaze K, na svakih 100 μ L pufera. Homogenate sam kratko promiješao na vrtložnoj miješalici i inkubirao u termobloku pri 60°C, kroz sat vremena. Sadržaj mikroepreveta sam svakih 20 minuta promiješao preokretanjem.

Nakon što su se mikroeprevete ohladile, dodao sam im 200 μ L kloroforma, te sam njihov sadržaj ponovno snažno promiješao rukom, nakon čega je slijedilo centrifugiranje od deset minuta pri 14000g na sobnoj temperaturi. Nakon završenog centrifugiranja sam gornju fazu otpipetirao u nove mikroeprevete, dodao im 50 μ L otopine za odvajanje komponenti (DNA Stripping Solution), te ponovno promiješao. Dobivenu smjesu sam inkubirao u termobloku, nekoliko minuta, pri 60°C.

Nakon inkubacije sam dodao 150 μ L otopine za taloženje (Precipitation Solution), te promiješao sadržaj snažno ih potresajući, kako bi se formirao bijeli precipitat. Mikroeprevete sam centrifugirao pri 14000g, pet minuta pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam izdvojio u nove mikroeprevete, te im potom dodao 500 μ L izopropanola, zajedno sve promiješao i centrifugirao pri 14000g, pet minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni supernatant sam dekantirao, te na taloge dodao 700 μ L 70%-tnog ledeno hladnog etanola. Slijedi zadnje centrifugiranje pri 14000g, dvije minute pri sobnoj temperaturi.

Mikroeprevete sam potom kratko stavio u termoblok, s otvorenim čepom, kako bi etanol ispario, pritom pazeći da talog ne bude potpuno suh, jer je u tom slučaju taloge DNA teško otopiti. Na kraju sam na taloge dodao 100 μ L TE (Tris-EDTA) pufera, resuspendirao ih i pohranio preko noći u hladnjak na 4°C.

Nakon izolacije DNA sam izmjerio apsorbancije pri 260 i 280 nm pomoću spektrofotometra za mjerenje mikrolitarskih volumena (NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific™). Nakon mjerenja sam izoliranu DNA pohranio u zamrzivaču na -20°C.

3.6. Izolacija ukupne RNA iz kultura gljive *Cryphonectria parasitica*

Ukupnu RNA iz micelija gljive *C. parasitica* bijele ili prijelazne morfologije izolirao sam pomoću komercijalnog kompleta GenElute™ Total RNA Purification Kit (Merck), prema protokolu proizvođača.

Otpriblike 30 mg tkiva gljive *C. parasitica* (potencijalno zaraženog s virusom CHV1) sam sastrugao s celofana, prebacio u mikroeprevetu i prelio tekućim dušikom, kako bi se tkivo zamrznilo. Takvo tkivo sam usitnio koristeći maleni plastični tučak. Usitnjenom tkivu sam dodao 600 µL litičkog pufera (Buffer RL), kojem sam prethodno dodao 1 µL β-merkaptoetanol, na svakih 100 µL pufera, te sam takav sadržaj epruveta promiješao na vrtložnoj miješalici nekoliko sekundi. Epruvete sam potom centrifugirao dvije minute pri 10000g. Nakon toga sam 400 µL supernatanta prepipetirao u nove sterilne mikroeprevete od 1,5 mL, dodao im jednaku količinu 70%-tnog etanola, te dobivenu smjesu promiješao na vrtložnoj miješalici.

U idućem koraku sam prebacio 800 µL uzorka na kromatografsku kolonu (priloženu u kompletu), koja se nalazi na mikroepreveti za sakupljanje eluata. Kolone sam centrifugirao jednu minutu pri 10000g, eluat odlio i kolonu vratio na mikroeprevetu za sakupljanje eluata.

Nakon spomenutog sam ispirao kolonu s 400 µL otopine za ispiranje (Wash Solution A), centrifugirao jednu minutu pri 10000g, eluat odlio i postupak ponovio još dva puta. Nakon posljednjeg centrifugiranja uklonio sam eluat, a kolone vratio na mikroeprevete za sakupljanje eluata, no nisam im dodao pufer za ispiranje. Ponovio sam centrifugiranje dvije minute pri 10000g, nakon čega sam bacio mikroeprevetu za sakupljanje eluata.

Kolone na kojoj je vezana RNA sam stavio u sterilne 1,5 mL epruvete priložene u kompletu, na kolonu dodao 50 µL otopine za eluciju (Elution Solution A) i centrifugirao prvo dvije minute na 200g, a zatim jednu minutu na 14000g, kako bi se vezana RNA eluirala s kolone.

Nakon izolacije RNA je slijedilo mjerenje apsorbancije pri 260 i 280 nm pomoću spektrofotometra za mjerenje mikrolitarskih volumena (NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific™). Nakon mjerenja sam uzorke RNA pohranio u zamrzivaču na -80°C.

3.7. Reverzna transkripcija (RT)

Reverznu transkripciju sam napravio pomoću komercijalnog kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), pomoću nasumičnih početnica, u PCR uređaju SimpliAmp™ Thermal Cycler, prema protokolu proizvođača.

U 10 µL 2X koncentrirane reakcijske smjese sam dodao po 10 µL svakog uzorka izolirane RNA. Uzorke koji su imali koncentraciju RNA veću od 200 ng/µL sam prije toga razrijedio.

Osim uzoraka izolirane RNA sam također koristio tri kontrole: pozitivnu – RNA izoliranu iz gljive *C. parasitica* u kojoj je prethodno dokazana prisutnost virusa CHV1, negativnu – RNA izoliranu iz gljive *C. parasitica* za koju je utvrđeno da nije zaražena s virusom CHV1, te ultračistu vodu.

Komponente potrebne za reverznu transkripciju navedene su u **Tablici 1**.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju (RT) virusne RNA, iz kompleta Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Komponenta	Volumen za jednu PCR reakcijsku smjesu	Konačna koncentracija u 20 µL
10X RT pufer	2 µL	1x
Smjesa dNTP-ova, 100 mM	0,8 µL	4 mM
10X RT nasumične početnice	2 µL	1x
Reverzna transkriptaza, 50 U/µL	1 µL	50 U
Inhibitor RNaze, 100 U/µL	1 µL	100 U
Ultračista voda	3,2 µL	
RNA kalup	10 µL	

Reverznu transkripciju sam proveo u tri koraka: 10 minuta na 25°C vezanja početnica s RNA kalupom, 120 minuta na 37°C sinteze cDNA i konačno pet minuta na 85°C završne denaturacije, nakon čega sam uzorke pohranio na -20°C.

3.8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Nakon izolacije DNA iz micelija gljive *C. parasitica*, molekularnom tipizacijom odredio sam alele pojedinih *vic* lokusa, koristeći šest kombinacija početnica.

Lančanu reakciju polimerazom (PCR) sam proveo za uzorke sakupljene s tri lokacije kontinentalne Hrvatske: 18 iz Hrvatske Kostajnice, 26 iz Požege i 10 iz Slunja, u PCR uređaju SimpliAmp™ Thermal Cycler i 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems®, pomoću komercijalnog paketa GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega). Uvjeti u kojima sam provodio PCR reakcije slijede protokol opisan u Kupper i Cornejo (2022) i Mlinarec i sur. (2018).

Komponente potrebne za PCR navedene su u **Tablici 2**.

Tablica 2. Koncentracije komponentni lančane reakcije polimerazom za umnožavanje *vic* lokusa gljive *C. parasitica*.

Komponenta	Volumen za jednu PCR reakcijsku smjesu	Konačna koncentracija u 20 μ L
5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	4 μ L	1x
MgCl ₂ , 25 mM	1,2 μ L	1,5 mM
dNTP smjesa, 10 mM svaki	0,4 μ L	0,2 mM
Početnica 1, 10 μ M	0,8 μ L	0,4 μ M
Početnica 2, 10 μ M	0,8 μ L	0,4 μ M
Početnica 3, 10 μ M	0,8 μ L	0,4 μ M

Tablica 2. – nastavak

Početnica 4, 10 μM *	0/0,8 μL	0,4 μM
Taq polimeraza, 5 U/ μL	0,2 μL	1 U
Ultračista voda*	11,3/10,8 μL	
DNA kalup	0,5 μL	

*Za umnožavanje lokusa *vic1*, *vic2* i *vic4* sam koristio tri početnice – zato jer im je nizvodna zajednička. Za umnožavanje lokusa *vic3*, *vic6* i *vic7* sam koristio četiri početnice, te sam stoga prilagodio volumen ultračiste vode u ukupnoj reakciji (volumen vode je umanjen za 0,8 μL u reakcijama s četiri početnice).

U **Tablici 3** navedeni su nazivi, sekvence i temperature vezanja početnica specifičnih za umnožavanje *vic* lokusa gljive *C. parasitica*, prema: Kupper i Cornejo (2022), Mlinarec i sur. (2018), te Short i sur. (2015).

Tablica 3. Nazivi lokusa, početnica, sekvence i temperature vezivanja početnica korištenih u lančanoj reakciji polimerazom, za određivanje *vic* genotipa gljive *C. parasitica*.

Lokus	Početnica	Sekvenca početnice u smjeru 5'→3'	Temperatura vezivanja početnice
<i>vic1</i>	vic1a-F vic1a-1R vic1a-2R	GCTATCCACCCTCACAGAGAA CGTCCTGCCTCAAGGAGATT CATTTTCGTCATCAGCACAAC	65°C
<i>vic2</i>	vic2-F vic2-1R vic2-2R	TTGATGGTGGAGTGTGACAGA TCTCCCAATGACCTGAAATG GATGTTTGGCATAACATCGGC	65°C → 60°C; -0,5°C/cik. (10X) 60°C (25X)

Tablica 3. – nastavak

<i>vic3</i>	vic3a-1F vic3a-1R vic3a-2F vic3a-2R	CAGGTTTAGCAGGTTCTTCC GCACGACAAATGGCACTG TCCATTGTCTCTATCCCATCC GCATCAGGACTTGCCAGATA	65°C
<i>vic4</i>	vic4-F vic4-1R vic4-2R	GCATGGGCAATGGTCTACTT TCCATCGCATAGGTACGCTC GCAATCAACGATCATCTGTC	65°C
<i>vic6</i>	vic6-1F vic6-1R vic6-2F vic6-2R	CGCATACTGTGTTTCCCAACT AAGATCCTTGCGTACCTCCA ACAGGATAGCAATCACTGCC ACAGGGA ACTCTGGTCGTTG	64°C
<i>vic7</i>	Cp-vic7-1F Cp-vic7-1R Cp-vic7-2F Cp-vic7-2R	TTGTCGAAAGGAACGCGGCT TTCTTCCTCTACCATCATCTGTG ACTTCAAACACGAATTCTGGC ACCATCTCCGTCTCGCATTCT	60°C

Reakcije PCR za kombinacije početnica *vic1a*, *vic3a* i *vic4* odvijale su se u sljedećim uvjetima: početna denaturacija DNA pri 95°C kroz 2 minute, nakon kojeg slijedi 35 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije DNA pri 95°C kroz 30 sekundi, sparivanja početnica s kalupom pri odgovarajućoj temperaturi prema **Tablici 3** kroz 30 sekundi, te produljivanja lanaca DNA pri 72°C kroz 1 minutu i 45 sekundi. Završni ciklus se sastoji od produljivanja lanaca DNA pri 72°C kroz 10 minuta.

Za umnažanje alela lokusa *vic2* reakcija je provedena postupnim smanjivanjem temperature sparivanja početnica (tzv. *touchdown* PCR), te se sastoji od početne denaturacije DNA pri 95°C kroz 2 minute, te deset ciklusa koji se sastoje od: denaturacije pri 95°C kroz 30 sekundi, sparivanja početnica s kalupom pri 65°C kroz 30 sekundi, pri čemu je tijekom svakog sljedećeg ciklusa temperatura sparivanja bila niža za 0,5°C do 60°C i konačno produljivanje lanaca DNA pri 72°C kroz 1 minutu i 45 sekundi. Potom su uslijedila 25 ciklusa u kojima se denaturacija odvijala pri 95°C kroz 30 sekundi, sparivanje početnica s kalupom pri 60°C kroz 30 sekundi i produljivanje lanca DNA pri 72°C kroz 1 minutu i 45 sekundi. Završno produljivanje lanaca DNA odvijalo se pri 72°C kroz 10 minuta.

3.9. Umnažanje dijela ORFA genomske regije virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom

Prisutnost virusa CHV1 sam dokazivao umnažanjem dijela ORFA regije njegovog genoma PCR-om, prema Allemann i sur. (1999), pomoću komercijalnog paketa GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega), prema uputama proizvođača. Pri tome sam koristio par početnica EP713-5 i R2280 (**Tablica 4**), preuzeto iz Allemann i sur. (1999).

Tablica 4. Početnice za ORFA regiju genoma virusa CHV1 lančanom reakcijom polimerazom.

DNA regija	Početnica	Sekvenca početnice u smjeru 5'→3'	Temperatura vezivanja početnice
ORFA	EP713-5	TTGGATTCCCGATTTCCTTCA	54°C
	R2280	CTTACCATCTCGCTTGACAAA	52,7°C

Nakon provedene reverzne transkripcije, pripremio sam sve komponente reakcije prema **Tablici 5**. U 49 µL reakcijske smjese dodao sam 1 µL cDNA dobivene reverznom transkripcijom, prema poglavlju 3.7., koja je služila kao kalup. Reakciju sam proveo u PCR uređaju Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler.

Koristio sam tri kontrole: pozitivnu – uzorak kod kojeg je prethodno dokazano da sadrži virus CHV1, negativnu – uzorak u kojemu je prethodno dokazano da ne sadrži virus i ultračistu vodu.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za umnažanje prvog otvorenog okvira čitanja (ORFA) genoma virusa CHV1.

