Prevalencija virusa Cryphonectria hypovirus 1 u gljivi Cryphonectria parasitica na području Skadra i Boke Kotorske

Milanović-Litre, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:639034

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Milanović-Litre

Prevalencija virusa *Cryphonectria hypovirus 1* u gljivi *Cryphonectria parasitica* na području Skadra i Boke kotorske

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

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

Zahvale

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perici na vodstvu, potpori i stručnim savjetima kojima je uvelike olakšala izradu ovog diplomskog rada.

Posebno hvala dragoj neposrednoj voditeljici dr. sc. Luciji Nuskern Karaici na njenom trudu, uloženom vremenu i motivaciji te pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, konstantnoj podršci i vjetru u leđa.

I hvala Tebi, na svemu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Prevalencija virusa *Cryphonectria hypovirus 1* u gljivi *Cryphonectria parasitica* na području Skadra i Boke kotorske

Marija Milanović-Litre

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rak kore kestena biljna je bolest uzrokovana gljivom *Cryphonectria parasitica.* Rast gljive uzrokuje rane na kori pitomog kestena zbog čega odumiru zaražene grane i debla. U Europi, RNA virus iz porodice *Hypoviridae* pod imenom *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) važan je čimbenik u biološkoj kontroli bolesti. Virus CHV1 izaziva hipovirulenciju – smanjuje virulentnost, sporulaciju i spolno razmnožavanje gljive *C. parasitica* te na taj način omogućuje oporavak stabala. Prvi i izuzetno važan korak za uspješnu biološku kontrolu je procjena trenutnog stanja i prirodne prevalencije virusa u određenoj populaciji što je u skladu s glavnim ciljem ovog istraživanja. Prevalencija virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica,* određena metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR), u populacijama s područja Boke kotorske iznosi 18,6%, a u drugoj istraživanoj populaciji s područja Skadra 33,33%. Saznanje o prisutnosti hipovirulencije u istraživanim populacijama pruža potencijal za biološku kontrolu bolesti, bilo prirodnu ili antropogenu.

(34 stranice, 8 slika, 5 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biološka kontrola, detekcija virusa, hipovirulencija, rak kore kestena

Voditelj: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica
Neposredni voditelj: dr. sc. Lucija Nuskern Karaica

Ocjenitelji:
Prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica
Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Prevalence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the fungus *Cryphonectria parasitica* from Skadar and Boka kotorska region

Marija Milanović-Litre

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Chestnut blight is a plant disease caused by the fungus *Cryphonectria parasitica*. The growth of the fungus causes wounds on the bark of the sweet chestnut leading to wilting of branches and trunks. In Europe, RNA virus from the family *Hypoviridae*, *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), acts as a biological control agent of chestnut blight. CHV1 induces hypovirulence – reduces virulence, sporulation and sexual reproduction of *C. parasitica* which leads to chestnut recovery. The first and extremely important step for successful biological control is the assessment of the current state and natural prevalence of the virus in a particular fungal population, which is in line with the main goal of this research. The prevalence of CHV1, determined by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), is 18.6% and 33.33% in Boka kotorska and Skadar population, respectively. Knowledge of the presence of natural hypovirulence in studied populations could have a positive impact on biological control of chestnut blight, whether natural or human-mediated.

(34 pages, 8 figures, 5 tables, 40 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: biological control, chestnut blight, hypovirulence, virus detection

Supervisor: Prof. Mirna Ćurković Perica
Co-supervisor: Lucija Nuskern Karaica, PhD

Reviewers:
Prof. Mirna Ćurković Perica
Asst. Prof. Mirela Sertić Perić
Assoc. Prof. Draginja Mrvoš-Sermek

Thesis accepted: September 15, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Rak kore kestena 1
1.1.1. Uzročnik bolesti 1
1.1.2. Simptomi bolesti 1
1.2. Mikovirusi porodice *Hypoviridae* 3
1.2.1. Porodica *Hypoviridae* 3
1.2.2. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) 3
1.3. Biološka kontrola raka kore kestena 7
1.4. Važnost molekularne detekcije virusa CHV1 9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. Popis kemikalija 11
3.2 Izolati gljive *Cryphonectria parasitica* korišteni u istraživanju 12
3.3. Priprema hranidbene podloge i sterilnog celofana 14
3.4. Uzgoj eksperimentalnih kultura 14
3.5. Dokazivanje prisutnosti virusa CHV1 u tkivu gljive *C. parasitica* 15
3.5.1. Izolacija RNA 15
3.5.2. Reverzna transkripcija (RT) 15
3.5.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 16
3.5.4. Elektroforeza u agaroznom gelu 18
3.6. Obrada podataka 18
4. REZULTATI 19
4.1. Prevalencija virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* s područja Crne Gore 19
4.2. Korelacija morfologije gljive *C. parasitica* i prisutnosti virusa CHV1 21
4.3. Korelacija između prisutnosti virusa CHV1 u gljivi *C. parasitica* i aktivnosti raka 23
5. RASPRAVA 24
6. ZAKLJUČAK 28
7. LITERATURA 29
8. ŽIVOTOPIS 34

1. UVOD

1.1. Rak kore kestena

1.1.1. Uzročnik bolesti

Rak kore kestena je biljna bolest koju uzrokuje fitopatogena gljiva mješinarka *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Početkom 20. stoljeća unesena je iz svog prirodnog areala, istočne Azije, u Sjevernu Ameriku i Europu gdje se proširila kroz populacije američkog kestena [*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.] i europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) uzrokujući velika oštećenja stabala (Anagnostakis 1987). S lokalnim vrstama kestena istočne Azije to nije slučaj jer su one otpornije na infekciju zahvaljujući koevoluciji sa spomenutim patogenom (Milgroom i Cortesi 2004). U Americi je bolest prvi put zabilježena 1904. godine na području New Yorka i kroz nekoliko desetljeća je gotovo u potpunosti uništila američki kesten, do tada dominantnu drvenastu vrstu na tom području (Anagnostakis 1987). U Europi je bolest opažena 1938. godine na sjeveru Italije odakle se širila u svim populacijama europskog pitomog kestena (Biraghi 1946). Ova gljiva mješinarka postala je klasičan primjer unesenog patogena koji ima potencijal izazvati izrazito štetne posljedice na autohtonim vrstama drveća (Anagnostakis 1987).

1.1.2. Simptomi bolesti

Ulaskom askospore (spolne spore) ili konidiospore (nespolne spore) kroz rane na kori debla ili grana, gljiva *C. parasitica* zaražava stablo kestena. Klijanjem spore razvija se micelij koji se intenzivno širi ispod kore stabla uzrokujući oštećenje kambija i sprječavanje transporta vode i hranjivih tvari (Heiniger i Rigling 1994). Na mjestu infekcije nastaje karakteristično uleknuće, takozvani rak (Slika 1A), koji naposljetku može uzrokovati odumiranje debla iznad mjesta infekcije ili sušenje pojedinih grana, ovisno na kojem dijelu stabla je došlo do infekcije (Rigling i Prospero 2018). Mlađa stabla su posebno osjetljiva na infekciju pa se bolest vrlo brzo prepozna po površinskom narančasto do crveno-smeđem oštećenju kore, nastalim pukotinama i oljuštenoj kori. Na starijim stablima promjene na kori su manje uočljive pa je oboljenje na temelju izgleda kore teško prepoznati sve dok se ne pojave uzdužni rascjepi ispod kojih su vidljiva narančasta plodna tijela gljive (Diller 1965). Osim toga karakteristični simptomi bolesti su i uvenuli listovi koji ne otpadaju s osušenih grana, što predstavlja najizraženiji rani simptom infekcije starijih stabala, kao i stvaranje brojnih mladih izbojaka ispod mjesta zaraze (Slika 1B), iako i ti novonastali izbojci vrlo često također obole i odumiru nakon par godina (Rigling i Prospero 2018).



Slika 1. Simptomi raka kore pitomog kestena. A) Oštećenje na kori pitomog kestena zaraženog gljivom *C. parasitica*. B) Tipičan simptom oboljenja je stvaranje izbojaka ispod mjesta zaraze te uvenuli listovi koji ne otpadaju sa osušenih grana zaraženih virulentnom gljivom. Fotografije snimio doc. dr. sc. Igor Poljak.

Širenje zaraze ne jenjava ni nakon odumiranja čitavog stabla jer gljiva *C. parasitica* prelazi na saprofitski način prehrane i uspješno stvara spore koje su izvor daljnjih infekcija (Prospero i sur. 2006).

Za razliku od populacije američkog kestena koja je gotovo u potpunosti uništena, na području Italije je 1951. godine uočen prirodni oporavak stabala kestena, a rak na takvim stablima se i morfološki razlikovao od tipičnog, aktivnog raka. Molekularnom detekcijom primijećeno je da su izolati takve gljive zaraženi RNA virusom – *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), a ta pojava smanjene virulentnosti gljive uslijed infekcije virusom CHV1 nazvana je hipovirulencija (Hillman i Suzuki 2004).

