



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Karla Peranić

**PROMJENE POPULACIJA
CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS 1 TIJEKOM
HORIZONTALNOG I VERTIKALNOG
PRIJENOSA TE NJIHOV MOGUĆI UČINAK
NA POKAZATELJE OKSIDACIJSKOG
STRESA GLJIVE DOMAĆINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Karla Peranić

**PROMJENE POPULACIJA
CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS 1 TIJEKOM
HORIZONTALNOG I VERTIKALNOG
PRIJENOSA TE NJIHOV MOGUĆI UČINAK
NA POKAZATELJE OKSIDACIJSKOG
STRESA GLJIVE DOMAĆINA**

DOKTORSKI RAD

MENTOR:

IZV. PROF. DR. SC. MARIN JEŽIĆ

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Karla Peranić

**POPULATION CHANGES OF
CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS 1 DURING
VERTICAL AND HORIZONTAL
TRANSMISSION AND THEIR POTENTIAL
EFFECT ON OXIDATIVE STRESS
PARAMETERS IN THE FUNGAL HOST**

DOCTORAL THESIS

MENTOR:

ASSOC. PROF. MARIN JEŽIĆ, PhD

Zagreb, 2026.

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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. <i>Castanea sativa</i> (pitomi ili europski kesten)	3
2.2. <i>Cryphonectria parasitica</i>	4
2.3. <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> (CHV1)	7
2.4. <i>Biološka kontrola mikovirusima</i>	9
2.5. <i>Sekvenciranje nove generacije</i>	13
2.6. <i>Specifičnosti evolucije virusa</i>	16
2.7. <i>Oksidacijski stres</i>	17
2.8. <i>Utjecaj CHV1 virusa na domaćinsku gljivu</i>	19
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	21
4. MATERIJALI I METODE	22
4.1. <i>Prikupljanje uzoraka gljive</i>	22
4.2. <i>Određivanje prisutnosti virusa CHV1 u uzorcima gljive</i>	23
4.3. <i>Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive</i>	26
4.3.1. <i>Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive kokultiviranjem s EU-testerima</i>	26
4.3.2. <i>Izolacija DNA iz uzoraka gljive</i>	27
4.3.3. <i>Molekularno određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive</i>	28
4.4. <i>Vertikalni prijenos virusa CHV1</i>	31
4.5. <i>Horizontalni prijenos virusa CHV1</i>	33
4.6. <i>Bioinformatička obrada virusnih populacija</i>	35
4.6.1. <i>Priprema uzoraka za PacBio sekvenciranje</i>	35
4.6.2. <i>Obrada podataka sekvenciranja</i>	37
4.6.3. <i>Identifikacija mutacija u virusnim populacijama</i>	37
4.6.4. <i>Identifikacija virusnih varijanti (haplotipova)</i>	38
4.6.5. <i>Statistička obrada i određivanje raznolikosti virusnih populacija</i>	39
4.7. <i>Određivanje biokemijskih parametara oksidacijskog stresa gljive</i>	43
4.7.1. <i>Priprema proteinskih ekstrakata</i>	43
4.7.2. <i>Mjerenje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST)</i>	43
4.7.3. <i>Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze</i>	44
4.7.4. <i>Mjerenje aktivnosti enzima lakaze</i>	45