Komponenta	Volumen za jednu PCR reakcijsku smjesu	Konačna koncentracija u 50 μL
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega)	10 μL	1x
MgCl ₂ , 25 mM	3 μL	1,5 mM
dNTP smjesa, 10 mM svaki	1 μL	0,2 mM
Početnica 1, 10 pmol/ μL	1 μL	0,2 μM
Početnica 2, 10 pmol/ μL	1 μL	0,2 μM
Taq polimeraza, 5 U/ μL	0,5 μL	2,5 U
Sterilna voda	32,5 μL	
cDNA kalup	1 μL	

PCR sam provodio u sljedećim uvjetima: jedan ciklus početne denaturacije DNA pri 94°C kroz 2 minute, nakon kojeg slijedi 35 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije DNA pri 94°C kroz 1 minutu, sparivanja početnica s kalupom pri 55°C kroz 1 minutu i 30 sekundi, te produljivanja lanaca DNA pri 72°C, kroz 1 minutu i 45 sekundi. Završni ciklus se sastoji od produljivanja lanaca DNA pri 72°C kroz 10 minuta.

3.10. Agarozna elektroforeza umnoženih fragmenata DNA

Nakon PCR-a, umnožene amplikone *vic* lokusa, kao i amplikone ORFA regije razdvojio sam agaroznom elektroforezom. Za elektroforezu amplikona *vic* lokusa pripremio sam 1,5%-tni agarozni gel, koristeći 1X SB pufer (10mM natrijev-borat, pH 8.5), slijedeći protokol opisan u Brody i Kern (2004), dok je gel za elektroforezu amplikona ORFA regije bio 0,8%-tni (koristio sam identičan pufer). U otopljeni agarozni gel sam dodao 1 μL po 50ml gela boje GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza), kako bih mogao vizualizirati DNA amplikone pod UV-svjetlom.

Elektroforezu sam provodio u 1X SB puferu, a u jažice sam izravno nanosio do pet μL PCR produkata (amplikoni *vic* lokusa), koji su nakon PCR već bili obojeni zeleno (5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)), kao i isti volumen molekularnog standarda za određivanje duljine fragmenata DNA (Quick-Load 1 kb DNA Ladder (NEB)), kako bih mogao procijeniti veličinu DNA fragmenata.

Elektroforezu amplikona ORFA regije sam također provodio u 1X SB puferu. U jažice sam ukupno nanosio 6 μL smjese, koja se sastojala od 5 μL PCR produkta i 1 μL obojanog pufera za nanošenje uzoraka (Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS (NEB)). Kao i kod elektroforeze amplikona *vic* lokusa, kao molekularni standard za određivanje duljine fragmenata DNA koristio sam Quick-Load 1 kb DNA Ladder (NEB).

Elektroforezu sam provodio pri 13 V/cm, dok se boja iz pufera u uzorcima koja najbrže putuje (žuta kod *vic* amplikona, crvena kod ORFA amplikona) nije približila rubu gela, nakon čega sam izvor struje isključio, a gel uklonio iz kadice. Gel sam potom fotografirao pomoću UV transiluminatora (UV Transilluminator 2530L, Syngene™), te sam pomoću standarda za određivanje molekularnih veličina DNA mogao odrediti veličinu DNA amplikona.

3.11. Sekvenciranje ORFA genomske regije virusa CHV1

Sekvenciranje ORFA regije virusa CHV1 obavljeno je pomoću Standard-Seq usluge u Macro genu (Nizozemska), te je napravljeno u oba smjera s istim početnicama koje sam koristio prilikom umnožavanja DNA amplikona (EP713-5 i R2280).

Dobivene neobrađene sekvence analizirane su pomoću programa GeneStudio (<https://genestudio-pro.software.informer.com/download/>), tako da sam elektroferograme virusnih izolata uredio koristeći standardne izolate Euro7 (AF082191) i EP721 (DQ861913) talijanskog podtipa virusa CHV1 kao referentne. Tako uređene sekvence sam dalje koristio prilikom izrade filogenijskog stabla i mreže haplotipova.

3.12. Analiza raznolikosti virusnih izolata CHV1 populacija Hrvatske Kostajnice i Požege

Nakon što sam programom MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) poravnao dobivene sekvence, koristeći opciju Muscle (Edgar 2004), skratio sam ih na jednaku veličinu, duljine 685 nt, te koristeći program DnaSP6 (Rozas i sur. 2017), odredio sam raznolikost populacija virusnih izolata CHV1 iz Hrvatske Kostajnice i Požege, koristeći navedene parametre: broj polimorfizama, broj haplotipova, raznolikost haplotipova i konačno nukleotidnu raznolikost.

Identične sekvence sam također koristio prilikom izrade filogenijskog stabla. Koristio sam model maksimalne vjerojatnosti, uz *bootstrap* vrijednost 500, te izolat EP713 (F1 podtip) kao vanjsku grupu.

Mrežu haplotipova virusnih izolata CHV1 sam napravio koristeći program PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>), koristeći model mreže najmanje udaljenosti (eng. *minimum spanning network*) (Bandelt i sur. 1999) populacija Hrvatske (Hrvatska Kostajnica, Požega, Kašt i Ozalj), Sjeverne Makedonije (Kalište i Smolari), Švicarske (Contone i Orselina) (Ježić i sur. 2018) i konačno Crne Gore (Boka Kotorska-Kostanjica, Boka Kotorska-Stoliv, jezero Skadar-Koštanjica i jezero Skadar-Ostros) (Nuskern i sur. 2022). Ukupno je analizirano 130 sekvenci virusnih izolata CHV1 duljine 562 nt, a analizirane populacije su imale od tri (jezero Skadar, Crna Gora) do 30 (Contone, Švicarska) virusnih izolata.

3.13. Statistička analiza raznolikosti istraživanih izolata gljive *Cryphonectria parasitica*

Raznolikost vc-tipova gljive *C. parasitica* unutar istraživanih populacija sam izrazio Shannonovim indeksom (H) (Shannon 1948), kojeg sam izračunao prema sljedećoj formuli, koristeći program PAST (PAleontological STatistics) (<https://past.en.lo4d.com/windows>):

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

gdje p_i predstavlja frekvenciju pojedinog vc-tipa, te se može izraziti omjerom:

$$p_i = \frac{n}{N}$$

pri čemu brojnik (n) predstavlja broj uzoraka pojedinog vc-tipa, dok nazivnik (N) predstavlja ukupni broj uzoraka.

Osim Shannonovog indeksa, izračunao sam i indeks ujednačenosti (E_H), kako bih mogao procijeniti zastupljenost vc-tipova kroz tri populacije gljive *C. parasitica* koje sam istraživao. On se računa prema formuli:

$$E_H = \frac{H}{\ln N}$$

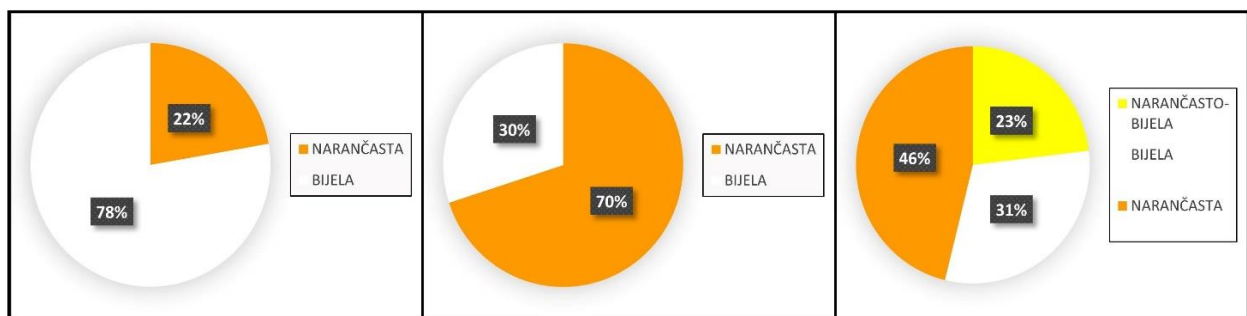
Neparametarskim Wilcoxonovim testom sam provjerio postoje li razlike među populacijama gljive *C. parasitica*. Usporedio sam raznolikost i sastav vc-tipova izolata gljive *C. parasitica* na području Hrvatske Kostajnice među više godina uzorkovanja: 2008., 2014. i 2021. (Ježić i sur. 2018, Krstin i sur. 2008), kao i na području Požege među dvije godine uzorkovanja – 2008. i 2021. (Krstin i sur. 2008). Također sam usporedio navedene dvije populacije uzorkovane u 2008., kao i sve populacije uzorkovane u 2021. godini – Hrvatska Kostajnica, Požega i Slunj. Značajnost dobivenih rezultata sam procijenio prema p-vrijednosti.

4. Rezultati

4.1. Morfologija kolonija gljive *Cryphonectria parasitica* u populacijama Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja

U sve tri spomenute lokacije kontinentalne Hrvatske se mogu naći izolati gljive *C. parasitica*, među kojima sam zabilježio tri karakteristične morfologije kolonija: narančastu do narančasto-smeđu, koja je karakteristična za virulentne izolate, bijelu koja je karakteristična za hipovirulentne izolate, te prijelaznu morfologiju – narančasto-bijelu, koju ponekad imaju hipovirulentni izolati koji sadrže virus CHV1, kao i virulentni izolati slabije pigmentacije.

Analizom morfoloških karakteristika kolonija gljive *C. parasitica* na području Hrvatske Kostajnice, od njih ukupno 18, četiri je bilo narančaste, a 14 izolata bijele morfologije. Prijelazne morfologije nisu zabilježene (**Slika 8A**). Od 26 kolonija gljive *C. parasitica* na području Požege, 12 ih je bilo narančaste, šest prijelazne i konačno osam izolata bijele morfologije (**Slika 8C**). U najmanjoj populaciji gljive *C. parasitica*, onoj na području Slunja, od svega deset kolonija, njih sedam je bilo narančaste, a preostala tri izolata bijele morfologije (**Slika 8B**). Prisutnost virusa CHV1 za spomenuta tri izolata nije potvrđena metodom RT-PCR.



Slika 8. Morfologija i udio izolata gljive *C. parasitica* na području Hrvatske Kostajnice (A), Požege (C) i Slunja (B).

4.2. Koncentracije izolirane genomske DNA i ukupne RNA populacija gljive *Cryphonectria parasitica*

Koncentracije izolirane genomske DNA kretale su se od 7,3 ng μ L⁻¹ do 887,9 ng μ L⁻¹ u Hrvatskoj Kostajnici, od 6,1 ng μ L⁻¹ do 6209,9 ng μ L⁻¹ u Požegi i konačno od 16,7 ng μ L⁻¹ do 155,8 ng μ L⁻¹ u Slunju. Navedene vrijednosti prikazane su u **Tablicama 6, 7 i 8.**

Tablica 6. Koncentracije genomske DNA populacije gljive *C. parasitica* sakupljenih u Hrvatskoj Kostajnici.

Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280	Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280
HK1	206,7	1,99	HK17	286,7	2,03
HK2	252,9	1,88	HK19	7,3	1,83
HK4	179,8	1,78	HK21	21,3	1,89
HK5	122,1	2,15	HK29	68,6	2,01
HK7	386,3	2,03	HK32	128,1	1,90
HK13	237,6	2,14	HK33	102,1	1,73
HK14A	348,3	2,03	HK36	546,0	2,02
HK14B	198,4	2,04	HK43	887,9	2,01
HK14C	52,7	1,97	HK49	560,8	2,04

Tablica 7. Koncentracije genomske DNA populacije gljive *C. parasitica* sakupljenih u Požegi.

Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280	Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280
PŽ1	15,2	1,91	PŽ17B	80,3	1,92
PŽ3	10,4	1,78	PŽ18	6,6	1,91
PŽ 8	71,6	1,90	PŽ30	17,9	1,99
PŽ10	6,1	2,00	PŽ30A	155,0	1,97
PŽ11	33,1	2,00	PŽ30B	9,7	1,99
PŽ11A	11,3	1,90	PŽ30C	16,9	2,09
PŽ11B	44,6	1,85	PŽ31	10,2	1,99
PŽ11C	169,8	2,00	PŽ40	62,1	1,95
PŽ13	58,6	2,06	PŽ42	852,3	1,95
PŽ13A	153,9	2,05	PŽ43	46,5	2,08
PŽ13B	64,4	1,89	PŽ45A	6209,9	1,91
PŽ17	80,0	1,97	PŽ46	343,4	2,05

Tablica 8. Koncentracije genomske DNA populacije gljive *C. parasitica* sakupljenih u Slunju.

Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280	Uzorak	$\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280
SL-1-A2	19,6	2,31	SL-8-B	68,3	1,95
SL-2-B1	17,4	2,12	SL-10-B	155,8	2,03
SL-2-B2	27,9	1,84	SL-11-A	31,8	1,88
SL-4-A	49,2	1,92	SL-11-B	18,9	1,95
SL-4-B	127,9	1,93	SL-11-C1	16,7	2,33

Koncentracije izolirane ukupne RNA kretale su se od 68,6 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ do 496,1 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ u Hrvatskoj Kostajnici, te od 96,9 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ do 576,4 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ u Požegi. Izmjerene vrijednosti prikazane su u **Tablicama 9 i 10.**

Tablica 9. Koncentracije izolirane ukupne RNA populacije gljive *C. parasitica* zaražene s virusom CHV1, sakupljenih u Hrvatskoj Kostajnici.

