

Promjena raznolikosti tipova vegetativne kompatibilnosti i prevalencije hipovirulentnih izolata gljive *Cryphonectria parasitica* u populacijama na području Ozlja i Kašta

Ogresta, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:562028>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lovro Ogresta

**Promjena razolikosti vegetativne
kompatibilnosti i prevalencije
hipovirulentnih izolata gljive *Cryphonectria
parasitica* u populacijama na području Ozlja i
Kašta**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lovro Ogresta

**Change in vegetative compatibility diversity
and hypovirulence prevalence in
Cryphonectria parasitica isolates from Ozalj
and Kašt area populations**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Marina Ježića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

Zahvale

Veliko hvala...

... mentoru dr. sc. Marinu Ježiću na povjerenju, jednostavnoj komunikaciji i strpljenju, te ugodnoj i opuštеноj atmosferi u laboratoriju gdje je vrijeme proletilo.

... mag. Karli Gregov na vođenju urednih dnevnika koji su mi spasili glavu više puta, i na svoj pruženoj pomoći.

... Emi Svirčević zbog pružene pomoći s više predmeta s geografskog odsjeka.

.... mojoj obitelji - mami, tati, sestri i baki na moralnoj i poglavito financijskoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Promjena raznolikosti vegetativne kompatibilnosti i prevalencije hipovirulentnih izolata gljive *Cryphonectria parasitica* u populacijama na području Ozlja i Kašta

Lovro Ogresta

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cryphonectria parasitica je parazitska gljiva mješinarica, uzročnik bolesti raka kore kestena, koja može biti pogubna za svog domaćina. Infekcijom gljive virusom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) dolazi do smanjenja njene virulencije (usporavanje rasta i slabija sporulacija micelija) te cijeljenja rakova. CHV1 se lako prenosi između micelija gljiva istog tipa vegetativne kompatibilnosti (vc), koji je definiran s 6 dialelnih lokusa vegetativne nekompatibilnosti (vic). Cilj ovog istraživanja bio je istražiti promjene u raznolikosti vc tipova i prevalenciji CHV1 u populacijama *C. parasitica* na području Ozlja i Kašta u 2014. i 2019. godini. Rezultati dobiveni RT-PCR testom i metodom koinokulacije uzoraka i standardnih testera pokazali su da se struktura ni jedne populacije nije značajno promijenila tijekom pet godina. Zbilježena su dva nova vc tipa u populaciji Kašta i osam u populaciji Ozlja, od kojih su tri u potpunosti nova na području Republike Hrvatske. Prevalencija hipovirulencije i distribucija vc tipova među hipovirulentnim izolatima nisu se značajno promijenile ni u jednoj populaciji. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da prema zastupljenosti vc tipova i raspodjeli CHV1 po raznim vc tipovima, obje populacije za sada stagniraju.

(36 stranica, 6 slika, 7 tablica, 42 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biološka kontrola, rak kore kestena, RNA virus

Voditelj: doc. dr. sc. Marin Ježić

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Marin Ježić

izv. prof. dr. sc. Marija Gligora Udovič

doc. dr. sc. Ivan Čanjevac

prof. dr. sc. Marijan Kovačić

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Change in vegetative compatibility diversity and hypovirulence prevalence in *Cryphonectria parasitica* isolates from Ozalj and Kašt area populations

Lovro Ogresta

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cryphonectria parasitica is a parasitic fungus that causes chestnut blight, which can be fatal for its host. Infection of the fungus with *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) leads to reduced virulence (i.e. slower growth and decreased sporulation of the mycelium) and healing of cankers. The virus is transmitted among individuals of the same vegetative compatibility (vc) type, controlled by 6 diallelic vegetative incompatibility (*vic*) loci. The aim of this study was to investigate changes in the diversity of vegetative compatibility and the prevalence of CHV1 in populations of *C. parasitica* in the area of Ozalj and Kašt in 2014 and 2019. The results obtained by RT-PCR test and pairing of the samples with standard testing strains showed that the structure of neither population changed significantly over the last five years. Two new genotypes were recorded in the population of Kašt and eight in the population of Ozalj, three of which have not been observed so far on the territory of the Republic of Croatia. The prevalence of hypovirulence and the distribution of vc types among hypovirulent isolates did not change significantly in either population. Based on these results, it can be concluded that two populations are in the state of stagnation in regard to vc type ratios and hypovirulence prevalence.

(36 pages, 6 figures, 7 tables, 42 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: biocontrol, chestnut blight, RNA virus

Supervisor: Asst. Prof. Marin Ježić

Reviewers:

Asst. Prof. Marin Ježić

Assoc. Prof. Marija Gligora Udovič

Asst. Prof. Ivan Čanjevac

Prof. Marijan Kovačić

Thesis accepted:

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Pitomi kesten (<i>Castanea sativa</i> Mill.) | 1 |
| 1.2. Gljiva <i>Cryphonectria parasitica</i> i rak kore pitomog kestena | 2 |
| 1.3. <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> (CHV1) i hipovirulentnost..... | 3 |
| 1.4. Vegetativna kompatibilnost | 4 |
| 1.5. <i>Cryphonectria parasitica</i> u Hrvatskoj | 6 |
| 2. CILJEVI | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 8 |
| 3.1. Lokacija uzorkovanja kore pitomog kestena | 8 |
| 3.2. Uzgoj kultura gljive <i>C. parasitica</i> | 9 |
| 3.3. Izolacija genomske DNA gljive <i>C. parasitica</i> | 9 |
| 3.4. Određivanje tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) izolata gljive <i>C. parasitica</i> lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i agaroznom elektroforezom | 10 |
| 3.5. Određivanje tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) izolata gljive <i>C. parasitica</i> uparivanjem sa standardnim sojevima poznatog vc tipa (testerima) | 12 |
| 3.6. Statističke metode..... | 14 |
| 4. REZULTATI | 15 |
| 4.1. Koncentracija DNA dobivenih iz micelija <i>Cryphonectria parasitica</i> | 15 |
| 4.2. Promjene genske strukture populacija <i>Cryphonectria parasitica</i> | 16 |
| 4.3. Promjena prevalencije hipovirulentnih izolata <i>Cryphonectria parasitica</i> | 19 |
| 5. RASPRAVA | 20 |
| 6. ZAKLJUČAK | 23 |
| 7. LITERATURA | 24 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 28 |

1. UVOD

1.1. Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.)

Rod *Castanea* pripada porodici Fagaceae te se dijeli na tri podskupine; Eucastanon, Balanocastanon i Hypocastanon koje se mogu naći u umjerenom šumskom pojasu sjeverne hemisfere. Broj vrsta se ne može sa sigurnošću utvrditi zbog široke upotrebe sinonima, kao i činjenice da neke vrste u skupini Hypocastanon nisu u potpunosti opisane (Corredoira i sur., 2017; Lang, i sur., 2006). Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) je jedini autohtoni pripadnik roda *Castanea* u Europi (Krebs i sur., 2004). Listopadno je stablo koje doseže visinu od 40 m, a opseg debla starih jedinki može iznositi do 9 m. Pupovi se razvijaju od travnja do lipnja, stabla na Mediteranu cvatu u svibnju i lipnju, dok u sjevernijim dijelovima obično mjesec dana kasnije. Oprašivanje se odvija vjetrom, a rjeđe pomoću kukaca. Plodovi sazrijevaju krajem listopada (Fernández-López i Alía, 2003). Areal pitomog kestena prostire se na 2,53 milijuna hektara površine centralne Europe, Balkana, Italije i sjeverozapada Pirinejskog poluotoka. Pitomi kesten ekonomski je značajan u mnogim europskim državama gdje se većinom koristi u drvnoj industriji (~80% kultiviranih površina) te manjim dijelom u prehrambenoj industriji (~20% kultiviranih površina) (Conedera i sur., 2004). U Hrvatskoj pitomi kesten raste u različitim ekološkim uvjetima i šumskim zajednicama. U kontinentalnoj klimi pitomi kesten preferira toplu i dobro osvijetljena mjesta. Raste na kiselom tlu na silikatnoj podlozi. U priobalnom području može se pronaći na mjestima s visokom precipitacijom koja nisu izložena vjetru i dubokim, ispranim tlima s karbonatnom podlogom. Njegovo stanište možemo podijeliti u dvije zone: prva, veća zona koja se nalazi između slovenske granice i Bosne i Hercegovine i druga, submediteranska zona koja obuhvaća područje Istre, Krka i Cresa (Idžojić i sur., 2009).