1.2. Mikovirusi porodice *Hypoviridae*

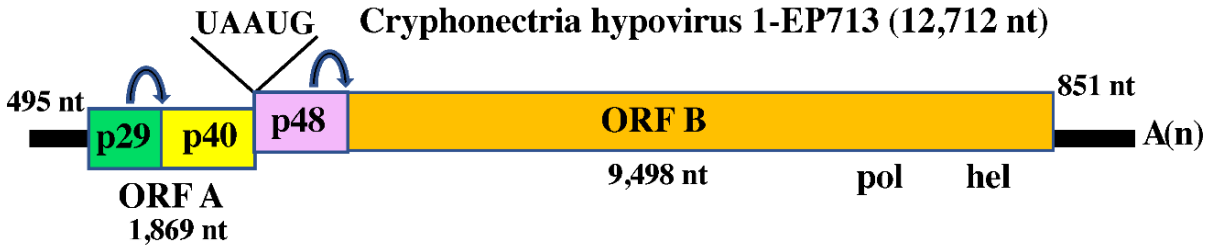
1.2.1. Porodica *Hypoviridae*

Virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) je najistraženija vrsta porodice *Hypoviridae* koja sadrži samo jedan rod – *Hypovirus*. Unutar roda *Hypovirus*, uz spomenutu vrstu CHV1, poznate su još tri vrste – CHV2, CHV3 i CHV4. Iako sve inficiraju fitopatogenu gljivu *C. parasitica* navedene vrste se međusobno razlikuju u organizaciji genoma, sposobnosti utjecaja na domaćina i rasprostranjenosti (Hillman i Suzuki 2004). Osim što su slične po duljini genoma, virusne vrste CHV1 (12.7 kb) i CHV2 (12.5 kb) sadrže i dva otvorena okvira čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*), ORF A i ORF B. S druge strane, vrste CHV3 (9.8 kb) i CHV4 (9.1 kb) imaju kraći genom i samo jedan otvoreni okvir čitanja (Dawe i Nuss 2013). Što se tiče rasprostranjenosti, virus CHV1, izuzev toga što je pronađen u Aziji odakle i potječe, prevladava i u Europi gdje se bilježi kao jedina prisutna vrsta roda *Hypovirus* (Milgroom i Cortesi 2004). Virus je najvjerojatnije unesen u Europu iz Azije zajedno sa svojim domaćinom, gljivom *C. parasitica* (Bryner i sur. 2012). U Sjevernoj Americi dominira virusna vrsta CHV4 dok CHV1 na tim prostorima izostaje, osim na nekoliko mjesta na koja je unesen radi biološke kontrole (Linder-Basso i sur. 2005). Virus CHV2 rasprostranjen je na području Sjeverne Amerike (New Jersey) i Kine, dok CHV3 obitava samo na području Sjeverne Amerike. Za razliku od virusne vrste CHV4 koja ima zanemariv utjecaj na hipovirulenciju, virusne vrste CHV2 i CHV3 također uzrokuju hipovirulentnost gljive *C. parasitica*, međutim, CHV2 ima nizak ekološki fitnes (slabo se širi u prirodnim populacijama), a CHV3 ima slab utjecaj na sporulaciju gljive (Hillman i Suzuki 2004).

1.2.2. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)

CHV1 je gola, jednolančana RNA (ssRNA, od engl. *single-stranded* RNA) iako je prevladavajući oblik u inficiranom miceliju dvolančana RNA (dsRNA, od engl. *double-stranded* RNA) koja se smatra replikativnim intermedijerom (Suzuki i sur. 2018). Ovaj virus nema proteinski omotač (kapsidu), niti strukturne proteine, a ne stvara niti virione – zrele infektivne virusne čestice. Virusna RNA smještena je u membranskim vezikulama u citoplazmi domaćina, fitopatogene gljive *C. parasitica* (Dawe i Nuss 2013). Genom virusa CHV1 veličine je 12,712 kbp i sadrži dva otvorena okvira čitanja, ORF A i ORF B. Kodirajuće domene ORF A i ORF B odvojene su nukleotidnim nizom 5`-UAAUG-3` u kojemu UAA predstavlja stop kodon domene ORF A, dok AUG predstavlja start kodon domene ORF B. Regija ORF A kodira za poliprotein p69 koji se autokatalitički cijepa na proteine p29, čija je uloga smanjenje pigmentacije, sporulacije i akumulacije lakaze, te protein p40 koji pospješuje nakupljanje

virusne RNA. S druge strane, ORF B regija kodira za protein p48, RNA-ovisnu RNA polimerazu i helikazu, dok ostatak produkta ove regije još nije identificiran (Slika 2) (Suzuki i sur. 2018).



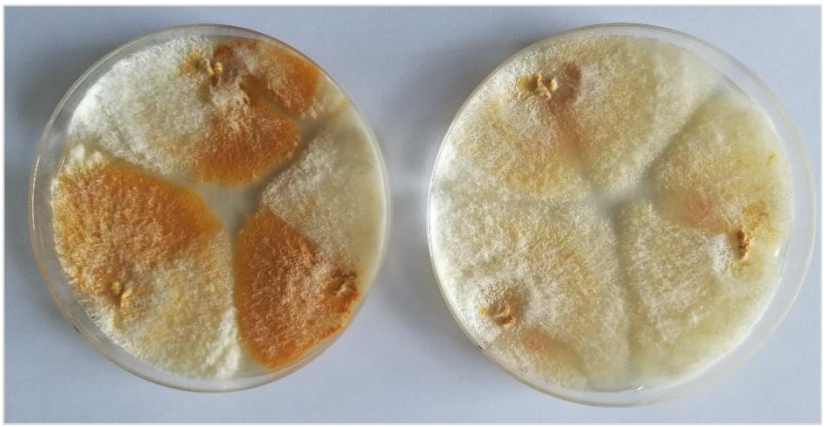
Slika 2. Organizacija genoma virusnog soja *Cryphonectria hypovirus 1*/EP713. ORF A je regija koja kodira proteine p29 i p40, a ORF B kodira protein p48, RNA-ovisnu RNA polimerazu i helikazu, dok ostatak produkta ove regije još nije identificiran. Strelice označavaju mjesto poznate autokatalize (preuzeto iz Suzuki i sur. 2018).

Allemann i sur. (1999) su na temelju razlike u dijelu genoma klasificirali CHV1 na četiri podtipa: talijanski CHV1 – I, dva francuska CHV1 – F1 i CHV1 – F2 te njemačko-španjolski podtip CHV1 – D/E. Naknadno je, sekvenciranjem dviju specifičnih regija virusnog genoma, otkriven gruzijski podtip CHV1 – G u populaciji *C. parasitica* na području Gruzije (Rigling i sur. 2018). Talijanski podtip je najrasprostranjeniji (Gobbin i sur. 2003). Francuski podtipovi su najvirulentniji, dok je talijanski podtip najmanje virulentan. Manja virulentnost slabije utječe na sporulaciju i rast gljive te joj omogućuje rasprostiranje, što rezultira i povećanom stopom širenja virusnog podtipa, a ujedno je to i razlog veće rasprostranjenosti talijanskog podtipa u Europi. Suprotno tome, virulentniji virusni sojevi poput sojeva francuskih podtipova više oslabljuju gljivu i na taj način im je smanjena mogućnost prijenosa u populacijama gljive *C. parasitica*, zbog čega imaju smanjeni ekološki fitnes i rjeđi su u prirodi (Robin i sur. 2010). Ono što je bitno istaknuti jest da održiva biološka kontrola ovisi o širenju jedinki gljive *C. parasitica* zaraženih hipovirusom (Rigling i Prospero 2018).

Virus CHV1 se kroz populacije gljive može širiti na dva načina: vertikalnim i horizontalnim putem. Vertikalno širenje hipovirusa moguće je klijanjem nespolnih spora, konidija. Prijenos virusa spolnim sporama, askosporama, do sada nije zabilježen (Prospero i sur. 2006). Horizontalni prijenos virusa odvija se spajanjem (anastomozom) hifa dviju jedinki gljive. Ovakav način prijenosa je ograničen takozvanim sustavom vegetativne kompatibilnosti (vc, od

engl. *vegetative compatibility*) (Cortesi i sur. 2001). U fitopatogene gljive *C. parasitica* sustav vegetativne kompatibilnosti kontroliran je s najmanje šest međusobno nevezanih *vic* lokusa čiji sastav alela određuje jesu li jedinke gljive međusobno kompatibilne. Naime, za ostvarivanje vegetativne kompatibilnosti i nesmetanog prijenosa virusa citoplazmatskim putem, aleli dviju jedinki gljive se moraju podudarati na svih šest *vic* lokusa. U tom slučaju nakon kontakta dolazi do fuzije hifa i formiranja heterokariona (Milgroom i Cortesi 2004). Jedinke s različitim alelima na jednom ili više *vic* lokusa su vegetativno nekompatibilne. Formiranje anastomoza takvih jedinki dovodi do nastajanja nestabilnog heterokariona i programirane stanične smrti. Iako razlika na lokusu *vic4* ne dovodi do smanjenja frekvencije prijenosa virusa među jedinkama, ipak formiranje anastomoza nekompatibilnih jedinki najčešće vrlo učinkovito smanjuje ili čak sprječava prijenos virusa među jedinkama (Cortesi i sur. 2001).

Ukoliko nekompatibilne gljive rastu zajedno u laboratorijskoj kulturi na području njihovog kontakta formira se stroga baražna linija kao rezultat programirane stanične smrti. Suprotno tome, ako su jedinke kompatibilne formira se heterokarionski micelij, takva anastomoza je stabilna i nema baražne linije (Slika 3) (Biella i sur. 2002).



Slika 3. Analiza prijenosa hipovirusa. Na mjestu kontakta vegetativno nekompatibilnih micelija gljive *C. parasitica* koji rastu jedan do drugoga na krumpirovom dekstroznom agaru (PDA) stvara se baražna linija koja jasno odjeljuje dva tipa micelija (lijevo), dok se miceliji vegetativno kompatibilnih jedinki stapaju i omogućuju prijelaz virusa CHV1 iz hipovirulentnog u virulentni uzorak (desno). Fotografiju snimila dr. sc. Lucija Nuskern Karaica.

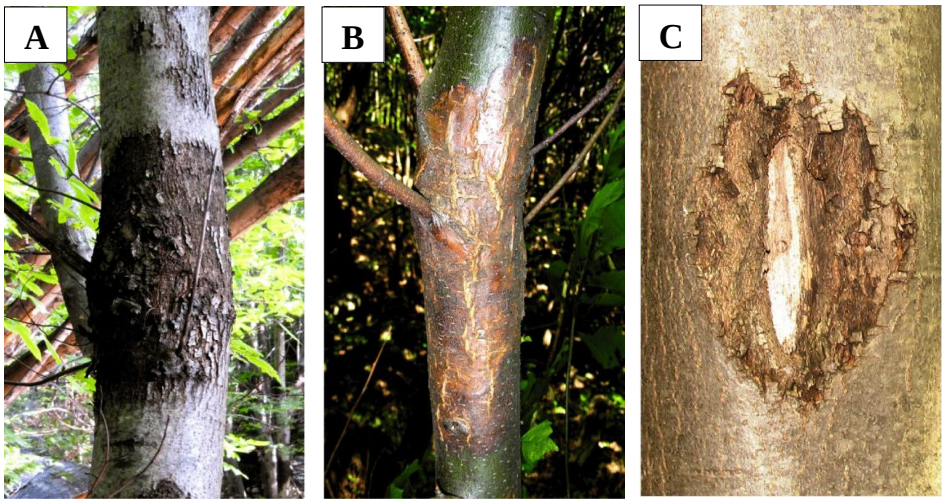
Jedna od teorija o biološkom značenju vegetativne kompatibilnosti u gljiva pretpostavlja da taj mehanizam služi u zaštiti od potencijalno štetnih citoplazmatskih elemenata – virusa, plazmida i slično (Caten 1972).