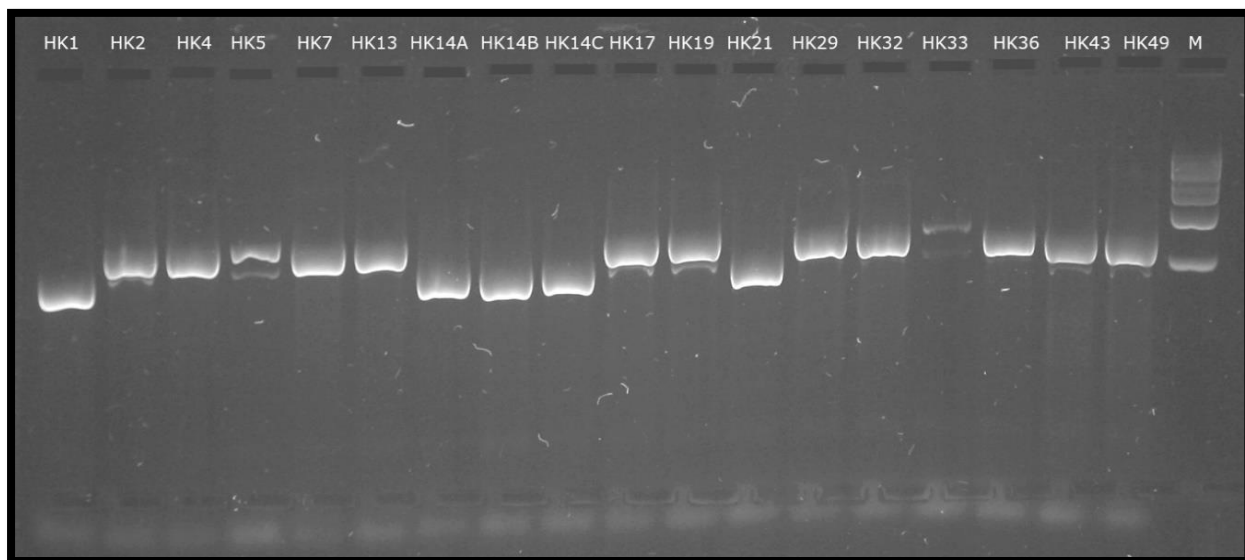
Uzorak	$\gamma(\text{RNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280	Uzorak	$\gamma(\text{RNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280
HK1	292,3	2,14	HK17	496,1	2,14
HK4	146,3	2,15	HK19	123,9	2,01
HK5	120,3	2,15	HK21	324,9	2,15
HK7	340,1	2,13	HK29	68,6	2,01
HK13	237,6	2,14	HK43	313,2	2,16
HK14B	347,9	2,15			

Tablica 10. Koncentracije izolirane ukupne RNA populacije gljive *C. parasitica* zaražene s virusom CHV1, sakupljenih u Požezi.

Uzorak	$\gamma(\text{RNA})/\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$	260/280
PŽ13A	229,1	2,13
PŽ31	238,2	2,13
PŽ42	96,9	2,13
PŽ43	248,9	2,14
PŽ45A	576,4	2,10
PŽ51	336,5	2,13

4.3. Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* u populacijama Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja

Za 18 uzoraka gljive *C. parasitica* s područja Hrvatske Kostajnice, odredio sam vc-tip PCR-om, tj. za svaki uzorak sam odredio alel prisutan na jednom od šest *vic* lokusa (primjer određivanja alela lokusa *vic4* prikazan je na **Slici 9**). Uspješno sam odredio vc-tip svih uzoraka sa sve tri lokacije uzorkovanja (**Tablice 11, 12 i 13**).



Slika 9. Elektroforeza PCR produkata dobivenih umnažanjem izolirane genomske DNA populacije gljive *C. parasitica* iz Hrvatske Kostajnice. M označava molekularni standard za određivanje veličine DNA, Quick-Load 1 kb DNA Ladder (NEB), kojim sam se služio prilikom procjene veličine DNA amplikona. Na slici je vidljivo 18 uzoraka koji predstavljaju alele na lokusu *vic4*. Gornja vrpca predstavlja alel 2 (veličine 741 nt), a donja vrpca alel 1 (veličine 529 nt) (Mlinarec i sur. 2018). Pošto su u uzorku HK5 vidljiva dva amplikona, te zbog slabije vidljive vrpce u uzorku HK33, za takve slučajeve je ponovljena PCR i elektroforeza.

Cortesi i Milgroom (1998) definirali su genotipove za 64 europska vc-tipa, na temelju čega sam odredio pripadnost mojih uzoraka određenom EU-tipu. Ukupno 54 izolata gljive *C. parasitica* s područja Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja su svrstani u 12 različitih vc-tipova. U populaciji

Hrvatske Kostajnice pronađeno je osam, u populaciji Požege pet i konačno u Slunju sedam različitih vc-tipova.

Tablica 11. Sastav alela na *vic* lokusima, te određeni vc-tip za populaciju gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Hrvatske Kostajnice.

Uzorak	<i>vic1</i>	<i>vic2</i>	<i>vic3</i>	<i>vic4</i>	<i>vic6</i>	<i>vic7</i>	EU-tip
HK1	2	2	1	1	2	2	EU-5
HK2	1	1	1	2	2	2	EU-4
HK4	2	1	1	2	2	2	EU-2
HK5	2	2	1	2	2	2	EU-1
HK7	2	1	1	2	2	2	EU-2
HK13	1	1	1	2	2	2	EU-4
HK14A	1	2	1	1	1	2	EU-24
HK14B	2	2	1	1	1	2	EU-21
HK14C	2	2	1	1	1	2	EU-21
HK17	1	2	1	2	2	2	EU-26
HK19	1	1	1	2	1	1	EU-12
HK21	2	2	1	1	2	2	EU-5
HK29	2	1	1	2	2	2	EU-2
HK32	2	2	1	2	2	2	EU-1
HK33	2	2	1	2	2	2	EU-1
HK36	2	2	1	2	2	2	EU-1
HK43	1	2	1	2	2	2	EU-26
HK49	1	2	1	2	2	2	EU-26

Tablica 12. Sastav alela na *vic* lokusima, te određeni vc-tip za populaciju gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Požege.

Uzorak	<i>vic1</i>	<i>vic2</i>	<i>vic3</i>	<i>vic4</i>	<i>vic6</i>	<i>vic7</i>	EU-tip
PŽ1	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ3	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ8	2	2	1	2	2	2	EU-1
PŽ10	1	1	1	2	2	2	EU-4
PŽ11	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ11A	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ11B	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ11C	1	1	1	2	2	2	EU-4
PŽ13	2	2	1	2	2	2	EU-1
PŽ13A	2	2	1	2	2	2	EU-1
PŽ13B	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ17	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ17A	2	1	1	2	1	1	EU-17
PŽ17B	2	1	1	2	1	1	EU-17
PŽ18	2	1	1	1	2	2	EU-6
PŽ30	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ30A	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ30B	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ30C	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ31	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ40	2	1	1	2	2	2	EU-2
PŽ42	2	1	1	1	2	2	EU-2
PŽ43	2	1	1	1	2	2	EU-6
PŽ45A	2	1	1	2	2	2	EU-2

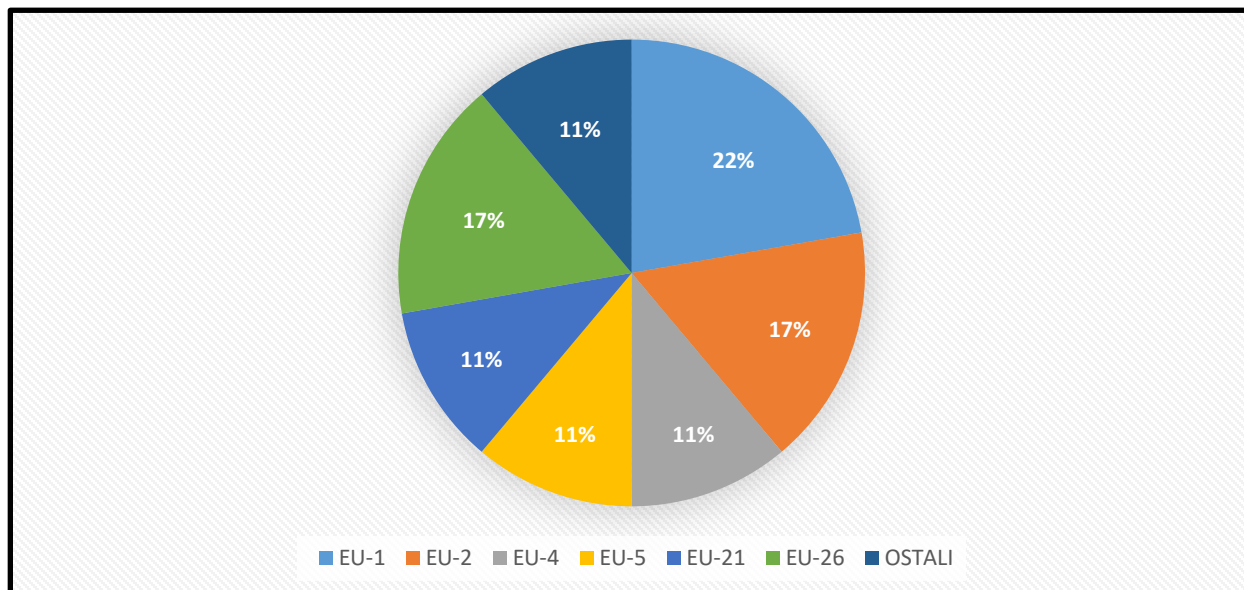
Tablica 12. – nastavak

PŽ46	2	2	1	2	2	2	EU-1
PŽ51	2	2	1	2	2	2	EU-1

Tablica 13. Sastav alela na *vic* lokusima, te određeni vc-tip za populaciju gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Slunja.

Uzorak	<i>vic1</i>	<i>vic2</i>	<i>vic3</i>	<i>vic4</i>	<i>vic6</i>	<i>vic7</i>	EU-tip
SL-1-A2	2	1	1	2	2	2	EU-2
SL-2-B1	2	1	1	1	2	2	EU-6
SL-2-B2	2	2	1	1	2	2	EU-5
SL-4-A	2	2	1	1	1	1	EU-15
SL-4-B	2	1	1	2	1	1	EU-17
SL-8-B	2	1	1	2	2	2	EU-2
SL-10-B	1	1	1	2	2	1	EU-8
SL-11-A	2	1	1	2	2	2	EU-2
SL-11-B	2	1	1	2	2	2	EU-2
SL-11-C1	2	2	1	2	2	2	EU-1

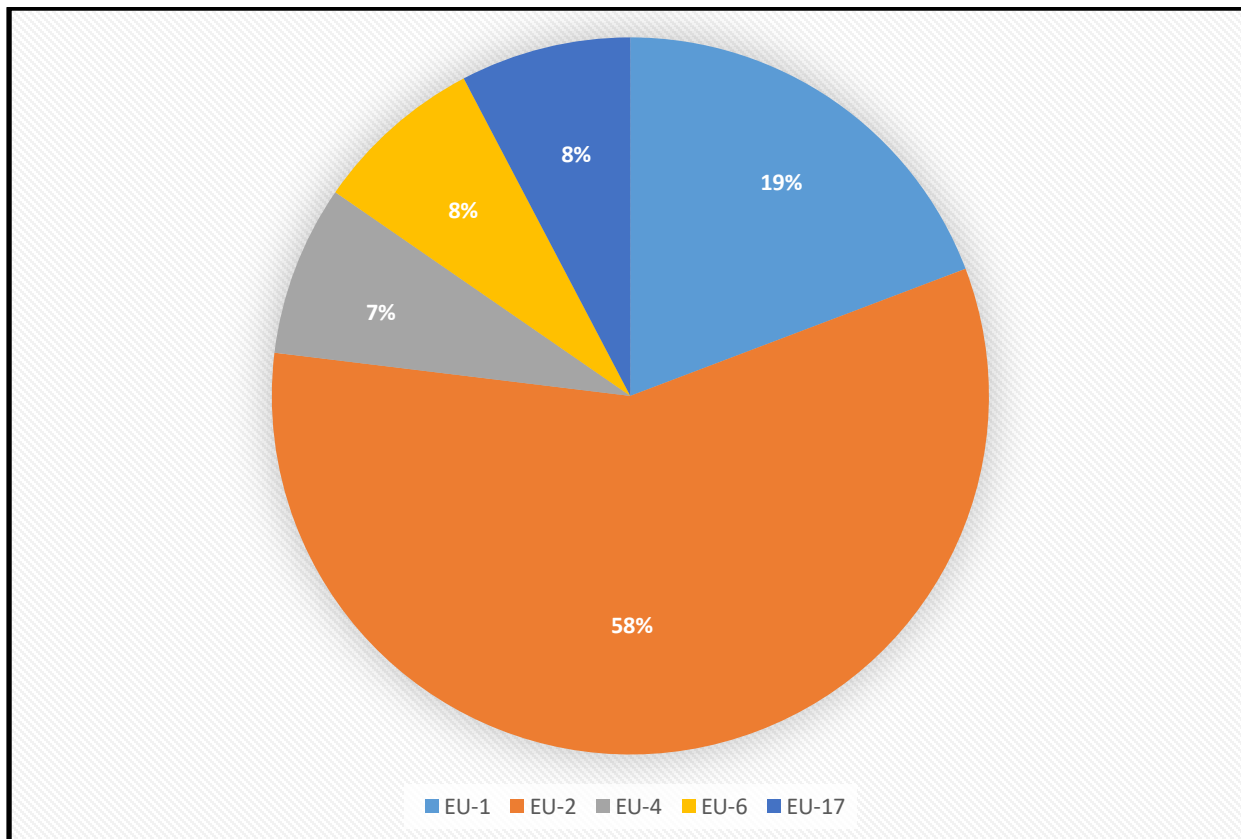
U populaciji Hrvatske Kostajnice najzastupljeniji vc-tip je EU-1, zastupljen s četiri izolata od ukupno 18, a slijede ga EU-2 i EU-26, koji su zastupljeni s po tri izolata. Vc-tipovi EU-4, EU-5 i EU-21 su zastupljeni s po dva, te konačno EU-12 i EU-24 s po jednim izolatom (**Slika 10**).