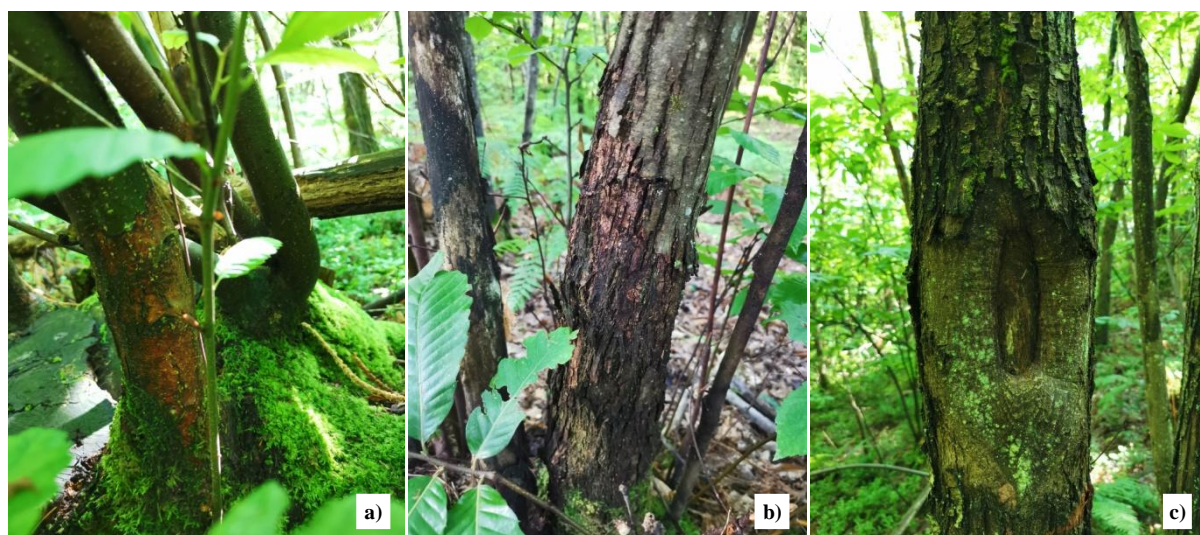
1.2. Gljiva *Cryphonectria parasitica* i rak kore pitomog kestena

Cryphonectria parasitica je parazitska gljiva mješinarica iz porodice Cryphonectriaceae unutar reda Diaporthales. Uzročnik je raka kore kestena, bolesti koja se nakon slučajnog unosa iz Japana u SAD početkom 20. stoljeća počela širiti kroz areal američkog kestena (*Castanea dentata*), uzrokujući veliku ekološku i ekonomsku štetu, devastirajući milijarde stabala američkog kestena. Prvi slučaj zaraze u Europi zabilježen je 1938. godine u Italiji na pitomom kestenu, *Castanea sativa*, odakle se gljiva *C. parasitica* proširila diljem kontinenta, uključujući i Hrvatsku (Dutech i sur., 2012).

Primarni domaćini gljive *C. parasitica* su pripadnici roda *Castanea*, ali postoje značajne razlike u teženi oboljenja među vrstama. Azijske vrste, japanski kesten *Castanea crenata* i kineski kesten *Castanea mollissima*, su otporne na bolest zbog zajedničke koevolucije s *C. parasitica*, dok europski i američki kesten, koji do 20. stoljeća nisu bili u doticaju s ovim patogenom, obično odumiru u roku od par godina nakon izlaganja zarazi (Anagnostakis, 1995). Bolest se može javiti i na vrstama izvan roda *Castanea* ako su biljke oslabljene, a pritisak patogena dovoljno jak. Slučajevi zaraze zabilježeni su kod više pripadnika roda *Quercus*, kao i na običnom grabu, *Carpinus betulus* (Rigling i Prospero, 2017). Bolest zahvaća nadzemne dijelove biljke: deblo i grane. Simptomi mogu varirati ovisno o vrsti i starosti domaćina kao i virulentnosti soja *C. parasitica* kojom je zaražen, ali najčešće podrazumijevaju lezije na kori poput napuknuća i promjene boje kore na mlađim dijelovima, koji poprimaju žuto-smeđu, narančastu-smeđu, crveno-smeđu ili svijetlo-smeđu boju. Gljiva razara kambij koji s vremenom odumire što uzrokuje uleknucé kore, čijim se odstranjivanjem na mjestu infekcije otkriva svijetlo-smeđi micelij gljive. Propadanjem kore i kambija, dijelovi biljke koji se nalaze distalno od raka odumiru, što se najjasnije vidi prema položaju uvenulih listova, dok se ispod raka može pronaći velik broj adventivnih mladica (Gonthier i Nicolotti, 2013).

Cryphonectria parasitica se rasprostranjuje pomoću spora koje raznose vjetar, kiša ili životinje koje dođu u kontakt s njima (Russin i sur., 1984). Gljiva proizvodi dva tipa spora, spolne spore – askospore i nespodne spore – konidije. Konidije mogu služiti za vegetativno razmnožavanje ili kao muške gamete u spolnom razmnožavanju. Askospore mogu nastati spajanjem spolno kompatibilne konidije i recipijentske hife ili spajanjem dvaju kompatibilnih

hifa, iz kojih nastaje dikarionska hifa. Kratkotrajni dikarionski stadij završava kariogamijom kojoj slijedi mejoza i stvaranje askospora. Spolna kompatibilnost uvjetovana je jednim dialelnim genskim lokusom (MAT) koji određuje tip rasploda (eng. *mating type*). *Cryphonectria parasitica* je heterotalična gljiva što znači da do spolnog razmnožavanja može doći samo između micelija koji posjeduju različite alele na MAT lokusima tj. između dvije MAT kompatibilne jedinice. Unatoč tome, u laboratorijskim, ali i prirodnim uvjetima ponekad je zabilježena i samooplodnja (Marra i Milgroom, 2001). Preduvjet za samooplodnju je nastanak heterokarionske stanice iako sam mehanizam nastanka heterokariona i samooplodnje nije u potpunosti razjašnjen (McGuire i sur., 2004).



Slika 1. Prikaz lezija uzrokovanih zarazom gljivom *C. parasitica*: a) Promjena boje kore na mladom kestenu, b) Rak rana na odraslom kestenu, c) Neaktivna, zacijeljena rana (kalusno tkivo)

1.3. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) i hipovirulentnost

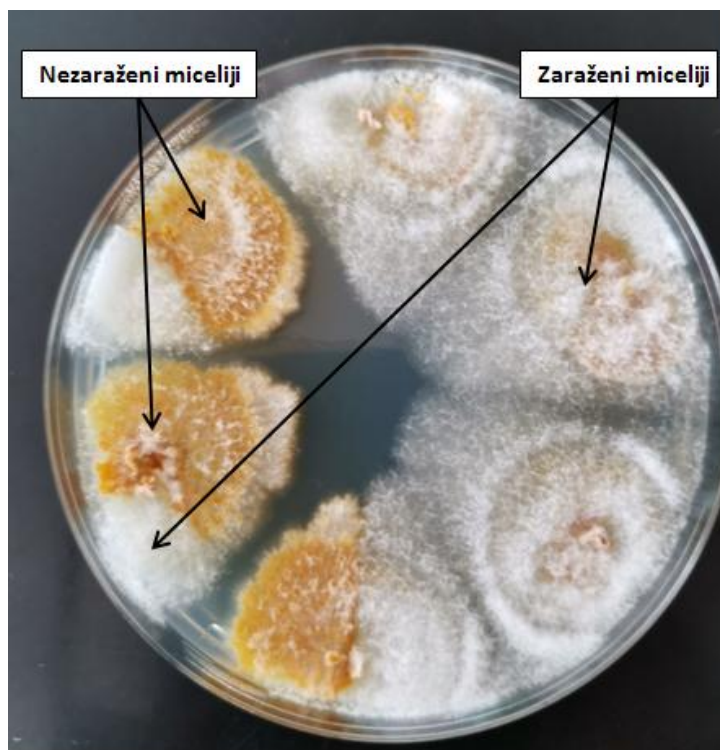
Hipovirulentnost gljive *C. parasitica* uzrokovana je infekcijom +ssRNA virusom bez kapside iz roda *Hypovirus*. Za razliku od agresivnog oblika bolesti raka kore kestena uzrokovanog nezaraženim sojevima gljive *C. parasitica*, sojevi zaraženi virusom CHV1 uzrokuju manje agresivan oblik bolesti, karakteriziran plitkim, površinskim nekrozama kore koje ne

predstavljaju prijetnju stablu. Hife gljive *C. parasitica* zaražene virusom CHV1, ne prodiru do kambija, spolno razmnožavanje je inhibirano te je proizvodnja konidija znatno slabija. Sekundarnom infekcijom virulentnih sojeva gljive *C. parasitica* virusom CHV1, koje se nalaze u agresivnim, brzorastućim rakovima, one prelaze u hipovirulentne oblike te može doći do zacjeljivanja rana na stablu (Slika 1.) (Nuss, 1992; Robin i Heiniger, 2001). Unutar roda *Hypovirus* do danas su opisane četiri vrste virusa: *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), prisutan u Europi, Japanu i Kini, CHV2 prisutan u Kini i Sjevernoj Americi te CHV3 i CHV4 koji su za sada detektirani samo u Sjevernoj Americi. CHV4 jedini je pripadnik roda *Hypovirus* koji ne uzrokuje pojavu hipovirulencije te uzrokuje gotovo nezamjetne morfološke promjene na domaćinu. Kako je gljiva *C. parasitica* autohtona azijska vrsta, pretpostavlja se da su vrste CHV1 i CHV2 uvezene iz Azije zajedno s domaćinom (Gobbin i sur., 2003) (Suzuki, Bradley, Hillman, 2004). Virus se vertikalno prenosi isključivo konidijama, dok prijenos virusa askosporama nije moguć (Anagnostakis, 1988). Horizontalni prijenos virusa odvija se anastomozom hifa između nezaražene i zaražene gljive (Anagnostakis SL i Day PR, 1979). Smatra se da su za širenje hipovirulencije, konidija zaraženih virusom CHV1 i hipovirulentnih fragmenata micelija, odgovorne razne skupine člankonožaca te fungivorni oblici roda *Aphelenchoides* koji su pronađeni u rakovima kestena. Grinje imaju dokazano važnu ulogu kao pasivni vektori koji prenose hipovirulentne hife i konidije na svom tijelu ili fekalnim peletima (Griffin i sur., 2012) (Bouneb i sur., 2016).