4.7.5.	Mjerenje ukupnih ne-proteinskih tiola.....	45
4.7.6.	Mjerenje lipidne peroksidacije	46
4.7.7.	Statistička obrada biokemijskih parametara oksidacijskog stresa	46
5.	REZULTATI.....	47
5.1.	Prisutnost virusa CHV1 u različitim EU-tipovima gljive.....	47
5.2.	Uspješnost vertikalnog prijenosa virusa CHV1	50
5.3.	Uspješnost horizontalnog prijenosa virusa CHV1	50
5.4.	Populacije virusa CHV1 u gljivi	54
5.4.1.	Promjene u sastavu i raznolikosti virusnih populacija prilikom vertikalnog prijenosa virusa CHV1	54
5.4.2.	Promjene u sastavu i raznolikosti virusnih populacija prilikom horizontalnog prijenosa virusa CHV1	58
5.4.3.	Struktura virusnih populacija	63
5.4.4.	Tipovi selekcije unutar domaćina	70
5.5.	Oksidacijski stres u gljive.....	72
5.5.1.	Oksidacijski stres u gljive nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1	72
5.5.2.	Oksidacijski stres u gljive nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1	75
5.6.	Interakcije između parametara oksidacijskog stresa te raznolikosti virusnih populacija prema mjerama raznolikosti Nei'H i π	79
6.	RASPRAVA	82
7.	ZAKLJUČCI.....	93
8.	LITERATURA	94
9.	PRILOZI	111
10.	ŽIVOTOPIS	126

Iz srca se zahvaljujem svima koji su bili uz mene prilikom nastajanja ovog doktorskog rada te mi pružali stručno znanje ili emocionalnu podršku na ovom putu.

Najprije se zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Marinu Ježiću koji me izabrao kao svoju prvu doktorandicu. Hvala na prenesenom znanju, stručnosti i profesionalnosti. Također se zahvaljujem na strpljenju i razumijevanju.

Hvala svim suradnicima na projektu, prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica što je uvijek spremna pomoći, saslušati te riješiti svaki problem i poteškoću, što je prije moguće. Hvala kolegama iz Švicarske, dr. Danielu Rigling i dr. Deborah Leigh koji su me jako lijepo ugostili tijekom usavršavanja, podučili novim metodama te imali znatan doprinos u ostvarenju ovog rada.

Velike zahvale također idu mojim curama sa Zavoda sa biokemiju - Luciji, Ivani, Maji i Dariji. Hvala na savjetima, ugodnoj radnoj atmosferi i ludim pričama. Uz vas nikad nije bilo dosadno i falit će mi vaša vedrina i spontano zaustavljanje posla da proslavimo svaku lijepu vijest i nečiji uspjeh! Jako mi je drago što vas, osim kolegicama, mogu zvati i prijateljicama.

Mojoj obitelji hvala na bezuvjetnoj potpori i razumijevanju.

I šećer na kraju, hvala mojoj boljoj polovici dr. sc. Mateju Peraniću (da mu barem negdje piše titula) na podršci, strpljenju i ljubavi.

INFORMACIJE O MENTORU:

Izv. prof. dr. sc. Marin Ježić je upisao smjer diplomirani inženjer biologije – molekularna biologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2002. godine. Diplomski rad naslova "Razgradnja gena *rbcL* tijekom starenja listova javora (*Acer pseudoplatanus* L.)" izradio je pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica te je 2007. godine i diplomirao. Krajem iste godine počinje volontirati na Botaničkom zavodu, Biološkog odsjeka PMF-a, a od siječnja 2008. godine zaposlen je na Botaničkom zavodu (danas: Zavod za mikrobiologiju), Biološkog odsjeka PMF kao znanstveni novak – asistent. Doktorirao je 2013. godine s temom „Raznolikost gljive *Cryphonectria parasitica* Murill Barr i njezin utjecaj na populacije pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill)“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perice. Od 2013. godine zaposlen je kao viši asistent – poslijedoktorand, od 2017. godine kao docent. Od 2023. godine radi kao izvanredni profesor na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Njegov znanstveni interes obuhvaća istraživanja raznolikosti gljiva i virusa te njihove ekološke interakcije s biljkama. Tijekom rada na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sudjelovao je na više znanstvenih projekata kao suradnik: „Biološka kontrola biljnih bolesti“ (2008.-2013.), „Diversity and interactions of chestnut, chestnut blight fungus and biocontrol agent - virus: implications on chesnut recovery“ (2014.-2017.), „Invasive chestnut diseases - epidemiological research and management options“ (2014.-2017.) i „From field to orchard: wild sweet chestnut populations and marron characteristics and adaptability to stress“ (2018.-2022.), a bio je i voditelj dvaju međunarodnih projekata koje su financirale Hrvatska zaklada za znanosti i Švicarska zaklada za znanost: „Dynamics of virus infection in mycovirus-mediated biological control of a fungal pathogen“ (2019.-2021.) te „Diversity and interactions of the chestnut bark canker mycobiome“ (od 2024.- 2028.). Do sada je objavio 40 radova u međunarodnim znanstvenim časopisima te sudjelovao s više od 80 priloga na raznim domaćim i međunarodnim skupovima. Bio je član organizacijskog odbora kao i urednik zbornika sažetaka međunarodnog kongresa „Power of Viruses“, 2018. godine. Tijekom godina kontinuirano kao član znanstvenog odbora podupire Simpozije studenata bioloških usmjerenja te Simpozije studenata doktorskih studija PMF-a. Član je uredništva časopisa *Acta Botanica Croatica* od 2017. godine. Na Biološkom odsjeku drži predavanja i praktičnu nastavu na više kolegija prijediplomskog i diplomskog studija – Ekologija bakterija i virusa, Metode istraživanja