Neke studije pokazuju da su pronađeni izolati koji se podudaraju na svih šest *vic* lokusa, a nisu vegetativno kompatibilni (Short i sur. 2015), što ukazuje na mogućnost da je vegetativna (ne)kompatibilnost u gljive *C. parasitica* kontrolirana s više od šest *vic* lokusa ili da na poznatim *vic* lokusima postoje dodatni aleli (Rigling i Prospero 2018).

1.3. Biološka kontrola raka kore kestena

Invazivni utjecaj fitopatogene gljive *C. parasitica* na domaćina – europski pitomi kesten ovisi o prisutnosti virusa CHV1 (Milgroom i Cortesi 2004). Kako je već spomenuto, fenomen prirodne biološke kontrole koji štiti europski kesten od razorne bolesti raka kore naziva se hipovirulencija, a prvi put je zabilježena u Italiji 1950-ih godina kada je uočen prirodni oporavak stabala koja su prethodno bila zaražena gljivom *C. parasitica* (Heiniger i Rigling 1994).

Hipovirulentna gljiva, ona koja je inficirana virusom CHV1, na kori stabla kestena uzrokuje pojavu nekroze, spororastućeg, površinskog raka kore (Slika 4A). Takav oblik bolesti je blaži jer infekcija hipovirusom usporava rast gljive i smanjuje joj sposobnost razmnožavanja. Kako je već opisano, aktivan rak kojeg uzrokuje virulentna gljiva, ona koja nije inficirana virusom CHV1, prepoznatljiv je po karakterističnom uzdužnom rascjepu koji nastaje zbog oštećenja kore i kambija (Slika 4B). U slučaju kada je takav aktivan rak inficiran hipovirulentnom gljivom agresivan oblik raka kore prelazi u kalus (Slika 4C). S obzirom da je prodiranje hipovirulentnog micelija usporeno, stablo kestena na to reagira stvaranjem kalusa koji postupno zacjeljuje ranu kore (Hillman i sur. 1992). Međutim, zbog dinamične strukture populacija gljive uočena je i pojava ponovne aktivacije raka na prethodno zaraslom kalusu (Ježić i sur. 2018).



Slika 4. Različiti tipovi oštećenja na kori pitomog kestena zaraženog gljivom *C. parasitica.* A) Nekroza – spororastući, površinski raka kore uzrokovan hipovirulentnom gljivom. B) Aktivni rak, prepoznatljiv po karakterističnom uzdužnom rascjepu, a izazvan je virulentnim sojem gljive. C) Kalus koji postupno zacjeljuje ranu, a nastaje nakon infekcije gljive *C. parasitica* virusom CHV1. Preuzeto iz Bryner i sur. 2014, Rigling i Prospero 2018.

Biološka kontrola bolesti zasniva se upravo na prethodno opisanoj pojavi kada do infekcije virusom CHV1 dođe sekundarno, ali se virus u populaciju gljive *C. parasitica* unosi antropogeno (Rigling i Prospero 2018). U širem smislu biološka kontrola podrazumijeva primjenu živih organizama u kontroli štetočina čije je glavni cilj postizanje učinkovite i samoodržive kontrole patogena. Povećana društvena svijest o okolišu i provedba strategija integriranog suzbijanja patogena su u drugoj polovici prošlog stoljeća utjecali na povećan interes za biološku kontrolu iako se za suzbijanje patogena šumskih populacija biološka kontrola još uvijek ne koristi u zadovoljavajućoj mjeri (Prospero i sur. 2021). Kako bi biološka kontrola bila uspješna potrebno je procijeniti zastupljenost vc tipova gljive na temelju čega se pripravlja mješavina koja sadrži hipovirulentne izolate gljive koji pripadaju najzastupljenijim vc tipovima na ciljanom području. Mješavina se nanosi u izbušene rupe na rubovima raka (Robin i sur. 2010). Uspjeh liječenja raka može se procijeniti na temelju morfologije raka i ponovne izolacije *C. parasitica* iz tretiranih rakova nakon najmanje jedne vegetacijske sezone. Za razliku od Sjeverne Amerike, u Europi, osim što je zastupljenost prirodne hipovirulentnosti visoka, biološka kontrola antropogenim unosom virusa je također vrlo uspješna (Prospero i Rigling 2016). Uzrok smanjenog uspjeha biološke kontrole u Sjevernoj Americi je postojanje velike raznolikosti vc tipova gljive što smanjuje mogućnost horizontalnog širenja virusa, kao i prevelika osjetljivost američkog kestena jer stabla odumiru prije nego li virus uspije inficirati gljivu (Milgroom i Cortesi 2004). Za uspješnost biološke kontrole također je važno odabrati onaj virusni soj koji ima optimalan učinak na virulentnost gljive, ali i dovoljno veliku sposobnost širenja unutar populacije. Virusni sojevi francuskog podtipa značajno smanjuju sporulaciju gljive čime uskraćuju i vlastito širenje kroz populaciju. S druge strane, virusni sojevi talijanskog podtipa slabije utječu na virulentnost gljive, ali imaju veću šansu da se prošire i ustabile u populaciji gljive (Morozov i sur. 2007).

Shodno tome, prvi i izuzetno važan korak ka uspješnijoj biološkoj kontroli je procjena trenutnog stanja i prirodne prevalencije virusa u određenoj populaciji.

1.4. Važnost molekularne detekcije virusa CHV1

Kako je već opisano, hipovirulentni izolati gljive, za razliku od virulentnih, na kori stabla kestena uzrokuje pojavu površinskih rakova. Iako je terenskim promatranjem na temelju izgleda raka moguće procijeniti razliku između aktivnog raka i kalusa ili nekroze i dalje ne postoji jasna veza između morfologije raka i infekcije hipovirusom (Bryner i sur. 2013). Jednako tako ponekad nije moguće na temelju morfoloških karakteristika laboratorijskih kultura gljive uzgojenih na hranidbenoj PDA podlozi sa sigurnošću odrediti radi li se o narančastoj ili bijeloj morfologiji. Virulentni izolati razvijaju narančaste micelije s brojnim sporama, dok hipovirulentni izolati razvijaju manje pigmentirane, bijele micelije s vrlo malo spora (Rigling i Prospero 2018).

No, i uvjeti rasta, osobito svjetlost i toplina, jako utječu na sporulaciju i pigmentaciju, što može mijenjati morfološke karakteristike micelija gljive (Hillman i sur. 1990). Stoga je najsigurnija potvrda prisutnosti virusa CHV1 molekularna detekcija dijela virusnog genoma.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

i. Metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR) provjeriti prisutnost virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* iz laboratorijskih kultura sakupljenih na području Skadra i Boke kotorske. Očekivana prisutnost virusa CHV1 bit će pokazatelj prirodne biološke kontrole bolesti.

ii. Odrediti prevalenciju hipovirulentnih izolata.

iii. Usporediti rezultate dobivene RT-PCR metodom s prethodnim procjenama temeljenim na morfološkim karakteristika micelija gljive.

iv. Odrediti udio hipovirulentnih izolata gljive u pojedinom tipu raka koji je određen terenskim promatranjem.

v. Usporediti prevalenciju virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* na istraživanom području s prevalencijom u populacijama gljive iz drugih zemalja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Popis kemikalija

Popis kemikalija korištenih u istraživanju prikazan je u Tablici 1.