Slika 10. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) izolata gljive *Cryphonectria parasitica* na području Hrvatske Kostajnice.

Shannonov indeks za Hrvatsku Kostajnicu iznosi 1,985, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 1,565 do 2,014. Indeks ujednačenosti iznosi 0,9099, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 0,7138 do 0,9495.

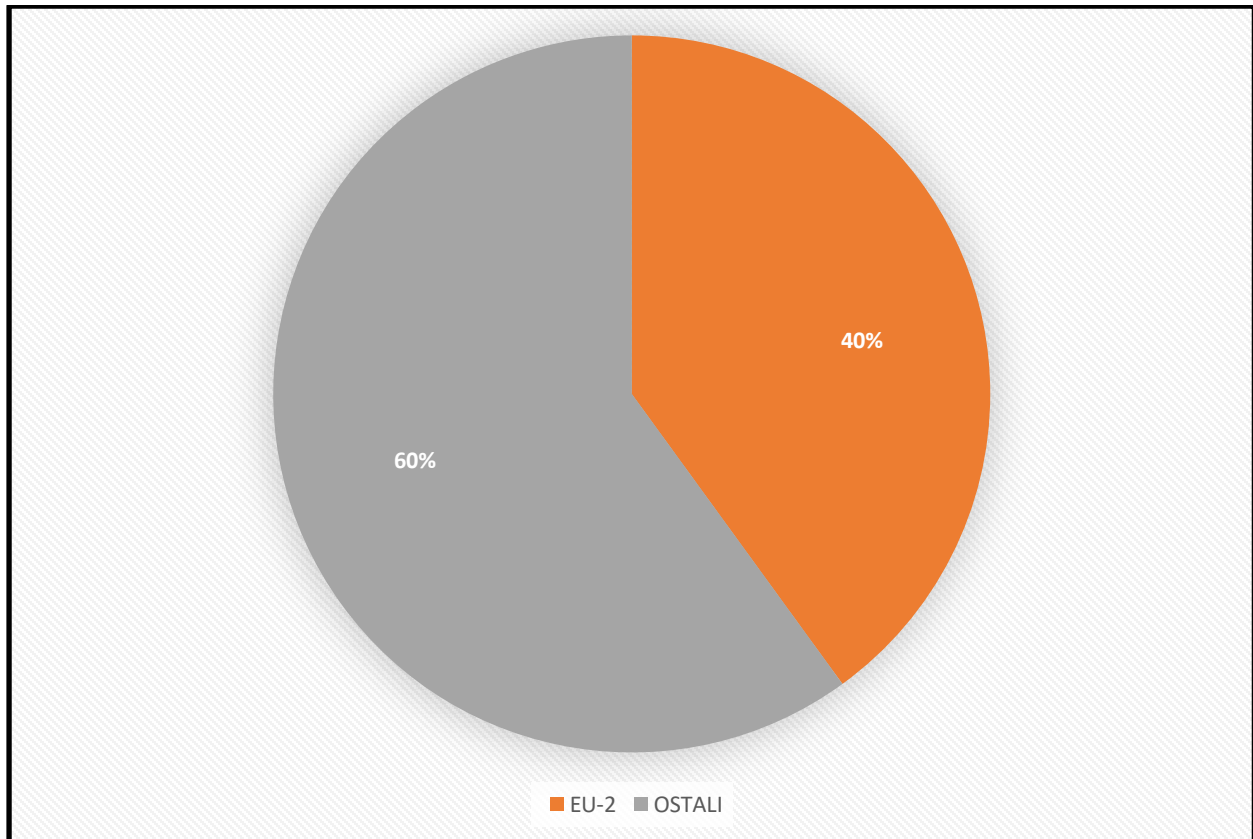
U populaciji Požege najzastupljeniji vc-tip je EU-2, zastupljen s 15 izolata od ukupno 26, a slijedi ga vc-tip EU-1 s pet izolata. Vc-tipovi EU-4, EU-6 i EU-17 su zastupljeni s po dva izolata (**Slika 11**).



Slika 11. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) izolata gljive *Cryphonectria parasitica* na području Požege.

Shannonov indeks za Požegu iznosi 1,226, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 0,7736 do 1,437. Indeks ujednačenosti iznosi 0,6817, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 0,505 do 0,8526.

U populaciji Slunja, najzastupljeniji je vc-tip EU-2, kojeg čine četiri izolata od ukupno deset, dok su ostali vc-tipovi predstavljeni sa samo jednim izolatom (EU-1, EU-5, EU-6, EU-8, EU-15 i EU-17) (**Slika 12**).



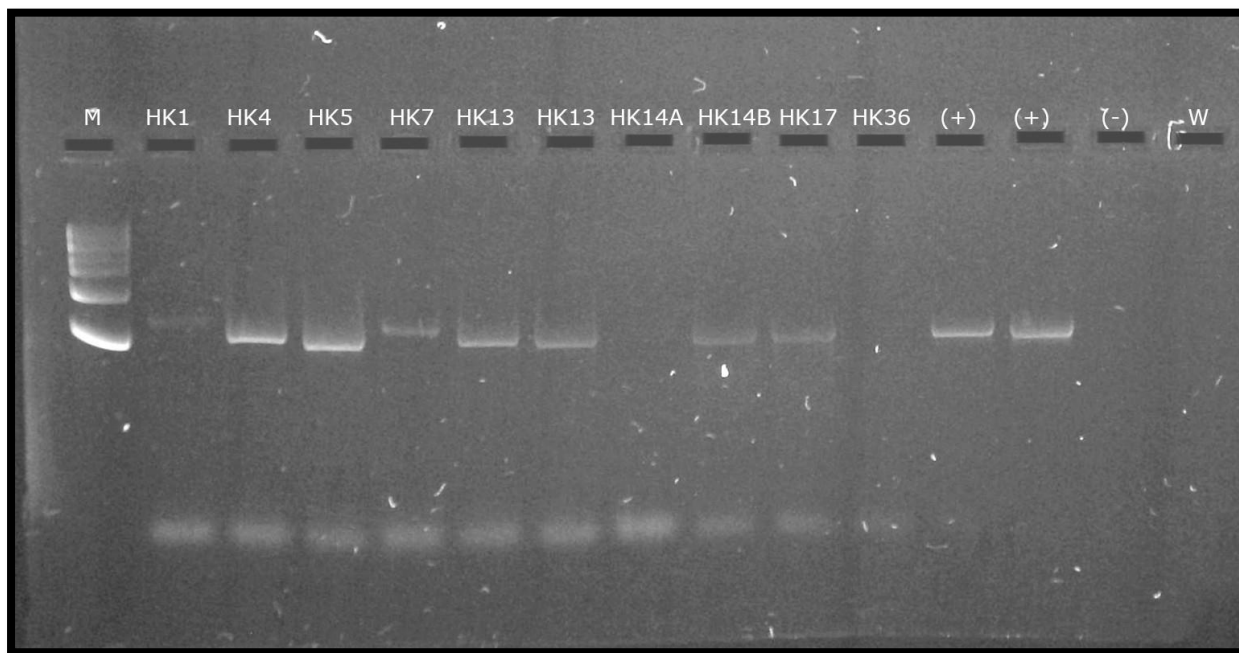
Slika 12. Zastupljenost tipova vegetativne kompatibilnosti (vc) izolata gljive *Cryphonectria parasitica* na području Slunja.

Shannonov indeks za Slunj iznosi 1,748, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 0,9404 do 1,887. Indeks ujednačenosti iznosi 0,8205, dok se 95%-tni interval pouzdanosti kreće od 0,6403 do 0,9572.

4.4. Potvrda prisutnosti virusa CHV1 u populacijama gljive *Cryphonectria parasitica* bijele ili prijelazne morfologije, na području Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja

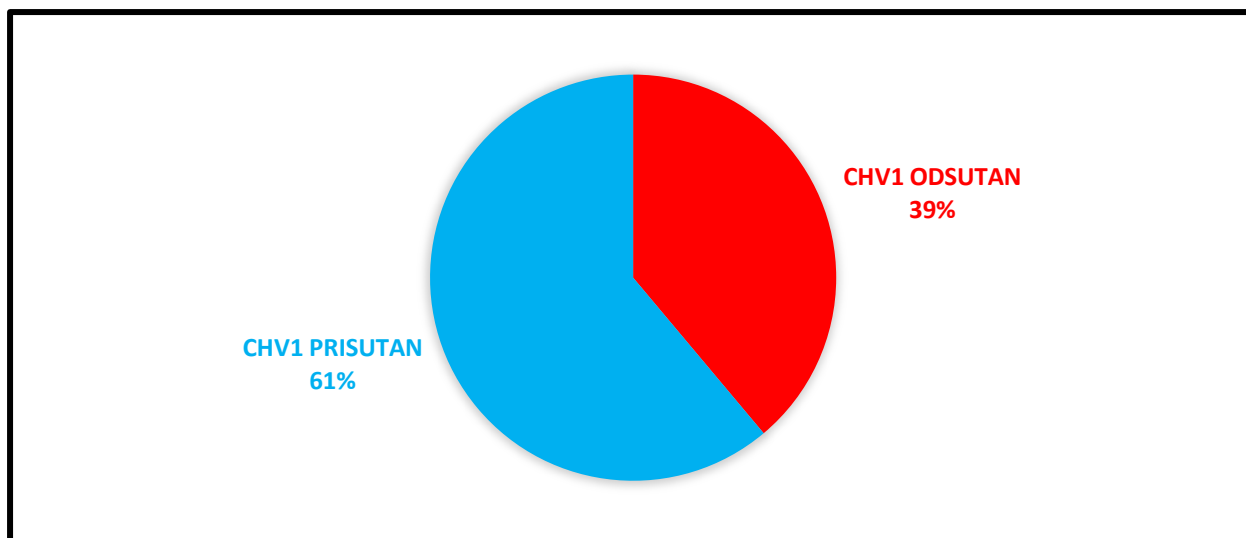
Iz micelija gljive *C. parasitica* uzgojenoj na PDA podlozi izolirana je RNA, kako bi se potvrdila prisutnost virusa CHV1 u izolatima bijele i prijelazne morfologije. Nakon izolacije RNA napravio sam reverznu transkripciju i potom PCR, s ciljem umnažanja ORFA regije genoma virusa CHV1.

Prisutnost amplicona DNA duljine 1439 nukleotida, što odgovara duljini ciljane sekvence ORFA, potvrdila je infekciju virusom CHV1 (**Slika 13**).



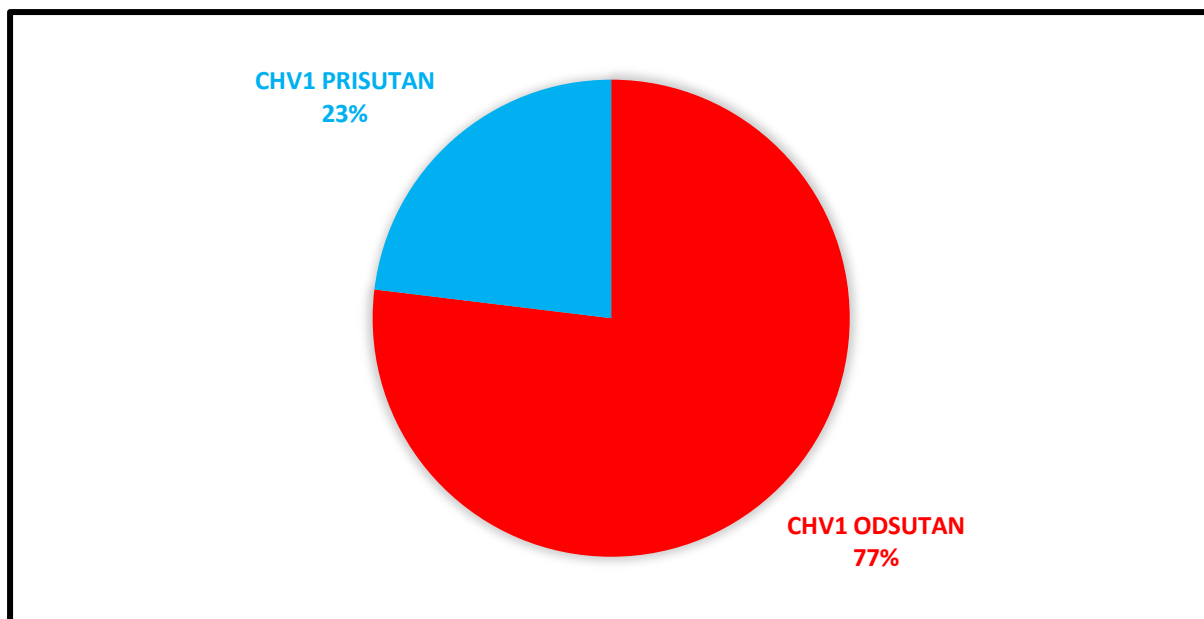
Slika 13. Prikazana je elektroforeza DNA amplicona virusa CHV1 nakon provedenog RT-PCR. M označava molekularni standard za određivanje duljine fragmenata DNA (Quick-Load 1 kb DNA Ladder (NEB)). Oznake od HK1 do HK36 predstavljaju DNA amplikone virusa CHV1, izolirane iz gljive *C. parasitica* s područja Hrvatske Kostajnice. Plus (+) označava pozitivne, a minus (-) negativnu kontrolu. Posljednji stupac (W) predstavlja ultračistu vodu. Jasno vidljiva vrpca u stupcima HK4, HK5 i HK13, te nešto slabije vidljiva u stupcima HK1, HK7, HK14B i HK17 predstavlja uspješno umnožene DNA amplikone ORFA regije virusa CHV1. Prazni stupci, HK14A i HK36 označavaju uzorke u kojima nije prisutan virus CHV1.