nukleinskih kiselina, Mikologija, Mikrobiologija patogena, Opća mikrobiologija, Osnove mikrobiologije, te Protista i gljive. Bio je mentor studentima prilikom izrade šest diplomskih radova i šest završnih radova. Koautor je poglavlja "Mycoviruses as Antivirulence Elements of Fungal Pathogens" u knjizi „The biological role of the virus“. Na studentskim anketama konzistentno je ocjenjen odličnim ocjenama te je dobitnik studentske nagrade Brdo i Nagrade Srećko Jelenić za nastavnu izvrsnost 2022. godine. Od 2024. godine predstojnik je Zavoda za mikrobiologiju.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**PROMJENE POPULACIJA *CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS 1* TIJEKOM
HORIZONTALNOG I VERTIKALNOG PRIJENOSA TE NJIHOV MOGUĆI UČINAK
NA POKAZATELJE OKSIDACIJSKOG STRESA GLJIVE DOMAĆINA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Sažetak

Mikovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) koristi se u biokontroli ozbiljnog fitopatogena, gljive *Cryphonectria parasitica*. U ovom radu istražena je raznolikost populacija CHV1 prije i nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa. Korišteni su terenski te prototipski izolati koji spadaju u dva podtipa virusa – francuski (F1) i talijanski (I). Prilikom vertikalnog prijenosa virusa u spore utvrđen je efekt uskog grla gdje samo određeni dio virusnih varijanti biva prenesen. Tijekom horizontalnog prijenosa takav efekt nije zabilježen. Analizirane populacije virusa su uglavnom bile sastavljene od manjeg broja dominantnih varijanti koje se najčešće prenose dok je većina ostalih zastupljena u malom broju. Osim toga, ustanovljeno je da je raznolikost populacija virusa CHV1 unutar domaćina ponajprije oblikovana negativnom selekcijom ($\pi_S > \pi_N$). Kako bi se utvrdila razina stresa domaćina kao posljedica zaraze virusom, kao pokazatelji oksidacijskog stresa korišteni su aktivnost glutation-S-transferaze, lakaze, superoksid dismutaze, te razina tiola i lipidne peroksidacije. Rezultati ukazuju da su izolati gljive *C. parasitica* u nekim slučajevima imali višu razinu oksidacijskog stresa nakon prijenosa virusa. Virusna raznolikost nije imala jasan učinak na pokazatelje oksidacijskog stresa gljive domaćina.