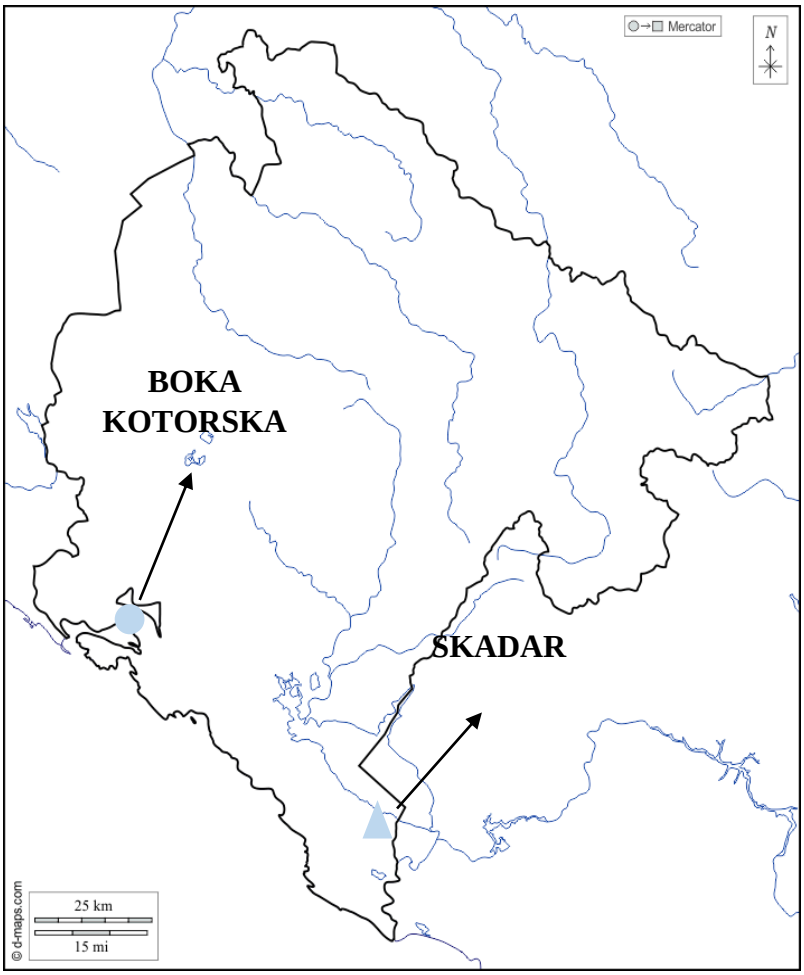
Tablica 1. Popis kemikalija

Naziv kemikalije	Proizvođač
Krumpirov dekstrozni agar (PDA, od engl. *potato dextrose agar*)	Difco™
Komercijalni paket za izolaciju ukupne RNA - *GenElute™ Total RNA Purification Kit*	Sigma
β-merkaptoetanol	Fluka Chemica
70%-tni etanol	Lach-Ner
Komercijalni paket za reverznu transkripciju - *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*	ThermoFischer Scientific
Smjesa deoksinukleotida za umnažanje virusnog dijela ORF B; *dNTP Mix*	TaKaRa
DNA polimeraza *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase*	Promega
Voda za molekularnu biologiju - *Molecular biology water*	AccuGENE®, Lonza
10x Tris/borat/etilendiamintetraoctena kiselina, TBE pufer	AccuGENE®, Lonza
Agaroza	Sigma
Boja za bojanje nukleinskih kiselina *GelStar™ nucleic acid gel stain*	Lonza
Standard za određivanje molekularne mase DNA - *100 bp DNA Ladder*	New England Biolabs

3.2 Izolati gljive *Cryphonectria parasitica* korišteni u istraživanju

Tijekom prosinca 2019., te svibnja i lipnja 2020. uslužnošću Milene Stojanović s Biotehničkog fakulteta u Podgorici sakupljeni su uzorci gljive *C. parasitica* s područja Crne Gore od kojih sam njih 79 koristila u ovom istraživanju. Uzorkovane su dvije populacije, a u svakoj su uzorci sakupljani na dvije lokacije: 1) populacija jezera Skadar s lokacijama Koštanjica (K-SJ) i Ostros (O-SJ) i 2) populacija Boke kotorske s lokacijama Stoliv (S-BZ) i Kostanjica (K-BZ) (Slika 5). Bolest je zabilježena na sve četiri lokacije (Stojanović i Magazin, 2018), ali ne postoje podaci o populacijskoj strukturi *C. parasitica* i prevalenciji virusa CHV1. Istraživanih 79 izolata dobiveno je uzorkovanjem 60 rakova kore kestena. Od ukupno 33 istraživana raka s područja Boke kotorske njih 24 je na temelju izgleda, na terenu prilikom prikupljanja, procijenjeno kao aktivan i agresivan rak, 2 su definirana kao nekroza, 6 ih je opisano kao pojava ponovne aktivacije raka na prethodno zaraslom kalusu (aktivan rak/kalus), dok jednom raku nije zabilježen tip. Što se tiče populacije s područja Skadra, na terenu prilikom prikupljanja je od ukupno 27 uzorkovanih rakova 20 procijenjeno kao aktivan i agresivan rak, 3 aktivan rak/kalus, 2 nekroza, dok za 2 raka nije zabilježen tip. Također su prethodno, uslužnošću dr. sc. Lucije Nuskern Karaice, uzorci procijenjeni prema morfološkim karakteristikama micelija gljive kao narančasti (virulentni), bijeli (hipovirulentni), intermedijarni izolati kojima na temelju morfologije nije moguće odrediti imaju li micelij narančaste ili bijele boje, te izolati atipično bijele morfologije koji u odnosu na izolate tipično bijele morfologije imaju različitu površinu i rub micelija u kulturi. Na području Boke kotorske, od ukupno 43 izolata izolirana iz 33 uzorkovana raka kestenove kore procijenjeno je da je njih 9 (20,93%) bijele morfologije, 29 (67,44%) narančaste morfologije, 2 (4,65%) izolata su karakterizirana kao atipično bijeli, a 3 (7%) izolata su intermedijarna. Na isti način procijenjeni su i izolati s područja Skadra. Od ukupno 36 izolata izoliranih iz 27 uzorkovanih rakova kestenove kore, 7 (19,44%) je bijelih, 14 (38,89%) narančastih, 9 (25%) izolata određeno je kao atipično bijeli, a 6 (16,67%) je intermedijarnih izolata.

Svaki rak uzorkovan je na tri mjesta, točnije na rubovima i u središtu, tako da pojedini analizirani izolati potječu s istog raka. Terenski izolati su bili pohranjeni u sterilnom 22%-tnom glicerolu na -80 °C.



Slika 5. Geografska područja istraživanih crnogorskih populacija gljive *Cryphonectria parasitica*. (Preuzeto: https://d-maps.com/m/europa/montenegro/montenegro08.gif)

3.3. Priprema hranidbene podloge i sterilnog celofana

Kao hranidbenu podlogu koristila sam krumpirov dekstrozni agar (PDA, od engl. *potato dextrose agar*) prekriven sterilnim celofanom. Prema uputama proizvođača potrebno je 39 g praha PDA otopiti u 1 L vode. Pripremljenu otopinu sam sterilizirala 20 minuta na 121 °C u autoklavu (Autoklav A-21, Kambič). Pripremanje ploča s hranidbenom podlogom, presađivanje uzoraka gljive i sakupljanje materijala sa sterilnog celofana potrebno je odraditi u sterilnim uvjetima, za što sam koristila kabinet s vertikalnim strujanjem zraka – laminar (Klimaoprema Cleanroom Technology KTV-A) koji osigurava radni prostor od kontaminacija. Prije i nakon rada u laminaru dezinficirala sam radni prostor 70%-tnim alkoholom, a pribor flambirala kako bi uklonila moguće kontaminacije. Oko 10 mL pripremljenog PDA medija sterilno sam ulijevala u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm i ostavila 20-30 minuta u laminaru pod UV-svjetlom dok agar ne polimerizira, a potom ih pohranila u hladnjak na 4 °C do upotrebe. Celofane sam uronila u čašu s deioniziranom vodom koja je prekrivena aluminijskom folijom, autoklavirala 20 minuta na 121 °C i spremila u hladnjak na 4 °C.

3.4. Uzgoj eksperimentalnih kultura

Prethodno pripremljene hranidbene podloge prekrila sam sterilnim celofanom i nasadila uzorke gljive *C. parasitica* iz laboratorijskih kultura terenskih izolata s područja Crne Gore koji su prethodno bili pohranjeni u 22%-tnom glicerolu na -80 °C. Vrlo malu količinu svakog od 79 uzoraka sam prenijela uz pomoć pincete iz Eppendorf epruveta na centar svake od pripremljenih ploča. Presađene uzorke sam inkubirala u fitotronu (Pol-eko aparatura) pri 24 °C i 70% relativne vlažnosti 7 dana u mraku zbog bolje replikacije virusa, a potom 7 dana na dnevnom svjetlu na sobnoj temperaturi zbog učinkovitije sporulacije gljive. Nakon 14 dana sam sastrugala tkivo s celofana sterilnim nožićem u Eppendorf epruvete od 2 mL i pohranila na -80 °C do iduće upotrebe.

Sakupljeno tkivo sam liofilizirala (CHRIST –Alpha 1-2LD) 24 h. Na početku procesa uređaj je postigao temperaturu od -58 °C i tlak od 0,080 mbar, a nakon 24 sata temperatura je iznosila -60 °C i tlak 0,045 mbar. Nakon liofilizacije suhe uzorke sam usitnila u uređaju za usitnjavanje (Tissuelyser, Qiagen) pomoću čeličnih kuglica promjera 5 mm pri frekvenciji od 30 Hz, 2 minute. Nakon usitnjavanja uzorke sam čuvala na sobnoj temperaturi do iduće upotrebe.

3.5. Dokazivanje prisutnosti virusa CHV1 u tkivu gljive *C. parasitica*

3.5.1. Izolacija RNA

Virusnu RNA iz micelija gljive *C. parasitica* izolirala sam pomoću komercijalnog kompleta *GenElute™ Total RNA Purification Kit* prema protokolu proizvođača. *GenElute™ Total RNA Purification Kit* se zasniva na selektivnom vezanju RNA na smolu na kromatografskoj koloni. Na analitičkoj vagi (Presica62A) sam odvagnula 3-5 mg prethodno dehidriranog i usitnjenog uzorka u sterilne Eppendorf epruvete od 2 mL. Svakom uzorku dodala sam 600 µL puferske otopine *Buffer RL* za liziranje stanica i 6 µL *β*-merkaptoetanola te promiješala na vrtložnoj miješalici (TechnoKartel, TK3S) 10 sekundi pri frekvenciji od 40 Hz. Ukoliko se cjelokupno tkivo nije u potpunosti rehidriralo smjesu sam dodatno homogenizirala mikrotučkom, a zatim centrifugirala 2 minute pri 1000 g (Eppendorf, Centrifuge 5424). Nakon toga sam 550 µL supernatanta prenijela u sterilne Eppendorf epruvete od 1,5 mL, dodala jednaku količinu 70%-tnog etanola i ponovno smjesu promiješala na vrtložnoj miješalici 10 sekundi pri frekvenciji od 40 Hz. U idućem koraku u kojem se RNA veže na kolonu prebacila sam 600 µL uzorka na priloženu kolonu koja je nataknuta na mikroepruvetu i centrifugirala 1 minutu pri 10 000 g, a zatim eluat bacila i vratila kolonu na mikroepruvetu. Postupak sam ponovila s preostalim uzorkom. Sljedeći korak je ispiranje kolone kako bi se uklonile nečistoće: dodala sam 400 µL otopine za ispiranje *Wash Solution A,* centrifugirala 1 minutu pri 10 000 g, eluat bacila i postupak ponovila još dva puta. Kolonu na kojoj je vezana RNA stavila sam u sterilnu epruvetu od 1,7 mL priloženu u kompletu, dodala 50 µL otopine *Elution Solution A* i centrifugirala prvo 2 minute na 200 g, a zatim 1 minutu na 14 000 g kako bi se vezana virusna RNA isprala s kolone. Koncentraciju izolirane RNA provjeravala sam mjerenjem apsorbancije pri 260 nm pomoću spektrofotometra (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) u 2 µL uzorka.