1.4. Vegetativna kompatibilnost

Vegetativna kompatibilnost (vc) ili heterokarionska kompatibilnost je sustav gena koji reguliraju formiranje heterokariona među dva genski različita micelija. Ukoliko dva micelija nisu kompatibilna, neće doći do stvaranja heterokariona ili će doći do njegova brzog propadanja (Bégueret i sur., 1995). Kod većine filamentoznih gljiva mješinarke vc uvjetovana je interakcijama alela, odnosno dva micelija su vegetativno nekompatibilna ako imaju barem jedan različiti alel na nekome od lokusa vegetativne nekompatibilnosti (*vic*). Kod gljive *C. parasitica* do sada je poznato šest dialelnih lokusa, koji određuju ukupno 64 različita vc genotipa. Recentnija istraživanja su pokazala da postoji ukupno barem 74 genotipa, no točan razlog (dodatni *vic* gen ili

alel na nekom od poznatih gena) za dodatnih 10 genotipa nije utvrđen (Cortesi i Milgroom, 1998; Robin i sur., 2000). Vc igra ključnu ulogu u širenju hipovirulencije jer je za prijenos CHV1 potreban stabilni heterokarion, odnosno anastomoza hifa koja perzistira (Slika 2.). Prijenos je moguć i između sojeva različitog vc tipa, ali je otežan i slabije uspješan (CHV1 se prenosi na nižoj frekvenciji nego među kompatibilnim hifama), pošto vc ne predstavlja savršenu barijeru za prijenos virusa. Pojedini *vic* aleli imaju različit utjecaj na brzinu propadnja heterokariona. Tako je primijećeno da među pojedinim sojevima koji su heteroalelični samo na lokusu *vic4*, prijenos virusa varira od 20-30% među izolatima sakupljenim u prirodi, do 100% kod laboratorijskih izolata (Cortesi i sur., 2001). Razlozi nisu u potpunosti utvrđeni te su pripisani tzv. pozadinskom genskom utjecaju.



Slika 2. Prikaz sojeva istog vc tipa kod kojih je došlo do prijenosa CHV i sojeva različitog vc tipa do kod kojih nije došlo do prijenosa CHV1.

1.5. *Cryphonectria parasitica* u Hrvatskoj

Prvi slučaj bolesti raka kore kestena u Hrvatskoj zabilježen je 1955. godine na području Lovrana (Kišpatić, 1956). Pretpostavlja se da se bolest proširila iz sjeverne Italije preko Slovenije. Dvadesetak godina kasnije, 1978. g., primijećena je i na pitomim kestenima kontinentalne Hrvatske (Halambek, 1986).

Hrvatske populacije gljive *C. parasitica* su među raznolikijima u Europi s pet varijabilnih *vic* lokusa na kojima su u svim populacijama pronađena dva različita alela (*vic1*, *vic2*, *vic4*, *vic6* i *vic7*), dok je *vic3* lokus uglavnom monomorfan, tj. jedan alel, *vic3-1* je prisutan redovito u svim populacijama i izolatima, dok je drugi alel, *vic3-2*, detektiran sporadično (Ježić i sur., 2018; Krstin i sur., 2008). U svim populacijama zabilježena je prisutnost CHV1 (Krstin i sur., 2008). Najzastupljeniji vc tipovi u Hrvatskoj su EU1, EU2 i EU12, od kojih su EU1 i EU2 dominantni vc tipovi u zapadnoj Europi i sjevernoj Italiji, dok je EU12 najzastupljeniji u istočnoj Europi i južnoj Italiji (Milgroom i sur., 2008). Tijekom godina najviše istraživanja o raznolikosti vc tipova i prevalenciji hipovirulencije provedeno je na populacijama Ozlja, Hrvatske Kostajnice i Buja. U Bujama je prevalencija hipovirulencije porasla s 12,7% u 2004. g. (Krstin i sur., 2008) na 19,5% u 2014. g. dok se u Hrvatskoj Kostajnici prevalencija smanjila s 50,8% u 2004. g. (Krstin i sur., 2008) na 29,9% u 2014. g.. Raznolikost je u istom periodu porasla s 1,69 na 2,56 u Bujama i s 1,58 na 2,49 u Hrvatskoj Kostajnici (Ježić i sur., 2018), što općenito ukazuje na lagano povećanje raznolikosti vc tipova gljive *C. parasitica* u Hrvatskoj, ali i stabilizaciju prevalencije CHV1 na 20-30% u populacijama.

2. CILJEVI

Cilj ovog istraživanja je odrediti tipove vegetativne (ne)kompatibilnosti uzoraka gljive *Cryphonectria parasitica* u populacijama Ozlja i Kašta prikupljenima 2019. godine te na temelju usporedbe tih rezultata s rezultatima iz 2014. godine procijeniti promjene raznolikosti vegetativne (ne)komptibilnosti te utvrditi u kakvom je ona odnosu s već određenom prevalencijom hipovirulentnih izolata u populacijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Lokacija uzorkovanja kore pitomog kestena

Lokaliteti su smješteni na području sjeverozapadne Hrvatske u blizini sela Kašt (45°70'22" s. g. š. i 15°36'31" i. g. d.) i grada Ozalja (45°59'89" s. g. š. i 15°46'16" i. g. d.) (Slika 3.). Kašt se nalazi u sjeverozapadnom dijelu parka prirode Žumberak u blizini granice sa Slovenijom dok je Ozalj smješten sjeverno od Karlovca na rijeci Kupi. Međusobno su udaljeni 13 km zračnom linijom te imaju isti klimatski tip, umjereno toplu vlažnu klimu s vrućim ljetom – Cfb (Filipčić, 1998). Uzorci su prikupljeni iglom za punkciju koštane srži iz zaražene kore stabala i površinski dezinficirani kratkotrajnim uranjanjem u 70 %-tni etanol, nakon čega su nasađeni u Petrijevu zdjelicu s hranjivim medijem – krumpirovim dekstroznim agarom (eng. *potato dextrose agar* – PDA; pripremljen otapanjem 39 g komercijalno pretpripremljenog medija u 1 L deionizirane vode, te steriliziran akutoklaviranjem pri 121°C, 20 minuta). Čiste kulture gljive *Cryphonectria parasitica* izolirane iz zaraženog tkiva dugotrajno su pohranjene u sterilnom 22 %-tnom glicerolu na -80 °C.



Slika 3. Prikaz lokacija uzorkovanja

3.2. Uzgoj kultura gljive *Cryphonectria parasitica*

Po jedna kockica PDA medija s micelijem određenog uzorka gljive *C. parasitica*, pohranjena na -80 °C, posađena je u Petrijevu zdjelicu sa svježim PDA medijem. Kroz nekoliko dana micelij nove kolonije bi počeo rasti te je iz Petrijeve zdjelice izrezana mala kocka medija s ruba nove kolonije gljive *C. parasitica* nakon čega je presađena na prethodno pripremljenu Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm s 20 mL PDA prekrivenim sterilnim celofanom. Izolati su ostavljeni da rastu pet do sedam dana u fitotronu u mraku pri 24 °C i 70 % vlažnosti.

3.3. Izolacija genomske DNA gljive *C. parasitica*

DNA je ekstrahirana koristeći komercijalni paket za izolaciju DNA „*Omni Prep kit for Fungus*“ (G-Biosciences), prema uputama proizvođača. 10-20 mg najsvježijeg rasta micelija sastrugano je s celofana i preneseno u mikroeprovete. Micelij je zamrznut pomoću tekućeg dušika te je usitnjen plastičnim tučkom. Nakon toga, dodano je 500 µl litičkog pufera (eng. *genomic lysis buffer*) i snažno pomiješano na vrtložnoj miješalici. Za svakih 100 µl litičkog pufera dodano je 1 µl otopine Proteinaze K (ukupno 5 µl po uzorku) te su mikroeprovete inkubirane jedan sat pri 60 °C. Sadržaj mikroeproveta je periodično miješan potresanjem rukom. Nakon što su se mikroeprovete ohladile dodano im je 200 µl kloroforma te su protresene rukom nekoliko puta. Centrifugirane su na 4 °C, 10 min pri 14000 g te je gornja (vodena) faza prebačena u nove mikroeprovete za centrifugiranje. U mikroeprovete je dodano 50 µl otopine za odvajanje komponenti (eng. *DNA stripping solution*) nakon čega su protresene i inkubirane 5-10 min na 60 °C. U mikroeprovete je dodano 150 µl precipitacijske otopine (eng. *precipitation solution*) nakon čega su miješane na vrtložnoj miješalici nekoliko puta i centrifugirane na 4 °C, 5 min pri 14000 g. Oko 450 µl supernatana prebačeno je u nove mikroeprovete gdje mu je dodano 500 µl izopropanola. Mikroeprovete su protresene desetak puta i centrifugirane na 4 °C, 5 min pri 14000 g. Nakon što se precipitat istaložio na dnu mikroeprovete, supernatant je dekantiran. U mikroeprovete je dodano 700 µl 70 %-tnog etanola te su centrifugirane na 4 °C, 1 min pri 14000 g. Etanol je dekantiran, a talozi DNA su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi. Kada je