(129 stranica, 17 slika, 14 tablica, 212 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: CHV1, hipovirulentnost, virusna raznolikost, biokemijski parametri stresa

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marin Ježić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

prof. dr. sc. Mirta Tkalec

izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

**POPULATION CHANGES OF *CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS 1* DURING VERTICAL
AND HORIZONTAL TRANSMISSION AND THEIR POTENTIAL EFFECT ON
OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN THE FUNGAL HOST**

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Abstract

Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1) is a mycovirus commonly used as a biocontrol agent of a serious phytopathogen *Cryphonectria parasitica*. In this thesis, viral diversity before and after vertical and horizontal transmission was determined. Field isolates, along with a few prototypic isolates that belong to two subtypes, French (F1) and Italian (I), were used. A bottleneck effect was observed during the vertical transmission of the virus into spores, suggesting that only certain viral variants are transmitted. During horizontal transmission that effect was not detected. Viral populations are mostly comprised of a smaller number of dominant variants that are usually transmitted, while the majority of variants are present in low abundance. The viral diversity of intra-host CHV1 populations is primarily shaped by negative selection ($\pi_S > \pi_N$). In order to determine the stress level of the host, several well-studied enzymatic and non-enzymatic oxidative stress parameters were used, namely glutathione S-transferase (GST), laccase, superoxide dismutase (SOD), thiol content, and level of lipid peroxidation, and it was shown that, in some cases, infected fungal isolates exhibit higher levels of oxidative stress after viral transmission. Viral diversity had no discernible effect on oxidative stress parameters of the host.

(129 pages, 17 figures, 14 tables, 212 references, original in Croatian)

Keywords: CHV1, hypovirulence, viral diversity, biochemical parameters of stress

Supervisor: Assoc. prof. Marin Ježić, PhD

Reviewers: Prof. Mirna Ćurković Perica, PhD

Prof. Mirta Tkalec, PhD

Assoc. prof. Ana Bielen, PhD

1. UVOD

Cryphonectria parasitica je fitopatogena gljiva koja na raznim vrstama kestena (rod *Castanea*) uzrokuje bolest rak kore kestena. Početkom 20. stoljeća je stigla iz Azije u Sjevernu Ameriku i Europu (Rigling i Prospero 2018) gdje se brzo proširila kroz populacije američkoga [*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.] i europskoga pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.) uzrokujući velike štete na njihovim populacijama (Anagnostakis 1987). Europske populacije kestena su se ubrzo počele oporavljati zbog uspostavljanja prirodne biološke kontrole gljive virusom *Cryphonectria hypovirus 1* - CHV1 (Robin i Heiniger 2001). Virus CHV1 uzrokuje kroničnu infekciju gljive te smanjuje njenu virulentnost prema domaćinu. Taj fenomen je poznat pod nazivom hipovirulentnost, a široka rasprostranjenost virusa CHV1 u Europi dovela je do uspostavljanja prirodne biološke kontrole ove iznimno opasne bolesti.

Virus CHV1 ima +ssRNA genom, visoku stopu replikacije i mutacije (Southwood i Ranganathan 2019) te ga stoga odlikuje velika genetska varijabilnost koja se postiže vrlo brzo unutar domaćina (Domingo i Holland 1997). Navedene karakteristike omogućuju ovom virusu brzu prilagodbu unutar domaćina zbog stvaranja novih virusnih varijanti s izmijenjenim biološkim karakteristikama te učinkovito savladavanje obrane domaćina (Gutiérrez i sur. 2012). Stoga su analize genetske strukture i evolucije virusnih populacija unutar domaćina ključne za osmišljavanje najboljih strategija za kontrolu štetnih virusa (Jridi i sur. 2006), odnosno, u slučaju virusa CHV1, za bolje razumijevanje i optimizaciju njegove uloge u biokontroli gljive *C. parasitica*. Smatra se da se virusne populacije u domaćinu uglavnom sastoje od nekoliko dominantnih varijanti koje su odgovorne za biološki učinak infekcije virusom te većeg broja rijetkih varijanti (Eliseev i sur. 2020).