3.5.2. Reverzna transkripcija (RT)

Metodom reverzne transkripcije prepisala sam izoliranu RNA pomoću enzima reverzne transkriptaze u komplementarnu DNA (cDNA) koja mi je zatim služila kao kalup za amplifikaciju segmenta od interesa u metodi lančane reakcije polimerazom. Reverznu transkripciju provela sam pomoću komercijalnog kompleta *High - Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* koji se temelji na korištenju nasumičnih početnica kako bi se osigurala učinkovitija sinteza prvog lanca cDNA. Prema uputama proizvođača 10 µL reakcijske smjese pomiješala sam s 10 µL svakog pojedinačnog uzorka pročišćene RNA u mikroepruveti za PCR. Uzorke koji su imali koncentraciju RNA veću od 200 ng/µL sam prethodno razrijedila do te koncentracije. Sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 2. Osim uzoraka izolirane RNA

koristila sam i kontrolne uzorke: pozitivna kontrola u kojoj je prethodno dokazana prisutnost virusa, negativna kontrola za koju je dokazano da nije zaražena virusom te vodena kontrola za provjeru valjanosti kemikalija. Uzorke sam kratko centrifugirala, stavila u uređaj za PCR (Applied Biosystems, SimpliAmp Thermal Cycler) i pokrenula program za reverznu transkripciju. Reverznu transkripciju sam provela u tri koraka; 10 minuta na 25 °C, 120 minuta na 37 °C te 5 minuta na 85 °C nakon čega sam uzorke na kratko vrijeme pohranila na 4 °C.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju (RT) virusne RNA iz kompleta *High - Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.*

Sastojak	Početna koncentracija	Volumen za jednu reakcijsku smjesu (µL)	Konačna koncentracija u 20 µL
Pufer RT	10 x	2	1 x
Smjesa dNTP-ova (100 mM)	25 x	0,8	1 x (4 mM)
RT nasumične početnice	10 x	2,0	1 x
Reverzna transkriptaza MultiScribe™	50 U/µL	1,0	50 U
Inhibitor RNaze	100 U/µL	1,0	100 U
dH_2O	–	3,2	–

3.5.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Prisutnost virusa dokazivala sam umnažanjem dijela njegovog otvorenog okvira čitanja (ORF B) metodom PCR pomoću komercijalnog kompleta *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*. PCR metoda temelji se na kontinuiranom ponavljanju denaturacije, vezanja početnica na kalup i produljivanja DNA slijeda u smjeru $5' \rightarrow 3'$. Prema uputama proizvođača 24 µL pripremljene reakcijske smjese pomiješala sam s 1 µL uzorka koji sadrži cDNA prethodno sintetiziranu RT metodom. Sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 3. Za amplifikaciju specifičnog segmenta od interesa koristila sam početnice prema radu Allemana i sur. (1999) koje su komplementarne krajevima ciljane sekvence ORF B, a to su EP 713-6 i EP 713-7 (Tablica 4). Osim navedenih uzoraka dodala sam pozitivnu kontrolu kod koje je prethodno dokazano da sadrži cDNA virusa CHV1 te vodenu kontrolu. Reakciju sam provela u PCR uređaju pri uvjetima prikazanima u Tablici 5, a potom uzorke pohranila na 4 °C do iduće upotrebe.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom za umnažanje dijela otvorenog okvira čitanja ORF B virusa CHV1 u kompletu *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase.*

Sastojak	**Početna koncentracija**	**Volumen za jednu PCR smjesu (µL)**	**Konačna koncentracija u 25 µL**
Pufer *Green GoFlexi*	5 x	5	1 x
$MgCl_2$	25 mM	1,5	1,5 mM
dNTP Mix (TaKaRa)	10 mM	0,5	0,2 mM
Početnica 1	10 pmol/µL	0,5	0,2 µM
Početnica 2	10 pmol/µL	0,5	0,2 µM
DNA polimeraza *GoTaq DNA Polymerase*	5 U/ µL	0,5	2,5 U
dH_2O	−	15,5	−

Tablica 4. Parovi početnica za umnažanje dijela otvorenog okvira čitanja ORF B virusa CHV1 prema radu Allemanna i sur. (1999).

Regija DNA	**Početnice**	**Sekvenca početnice**	**Duljina odsječka**
ORF B	EP 713-6	**5'** GCCACTTCGTGGGACAATAC **3'**	1702 nt
	EP 713-7	**5'** GGGAAGAAAGTGGACTTACC **3'**	

Tablica 5. Uvjeti pri kojima je provedena lančana reakcija polimerazom (PCR).

Broj ciklusa	**Temperatura**	**Vrijeme/minute**
1	94 °C	2:00
35	94 °C 55 °C 72 °C	1:00 1:30 2:00
1	72 °C	10:00

3.5.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Prisutnost virusa provjeravala sam razdvajanjem umnoženih PCR produkata pomoću agarozne gel elektroforeze (uređaj za napajanje BIO-RAD PowerPac HC, kadica BIO-RAD wide mini-sub cell gt) tijekom 45 minuta pri naponu od 90 V. Elektroforezu sam provodila u 1%-tnom agaroznom gelu u 0,5 x TBE puferu u koji sam prethodno dodala 0,5 x boje za bojanje nukleinskih kiselina *GelStar*^{TM} *nucleic acid gel stain*. Kako bih analizirala dobivene rezultate u prvu i posljednju jažicu dodala sam 2 µL DNA markera pomiješanog s 1 µL boje za nanošenje uzorka (30%-tni glicerol u vodi, 0,25%-tna boja bromfenol plavo, 0,25%-tna boja ksilencijanol), a između njih sam nanosila po 3 µL PCR produkta. Odsječke DNA sam vizualizirala pod UV svjetlom na transiluminatoru (Syngene). S obzirom da su početnice konstruirane tako da umnažaju specifični dio genoma (ORF B), zaključila sam da je virus prisutan u uzorcima gljive *C. parasitica* iz laboratorijskih kultura ukoliko su na gelu vidljivi odsječci DNA duljine 1702 nukleotida.

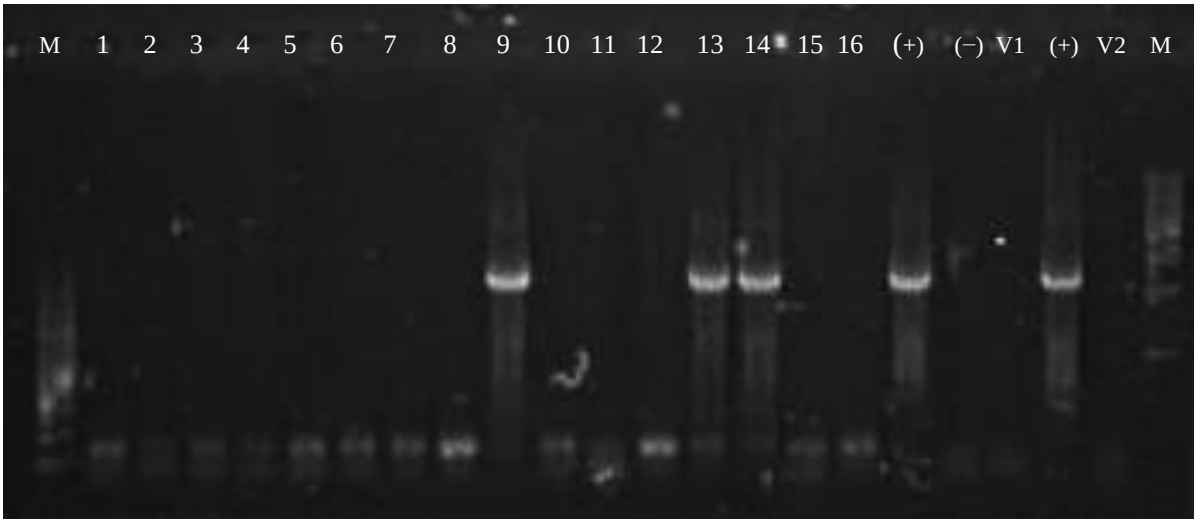
3.6. Obrada podataka

Nakon provedene elektroforeze u agaroznom gelu, vidljivi odsječci DNA duljine 1702 nukleotida, koji odgovaraju duljini ciljane sekvence (ORF B), pokazatelj su da je virus prisutan u uzorcima gljive *C. parasitica* i takvi izolati definirani su kao pozitivni. Uz pomoć računalnog programa *Microsoft Excel* odredila sam udio pozitivnih i negativnih izolata gljive po pojedinoj populaciji. U istom računalnom programu odredila sam i udio hipovirulentnih izolata na temelju morfoloških karakteristika micelija gljive te udio hipovirulentnih izolata gljive u pojedinom tipu raka koji je ranije određen terenskim promatranjem. Sve grafičke prikaze sam također izrađivala u računalnom programu *Microsoft Excel.*