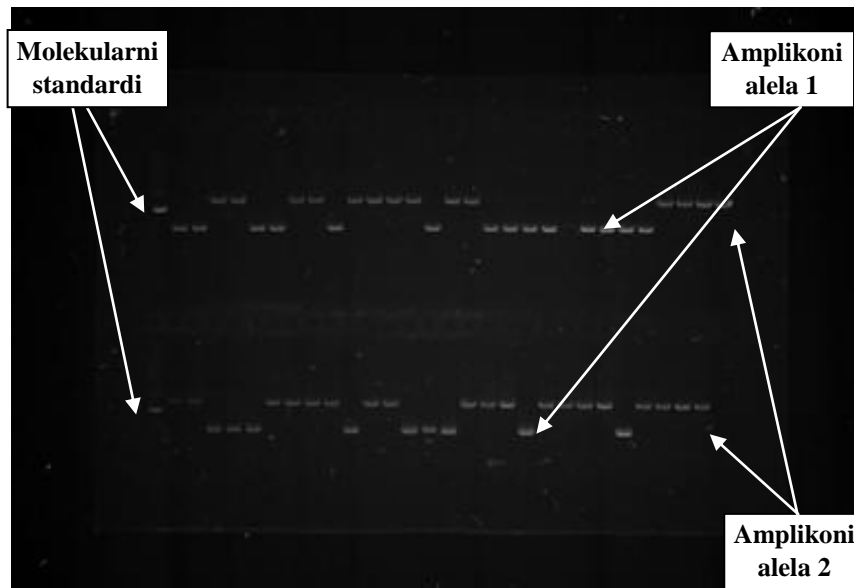
zaostali etanol ishlapió, u mikroeprovete je dodano 50 μl sterilne deionizirane vode. Koncentracija izolirane DNA izmjerena je pomoću spektrofotometra za mikrovolumene (NanoDrop, Thermo Scientific). Ukoliko je koncentracija DNA bilo izuzetno velika ($>500 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$) za PCR, uzorci su bili razrijeđeni 5 ili 10 puta dodavanjem odgovarajuće količine sterilne deionizirane vode.

3.4. Određivanje tipova vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) izolata gljive *C. parasitica* lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i agaroznom elektroforezom

Šest kombinacija početnica specifičnih za pojedine *vic* lokuse (Tablica 1.) korišteno je za određivanje vc tipova gljive *C. parasitica*. Reakcijski volumen je iznosio 20 μl te je sadržavao: 1 X GoTaq reakcijskog pufera, 1,5 mM MgCl_2 , 200 μM mješavine deoksinukleotidtrifosfata (dNTP-a), 1 U GoTaq DNA polimeraze (Promega), 0,2 μM pojedine početnice i 0,5 μl otopine DNA. Reakcija se odvijala pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C, 2 min, nakon koje je slijedilo 34 ciklusa koji se sastoje od denaturacije pri 95 °C, 30 s, odgovarajuće temperature vezanja početnica 30 s (Tablica 1.) i produljenja lanaca pri 72 °C, 1 min 45 s, nakon kojih je slijedilo završno produljenje lanaca pri 72 °C, 10 min. Elektroforeza amplicona je provedena u 1,2 ili 1,5 %-tnom agaroznom gelu, koristeći 0,5 X komercijalno dostupan TBE puffer (Tris/borat/EDTA, Lonza) pri 5 V/cm u trajanju od 1 h. Za kontrolu veličine amplicona prilikom elektroforeze korišten je molekularni standard za određivanje veličine fragmenta DNA GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) s fragmentima veličine 250 bp do 10 kbp prema uputama proizvođača. DNA je vizualizirana bojom GelStar (Lonza), koja je bila dodana u gel u koncentraciji 0,2 X te osvjetljavanjem gela nakon završene elektroforeze na UV transiluminatoru (Slika 4.).

Tablica 1. Prikaz početnica korištenih u PCR-u prema Short i sur. (2015) i Mlinarec i sur. (2018)

| Ciljani gen | Očekivana veličina amplifikacije alela 1 (pb) | Očekivana veličina amplifikacije alela 2 (pb) | Naziv početnice | Temperatura vezanja početnica | Sekvenca početnice (3'-5') |
|--|---|---|--|-------------------------------|--|
| <i>vic1</i> (Short i sur., 2015) | 308 | 1470 | vic1a-F vic1a-1R vic1a-2R | 65°C | GCTATCCACCCTCACAGAGAA CGTCCTGCCTCAAGGAGATT CATTTTCGTCATCAGCACAAC |
| <i>vic2</i> (Short i sur., 2015) | 660 | 1089 | vic2-F vic2-1R vic2-2R | 60°C | TTGATGGTGGAGTGTGACAGA TCTCCCAATGACCTGAAATG GATGTTTGGCATAATCGGC |
| <i>vic3</i> (Short i sur., 2015) | 538 | 1203 | vic3a-1F vic3a-1R vic3a-2F vic3a-2R | 60°C | CAGGTTTAGCAGGTTTCTTCC GCACGACAAATGGCACTG TCCATTGTCTCTATCCCATCC GCATCAGGACTTGCCAGATA |
| <i>vic4</i> (Mlinarec i sur., 2018) | 386 | 919 | vic4-F vic4-1R vic4-2R | 60°C | GCATGGGCAATGGTCTACTT TCCATCGCATAGGTACGCTC GCAATCAACGATCATCTGTC |
| <i>vic6</i> (Short i sur., 2015) | 238 | 813 | vic6-1F vic6-1R vic6-2F vic6-2R | 64°C | CGCATACTGTGTTTCCCAACT AAGATCCTTGCGTACCTCCA ACAGGATAGCAATCACTGCC ACAGGGA ACTCTGGTCGTTG |
| <i>vic7</i> (Short i sur., 2015) | 728 | 1109 | vic7-F vic7-1R vic7-2R | 60°C | AGGTACACCCCAAGATTCC CCACGAAGTCTCTGGCGTA CAGGCTCGATTCTCAAGGTG |

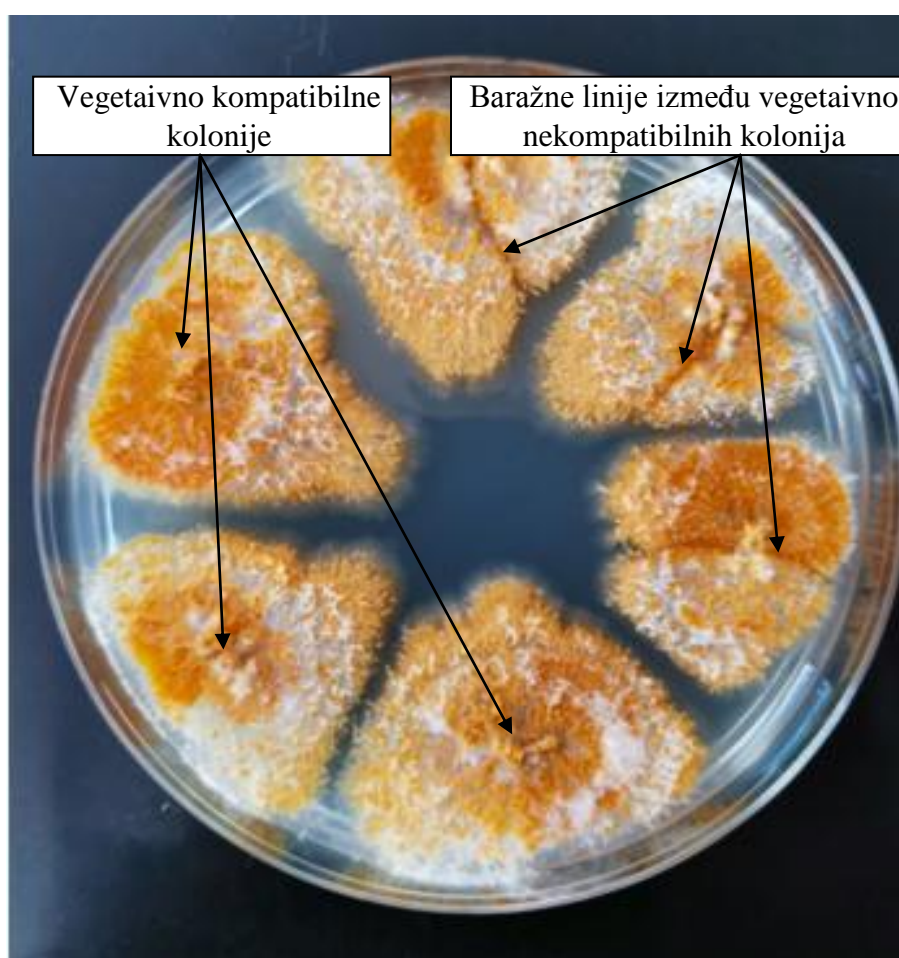


Slika 4. Primjer rezultata elektroforeze pri 0,5 X TBE pufera pri 5 V/cm u 1,2 %-tnom agaroznog gelu s dodatkom GelStar boje. Prikazani su amplikoni lokusa *vic6* uz standarde koji se nalaze na lijevom kraju oba reda.