Virus CHV1 je dokazan u 11 od 14 izolata gljive *C. parasitica* bijele morfologije, u populaciji sakupljenoj u Hrvatskoj Kostajnici. U tri slučaja, HK14A, HK36 i HK49, bijela morfologija izolata gljive *C. parasitica* rezultat je slabije pigmentacije, a ne prisutnosti virusa CHV1. Prisutnost virusa CHV1 potvrđena je u 11 od ukupno 18 izolata iz Hrvatske Kostajnice (**Slika 14**).



Slika 14. Prisutnost virusa CHV1 u ukupnoj populaciji izolata gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Hrvatske Kostajnice.

Infekcija virusom CHV1 potvrđena je u šest od 23 izolata gljive *C. parasitica* u populaciji Požege, od kojih je njih osam prethodno okarakterizirano kao izolati bijele morfologije, što znači da je bijela morfologija gljive u dva specifična slučaja – PŽ11A i PŽ46 – rezultat slabije pigmentacije, a ne prisutnosti virusa CHV1. Virus CHV1 nije detektiran niti u jednom izolatu prijelazne morfologije: PŽ8, PŽ10, PŽ11C, PŽ13B, PŽ30B i PŽ30C (**Slika 15**).



Slika 15. Prisutnost virusa CHV1 u ukupnoj populaciji izolata gljive *Cryphonectria parasitica* s područja Požege.

Prema morfologiji kolonija, tri uzorka iz Slunja su bijeli, odnosno vjerojatno zaraženi s virusom CHV1, no njih nisam molekularno provjerio na prisutnost istog.

Uspješno umnožene ORFA genomske regije virusa CHV1 sekvencirane su komercijalnom uslugom u Macrogenu (Nizozemska), radi daljnje analize.

4.5. Usporedba raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti populacija gljive *Cryphonectria parasitica* iz Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja s podacima iz 2008. i 2014. godine

Podatci o raznolikosti vc-tipova populacija gljive *C. parasitica* u populacijama iz Hrvatske Kostajnice i Požege su uspoređivani s podacima iz Ježić i sur. (2018) i Krstin i sur. (2008). Podatci o raznolikosti vc-tipova populacije gljive *C. parasitica* iz Slunja su u ovom radu objavljeni po prvi put.

Tablica 14. Vrijednosti Wilcoxonovog testa (W) i p-vrijednosti (p) među tri populacije gljive *C. parasitica* kontinentalne Hrvatske, uzorkovanih u istoj godini.

Uspoređene populacije	Wilcoxon vrijednost (W)	p-vrijednost (p)
Hrvatska Kostajnica (2021.) i Požega (2021.)	34	0,51
Hrvatska Kostajnica (2021.) i Slunj (2021.)	44	0,69
Požega (2021.) i Slunj (2021.)	21	0,67
Hrvatska Kostajnica (2008.) i Požega (2008.)	18,5	0,94

Među populacijama gljive *C. parasitica* Hrvatske Kostajnice (2021.) i Požege (2021.), Hrvatske Kostajnice (2021.) i Slunja (2021.), Požege (2021.) i Slunja (2021.), kao niti među populacijama Hrvatske Kostajnice i Požege uzorkovanih u 2008. godini nema značajnih razlika u sastavu vrst tipova.

Tablica 15. Vrijednosti Wilcoxonovog testa (W) i p-vrijednosti (p) populacije gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj Kostajnici, u različitim vremenskim intervalima.

Uspoređene populacije	Wilcoxon vrijednost (W)	p-vrijednost (p)
Hrvatska Kostajnica (2008.) i (2014.)	176,5	0,45
Hrvatska Kostajnica (2014.) i (2021.)	168	0,18
Hrvatska Kostajnica (2008.) i (2021.)	40,5	0,91

Populacija gljive *C. parasitica* Hrvatske Kostajnice nije se značajno promijenila tokom vremenskih perioda od šest, osam, odnosno 14 godina.

Tablica 16. Vrijednosti Wilcoxonovog testa (W) i p-vrijednosti (p) populacije gljive *C. parasitica* u Požegi, u intervalu od 14 godina.

Populacije	Wilcoxon vrijednost (W)	p-vrijednost (p)
Požega (2008.) i (2021.)	22	0,57

Prema rezultatima Wilcoxonovog testa, raznolikost i sastav populacije gljive *C. parasitica* u Požegi se također nije značajno promijenila tijekom 14 godina.

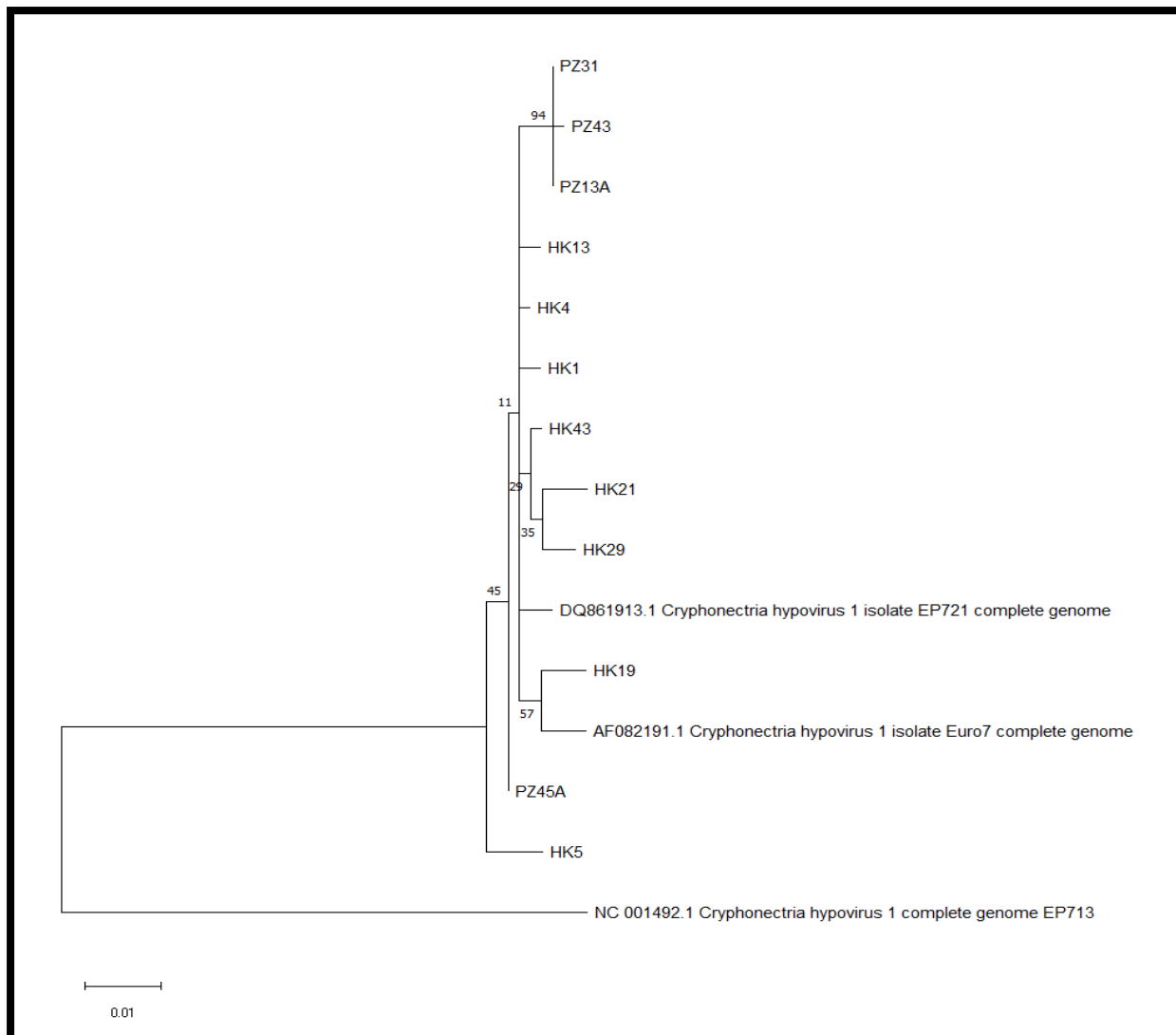
4.6. Karakteristike i raznolikost populacija virusnih izolata CHV1 Hrvatske Kostajnice i Požege

U analiziranim segmentima ORFA regije 12 virusnih izolata CHV1 iz populacija Hrvatske Kostajnice i Požege, utvrđeno je 27 različitih polimorfizama, među ukupno 11 jedinstvenih sekvenci (haplotipova). Nukelotidna raznolikost svih analiziranih izolata (P_i) iznosi 0,00946, dok su podatci za pojedine populacije prikazani u **Tablici 17**.

Tablica 17. Raznolikost izolata virusa CHV1 u dvije populacije gljive *C. parasitica* analizirane u ovom radu.

Populacija Parametri	Hrvatska Kostajnica	Požega	Hrvatska Kostajnica i Požega
BROJ POLIMORFIZAMA (S)	23	5	27
BROJ HAPLOTIPOVA (N)	8	3	11
RAZNOLIKOST HAPLOTIPOVA (H)	1	0,833	0,985
NUKLEOTIDNA RAZNOLIKOST (Pi)	0,01047	0,00367	0,00946
BROJ IZOLATA PO POPULACIJI	8	4	12

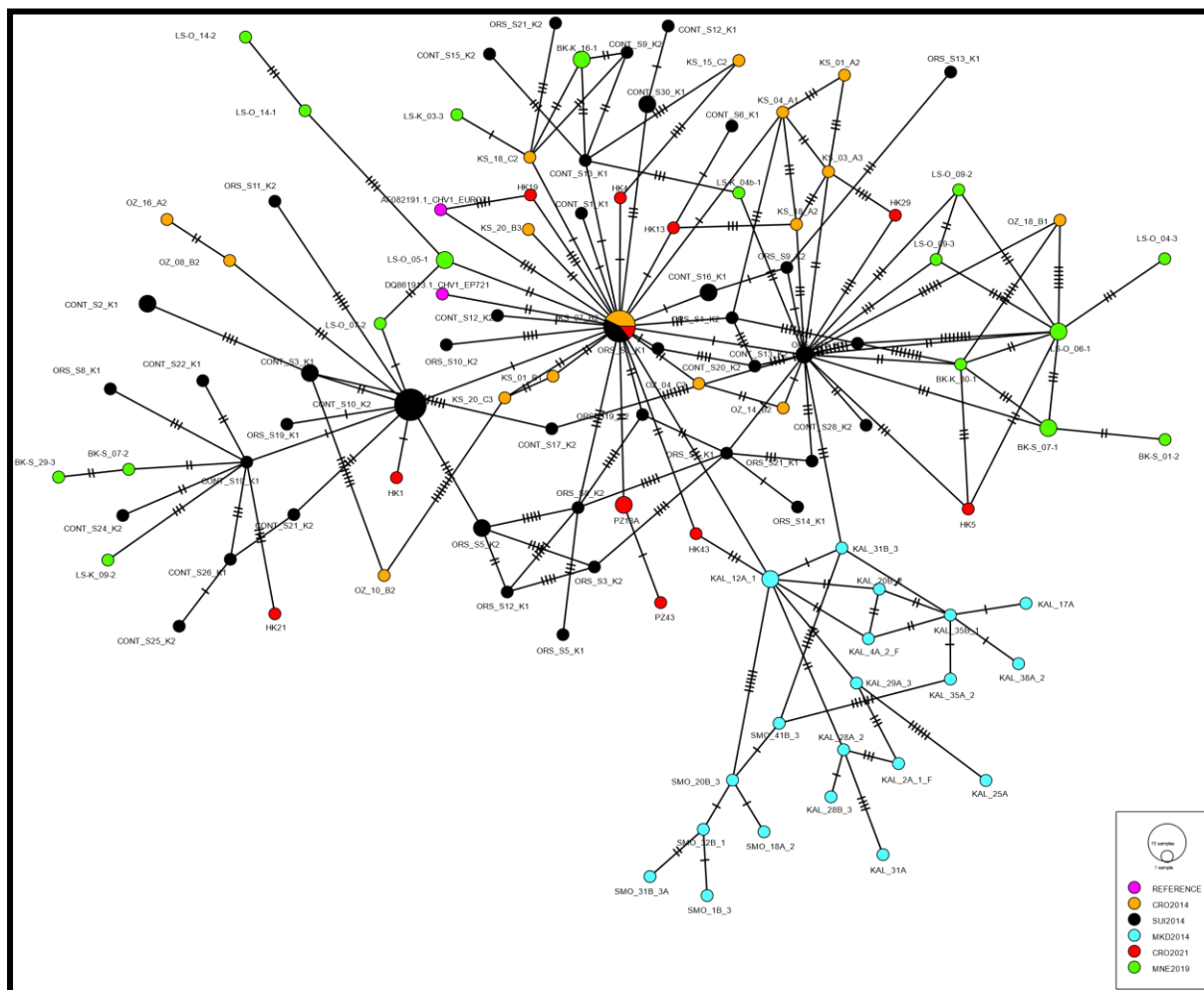
Kako bih utvrdio pripadnost hipovirusnih izolata s područja Hrvatske Kostajnice i Požege podtipu virusa CHV1, napravio sam filogenijsko stablo najveće vjerojatnosti (**Slika 16**), na temelju djelomičnih sekvenci ORFA regije virusa CHV1. Hipovirusni izolati se jasno grupiraju zajedno s prototipskim izolatima EP721 i Euro7 (I podtip) u jednu grupu, odvojenu od izolata EP713 (F1 podtip).



Slika 16. Filogenijsko stablo 12 sekvenci virusnih izolata CHV1, s područja Hrvatske Kostajnice i Požege, na temelju djelomičnih sekvenci ORFA regije duljine 1378 nt, uz izolat EP713 (F1 podtip) kao vanjsku grupu. Analiza je napravljena pomoću metode maksimalne vjerojatnosti, temeljene na Tamura-Nei modelu. Brojevi pored svakog čvora predstavljaju mjeru podržanosti (*bootstrap* vrijednost).