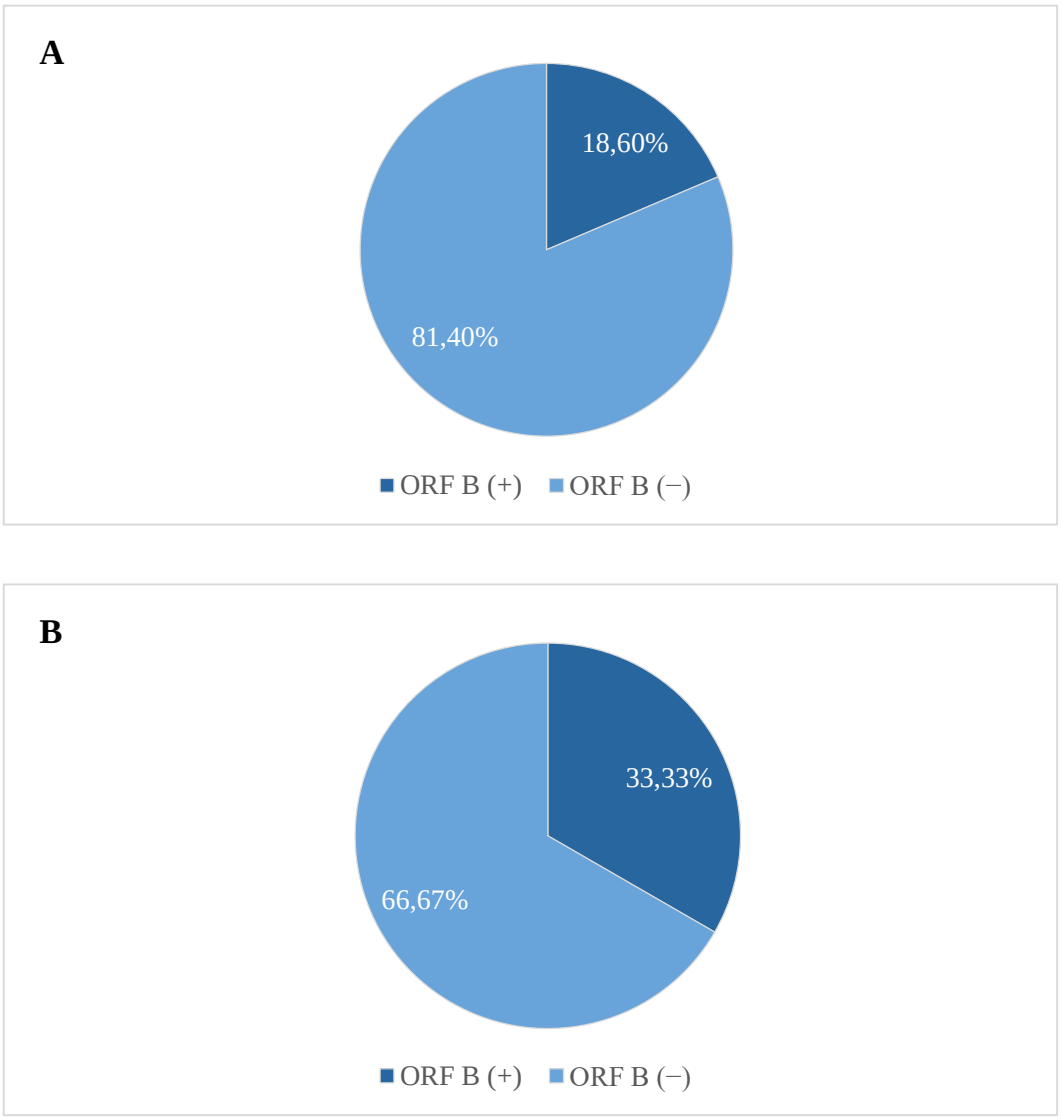
4. REZULTATI

4.1. Prevalencija virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* s područja Crne Gore

Iz svih uzoraka gljive *C. parasitica* izolirana je RNA, nakon čega je uslijedila RT-PCR metoda i elektroforeza. U uzorcima u kojima je na gelu bio vidljiv odsječak DNA duljine 1702 nukleotida, što odgovara duljini ciljane sekvence ORF B, dokazana je prisutnost virusa CHV1 (Slika 6). Hipovirulencija je dokazana za 8 od ukupna 43 izolata gljive sakupljena na području Boke kotorske. Prevalencija u toj populaciji iznosi 18,6% (Slika 7A). U drugoj istraživanoj populaciji s područja Skadra hipovirulencija je dokazana za 12 od 36 izolata gljive. Prevalencija virusa CHV1 u toj populaciji je nešto veća i iznosi 33,33% (Slika 7B).



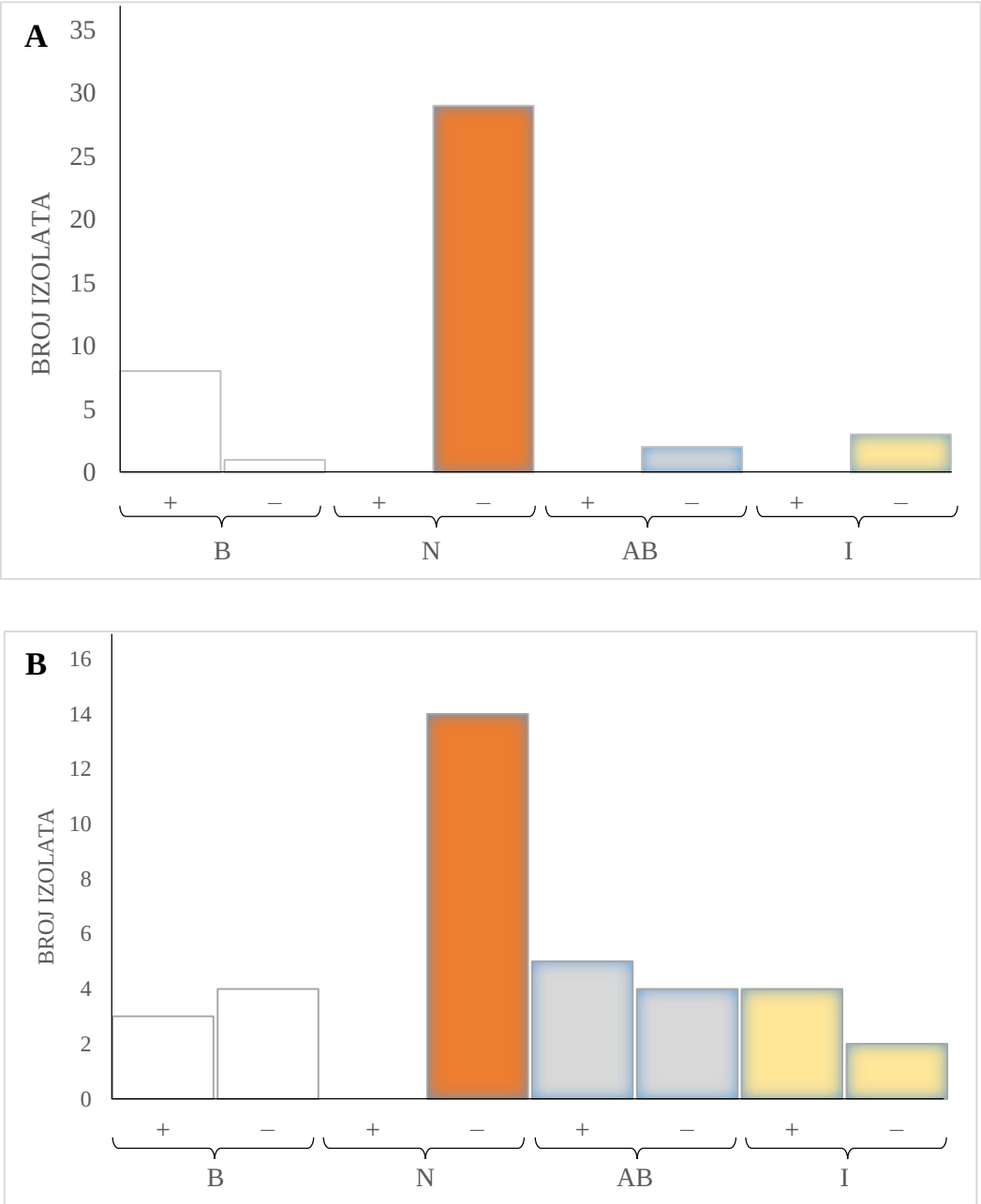
Slika 6. Primjer dokazivanja prisutnosti virusa CHV1 u miceliju gljive *Cryphonectria parasitica* elektroforezom PCR produkata, dio sekvence ORF B duljine 1702 nukleotida, u 1%-tnom agaroznom gelu u uzorcima: **M** = standard za određivanje molekularne mase DNA (100 pb), **1** = S-BZ 21-1, **2** = S-BZ 23-2, **3** = S-BZ 24-2, **4** = S-BZ 26-1, **5** = S-BZ 26-2, **6** = S-BZ 27-1, **7** = S-BZ 27-3, **8** = S-BZ 28-2, **9** = S-BZ 29-3, **10** = S-BZ 30-3, **11** = S-BZ 31-2, **12** = K-SJ 01-1, **13** = K-SJ 03-3, **14** = K-SJ 04b-1, **15** = K-SJ 05-3, **16** = K-SJ 08-2, **(+)** = pozitivna kontrola reverzne transkripcije, **(−)** = negativna kontrola reverzne transkripcije, **V1** = vodena kontrola za reverznu transkripciju, **(+)** = pozitivna kontrola za PCR, **V2** = vodena kontrola za PCR, **M** = standard za određivanje molekularne mase DNA (1 kb). Uzorci 1-11 potječu iz populacije s područja Boke kotorske s lokacije Stoliv (S-BZ), a uzorci 12-16 iz populacije s područja Skadra s lokacije Koštanjica (K-SJ). Prisutnost virusa dokazana je u uzorcima **9** = S-BZ 29-3, **13** = K-SJ 03-3 i **14** = K-SJ 04b-1.



Slika 7. Prevalencija virusa CHV1 u istraživanim populacijama gljive *Cryphonectria parasitica* s područja A) Boke kotorske i B) Skadra. Prisutnost virusa CHV1, dokazana na temelju molekularne analize, karakterizirana je kao pozitivan rezultat, ORF B (+), a odsutnost kao negativan rezultat, ORF B (−).