3.5. Određivanje tipa vegetativne (ne)kompatibilnosti (vc) izolata gljive *C. parasitica* uparivanjem sa standardnim sojevima poznatog vc tipa (testerima)

U slučaju nezadovoljavajućih, odnosno nejednoznačnih rezultata određivanja vc tipa izolata gljive *C. parasitica* pomoću PCR-a izolati su uparivani sa standardnim testerima gljive *C. parasitica* poznatog vc tipa. Izolati i testerima su prvo uzgojeni u uvjetima opisanim u poglavlju „3.2. Uzgoj kultura gljive *C. parasitica*“. Nakon nekoliko dana, šest komadića najmlađeg micelija kolonije neodređenog vc tipa preneseno je u novu Petrijevu zdjelicu sa svježim PDA medijem, pored njih je inokuliran micelij dvaju standardnih sojeva (tzv. testerima) u triplikatu te su ostavljene da rastu sedam dana u uvjetima opisanim u poglavlju „3.2. Uzgoj kultura gljive *C. parasitica*“ (Slika 5). Kada su standardni soj i uzgojena kolonija gljive *C. parasitica* vegetativno

kompatibilni, dolazi do potpunog sraštavanja njihovih hifa te formiranja heterokarionskog micelija. U tom slučaju, mjesto kontakta micelija nije vidljivo i morfološki se ne razlikuje od ostatka micelija. U slučaju vegetativne nekompatibilnosti između standardnog soja i kolonije gljive *C. parasitica* na mjestu kontakta dolazi do formiranja tzv. „baražne linije“ tj. na mjestu kontakta dolazi do apoptoze hifa nekomatibilnih micelija, koja je vidljiva golim okom. Nakon što su pokazale vegetativnu kompatibilnost s jednim od standardnih sojeva, kulturama je dodijeljen odgovarajući vc tip. (Slika 5.)



Slika 5. Prikaz vegetativno kompatibilnih kolonija bez baražne linije i vegetativno nekompatibilnih kolonija između kojih nastaju baražne linije

3.6. Statističke metode

Struktura populacija gljive *C. parasitica* analizirana je i uspoređena sa strukturama populacija na istom lokalitetu prethodnih godina, kao i s drugim bliskim populacijama. Osnovnim metodama deskriptivne statistike prikazana je brojnost tipova vegetativne kompatibilnosti i njihova zastupljenost, dok je raznolikost populacija određena Shannonovim indeksom ($H' = -\sum_i \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n}$) i indeksom ujednačenosti ($e = \frac{H'}{\ln N}$). Sastav populacija međusobno je uspoređen Mann-Whitneyevim testom, odnosno Kruskal-Wallisovim testom kako bi se utvrdile razlike u sastavu populacija tj. brojnosti i zastupljenosti ve tipova u ukupnoj populaciji. Osim ukupne populacije zasebno su uspoređivane hipovirulentne i virulentne subpopulacije. Program korišten za statističku analizu podataka bio je Past verzija 3.26.

4. REZULTATI

4.1. Koncentracija DNA dobivenih iz micelija *Cryphonectria parasitica*

Koncentracije izolirane DNA znatno variraju iako je količina micelija u ekstrakciji iznosila između 10 i 20 mg. Čistoća DNA prikazana je kao omjer apsorpcije otopljene DNA, čiji je maksimum na valnoj duljini od 260 nm, i zaostalih nečistoća, najviše proteina, iz procesa ekstrakcije čiji je maksimum apsorpcije na 280 nm valne duljine. Kod dobro pročišćenih uzoraka ovaj omjer iznosi 1,7-2,0 (Tablica 2.).

Tablica 2. Prikaz masenih koncentracije DNA u uzorcima izraženih u $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$ i čistoće uzoraka omjerom apsorpcije pri 260 i 280 nm izmjerenih na NanoDrop-u (ThermoScientific)

| Oznaka uzorka | Kašt | | Oznaka uzorka | Ozalj | |
|---------------|--|-----------|---------------|--|-----------|
| | $\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$ | A260/A280 | | $\gamma(\text{DNA})/\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$ | A260/A280 |
| ks 07.1 | 38 | 1,89 | oz 15.4 | 81,4 | 1,87 |
| ks 10.1 | 513 | 1,91 | oz 19.3 | 87,5 | 1,95 |
| ks 22.1 | 52 | 1,72 | oz 14.2 | 967,2 | 1,7 |
| ks 23.2 | 51,1 | 1,97 | oz 20.3 | 616,6 | 1,85 |
| ks 27.2 | 143,5 | 1,9 | oz 20.6 | 236 | 1,83 |
| ks 30.5 | 200,2 | 1,86 | oz 23.3 | 20,8 | 1,48 |
| ks 46.1 | 46,8 | 1,91 | oz 34.3 | 74,8 | 1,94 |
| ks 46.3 | 295 | 1,79 | oz 35.5 | 454 | 1,91 |
| ks 46.4 | 905,5 | 1,94 | oz 39.1 | 49,4 | 1,97 |
| ks 46.6 | 144,3 | 1,75 | oz 40.5 | 244,5 | 1,89 |
| ks 33.1 | 233,6 | 1,84 | oz 41.3 | 93,4 | 1,83 |
| | | | oz 45.4 | 166,1 | 1,89 |
| | | | oz 47.1 | 316,7 | 1,94 |

4.2. Promjene genske strukture populacija *Cryphonectria parasitica*

Genska raznolikost *C. parasitica* povećala se na području Kašta dok se na području Ozlja smanjila unazad pet godina. Shannonov indeks raznolikosti je na području Kašta 2014. g. iznosio 1,67 dok je u 2019. g. porastao na 2,04 (Tablica 3.). Na području Ozlja Shannonov indeks raznolikosti je 2014. g. iznosio 1,98 dok je 2019. godine pao na 1,50. Broj detektiranih vc tipova se tijekom godina povećao s 8 na 12 na području Kašta, dok se na području Ozlja smanjio s 14 na 10. Ujednačenost je neznatno porasla u populaciji na području Kašta s 0,80 na 0,82 dok se na području Ozalja smanjila s 0,75 na 0,65, što znači da se brojnost i raznolikost vc tipova nije značajno promjenila (Tablica 3.).

Tablica 3. Raznolikost populacija *Cryphonectria parasitica* na području Kašta i Ozlja, podaci iz 2014. prema (Ježić i sur., 2021)

| Godina uzorkovanja | Kašt | | | | | Ozalj | | | | |
|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | N ^a | vc ^b | HV (%) ^c | H ^d | e ^e | N ^a | vc ^b | HV (%) ^c | H ^d | e ^e |
| 2014 | 34 | 8 | 35,3 | 1,67 (1,25-1,87) | 0,66 (0,47-0,81) | 36 | 14 | 33,3 | 1,98 (1,40-2,2) | 0,51 (0,46-0,71) |
| 2019 | 40 | 12 | 30 | 2,04 (1,64-2,21) | 0,64 (0,54-0,77) | 58 | 10 | 34,5 | 1,50 (1,14-1,74) | 0,45 (0,36-0,57) |

^a Broj izolata

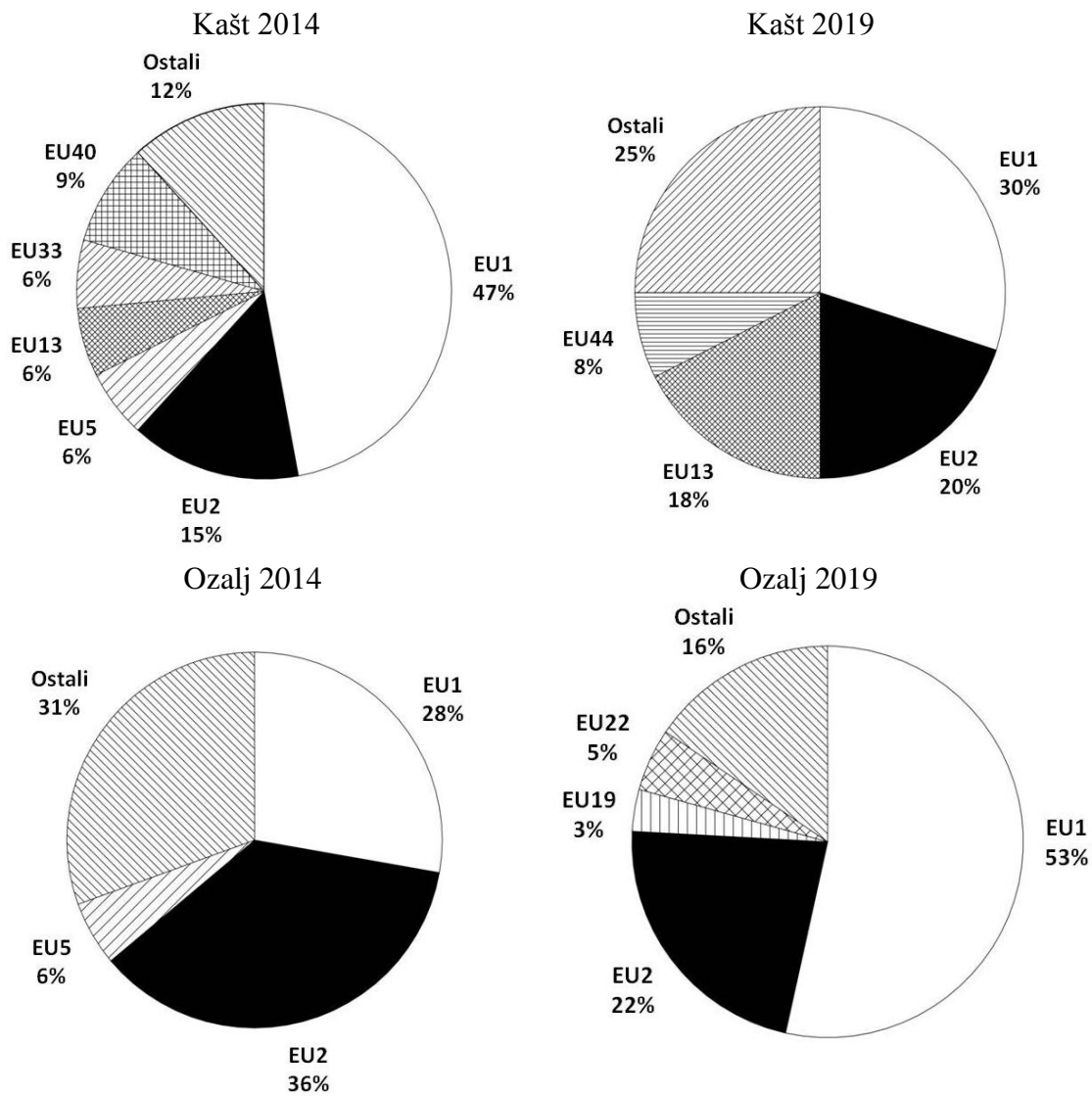
^b Broj tipova vegetativne kompatibilnosti (vc)