Mreža haplotipova 130 izolata iz Hrvatske, Švicarske i Makedonije (Ježić i sur. 2018), te Crne Gore (Nuskern i sur. 2022), smješta sve izolate u jednu grupu bez značajnije diferencijacije, zajedno s prototipskim izolatom Euro7, koji pripada talijanskom podtipu virusa CHV1.

Sekvence virusnih izolata CHV1 iz Sjeverne Makedonije izdvajaju se u manju, zasebnu grupu (Slika 17).



Slika 17. Mreža haplotipova napravljena u programu PopART, koristeći sekvence ORFA regije virusnih izolata CHV1 (duljine 562 nt), izoliranih iz hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica*. Veličina krugova je proporcionalna broju virusnih izolata CHV1 koji posjeduju istu sekvencu. Izolati iz Hrvatske su prikazani crvenom i narančastom, izolati iz Sjeverne Makedonije plavom, izolati iz Švicarske crnom, izolati iz Crne Gore zelenom i konačno referentni izolati ružičastom bojom. Broj manjih okomitih crta na glavne crne linije predstavljaju broj nukleotidnih mutacija (razlika), po kojem se razlikuju dva povezana virusna izolata.

5. Rasprava

Na istraživanim područjima Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja, od ukupno 54 izolata gljive *Cryphonectria parasitica*, zabilježeno je 12 različitih vc-tipova. Svih 12 je već otprije nađeno u Hrvatskoj, odnosno u opisanim populacijama nisu zamijećeni novi vc-tipovi.

Udio najzastupljenijih vc-tipova u Hrvatskoj Kostajnici, EU-1 (22%) i EU-2 (17%), sličan je u usporedbi s podacima od prije sedam godina (Ježić i sur. 2018), gdje su EU-1 (23%) i EU-2 (22%) također bili najzastupljeniji. Međutim, postoje razlike u zastupljenosti ostalih vc-tipova, pošto ih je prethodno nađeno 21, no u ovom radu ih je svega osam. Jedan novi vc-tip, EU-4, nije nađen u istraživanju opisanom u Ježić i sur. (2018), dok tipovi EU-3, EU-7, EU-8, EU-9, EU-13, EU-14, EU-15, EU-17, EU-18, EU-19, EU-22, EU-23, EU-25 i EU-30 nisu nađeni u ovom istraživanju. U odnosu na podatke od prije 15 godina (Krstin i sur. 2008), EU-2 (31%) je bio najzastupljeniji vc-tip, nakon čega je slijedio EU-1 (29%), što čini obrat u odnosu na podatke u ovom radu. Utvrđene su i određene razlike u zastupljenosti ostalih vc-tipova. Iako je u radu Krstin i sur. (2008) također detektirano osam zastupljenih vc-tipova, dogodila se promjena u njihovom sastavu. Naime, vc-tipovi EU-3, EU-11, EU-20 i EU-29 više nisu pronađeni, dok je EU-4 prvi put nađen u ovom istraživanju. Spomenuti vc-tip nije bio prisutan niti 2014. godine, no zastupljen je u Istri (Buje), u 2006. (Krstin i sur. 2008). i 2014. godini (Ježić i sur. 2018). Dva su potencijalna razloga zašto spomenuti vc-tip nije detektiran prije 2021. godine: ili je došao imigracijom jedinki iz susjednih populacija, npr. iz Istre (Ježić i sur. 2018, Krstin i sur. 2008), ili je nastao prilikom spolnog razmnožavanja, zbog nastanka nove kombinacije alela *vic* lokusa. Jedan od razloga za detektirani manji broj vc-tipova 2021. godine bi mogao biti što je uzorkovani broj zaraženih kora stabala i broj dobivenih izolata gljive *C. parasitica* bio manji, te su tako kod uzorkovanja promakli ostali izolati koji su tamo prisutni, pogotovo oni koji su u populaciji prisutni u niskoj frekvenciji.

Unatoč promjenama u sastavu i zastupljenosti vc-tipova u populaciji Hrvatske Kostajnice, vrijednosti Wilcoxonovog testa ukazuju da između 2021. i 2014. godine, između 2014. i 2006. godine, kao i tijekom najduljeg perioda, između 2021. i 2006. godine, one nisu značajne, odnosno sastav populacije se tijekom godina nije značajno promijenio. Jedno od objašnjenja je da je došlo

do ravnoteže u odnosu, kako broja, tako i zastupljenosti određenih izolata gljive *C. parasitica* tijekom navedenih vremenskih perioda.

Udio najzastupljenijih vc-tipova u Požegi, EU-2 s 58% i EU-1 s 19%, sličan je u usporedbi s podacima od prije 15 godina (Krstin i sur. 2008), gdje je EU-2 (41%) bio najzastupljeniji, dok je EU-1 (21%) bio drugi po zastupljenosti. Međutim, postoje razlike u zastupljenosti ostalih vc-tipova. Dok je njihov broj ostao isti (pet), dogodila se promjena u njihovom sastavu. Naime, vc-tipovi EU-9, EU-12 i EU-20 više nisu pronađeni, dok su EU-4, EU-6 i EU-17 zamijećeni kao novi vc-tipovi u toj populaciji. Treba naglasiti da tri novospomenuta vc-tipa predstavljaju posve nove izolate gljive *C. parasitica* u populaciji Požege, makar su vc-tipovi EU-4 i EU-17 već bili detektirani u Istri (Buju) tijekom 2006. (Krstin i sur. 2008) i 2014. godine (Ježić i sur. 2018), dok je EU-17 zamijećen i u Ozlju 2006. godine (Krstin i sur. 2008). Kao objašnjenje se može navesti relativna geografska blizina spomenutih populacija, koja je olakšala migraciju jedinki navedenih vc-tipova, ali i novonastale rekombinacije već prisutnih *vic* alela u Požegi.

Unatoč promjenama u sastavu i zastupljenosti vc-tipova u populaciji Požege, vrijednost Wilcoxonovog testa ukazuje da između 2021. i 2006. godine one nisu značajne, odnosno sastav populacija se tijekom 13 godina nije značajno promijenio. Treba napomenuti da unatoč izmjeni u frekvenciji među najzastupljenijim vc-tipovima (EU-2 i EU-1), to i dalje nije dovoljno velika promjena za koju se može tvrditi da se sastav populacije gljive *C. parasitica* značajnije promijenio.

Populacija Slunja je prvi put obrađena u ovom radu, te je ujedno i najmanja od svih analiziranih, sa svega 10 uzoraka, od kojih je najzastupljeniji vc-tip EU-2 (40%).

Podatci o raznolikosti vc-tipova populacija gljive *C. parasitica*, između Hrvatske Kostajnice, Požege i Slunja ukazuju da sastav tih populacija u 2021. godini nije značajno različit. Relativno mala geografska udaljenost između spomenutih populacija može biti razlog sličnosti u sastavu među vc-tipovima spomenutih populacija.

U prethodnim istraživanjima u Hrvatskoj, među 338 izolata gljive *C. parasitica* prisutno je 18 vc-tipova (Krstin i sur. 2008). U Bosni i Hercegovini prisutno je 29 vc-tipova među 920 izolata gljive

(Trestić i sur. 2001), u Bugarskoj i Rumunjskoj po dva vc-tipa među 210, odnosno 27 izolata, a u Grčkoj svega jedan vc-tip među 379 (Milgroom i sur. 2008). U Sloveniji je nađeno 15 vc-tipova među 254 izolata gljive (Krstin i sur. 2011), u Italiji 20 vc-tipova među 716, u Švicarskoj 26 vc-tipova među 367 (Cortesi i Milgroom 1998), u Njemačkoj 15 vc-tipova među 248 (Peters i sur. 2014) i konačno u Portugalu devet vc-tipova među 617 analiziranih izolata (Bragança i sur. 2007). Vrijednosti dosta variraju od zemlje do zemlje no, generalno govoreći, manja zastupljenost određenih vc-tipova je vjerojatno posljedica samog širenja gljive *C. parasitica* kroz Europu. Gljiva *C. parasitica* je invazivna vrsta, čija je raznolikost manja na rubu njenog areala (fronti njenog širenja), dok je u centru (mjestu unosa) značajno veća. To se može pratiti kroz njenu epidemiologiju. Naime, prvo se proširila kroz Apeninski poluotok (Italiju), da bi se potom širila kroz susjedne države. Jasno se može uočiti kako, gledajući od južne Švicarske i Italije (Cortesi i Milgroom 1998), prema susjednim zemljama, broj vc-tipova opada u smjeru sjevera, zapada (Peters i sur. 2014) i jugoistoka (Karadžić i sur. 2019, Myteberi i sur. 2013, Sotirovski i sur. 2004).

Koristeći gornje podatke možemo shvatiti zašto postoje značajne razlike u zastupljenosti vc-tipova u različitim dijelovima Europe. Tip vegetativne kompatibilnosti EU-12 je najzastupljeniji u jugoistočnoj Europi (Bosna i Hercegovina, Srbija, Crna Gora, Sjeverna Makedonija, Albanija, Bugarska, Rumunjska i Grčka), dok su vc-tipovi EU-1 i EU-2 najzastupljeniji u srednjoj (Njemačka, Švicarska i Hrvatska) i dijelu južne Europe (Italija) (Karadžić i sur. 2019, Robin i Heiniger 2001). Naime, prema prethodnim istraživanjima, u Hrvatskoj je EU-1 jedini vc-tip na području Markuševca (100%) (Krstin i sur. 2008), dok je EU-2 najzastupljeniji na području Šamarice (50%) (Krstin i sur. 2008), kao i u Italiji (Cortesi i Milgroom 1998), Švicarskoj (Cortesi i Milgroom 1998) i Njemačkoj (Peters i sur. 2014). U Sjevernoj Makedoniji (Sotirovski i sur. 2004), Bugarskoj (Milgroom i sur. 2008), Rumunjskoj (Milgroom i sur. 2008) i Grčkoj (Sotirovski i sur. 2004) dominira vc-tip EU-12 (zastupljen je preko 90%), dok u Crnoj Gori (Nuskern i sur. 2022), Bosni i Hercegovini (Trestić i sur. 2001), Srbiji (Karadžić i sur. 2019) i Albaniji (Myteberi i sur. 2013) on predstavlja najzastupljeniji vc-tip, redom s 58,2%, 30,43%, 72,9% i 39%. U Sloveniji je to vc-tip EU-13 (40%) (Krstin i sur. 2011), te konačno u Portugalu vc-tip EU-11 (80,2%) (Bragança i sur. 2007).

Podatci u ovom radu ukazuju da su u Hrvatskoj, u tri analizirane populacije, najzastupljeniji vc-tipovi EU-1 (Hrvatska Kostajnica) i EU-2 (Požega i Slunj). Ti podatci se djelomično poklapaju s podacima o zastupljenosti vc-tipova tijekom prijašnjih godina – 2014. (Ježić i sur. 2018) i 2006. (Krstin i sur. 2008). Na Balkanskom poluotoku dominira vc-tip EU-12, vjerojatno iz razloga što je spomenuti vc-tip unesen u te zemlje, gdje se potom naknadno širio nespolnim razmnožavanjem (klonalno), dok su u zemljama centralne Europe najčešći vc-tipovi EU-1 i EU-2 (Robin i Heiniger 2001).

Jedan od pokazatelja raznolikosti populacije je Shannonov indeks (H). Za populaciju gljive *C. parasitica* na području Hrvatske Kostajnice on iznosi 1,985, za populaciju Požege 1,226 i konačno za populaciju Slunja 1,748. Vrijednosti Shannonovog indeksa su manje u odnosu na vrijednosti istog u Bosni i Hercegovini (Trestić i sur. 2001) i Švicarskoj (Cortesi i Milgroom 1998), dok su u odnosu na Portugal (Bragança i sur. 2007), Njemačku (Peters i sur. 2014), Srbiju (Karadžić i sur. 2019), Sjevernu Makedoniju (Sotirovski i sur. 2004), Albaniju (Myteberi i sur. 2013), Bugarsku i Rumunjsku (Milgroom i sur. 2008) veće. Vrijednosti Shannonovog indeksa su najsličnije onima iz Italije (Cortesi i Milgroom 1998), Slovenije (Krstin i sur. 2011) i Crne Gore (Nuskern i sur. 2022). Najsličniji indeksi su karakteristični za populacije koje su geografski bliže. Pošto se gljiva *C. parasitica* iz Italije prvo počela širiti prema susjednim zemljama, upravo tamo je i primijećena njena najveća raznolikost. Manja vrijednost Shannonovog indeksa u Njemačkoj (Peters i sur. 2014), Portugalu (Bragança i sur. 2007), Srbiji (Karadžić i sur. 2019), Sjevernoj Makedoniji (Sotirovski i sur. 2004), Albaniji (Myteberi i sur. 2013), Bugarskoj i Rumunjskoj (Milgroom i sur. 2008) je posljedica njihove veće geografske udaljenosti od Italije; naime tijekom primarno klonalnog širenja populacija gljive *C. parasitica* u spomenute zemlje, došlo je do smanjenja njihove genske raznolikosti, pada broja vc-tipova, a samim time i smanjenja Shannonovog indeksa (Grünwald i sur. 2003, Milgroom i sur. 2008).

Iako postoji mogućnost da se i na području Hrvatske rekombinacijom tijekom spolnog razmnožavanja gljive *C. parasitica* poveća broj vc-tipova, to do sada još nije zabilježeno. U populacijama Hrvatske Kostajnice i Požege, broj vc-tipova može se povećati na 2^5 , odnosno do 32 različita vc-tipa, jer je u tim populacijama pristuno pet različitih polimorfnih *vic* lokusa, dok se na

području Slunja broj vc-tipova može povećati na 2^4 , odnosno do 16 različitih vc-tipova, jer je u toj populaciji prisutno četiri različitih polimorfnih *vic* lokusa.