4.2. Korelacija morfologije gljive *C. parasitica* i prisutnosti virusa CHV1

Molekularnom metodom virus je potvrđen u 8 izolata gljive *C. parasitica* iz populacije s područja Boke kotorske, od kojih je svih 8 (100 %) prethodno okarakterizirano kao izolati bijele morfologije. Međutim, u jednom izolatu koji je opisan kao bijeli, molekularnom metodom nije dokazana prisutnost virusa. Virus nije detektirani niti u 29 izolata narančaste morfologije, niti u 2 izolata prethodno opisana kao atipično bijela, kao ni u 3 izolata intermedijarne morfologije (Slika 8A). U istraživanoj populaciji s područja Skadra 3 (25%) izolata u kojima je detektiran virus su prethodno opisani kao bijeli, 5 (41,67%) izolata u kojima je detektiran virus je prethodno određeno kao atipično bijeli, a 4 (33,33%) hipovirulentna izolata su prethodno definirana kao izolati intermedijarne morfologije. Virus nije dokazan niti u jednom od ukupno 14 izolata narančaste morfologije (Slika 8B).



Slika 8. Korelacija molekularne detekcije virusnog genoma i morfološke karakterizacije izolata gljive *Cryphonectria parasitica* iz populacije s područja A) Boke kotorske i B) Skadra. Izolati gljive su opisani kao bijeli (B), narančasti (N), atipično bijeli (AB), te intermedijarni (I) izolati kojima na temelju morfologije nije moguće odrediti imaju li micelij narančaste ili bijele boje. Prisutnost virusa CHV1, dokazana na temelju molekularne analize, karakterizirana je kao pozitivan (+) rezultat, a odsutnost kao negativan (−) rezultat.

4.3. Korelacija između prisutnosti virusa CHV1 u gljivi *C. parasitica* i aktivnosti raka

Svih 8 izolata s područja Boke kotorske za koje je molekularnom metodom dokazana hipovirulencija potječu iz rakova koji su terenskom procjenom određeni kao aktivni i agresivni. Na području Skadra 9 (75%) hipovirulentnih izolata proizlazi iz rakova koji su procijenjeni kao aktivni i agresivni, 1 (8,33%) hipovirulentni izolat detektiran je iz nekroze, dok su 2 (16,67%) hipovirulentna izolata uzorkovana iz raka koji je opisan kao pojava ponovne aktivacije raka na prethodno zaraslom kalusu (aktivan rak/kalus).

Kako je već spomenuto, svaki rak uzorkovan je na tri mjesta tako da pojedini analizirani izolati potječu s istog raka. Svi takvi multipli izolati iz populacije s područja Boke kotorske imali su ujednačen status virulentnosti/hipovirulentnosti određen molekularnom metodom. Drugim riječima, nije detektiran niti jedan rak u kojem je dio izolata gljive bio hipovirulentan, a dio virulentan. U populaciji s područja Skadra u dva raka dio izolata gljive je bio hipovirulentan, a dio virulentan. Konkretno, u raku K-SJ 09 za jedan izolat je dokazano da je hipovirulentan, ali ne i za drugi izolat iz istog raka. U drugom slučaju, u raku O-SJ 14, hipovirulencija je dokazana u 2 od 3 izolata. Svi ostali slučajevi multiplih izolata s područja Skadra imali su ujednačen status virulentnosti/hipovirulentnosti, tj. ili su bili svi hipovirulentni ili svi virulentni.

5. RASPRAVA

Tipična karakteristika virulentnih izolata je stvaranje narančastih micelija s brojnim sporama na hranidbenoj PDA podlozi (Rigling i Prospero 2018), što sam potvrdila i u ovom istraživanju. Dakle, virus CHV1 nije detektiran u niti jednom istraživanom izolatu koji je prethodno prema morfološkim karakteristikama micelija gljive *C. parasitica* procijenjen kao izolat narančaste morfologije. Jednak trend pokazuju i prethodno provedena istraživanja. Primjerice, isti rezultati zabilježeni su u istraživanjima koja su Krstin i sur. proveli na području Hrvatske i Slovenije (Krstin i sur. 2008, Krstin i sur. 2011) kao i u istraživanju provedenom na području sjeverne Španjolske (Trapiello i sur. 2017). U populaciji s područja Boke kotorske, u jednom izolatu koji je prethodno okarakteriziran kao izolat bijele morfologije, virus ipak nije detektiran. Još konfuznija situacija pojavljuje se u izolatima iz populacije s područja Skadra. Naime, osim što je samo dio izolata bijele morfologije hipovirulentan, ispostavilo se i da je virus prisutan u izolatima koji su prethodno određeni kao atipično bijeli, kao i u intermedijarnim izolatima. Shodno tome, postotak bijelih izolata, koji razvijaju manje pigmentirane micelije s vrlo malo spora, ne predstavlja točnu prevalenciju virusa u populaciji gljive. Budući da je od ranije poznato da uvjeti rasta, osobito svjetlost i toplina, jako utječu na sporulaciju i pigmentaciju, i samim time mijenjaju morfološke karakteristike micelija gljive (Hillman i sur. 1990) procjena morfologije nije pouzdan kriterij za utvrđivanje hipovirulentnih izolata. Iz tog razloga je upravo jedan od ciljeva ovog istraživanja bio molekularnom metodom provjeriti prisutnost virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica*.

Tipovi raka i njihova brojnost obično se koriste za procjenu stanja raka kestenove kore (Ježić i sur. 2014). Iako jedan istraživani izolat s područja Skadra, za kojeg je molekularnom metodom dokazana hipovirulencija, potječe iz raka koji je terenskom procjenom određen kao nekroza, ipak najveći broj izolata potječe iz rakova koji su prethodno procijenjeni kao aktivni i agresivni. Naime, u prirodi se pokazalo da je ponekad moguće u aktivnim rakovima pronaći virulentni i/ili hipovirulentni izolat gljive. Potencijalni razlog te pojave je taj da se virulentna gljiva, koja je odgovorna za nastanak aktivnog raka, tek u kasnijoj fazi zarazi hipovirusom, a transformacija aktivnog raka u kalus nije trenutačna. Nadalje, postoji mogućnost da je micelij gljive u aktivnom raku samo djelomično zaražen hipovirusom (Ježić i sur. 2014). Isto tako su na području Skadra primijećeni hipovirulentni izolati koji potječu iz rakova koji su prethodno određeni kao pojava reaktivacije raka na prethodno zaraslom kalusu, aktivan rak/kalus. Međutim, terenskim promatranjem nije uvijek jednostavno definirati radi li se o ponovnoj aktivaciji raka na zaraslom kalusu ili pak o fazi koja vodi ka zacijeljenu rane. Kako bi se

razlikovala navedena dva stadija potrebno je pratiti stanje tijekom godina, ali svakako, hipovirulentan izolat moguće je pronaći u oba slučaja (Ježić i sur 2018). U konačnici, prema istraživanju Bryner i sur. ustanovljeno je da morfologija raka i infekcija hipovirusom nisu uvijek jasno povezane te da se prisutnost virusa CHV1 može definitivno potvrditi samo molekularnim metodama (Bryner i sur. 2013).

U ovom istraživanju uočeno je nekoliko rakova koji su sadržavali i virulentne i hipovirulentne gljive. Navedena pojava već je uočena u prethodnim istraživanjima, a temelji se na mogućoj pojavi više različitih tipova vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* u istom raku, što uvelike sprječava prijenos virusa među jedinkama (Hogan i Griffin, 2002). To je pokazatelj dinamičnog sustava gljive koja na širenje hipovirusa reagira velikom zastupljenošću spolnog razmnožavanja jer na taj način mogu nastati novi, rijetki vc tipovi koji bi se barem privremeno mogli oduprijeti infekciji hipovirusom (Ježić i sur. 2018). No, u ovom istraživanju nije određivana raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti stoga nije moguće potvrditi konačan uzrok ovoj pojavi.

Prevalencija virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica,* određena RT-PCR metodom, u istraživanoj populaciji s područja Boke kotorske iznosi 18,6%, dok je u drugoj istraživanoj populaciji s područja Skadra nešto veća i iznosi 33,33%. S obzirom da postotak bijelih izolata ne predstavlja točnu prevalenciju virusa u populaciji gljive, pri usporedbi rezultata s drugim istraživanjima rabljeni su samo podaci dobiveni molekularnim metodama. Prema istraživanju koje su Sotirovski i sur. (2006) proveli u Sjevernoj Makedoniji u 7 populacija gljive, u dvije populacije u niti jednom izolatu gljive nije detektiran virus dok se prevalencija u ostalim populacijama kreće u rasponu od 11,1% do 57,1%. U svim populacijama detektiran je talijanski podtip virusa, CHV1 – I. Prema istraživanju iz 2008. godine, od ukupno 10 istraživanih populacija na području Hrvatske, najmanja prevalencija virusa zabilježena je u populaciji priobalnog područja i iznosi 12,7%, dok je najveća prevalencija određena u kontinentalnoj populaciji i iznosi 66,6% (Krstin i sur. 2008). Slične rezultate pokazuje istraživanje provedeno 2011. godine u 7 populacija diljem Slovenije, prevalencija se kreće od 11,1% u istraživanoj populaciji u blizini austrijske granice do 72,2% u populaciji u blizini hrvatske granice (Krstin i sur. 2011). Svi identificirani izolati hipovirusa iz Hrvatske i Slovenije pripadali su talijanskom podtipu CHV1 – I (Krstin i sur. 2008, Krstin i sur. 2011). Što se tiče zemalja južne Europe prevalencija je nešto niža. Tako studija provedena 2017. godine na sjeveru Španjolske, u šumama Asturija, pokazuje da je prevalencija hipovirusa u dvije istraživane populacije gljive 6%. Osim izolata prikupljenih za to istraživanje analizirani su i izolati iz laboratorijske zbirke

koji su korišteni u prethodnim istraživanjima: prevalencija je bila 3,3%, a detektirani virusi pripadali su njemačkom, CHV1 – D i španjolskom podtipu, CHV1 – E (Trapiello, 2017). Zamora i sur. (2012) su proveli istraživanje u sjeverozapadnom dijelu Španjolske, u provinciji León, gdje prevalencija virusa koji je pripadao francuskom podtipu, CHV1 – F1, iznosi 3,1%. Niska prevalencija bilježi se i u Portugalu, prema istraživanju koje su Braganca i sur. proveli u populacijama diljem kontinentalnog dijela zemlje, kao i na Azorskim otocima te otoku Madeira, gdje je samo jedan izolat od ukupno 617 bio hipovirulentan (Braganca i sur, 2007). Prema navedenim podacima evidentno je da je prevalencija virusa u istraživanim populacijama s područja Crne Gore najsličnija prevalenciji u većini populacija s područja Sjeverne Makedonije, mada u pojedinim populacijama s područja Sjeverne Makedonije virus uopće nije detektiran (Sotirovski i sur. 2006).