^c Udio uzoraka zaraženih *Cryphonectria hypovirusom 1*

^d Shannonov indeks (95% interval pouzdanosti u zagradama)

^e Ujednačenost (95% interval pouzdanosti u zagradama)

U 2014. g. najzastupljeniji vc genotipovi u obje populacije bili su EU1 i EU2, što se tijekom pet godina nije promijenilo (Slika 6.). U populaciji Kašta zabilježeno je osam novih vc tipova: EU7, EU14, EU15, EU21, EU22, EU24, EU29 i EU44, dok su u populaciji Ozlja zabilježena dva nova vc tipa: EU19 i EU22. Tri vc tipa su po prvi put zabilježena na području Republike Hrvatske: EU33, EU39 i EU40. Potpuni pregled vc tipova po populacijama i po godinama prikazan je u Tablici 4.



Slika 6. Promjena zastupljenosti dominantnih vc tipova u Kaštu i Ozlju između 2014. i 2019. godine. Vc tipovi kojima pripadaju jedan ili dva pronađena izolata (<5% ukupnog broja uzoraka) predstavljaju kategoriju „Ostali“.

Tablica 4. Pregled vc tipova i njihova zastupljenost u populacijama Kašta i Ozlja u 2014. i 2019. godini

| Vc tip | Ozalj 2014 | | Ozalj 2019 | | Kašt 2014 | | Kašt 2019 | |
|--------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | N ^a | % | N ^a | % | N ^a | % | N ^a | % |
| EU1 | 10 | 27,8 | 31 | 53,5 | 16 | 47,1 | 12 | 30 |
| EU2 | 13 | 36,1 | 13 | 22,4 | 5 | 14,7 | 8 | 20 |
| EU3 | 1 | 2,8 | 1 | 1,7 | | | | |
| EU5 | 2 | 5,6 | - | - | 2 | 5,9 | - | - |
| EU7 | | | | | - | - | 1* | 2,5 |
| EU11 | 1 | 2,8 | - | - | | | | |
| EU12 | 1 | 2,8 | - | - | 1 | 2,9 | - | - |
| EU13 | 1 | 2,8 | 2 | 3,5 | 2 | 5,9 | 7 | 17,5 |
| EU14 | 1 | 2,8 | 1 | 1,7 | - | - | 1* | 2,5 |
| EU15 | | | | | - | - | 2* | 5 |
| EU17 | 1 | 2,8 | 2 | 3,5 | 3 | 8,8 | 2 | 5 |
| EU19 | - | - | 2* | 3,5 | | | | |
| EU21 | 1 | 2,8 | 1 | 1,7 | - | - | 1* | 2,5 |
| EU22 | - | - | 3* | 5,2 | - | - | 1* | 2,5 |
| EU24 | | | | | - | - | 1* | 2,5 |
| EU28 | 1 | 2,8 | 2 | 3,5 | | | | |
| EU29 | | | | | - | - | 1* | 2,5 |
| EU30 | 1 | 2,8 | - | - | | | | |
| EU33 | | | | | 2** | 5,9 | - | - |
| EU39 | 1** | 2,8 | - | - | | | | |
| EU40 | 1** | 2,8 | - | - | 3** | 8,8 | - | - |
| EU44 | | | | | - | - | 3* | 7,5 |
| ukupno | 36 | | 58 | | 34 | | 40 | |

^a Broj vc tipova

* vc tipovi koji su prvi put zabilježeni u 2019. godini

** vc tipovi koji su prvi put zabilježeni na području RH

Unatoč promjenama u indeksima raznolikosti populacija – porast raznolikosti u Kaštu i smanjenje u Ozlju, populacije se nisu značajno promijenile između 2014. i 2019. g. Među svim uspoređenim populacijama Kašta i Ozlja iz 2014. i 2019. g. prema Kruskal-Wallisovom testu nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti pojedinih vc tipova: χ^2 : 1,004, p-vrijednost 0,791. Osim toga, prema Mann-Whitneyevom testu među pojedinim parovima uspoređenih populacija, unatoč promjenama u zastupljenosti pojedinih vc tipova, nisu primjećene statistički značajne razlike (Tablica 5.).

Tablica 5. Rezultati Mann-Whitneyevog testa za utvrđivanje značajne razlike u distribuciji i frekvenciji vc tipova između populacija Kašta i Ozlja u 2014. i 2019. g..

| Uspoređene populacije | Mann-Whitney (U) | Mann-Whitney (p-vrijednost) |
|------------------------|------------------|-----------------------------|
| Kašt 2014 i Ozalj 2014 | 121 | 0,7993 |
| Kašt 2014 i 2019 | 117 | 0,6832 |
| Ozalj 2014 i 2019 | 107 | 0,4259 |
| Ozalj 2019 i Kašt 2019 | 107 | 0,4305 |

4.3. Promjena prevalencije hipovirulentnih izolata *Cryphonectria parasitica*

U populaciji Kašta prevalencija CHV1 pala je s 35,3% na 30% između 2014. g. i 2019.g., dok je u Ozlju u istom periodu prevalencija neznatno porasla s 33,3% na 34,5% (Tablica 3.). Prema Kruskal-Wallisovom testu razlike u distribuciji zaraženih i nezaraženih izolata među različitim vc tipovima nisu bile značajne: χ^2 : 8,772, p-vrijednost 0,1863. Osim toga, uspoređivanjem distribucije određenih vc tipova između svih hipovirulentnih uzoraka populacija Kašta i Ozlja 2014. i 2019. g. također nisu utvrđene razlike. Također, nije uočena promjena u distribuciji hipovirulentnih izolata među vc tipovima u pojedinim populacijama između 2014. i 2019. g. (Tablica 6.).

Tablica 6. Rezultati Mann-Whitneyjevog testa za utvrđivanje značajne razlike u distribuciji vc tipova između ukupnog broja prikupljenih izolata i hipovirulentnih izolata u populacijama Kašta i Ozlja tijekom 2014. i 2019. godine.

| Uspoređene populacije | Mann-Whitney (U) | Mann-Whitney (p-vrijednost) |
|------------------------------------|------------------|-----------------------------|
| Kašt 2014 N^a i HV ^b | 105 | 0,3292 |
| Kašt 2019 N^a i HV ^b | 114 | 0,5964 |
| Ozalj 2014 N^a i HV ^b | 96 | 0,2122 |
| Ozalj 2019 N^a i HV ^b | 83 | 0,05892 |
| Kašt HV 2014 i 2019 | 111 | 0,4609 |
| Ozalj HV 2014 i 2019 | 106 | 0,3062 |

^a Ukupan broj izolata

^b Broj hipovirulentnih izolata

5. RASPRAVA

Broj detektiranih tipova vegetativne kompatibilnosti (vc tipova) u populaciji Kašta porastao je s osam na 12, dok se u Ozlju smanjio s 14 na 10. U populaciji Ozlja zabilježeno je osam novih vc tipova, dok su u populaciji Kašta zabilježena dva nova vc tipa. Ukupno 16 vc tipova je detektirano u obje populacije, a 8 njih je zabilježeno prvi put u 2019. g., od kojih su tri vc tipa u potpunosti nova za područje Republike Hrvatske, što podiže broj detektiranih vc tipova na 34 (Ježić i sur., 2018; Krstin i sur., 2008; Mlinarec i sur., 2018). Obje populacije genski su raznolike i oba alela (-1 i -2) su redovito prisutna na pet od šest *vic* lokusa u svim populacijama, te je barem dio novih (otprije nepoznatih, odnosno pronađenih u ovom istraživanju) vc tipova vjerojatno rezultat rekombinacije uslijed spolnog razmnožavanja. Ne može se isključiti niti utjecaj migracija, odnosno širenje određenih vc tipova iz susjednih zemalja. Stoga je u budućnosti moguće očekivati pojavu svih 64 vc tipova, bilo zbog rekombinacija prisutnih sojeva gljive *Cryphonectria parasitica*, bilo zbog migracija novih izolata iz susjednih zemalja (Cortesi i Milgroom, 1998; Ježić i sur., 2012; Peters i sur., 2014). Slično istraživanje provedeno u periodu od 10 g. na području Buja i Hrvatske Kostajnice (Ježić i sur., 2018) pokazalo je značajnu promjenu Shanonovog indeksa raznolikosti u obje populacije, dok je ujednačenost ostala gotovo nepromijenjena. Ti rezultati ukazuju da se bogatstvo (brojnost) vc tipova povećalo, no to se nije odrazilo na njihovu opću distribuciju u populaciji. Kako se ujednačenost populacija nije značajno promijenila između 2014. g. i 2019. g. može se zaključiti da novi vc tipovi nisu imali značajan utjecaj na promjenu strukture populacija. Izostanak značajne promjene raznolikosti u ovom istraživanju može se pripisati 5 godina kraćem intervalu uzorkovanja, ali i usporavanju porasta raznolikosti populacije tijekom godina, koje je već prije primijećeno u nešto starijim populacijama (Ježić i sur. 2021).