U razmaku od nekoliko godina ponovljena su istraživanja u Sjevernoj Makedoniji, Švicarskoj i Hrvatskoj. U Sjevernoj Makedoniji se situacija gotovo i nije promijenila, te je tamo i dalje dominantan tip EU-12 (Ježić i sur. 2021). Trenutna visoka učestalost vc tipova EU-1 i EU-2 u Švicarskoj i Hrvatskoj ukazuje na prilično stabilnu strukturu populacija tijekom vremena (Ježić i sur. 2021). Kao i u prethodnim istraživanjima, provedenim prije 20-ak godina, ovim populacijama dominiraju vc-tipovi EU-1 i EU-2, te njihova dva rekombinanta, EU-5 i EU-6 (Ježić i sur. 2021, Krstin i sur. 2008, Robin i Heiniger 2001, Robin i sur. 2000). Spomenuta stabilnost populacija je zanimljiva, pogotovo jer se tijekom vremena očekuje povećanje raznolikosti u onim populacijama koje imaju više polimorfnih *vic* lokusa, a u kojima je ujedno bila zabilježena i spolna reprodukcija (Ježić i sur. 2018). Primjerice, istraživanja provedena u Njemačkoj su pokazala da se originalni broj vc-tipova u šumskim područjima više nego udvostručio, u razdoblju između 1992. i 2012. godine (Peters i sur. 2012, 2014).

U aktivnim rakovima, kalusima i nekrozama na kori stabala kestena moguće je pronaći i virulentne i hipovirulentne izolate gljive *C. parasitica* (Griffin 2008, Ježić i sur. 2018, 2019). Jedno od objašnjenja je da se virulentni izolati gljive *C. parasitica*, odgovorni za nastanak aktivnog raka, nakon zaraze virusom CHV1 polako transformiraju iz virulentnog u hipovirulentni. Ponekad je micelij gljive *C. parasitica* u aktivnom raku kore kestena samo djelomično zaražen hipovirusom (Griffin 2008, Ježić i sur. 2014). Osim toga, Bryner i sur. (2013) su pokazali da morfologija raka i infekcija hipovirusom nisu uvijek jasno povezane, te da se prisutnost virusa CHV1 može definitivno potvrditi jedino molekularnim metodama.

Od ranije je poznato da uvjeti rasta gljive *C. parasitica*, poput svjetlosti i topline, jako utječu na sporulaciju i pigmentaciju kolonija (Hillman i sur. 1990), odnosno mogu mijenjati njene morfološke karakteristike. Stoga procjena morfologije kolonije nije uvijek pouzdan način utvrđivanja hipovirulentnih izolata. Zbog navedenih razloga je jedan od ciljeva ovog rada bio metodom RT-PCR dokazati prisutnost virusa CHV1 u izolatima gljive *C. parasitica*.

Tipična karakteristika virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* je stvaranje narančastih do narančasto-smeđih kolonija, s intenzivnom sporulacijom na hranidbenoj PDA podlozi (Rigling i Prospero 2018), što sam i potvrdio u ovom radu: virus CHV1 nije detektiran ni u jednom analiziranom soju gljive *C. parasitica*, koji je prema morfološkim karakteristikama micelija procijenjen kao virulentan, tj. soj narančaste ili narančasto-smeđe morfologije. To je u skladu s drugim sličnim istraživanjima, primjerice na području Hrvatske i Slovenije (Krstin i sur. 2008, 2011), kao i u istraživanju provedenom na sjeveru Španjolske (provincija Asturija) (Trapiello i sur. 2017).

U populaciji Hrvatske Kostajnice, od 14 izolata gljive *C. parasitica* bijele morfologije, virus CHV1 nije detektiran u njih tri, dok u populaciji Požege od osam izolata gljive bijele morfologije, virus CHV1 nije nađen u dva, kao niti u šest izolata gljive prijelazne morfologije. Upravo zbog takvih slučajeva se ne može tvrditi da slabija pigmentacija kolonija *C. parasitica* uvijek pouzdano ukazuje na prisutnost virusa CHV1. Slične rezultate su dobili Akıllı i sur. (2013) i Castaño i sur. (2015), koji su također pokazali da pojedini izolati gljive *C. parasitica* mogu imati slabiju pigmentaciju, čak i kad virus CHV1 nije prisutan. Tako su Castaño i sur. (2015) među 179 izolata bijele i prijelazne morfologije samo u njih 35 dokazali virus CHV1 (~20%), a u istraživanju na području Turske u 75,7% izolata bijele morfologije i 55% izolata prijelazne morfologije dokazana je prisutnost virusne RNA, metodom RT-PCR (Akıllı i sur. 2013).

Zastupljenost hipovirulentnih izolata u populaciji gljive *C. parasitica* na području Hrvatske Kostajnice iznosi 61%, a u Požegi 23%, te su usporedivi s rezultatima prijašnjeg istraživanja (Krstin i sur. 2008), gdje je postotak hipovirulentnih izolata u populacijama iznosio od 12,7 do 66,6%. Ježić i sur. (2018) su recentnije zabilježili značajno veći udio hipovirulentnih izolata: od 57,4 do 72,6%, u populacijama Istre i Hrvatske Kostajnice. U Sloveniji su hipovirulentni izolati zastupljeni od 11,1% u populaciji Novo Mesto, do 72,2% u populaciji Kranj (Krstin i sur. 2011). Prema istraživanju opisanom u Sotirovski i sur. (2006), u sedam populacija Sjeverne Makedonije virus CHV1 nađen je u ~20% izolata, uz veliku varijabilnost prevalencije među lokalitetima. Svi istraživani izolati virusa CHV1 iz Sjeverne Makedonije, Hrvatske i Slovenije pripadaju talijanskom podtipu CHV1 – I (Ježić i sur. 2018, Krstin i sur. 2008, 2011, Sotirovski i sur. 2006).

U Portugalu i Španjolskoj je zastupljenost hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* niža. Španjolski izolati su analizirani dva puta, jednom koristeći laboratorijsku kolekciju opisanu u istraživanjima González-Varela i sur. (2011), Trapiello (2010) i Valdezate i sur. (2001), u kojima je od ukupno 813 izolata svega 27 okarakterizirano kao hipovirulentni (3,3%), a pripadaju Njemačkom (CHV1 – D) i Španjolskom podtipu (CHV1 – E). Trapiello i sur. (2017) su opetovanim uzorkovanjem prirodnih populacija pokazali da je zastupljenost hipovirulentnih izolata porasla na 6%. Zamora i sur. (2012) su zabilježili svega ~1% hipovirulentnih izolata iz Španjolske koji pripadaju francuskom podtipu (CHV1 – F1). Sličan slučaj je zabilježen i u Portugalu, u istraživanju opisanom u Bragança i sur. (2007), gdje je svega jedan izolat – od ukupno 617 – bio hipovirulentan. U naknadnom istraživanju opisanom u Castaño i sur. (2015), u šumama Katalonije (sjeveroistočna Španjolska), od 312 izolata njih 179 je bilo bijele i prijelazne morfologije, a kod svega 35 je potvrđena zaraza virusom CHV1 (~11%).

U Hrvatskoj je bolest raka kore kestena prvi put zabilježena 1955. godine (Kišpatić 1956), u blizini Opatije, a do danas su hipovirulentni izolati nađeni u svakoj proučavanoj populaciji (Krstin i sur. 2017). Očekivano, slična opažanja uočena su i u Slovenskim populacijama, gdje je bolest prvi put zabilježena 1950. godine (Jurc 2002), u blizini granice s Italijom. Hipovirulentni izolati gljive *C. parasitica* su i tamo prisutni u svim proučavanim populacijama (Krstin i sur. 2011). Zastupljenost virusa CHV1 u spomenutim populacijama je visoka, za razliku od populacija Španjolske i Portugala. Jedno od objašnjenja su ponudile Robin i Heiniger (2001), ukazavši na postojanje određene korelacije između opažanja bolesti raka kore kestena i prve pojave hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica*, gdje je virus CHV1 obično detektiran prvi put tek 20 do 30 godina nakon pojave raka kore kestena na nekom području. Primjerice, u sjeverozapadnom dijelu Španjolske (pokrajina León) je bolest prvi puta zabilježena 1978. godine, a u sjevernom dijelu (provincija Asturija) 1982. godine (Trapiello i sur. 2017) i konačno u Portugalu tek 1989. godine, u kontinentalnom dijelu zemlje (Robin i Heiniger 2001). Upravo je u tim zemljama zabilježena vrlo niska prevalencija virusa CHV1. Osim samog vremena pojave hipovirulentnih izolata na nekom području, niska razina hipovirulencije često se opaža u onim područjima Europe gdje se gljiva *C. parasitica* pojavila recentno, dok je zastupljenost virusa CHV1 veća u zemljama gdje je bolest raka kore kestena prisutna duže vrijeme, a hipovirulentnost uspostavljena prirodno (Hoegger i sur. 2000). Primjerice, na teritoriju Sjeverne Makedonije najveća je zastupljenost virusa CHV1

zabilježena u populaciji u kojoj je bolest raka kore kestena prvi puta uočena 1974. godine, dok hipovirus nije otkriven u populacijama u kojima se bolest tek relativno nedavno pojavila (Sotirovski i sur. 2006). Na području Crne Gore bolest je uočena oko 1980. godine (Rigling i sur. 2014), te je od tada virus CHV1 zabilježen u svim istraživanim populacijama gljive *C. parasitica*, s ukupnom zastupljenošću od 26,6% (Nuskern i sur. 2022). Pošto je hipovirus u istraživanim populacijama gljive *C. parasitica* u Sjevernoj Makedoniji i Crnoj Gori tek u ranoj fazi širenja, on se može detektirati samo u manjem broju izolata.

Kako bi utvrdili pripadnost virusnih izolata s područja Hrvatske Kostajnice i Požege nekom od europskih podtipova virusa CHV1, napravljena je molekularna filogenijska analiza, metodom maksimalne vjerojatnosti, na temelju djelomičnih sekvenci ORFA regije. U skladu s dosadašnjim istraživanjima (Krstin i sur. 2008, Ježić i sur. 2021) potvrđeno je da svi virusni izolati pripadaju talijanskom podtipu.

Upravo je talijanski podtip najrašireniji u Europi (Gobbin i sur. 2003), što se objašnjava njegovim optimalnim ekološkim fitnessom, pogotovo u odnosu na virusne izolate francuskog F1 podtipa (Chen i Nuss 1999, Robin i sur. 2010). Virusni izolati s područja Hrvatske (Hrvatska Kostajnica, Požega, Kašt i Ozalj) najsrodniji su onima iz Švicarske (Gobbin i sur. 2003, Ježić i sur. 2018).

Mreža haplotipova opisana u ovom radu je jako slična haplotipskim mrežama opisanim u Ježić i sur. (2021) i Nuskern i sur. (2022). Primjerice, sekvence s područja Hrvatske (Hrvatska Kostajnica i Požega) su najbližnje onima iz drugih područja Hrvatske (Kašt i Ozalj). Spomenute sekvence se grupiraju zajedno sa sekvencama s područja Švicarske, pošto sve pripadaju talijanskom podtipu. Populacije virusa CHV1 su vrlo mlade, te među njima još nije došlo do značajnije genske diferencijacije, a efekt populacijskog uskog grla je ostavio slab utisak na virus CHV1, za razliku od populacija gljive *C. parasitica*, gdje je vidljiva jasna razlika u genetičkoj raznolikosti među populacijama raznih regija Europe. Spomenuta haplotipska mreža smješta sve virusne izolate u jednu grupu, bez značajnije populacijske diferencijacije, zajedno s prototipskim izolatom Euro7, koji pripada talijanskom podtipu hipovirusa (Gobbin i sur. 2003). S obzirom da su analizirane sekvence ORFA regije vrlo slične, možemo pretpostaviti da izolati virusa CHV1 imaju vrlo recentnog zajedničkog pretka. Pretpostavlja se da je on unesen u Italiju zajedno s gljivom *C.*

parasitica (Bryner i sur. 2012, Mlinarec i sur. 2018), te da je prvotno inficirao populacije ove gljive u srednjoj Europi, poput: talijanskih, švicarskih, slovenskih i hrvatskih. Nakon toga je virus CHV1 zajedno s populacijama svog domaćina migrirao prema jugoistočnoj Europi (Bryner i sur. 2012). Kao jedan od mogućih načina liječenja bolesti raka kore kestena može se koristiti biološka kontrola pomoću virusa CHV1. U onim populacijama gljive *C. parasitica* kod kojih dominira nesporno razmnožavanje i koje su manje raznolike, prirodno širenje hipovirulencije je lakše, zato što se virus CHV1 uspješno širi anastomozama zaraženih i nezaraženih micelija istih vc-tipova, kao i nespornim sporama (Sotirovski i sur. 2004). S vremenom se, međutim, u populacijama gljive *C. parasitica* unosom/migracijom izolata gljiva iz susjednih populacija mogu pojaviti novi vc-tipovi ili oni pak mogu nastati putem spolnog razmnožavanja, tako da u tim slučajevima liječenje stabala kestena može biti otežano. Sukladno tome se smanjuje i vjerojatnost uspješnog širenja virusa CHV1 u tim populacijama. Na temelju dobivenih podataka za populacije unutar Hrvatske, potencijalni broj novih vc-tipova (32 u Hrvatskoj Kostajnici i Požegi, te 16 u Slunju) može predstavljati prepreku za uspješnu biološku kontrolu raka kore kestena. Iz tog razloga je bitno pratiti područja prirodnog rasta i/ili uzgoja kestena, raznolikost populacija gljive *C. parasitica* i zastupljenost virusa CHV1 u populacijama kroz duži vremenski period.