Prevalencija u populacijama s područja Hrvatske i Slovenije je visoka, suprotno tome na sjeverozapadnom dijelu Španjolske i u Portugala izrazito niska. Nisku prevalenciju virusa u populacijama gljive moguće je objasniti na temelju istraživanja koje su proveli Robin i Heinger (2001). Naime, prema njihovom istraživanju postoji određena korelacija između prvog opažanja bolesti raka kore kestena i prve pojave hipovirulentnih izolata, gdje jedan događaj prati drugi u vremenskom razdoblju od 20 do 30 godina. U sjeverozapadnom dijelu Španjolske bolest je prvi puta zabilježena 1978., a u sjevernom dijelu zemlje, u šumama Asturija tek 1982. godine (Trapiello, 2017). Što se tiče Portugala bolest je prvi puta uočena 1989. godine u kontinentalnom dijelu zemlje (Robin i Heinger 2001). Niska razina hipovirulencije često se opaža u područjima Europe gdje se tek u bliskoj prošlosti pojavila gljiva *C. parasitica,* a hipovirus bi tada mogao biti tek u ranoj fazi širenja (Hoegger i sur. 2000). Suprotno tome, prevalencija virusa je veća u zemljama s dugom poviješću bolesti gdje je hipovirulencija prirodno uspostavljena. U Hrvatskoj je bolest raka kestenove kore zabilježena već 1955. godine, a do danas su hipovirulentni izolati otkriveni u svakoj proučavanoj populaciji (Krstin i sur. 2016). Očekivano slična opažanja uočena su i u slovenskim populacijama, bolest je prvi puta zabilježena 1950., a hipovirulencija je široko rasprostranjena u svim istraživanim populacijama (Krstin i sur. 2011). Na prostoru Sjeverne Makedonije, najveća prevalencija zabilježena je u populaciji u kojoj je bolest prvi puta uočena 1974. godine, nasuprot tome, hipovirus nije otkriven u populacijama u kojima se gljiva tek pojavila (Sotirovski i sur. 2006). Na području Crne Gore bolest je uočena oko 1980. (Rigling i sur. 2014), no, ne postoje podaci o populacijskoj strukturi *C. parasitica* i prevalenciji CHV1 (Stojanović i Magazin 2018). Prema

tome, korelacija trenutačnog stanja prevalencije virusa koja je određena u ovom istraživanju i godine uočavanja bolesti je u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Robin i Heinger (2001).

Postoji mogućnost da je hipovirus u istraživanim populacijama tek u ranijoj fazi širenja i da se još nije ustabilio u populacijama gljive. Kako bi sa sigurnošću došli do pravog odgovora potrebne su dugogodišnje kontrole istraživanih populacija. Već sama prisutnost hipovirulencije na području Boke kotorske i Skadra pruža potencijal za biološku kontrolu bolesti, bilo prirodnu ili antropogenu, no, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se produbilo znanje o dinamici interakcije gljiva – virus. Nadalje, spolno razmnožavanje gljive, praćeno povećanjem raznolikosti vc tipova, je potencijalna prepreka za prirodnu kontrolu bolesti. Stoga je važno da daljnja istraživanja uključe redovito praćenje prevalencije virusa u populacijama gljive kroz duže vremensko razdoblje. Što se tiče antropogene biološke kontrole potrebno je u narednim istraživanjima obuhvatiti procjenu zastupljenosti vc tipova gljive radi učinkovitijeg prijenosa hipovirusa kao i odrediti podtip virusa, te odabrati izolate koji bi imali optimalan učinak na virulentnost gljive, ali i dovoljno veliku sposobnost širenja unutar populacije. Konačno, uspjeh liječenja raka može se procijeniti na temelju ponovne izolacije gljive *C. parasitica* iz tretiranih rakova nakon najmanje jedne vegetacijske sezone.

6. ZAKLJUČAK

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR) provjeriti prisutnost virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* iz laboratorijskih kultura kako bi se dobio uvid u stanje prirodne biološke kontrole bolesti raka kestenove kore na području Skadra i Boke kotorske.

Prema ovom istraživanju prevalencija virusa CHV1 u uzorcima gljive *C. parasitica* u istraživanoj populaciji s područja Boke kotorske iznosi 18,6%, dok je u drugoj istraživanoj populaciji s područja Skadra nešto veća i iznosi 33,33%.

Postotak bijelih izolata ne predstavlja točnu prevalenciju virusa u populaciji gljive. Budući da je od ranije poznato da uvjeti rasta jako utječu na sporulaciju i pigmentaciju, i samim time mijenjaju morfološke karakteristike micelija gljive, procjena morfologije nije pouzdan kriterij za utvrđivanje hipovirulentnih izolata. Prisutnost virusa CHV1 može se definitivno potvrditi samo molekularnim metodama.

Isto tako, iako se tipovi raka i njihova brojnost obično koriste za procjenu ozbiljnosti raka kestenove kore prema rezultatima ovog istraživanje ustanovljeno je da morfologija raka i infekcija hipovirusom nisu jasno povezane.

Saznanje o prisutnosti hipovirulencije na području Boke kotorske i Skadra pruža potencijal za biološku kontrolu bolesti, bilo prirodnu ili antropogenu.

7. LITERATURA

Allemann C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV 1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology 8(5): 843-854.

Anagnostakis S. L., Hau B., Kranz J. (1986): Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. Plant Disease. 70(6): 536-538.

Biella S., Smith M.L., Aist J.R., Cortesi P., Milgroom, M.G. (2002): Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 269(1506): 2269-2276.

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

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.

Bryner S. F., Prospero S., Rigling D. (2014): Dynamics of *Cryphonectria hypovirus* infection in chestnut blight cankers. Phytopathology. 104(9): 918-925.

Bryner S. F., Rigling D., Brunner P. C. (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 S.F., Sotirovski K., Akilli 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.

Caten C.E. (1972): Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. Microbiology. 72(2): 221–229.

Cortesi P., McCulloch C.E., Song H.Y., Lin H.Q., Milgroom M.G. (2001): Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Genetics. 159(1): 107–118.

Dawe A. L., Nuss D. L. (2013): Hypovirus molecular biology: From Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus. Advances in virus research. 86: 109-147.

Diller J.D. (1965): Chestnut Blight. Forest Pest Leaflet 94. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington, D.C., str. 1-7.

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

Heiniger U., Rigling D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. Annual review of phytopathology. 32(1): 581–599.

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

Hillman B.I., Suzuki, N. (2004): Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Advances in virus research. 63(642): 423–472.

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

Hogan E. P., Griffin G. J. (2002): Incomplete movement of *Cryphonectria hypovirus 1* within a vegetative compatibility type of *Cryphonectria parasitica* in natural cankers on grafted American chestnut trees. Forest Pathology. 32(6): 331-344.

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

Ježić M., Mlinarec J., Vuković R., Katanić Z., Krstin L., Nuskern L., Poljak I., Idžojtić M., Tkalec M., Ćurković-Perica M. (2018): Changes in *Cryphonectria parasitica* populations affect natural biological control of chestnut blight. Phytopathology. 108(7): 870-877.

Krstin L., Katanić Z., Ježić M., Poljak I., Nuskern L., Matković I., Idžojtić M., Ćurković-Perica M. (2017): Biological control of chestnut blight in Croatia: an interaction between host sweet chestnut, its pathogen *Cryphonectria parasitica* and the biocontrol agent *Cryphonectria hypovirus 1*. Pest Management Science. *73*(3): 582-589.

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

Krstin L., Novak-Agbaba S., Rigling D., Krajačić M., 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(4): 752-761.

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

Milgroom M. G., Cortesi P. (2004): Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annual review of phytopathology. 42: 311-338.

Morozov A.Y., Robin, C., Franc, A. (2007): A simple model for the dynamics of a host–parasite–hyperparasite interaction. Journal of theoretical biology. 249(2): 246–253.

Prospero S., Botella L., Santini A., Robin C. (2021): Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality? Forest Ecology and Management. 496, 119377.

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.

Prospero S., Rigling D. (2016): Using molecular markers to assess the establishment and spread of a mycovirus applied as a biological control agent against chestnut blight. Biocontrol. 61(3): 313–323.

Rigling D., Borst N., Cornejo C., Supatashvili A., Prospero S. (2018): Genetic and phenotypic characterization of *Cryphonectria hypovirus 1* from Eurasian Georgia. Viruses. 10(12): 687.

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

Rigling D., Schütz-Bryner S., Heiniger U., Prospero S. (2014): Canker of chestnut bark: biology, symptoms and control. Notice pour le Praticien. 54: 8-14.

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., Rigling D. (2010): Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in southern-eastern France is associated with fitnes related traits. Biological Control. 53(1): 55-61.

Short D.P.G., Double M., Nuss D.L., Stauder C.M., MacDonald W., Kasson, M.T. (2015): Multilocus PCR assays elucidate vegetative incompatibility gene profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. Applied and environmental microbiology. 81(17): 5736–5742.

Sotirovski K., Milgroom M. G., 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 S. A., Kim K. H., Pearson M., Marzano S. Y. L., Yaegashi H., i sur. (2018). ICTV virus taxonomy profile: *Hypoviridae.* Journal of General Virology. 99(5): 615–616.

Trapiello E., Rigling D., González A. J. (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.

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

8. ŽIVOTOPIS

Marija Milanović-Litre rođena je u Sinju u Republici Hrvatskoj. Završila je osnovnu školu Kamešnica u Otoku dalmatinskom. Nakon završene osnovne škole, 2011. godine, upisuje Franjevačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Sinju.

Nakon toga, 2015. godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij biologija i kemija – nastavnički smjer na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.