U obje populacije vc tipovi EU1 i EU2 su i dalje najzastupljeniji vc tipovi u 2019. godini. To je očekivano s obzirom na to da su na dvije lokacije u relativnoj blizini Kašta, EU1 i EU2 predstavljali 80% (Gornji Suhor, ~7 km zračne linije), odnosno 77% (Brežice, ~28 km zračne linije) udjela vc tipova (Krstin i sur., 2011). U susjednim državama (i nešto udaljenijim populacijama) situacija je vrlo slična: u Bosni i Hercegovini najzastupljeniji vc tipovi su EU1, EU2, EU12 i EU13 (Trestic i sur., 2001), u Sloveniji EU1, EU2 i EU13 (Krstin i sur., 2011), u

Mađarskoj EU1, EU6, EU12, EU13 (Radocz, 2001) i u Italiji EU2, EU1 i EU5 (Cortesi i Milgroom, 1998). Slična situacija zabilježena je u Bujama i Hrvatskoj Kostajnici gdje su najzastupljeniji vc tipovi također EU1 i EU2. Važno je istaknuti da je u Bujama zastupljenost vc tipa EU13 prelazila 10%, pošto je i u ovom istraživanju najznačajniji porast zastupljenosti nekog vc tipa bio upravo kod EU13 na području Kašta čija je zastupljenosti sa 6% u 2014. g. porasla na 18% u 2019. g..

Zbog razlike u alelima samo kod *vic2* lokusa, EU1 (2212-22) i EU2 (2112-22) oni mogu uslijed spolnog razmnožavanja i rekombinacije stvoriti samo potomstvo EU1 i EU2 vc tipa što djelomično objašnjava zašto ta dva vc tipa perzistiraju na vrlo širokom istraživanom području (Tablica 7.). Recentna istraživanja na području centralne Europe pokazuju sličnu dinamiku populacija uz rijetke iznimke: emergencija novih genotipova koji značajno ne mijenjaju strukturu populacija, dok najzastupljeniji genotipovi perzistiraju kroz godine (Ježić i sur. 2021.; Peters i sur., 2014).

Tablica 7. Vic genotipovi i pripadajući EU tipovi (Cortesi i Milgroom, 1998)

| <i>vic</i> genotip | EU tip | <i>vic</i> genotip | EU tip | <i>vic</i> genotip | EU tip | <i>vic</i> genotip | EU tip |
|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| 2212-22 | EU1 | 2112-11 | EU17 | 2222-11 | EU33 | 1122-21 | EU49 |
| 2112-22 | EU2 | 2211-21 | EU18 | 1121-11 | EU34 | 1121-12 | EU50 |
| 2212-12 | EU3 | 1211-21 | EU19 | 2222-12 | EU35 | 2221-12 | EU51 |
| 1112-22 | EU4 | 1111-22 | EU20 | 2121-11 | EU36 | 1221-12 | EU52 |
| 2211-22 | EU5 | 2211-12 | EU21 | 1221-11 | EU37 | 1121-21 | EU53 |
| 2111-22 | EU6 | 2112-21 | EU22 | 2122-22 | EU38 | 1222-22 | EU54 |
| 2212-21 | EU7 | 2111-12 | EU23 | 2122-21 | EU39 | 1221-22 | EU55 |
| 1112-21 | EU8 | 1211-12 | EU24 | 1122-11 | EU40 | 1122-12 | EU56 |
| 2111-11 | EU9 | 1212-21 | EU25 | 2222-21 | EU41 | 2121-21 | EU57 |
| 2122-11 | EU10 | 1212-22 | EU26 | 1111-11 | EU42 | 2121-12 | EU58 |
| 1212-11 | EU11 | 1111-12 | EU27 | 1111-21 | EU43 | 2121-22 | EU59 |
| 1112-11 | EU12 | 2212-11 | EU28 | 2222-22 | EU44 | 2221-22 | EU60 |
| 1211-11 | EU13 | 1112-12 | EU29 | 1222-11 | EU45 | 1121-22 | EU61 |
| 2112-12 | EU14 | 1212-12 | EU30 | 2221-11 | EU46 | 1122-22 | EU62 |
| 2211-11 | EU15 | 1211-22 | EU31 | 1222-21 | EU47 | 1221-21 | EU63 |
| 2111-21 | EU16 | 2122-12 | EU32 | 1222-12 | EU48 | 2221-21 | EU64 |

Pojava manje zastupljenih EU-tipova, izuzev EU44 koji posjeduje alel *vic-3-2*, neuobičajena za područje Republike Hrvatske, može se najlakše objasniti spolnim razmnožavanjem dvaju čestih EU-tipova: EU2 (2112-22) i EU13 (1211-11) koji su heteroalelični na ostalih pet *vic* lokusa (Cortesi i Milgroom, 1998). Pojava alela *vic-3-2* je najvjerojatnije rezultat migracije izolata francuskih populacija, u kojima je ovaj alel redovito prisutan, preko centralne Europe i Slovenije gdje i jest prvi put zabilježen 2009. godine (Peters i sur., 2014; Robin i sur., 2009).

Ovo istraživanje pokazalo je mali pad u prevalenciji hipovirulencije u populaciji Kašta s 35,3% u 2014. g. na 30% u 2019. g. dok je u Ozlju u istom razdoblju prevalencija hipovirulencije neznatno porasla s 33% na 34,5%. Trend stabiliziranja prevalencije hipovirulencije na ~30% zabilježili su i (Ježić i sur., 2018) u drugim hrvatskim populacijama gljive *C. parasitica*: u Bujama se prevalencija hipovirulencije povećala s 12,7% na 19,5%, a u Hrvatskoj Kostajnici se smanjila s 50,8% na 29,9%. Mala promjena prevalencije CHV1 je u skladu s očekivanjima uzevši u obzir da se struktura ni jedne populacije nije značajno promijenila, a smatra se da je efikasnost širenja ovoga virusa kroz populaciju ograničena, između ostaloga i raznolikošću *vc* tipova populacije (Milgroom i Cortesi, 2004). Interesantno je primijetiti da je u Švicarskoj, unatoč velikoj raznolikosti domaćinskih populacija gljive *C. parasitica*, prevalencija CHV1 nešto veća te se uglavnom kreće oko ili čak iznad 50% (Ježić i sur., 2021). Mann-Whitneyjev test je pokazao da se distribucija *vc* tipova među hipovirulentnim izolatima u obje populacije također nije značajno promijenila tijekom 5 godina, a isto vrijedi i za distribuciju *vc* tipova između ukupnog broja izolata i hipovirulentnih izolata. Kako se virus unutar populacije širi horizontalno među jedinkama istog *vc* tipa svaka pojava novog *vc* tipa predstavlja novu barijeru u njegovom širenju. Zato populacije s malim promjenama u distribuciji i zastupljenosti pogoduju prijenosu CHV1 (Bégueret i sur., 1994; Cortesi i Milgroom, 1998; Leslie, 1993). Nedostatak značajnih promjena ukazuje na to je dinamika između *Cryphonectria hypovirusa 1* i *C. parasitica* u ovim populacijama za sada u ravnoteži.

6. ZAKLJUČAK

- Raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti populacija Kašta i Ozlja nije se značajno promjenila od 2014 do 2019. godine.
- Ujednačenost tipova vegetativne kompatibilnosti populacija Kašta i Ozlja nije se značajno promjenila od 2014 do 2019. godine.
- U populaciji Ozlja detektirano je 8, a u populaciji Kašta 2 nova genotipa u 2019. godini
- U populacijama Kašta i Ozlja u 2019. godini detektirana su 3 nova genotipa na području Republike Hrvatske: EU33, EU39 i EU40.
- Prevalencija hipovirulencije populacija Kašta i Ozlja od 2014. do 2019. godine pokazala je malu promjenu ($\leq 5,3\%$).
- Distribucija tipova vegetativne kompatibilnosti populacija Kašta i Ozlja među hipovirulentim izolatima se nije značajno promijenila.