6. Zaključci

- Genska raznolikost istraživanih populacija gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj je usporediva sa susjednim zemljama središnje Europe, poput Italije, Švicarske i Slovenije; među 54 analiziranih izolata nađeno je 12 različitih vc-tipova
- Populacije gljive *C. parasitica* Hrvatske imaju veću gensku raznolikost od zemalja zapadne Europe, poput Španjolske i Portugala ili jugoistočne Europe poput Sjeverne Makedonije, Bugarske, Rumunjske i Grčke
- Prisutnost virusa CHV1 u hipovirulentnim izolatima gljive *C. parasitica* može se potvrditi jedino molekularnim metodama
- Virus CHV1 prisutan je u svim istraživanim populacijama, uz različitu prevalenciju, a spoznaja o prisutnosti hipovirulentnih izolata gljive *C. parasitica* na istraživanim područjima Hrvatske pruža potencijal za biološku kontrolu bolesti, bilo prirodnu ili antropogenu
- Virusne sekvence s područja Hrvatske pripadaju talijanskom podtipu

7. Literatura

Abid M, Khan MAU, Mushtaq S, Afzaal S, Haider MS (2018) A Comprehensive review on mycovirusea as biological control agent. *World Journal of Biology and Biotechnology* 3(2): 187–192.

Akıllı S, Serçe ÇU, KatircioğluYZ, Maden S, Rigling D (2013) Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 135: 323–334.

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

Anagnostakis SL (1987) Chestnut Blight: The Classical Problem of an Introduced Pathogen. *Mycologia* 79: 23–37.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.

Biraghi A (1946) Il cancro del castagno causato da *Endothia parasitica*. *L'Italia Agricola* 83: 406–414.

Borges O, Gonçalves B, Carvalho JLRS, Correia P, Silva AP (2008) Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry* 106(3): 976–984.

Botondi R, Vailati M, Bellincontro A, Massantini R, Forniti R, Mencarelli F (2009) Technological parameters of water curing affect postharvest physiology and storage of marrons (*Castanea sativa* Mill., Marrone fiorentino). *Postharvest Biology and Technology* 51(1): 97–103.

Bragança H, Simões S, Onofre N, Tenreiro R, Rigling D (2007) *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology* 37(6): 391–402.

Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36(2): 214–216.

Bryner SF, Rigling D, Brunner PC (2012) Invasion history and demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus 1* across European populations of the chestnut blight fungus. *Ecology and Evolution* 2(12): 3227–3241.

Bryner SF, Sotirovski K, Akıllı S, Risteski M, Perlerou C, Rigling D (2013) Informative value of canker morphology on the presence or absence of virus infection in chestnut blight cankers. *Forest Pathology* 43(6): 496–504.

Castaño C, Bassie L, Oliach D, Gómez M, Medina V, Liu B, Colinas C (2015) *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) survey reveals low occurrence and diversity of subtypes in NE Spain. *Forest Pathology* 45: 51–59.

Chen B, Nuss 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(2): 985–992.

Cortesi P, Milgroom MG (1998) Genetics of Vegetative Incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8): 2988–2994.

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(1): 107–118.

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

Deacon JW (1980) Fungal Biology. University of Edinburgh, UK.

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792–1797.

Feau N, Dutech C, Brusini J, Rigling D, Robin C (2014) Multiple introductions and recombination in *Cryphonectria hypovirus 1*: perspective for a sustainable biological control of chestnut blight. *Evolutionary Applications* 7(5): 580–596.

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

Glass NL, Kaneko I (2003) Fatal Attraction: Nonself Recognition and Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Fungi. *Eukaryotic Cell* 2(1): 1–8.

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

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

González-Varela G, González AJ, Milgroom M (2011) Clonal population structure and introductions of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in Asturias, northern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 131: 67–79.

Griffin GJ (1986) Chestnut Blight and its Control. *Horticultural Reviews* 8: 291–336.

Griffin GJ (2008) Frequencies and spatial patterns of white hypovirulent and pigmented strains of *Cryphonectria parasitica* within blight-controlled cankers on grafted American chestnut trees 15-16 years after inoculation. *European Journal of Forest Pathology* 29(6): 377–390.

Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93(6): 738–746.

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

Heald FD (1926) Manual of plant diseases. McGraw-Hill, New York.

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

Hillman BI, Shapira R, Nuss DL (1990) Hypovirulence-associated suppression of host functions in *Cryphonectria parasitica* can be partially relieved by high light intensity. *Phytopathology* 80(10): 950–956.

Hillman BI, Tian Y, Bedker PJ, Brown MP (1992) A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. *The Journal of General Virology* 73(3): 681–686.

Hillman BI, Halpern BT, Brown MP (1994) A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology* 201(2): 241–250.

Hoegger PJ, Rigling D, Holdenrieder O, Heiniger U (2000) Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycological Research* 104(9): 1108–1116.

Huntley B, Birks HJB (1983) An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.

Ježić M, Krstin L, Poljak I, Liber Z, Idžojić M, Jelić M, Meštrović J, Zebec M, Ćurković-Perica M (2014): *Castanea sativa*: genotype-dependent recovery from chestnut blight. *Tree Genetics & Genomes* 10(1): 101–110.

Ježić M, Mlinarec J, Vuković R, Katanić Z, Krstin Lj, Nuskern L, Poljak I, Idžojić M, Tkalec M, Ćurković-Perica M (2018) Changes in *Cryphonectria parasitica* Populations Affect Natural Biological Control of Chestnut Blight. *Phytopathology* 108(7): 870–877.

Ježić M, Kolp M, Prospero S, Sotirovski K, Double M, Rigling D, Risteski M, Karin-Kujundžić V, Idžojić M, Poljak I, Ćurković-Perica M (2019) Diversity of *Cryphonectria parasitica* in callused chestnut blight cankers on European and American chestnut. *Forest Pathology* 49(6).

Ježić M, Schwarz JM, Prospero S, Sotirovski K, Risteski M, Ćurković-Perica M, Nuskern L, Krstin Lj, Katanić Z, Maleničić E, Poljak I, Idžojić M, Rigling D (2021) Temporal and Spatial Genetic Population Structure of *Cryphonectria parasitica* and Its Associated Hypovirus Across an Invasive Range of Chestnut Blight in Europe. *Phytopathology* 111(8): 1327–1337.

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

Karadžić D, Radulović Z, Sikora K, Stanivuković Z, Golubović Ćurguz V, Oszako T, Milenković I (2019) Characterisation and pathogenicity of *Cryphonectria parasitica* on sweet chestnut and sessile oak trees in Serbia. *Plant Protection Science* 55(3): 191–201.

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

Konstantinidis P, Tsiourlis G, Xofis P, Buckley GP (2008) Taxonomy and ecology of *Castanea sativa* Mill. forests in Greece. *Plant Ecology* 195(2): 235–256.

Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W (2004) Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* 13(3): 145–160.

Krstin Lj, Novak-Agbaba S, Rigling D, Krajačić M, Čurković-Perica M (2008) Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* 57(6): 1086–1096.

Krstin Lj, Novak-Agbaba S, Rigling D, Čurković-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(4): 752–761.

Krstin Lj, Katanić Z, Ježić M, Poljak I, Nuskern L, Matković I, Idžojtić M, Čurković-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(3): 582–589.

Kües U, Casselton LA (1992) Fungal mating type genes – regulators of sexual development. *Mycological Research* 96: 993–1006.

Kumar V, Chandel S (2016) Mycoviruses and their role in biological control of plant diseases. *International Journal of Plant Sciences* 11(2): 375–382.

Kupper Q, Cornejo C (2022) A Multiplex PCR Approach to Determine Vegetative Incompatibility Genotypes and Mating Type in *Cryphonectria parasitica*. *Methods in Molecular Biology* 2536: 435–446.

Linder-Basso D, Dynek JN, Hillman BI (2005) Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. *Virology* 337(1): 192–203.

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

Mello A, Murat C, Bonfante P (2006) Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiology Letters* 260(1): 1–8.

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

Milgroom MG, Cortesi P (1999) Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(18): 10518–10523.

Milgroom MG, Sotirovski K, Spica D, Davis JE, Brewer MT, Milev M, Cortesi P (2008) Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 17(20): 4446–4458.

Mlinarec J, Ježić M, Ćosić J, Ćurković-Perica M (2018) Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in populations of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. *Plant Pathology* 67(3): 741–749.

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

Nuskern L, Stojanović M, Milanović-Litre M, Šibenik T, Ježić M, Poljak I, Ćurković-Perica M (2022) Filling the Gap in Southern Europe–Diversity of *Cryphonectria parasitica* and Associated Mycovirus (*Cryphonectria hypovirus 1*) in Montenegro. *Journal of Fungi* 8(6): 552.

Peraza-Reyes L, Berteaux-Lecellier V (2013) Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology* 4: 244.

Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A (2010) Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition* 64(3): 112–120.

Peters FS, Holweg CL, Rigling D, Metzler B (2012) Chestnut blight in south-western Germany: multiple introductions of *Cryphonectria parasitica* and slow hypovirus spread. *Forest Pathology* 42(5): 397–404.

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(2): 193–210.

Piccoli L (1922) Monografia sul Castagno. Tripolito Spinelli. Firenze.

Prospero S, Conedera M, Heiniger U, Rigling D (2006) Saprophytic Activity and Sporulation of *Cryphonectria parasitica* on Dead Chestnut Wood in Forests with Naturally Established Hypovirulence. *Phytopathology* 96(12): 1337–1344.

Read ND, Beckett A (1996) Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycological Research* 100(11): 1281–1314.

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

Rigling D, Schütz-Bryner S, Heiniger U, Prospero S (2014): Le chancre de l'écorce du châtaignier: Symptômes, biologie et mesures pour le combattre. *Notice pour le praticien* 54: 1–8.

Rigling D, Prospero S (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology* 19(1): 7–20.

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(7): 730–737.

Robin C, Heiniger U (2001) Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* 76(3): 361–367.

Robin C, Lanz S, Soutrenon A, Riglin 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(1): 55–61.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34(12): 3299–3302.

Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang KJ, Stimm B, Roloff A (2006) Enzyklopädie der Laubbäume, Nikol Verlag, Hamburg.

Shannon CE (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379–423 and 623–656.

Shear CL, Stevens NE (1913) The chestnut blight-parasite (*Endothia parasitica*) from China. *Science* 38(974): 295–297.

Short DPG, Double M, Nuss DL, Stauder CM, MacDonald W, Kasson MT (2015) Multilocus PCR Assays Elucidate Vegetative Incompatibility Gene Profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 81(17): 5736–5742.

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(1): 66–73.

Sotirovski K, Papazova-Anakieva I, Grünwald NJ, Milgroom MG (2004) Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology* 53(3): 325–333.

Sotirovski K, Milgroom MG, Rigling D, Heiniger U (2006) Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia. *Forest Pathology* 36(2): 136–143.

Stojanović M, Magazin N (2020) Variability of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Montenegro according to morphological traits of fruits and UPOV descriptors. *Genetika* 52(2): 571–584.

Suzuki N, Ghabrial SA, Kim K, Pearson M, Marzano SL, Yaegashi H, Xie J, Guo L, Kondo H, Koloniuk I, Hillman BI (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Hypoviridae*. *Journal of General Virology* 99(5): 615–616.

Tрпиello E (2010) *Cryphonectria parasitica* en ocho concejos del Principado de Asturias. Magistarski rad, Universidad de León, Spain.

Tрпиello Vázquez E (2017) Chancro en castaño: hongos implicados en la enfermedad y estrategias de control de *Cryphonectria parasitica*. Tesis Doctoral, Universidad de León, Spain.

Tрпиello E, Rigling D, González AJ (2017) Occurrence of hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* isolates in northern Spain: an encouraging situation for biological control of chestnut blight in Asturian forests. *European Journal of Plant Pathology* 149(2): 503–514.

Trestić T, Ušćuplić M, Colinas C, Rolland G, Giraud A, Robin C (2001) Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Landscape Research* 76(3): 391–396.

Valdezate C, Alzugaray R, Landeras E, Braña M (2001) Situación actual de *Cryphonectria parasitica* (Murril) Anderson, cancro cortical, en los castañares asturianos. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas* 27: 401–410.

Zamora P, Martín AB, Rigling D, Diez JJ (2012) Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. *Forest Pathology* 42(5): 412–419.

Zavišić N, Rosić Ž, Trubajić T (2014) Utjecaj tipa tla na morfološka svojstva sijanaca pitomog kestena (*Castanea sativa*). 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture. Dubrovnik, Hrvatska.

Zhang L, Baasiri RA, Van Alfen NK (1998) Viral Repression of Fungal Pheromone Precursor Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 18(2): 953–959.

Zohary D, Hopf M (1988) Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford University Press, Oxford.

8. Životopis

Rođen sam 13. prosinca 1995. godine u Zagrebu, gdje sam završio Osnovnu školu Savski Gaj, nakon čega sam upisao Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, koju sam završio 2013. godine. Iste godine upisao sam studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, koji sam pohađao tri godine. Tokom treće godine promijenio sam fakultet, te sam u akademskoj godini 2017./2018. upisao preddiplomski sveučilišni studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski sveučilišni studij Ekologije i zaštite prirode, modul More upisao sam u akademskoj godini 2020./2021.

Za vrijeme preddiplomskog studija sudjelovao sam na manifestaciji „Noć biologije“, te sam i predstavljao Biološki odsjek PMF-a na Smotri Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom zadnje dvije godine studija sam upisao i odradio Laboratorijsku stručnu praksu, u Laboratoriju za virologiju na mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, kao i ljetnu praksu u Institutu za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku. U spomenutom periodu sam ponovno predstavljao Biološki odsjek PMF-a u XV. gimnaziji, na manifestaciji naziva „Dan i noć na PMF-u“.

Poznajem rad na računalu, te svakodnevno koristim Microsoft Office alate (Word, Excel, PowerPoint, Outlook). Također, poznajem i koristim engleski jezik i u govoru i u pismu. Otvoren sam, komunikativan i orijentiran prema timskom radu.