7. LITERATURA

- Anagnostakis, S.L. (1995). The Pathogens and Pests of Chestnuts. In *Advances in Botanical Research*, J.A. Callow, J.H. Andrews i I.C. Tommerup, eds. (Academic Press), pp. 125–145.
- Anagnostakis, S.L. (1988). *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology* 6, 123–136.
- Anagnostakis, S.L. i Day P.R. (1979). Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69, 1226–1229.
- Bégueret, J., Turcq, B. i Clavé, C. (1995). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. *Trends in Genetics : TIG* 10, 441–446.
- Bouneb, M., Turchetti, T., Nannelli, R., Roversi, P.F., Paoli, F., Danti, R. i Simoni, S. (2016). Occurrence and transmission of mycovirus *Cryphonectria hypovirus 1* from dejecta of *Thyreophagus corticalis* (Acari, Acaridae). *Fungal Biology* 120, 351–357.
- Conedera, M., Manetti, M.C., Giudici, F. i Amorini, E. (2004). Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia Mediterranea* 30, 179–193.
- Corredoira, E., Martínez, M.T., Cernadas, M.J. i San José, M.C. (2017). Application of Biotechnology in the Conservation of the Genus *Castanea*. *Forests* 8, 394.
- Cortesi, P. i Milgroom, M.G. (1998). Genetics of Vegetative Incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2988–2994.
- Cortesi, P., McCulloch, C.E., Song, H., Lin, H. i Milgroom, M.G. (2001). Genetic Control of Horizontal Virus Transmission in the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159, 107–118.
- Dutech, C., Barrès, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M.G. i Ravigné, V. (2012). The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Molecular Ecology* 21, 3931–3946.
- Fernández-López J i Alía R (2003). Technical guidelines for genetic conservation and use for chestnut (*Castanea sativa*). *International Plant Genetic Resources Institute* 6.
- Filipčić, A. (1998). Klimatska regionalizacija Hrvatske po W. Köppenu za standardno razdoblje 1961.-1990. u odnosu na razdoblje 1931.-1960. *Acta Geographica Croatica* 33, 1–15.
- Gobbin, D., Hoegger, P.J., Heiniger, U. i Rigling, D. (2003). Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Res* 97, 39–46.

- Gonthier, P. i Nicolotti, G. (2013). Infectious Forest Diseases (CABI).
- Griffin, G.J., Eisenback, J.D. i Oldham, K. (2012). Widespread distribution of fungivorous aphelenchoides spp. in blight cankers on American chestnut trees. *Journal of Nematology* 44, 316–320.
- Halambek M. (1986). Istraživanje virulentnosti gljive *Endothia parasitica* Murr./And. uzročnika raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). Šumarski Fakultet Zagreb, Phd Thesis.
- Idžojić, M., Zebec, M., Poljak, I. i Medak, J. (2009). Variation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Croatia according to the morphology of fruits. In Sauteria, Schriftenreihe Für Systematische Botanik, Floristik Und Geobotanik, pp. 323–333.
- Ježić, M., Krstin, L., Rigling, D. i Ćurković-Perica, M. (2012). High diversity in populations of the introduced plant pathogen, *Cryphonectria parasitica*, due to encounters between genetically divergent genotypes. *Molecular Ecology* 21, 87–99.
- Ježić, M., Mlinarec, J., Vuković, R., Katanić, Z., Krstin, L., Nuskern, L., Poljak, I., Idžojić, M., Tkalec, M. i Ćurković-Perica, M. (2018). Changes in *Cryphonectria parasitica* Populations Affect Natural Biological Control of Chestnut Blight. *Phytopathology*® 108, 870–877.
- Ježić, M., Schwarz J.M., Prospero, S., Sotirovski, K., Risteski, M., Ćurković-Perica, M., Nuskern, L., Krstin, Lj., Katanić, Z., Maleničić, E. i suradnici (2021). Temporal and spatial genetic population structure of *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus across an invasive range of chestnut blight in Europe.
- Karadžić, D., Radulović, Z., Sikora, K., Stanivuković, Z., Ćurguz, V.G., Oszako, T. i Milenković, I. (2019). Characterisation and pathogenicity of *Cryphonectria parasitica* on sweet chestnut and sessile oak trees in Serbia. *Plant Protection Science* 55 (2019), 191–201.
- Kišpatić, J. (1956). Rak kestenove kore (*Endothia parasitica* Anders.). *Zavod Za Zaštitu Bilja, Uput. Iz Zaštite Bilja* 19, 1–12.
- Krebs, P., Conedera, M., Pradella, M., Torriani, D., Felber, M. i Tinner, W. (2004). Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): An extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* 13, 145–160.
- Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M. i Perica, M.Ć. (2008). Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* 57, 1086–1096.
- Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D. i Ćurković-Perica, M. (2011). Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* 60, 752–761.
- Lang, P., Dane, F. i Kubisiak, T. L. (2006). Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast trnT-L-F sequence data. *Tree Genet. Genom* 2, 132–139.

- Leslie, J.F. (1993). Fungal Vegetative Compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31, 127–150.
- Marra, R. i Milgroom, M. (2001). The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: Selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86, 134–143.
- McGuire, I.C., Marra, R.E. i Milgroom, M.G. (2004). Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* 41, 521–533.
- Milgroom, M.G., Sotirovski, K., Spica, D., Davis, J.E., Brewer, M.T., Milev, M. i Cortesi, P. (2008). Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 17, 4446–4458.
- Mlinarec, J., Jezic, M., Čosić, J. i Ćurković-Perica, M. (2018). Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in populations of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. *Plant Pathology* 67.
- Nuss, D. L. (1992). Biological control of chesnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 56.
- Peters, F.S., Bußkamp, J., Prospero, S., Rigling, D. i Metzler, B. (2014). Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. *Fungal Biology* 118, 193–210.
- Radocz, L. (2001). Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. *For. Snow Landsc. Res* 76, 368–372.
- Rigling, D. i Prospero, S. (2017). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology* 19.
- Robin, C., Anziani, C. i Cortesi, P. (2000). Relationship Between Biological Control, Incidence of Hypovirulence i Diversity of Vegetative Compatibility Types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90, 730–737.
- Robin, C., Capdevielle, X., Martin, M., Traver, C. i Colinas, C. (2009). *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58, 527–535.
- Russin, J.S., Shain, L. i Nordin, G.L. (1984). Insects as carriers of virulent and cytoplasmic hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus. *J. Econ. Entomol* 77, 838–846.
- Short, D.P.G., Double, M., Nuss, D.L., Stauder, C.M., MacDonald, W. i Kasson, M.T. (2015). Multilocus PCR Assays Elucidate Vegetative Incompatibility Gene Profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5736–5742.
- Suzuki, N. i Hillman, B.I. (2004). Viruses of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in Virus Research* 63, 423–472.

Trestic, T., Uscuplic, M., Colinas, C., Rolland, G., Giraud, A. i Robin, C. (2001). Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. For. Snow Landsc. Res 76, 391–396.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Lovro Ogresta
e-mail: logresta@stud.biol.pmf.hr

Obrazovanje

2018. – 2021. Diplomski studij Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb

2014. – 2018. Preddiplomski studij Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb

2010.– 2014. Gimnazija Dubrovnik, Dubrovnik

Radno iskustvo

Ak. godina 2017./18. Demonstrator na kolegiju alge i gljive

Ak. Godina 2016./17. Demonstrator na kolegiju Protista

Ak. godina 2015./16. Demonstrator na kolegiju Protista

Listopad 2020.-Lipanj 2020. Erasmus + stručna praksa na odjelu za biomolekularnu fiziku na Sveučilištu Babes-Bolyai

- Rad s različitim spektrometrijskim analitičkim metodama

Ožujak 2018. - 2019. Zoološki vrt Zagreb

- Edukator i animator

Listopad 2016.-2018. Praksa na odjelu za znanstvena istraživanja klinike za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević

- Rad s infektivnim materijalom i metodama molekularne dijagnostike; Obrada makroskopskih uzoraka, izolacija virusne RNA, rad s PCR metodama, obrada rezultata

Lipanj 2015.-2016. Praksa u botaničkom zavodu PMF-a

- Rad na području algologije kopnenih voda; terensko uzorkovanje i laboratorijska obrada materijala, rad na inverznim i standardnim svjetlosnim mikroskopima, determinacija slatkovodnih algi

Ljeto 2015./2016. Praksa u institutu za more i priobalje Dubrovnik

- Rad u području populacijske gentike; Izolacija DNA iz životinjskih stanica, osmišljavanje prajmera, rad s PCR metodama, rads genomskim bazama podataka
- Rad na ekologiji planktona; terensko uzorkovanje i laboratorijska obrada materijala, determinacija, proizvodnja hranjivih medija, izolacija i uzgoj planktonskih kultura.

Poznavanje jezika

Materinski jezik: Hrvatski

Strani jezici:

| jezik | slušanje | čitanje | govorna interakcija | govorna produkcija | pisanje |
|----------|----------|---------|---------------------|--------------------|---------|
| Engleski | C1 | C1 | C1 | C1 | C1 |

Komunikacijske i društvene vještine

- razvijene komunikacijske i prezentacijske vještine stečene kroz obrazovanje te prilikom vođenja raznih radionica i izvođenja demonstratura
- sklonost timskom radu i suradnji s ljudima te učenju novih znanja i vještina

Ostale vještine

- dobra računalna pismenost te vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)
- položen tečaj za NAUI Advanced scuba diver
- dozvola za upravljanje brodicom