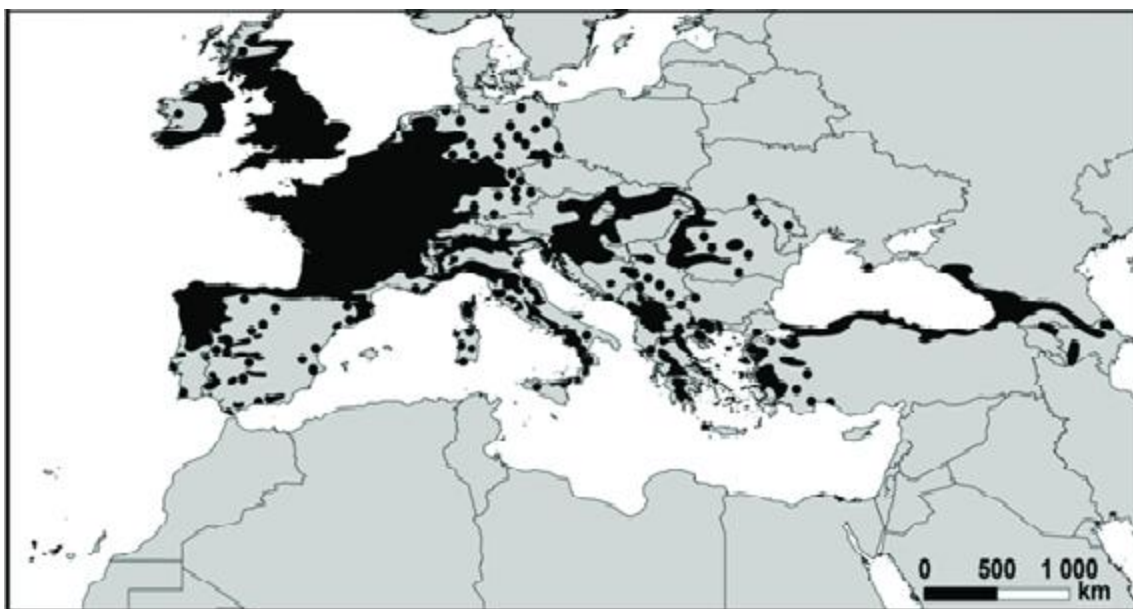
U ovom istraživanju proučavan je virus CHV1, odnosno raznolikost virusnih populacija prije i nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa u više zaraženih izolata gljive *C. parasitica* kako bi se dobio kompletniji uvid u evoluciju ovog virusa te dinamiku same virusne infekcije. Infekcija virusom CHV1 predstavlja biotički stress te mijenja ekspresiju gena, akumulaciju genskih transkripata i aktivnost proteina u gljivi *C. parasitica* (Chen i sur. 1996; Allen i sur. 2003; Kim i sur. 2012). Kako konačna biološka funkcionalnost proteina ovisi o njihovoj aktivnosti, podaci o učinku infekcije virusom CHV1 na aktivnost enzima gljive *C. parasitica*, posebno onih

uključenih u obranu od oksidacijskog stresa, vrlo su važni za bolje razumijevanje interakcija između virusa CHV1 i njegovog domaćina.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Castanea sativa (pitomi ili europski kesten)*

Rod *Castanea* spada u porodicu bukovki (Fagaceae), porijeklom je iz istočne Azije, odakle se rasprostranio Europom i Sjevernom Amerikom (Lang i sur. 2007). Danas su vrste ovoga roda prisutne diljem sjeverne hemisfere. U rod *Castanea* spada nekoliko vrsta kestena, a najistaknutiji predstavnik je *Castanea sativa* (Mill) tj. pitomi kesten koji je autohtona vrsta na području Europe i Male Azije (Slika 1.). Pitomi kesten je srednje veliko listopadno stablo koje može dosegnuti visinu od 30-35 metara te doživjeti starost i do 1000 godina. Kora je kod mlađih stabala siva, sjajna i glatka dok kasnije poprimi smeđu boju, deblja je i uzdužno ispucana. Listovi su duguljasti, kopljastog oblika, zaobljene osnove i šiljastog vrha. Vrsta je monocična te se cvjetovi razvijaju od kasnog lipnja do srpnja, a oprašuju se vjetrom ili kukcima. Plod je sjajni, tamnosmeđi orah (kesten). Plodovi su smješteni u kupulama, najčešće po jedan do tri zajedno. Kupula je kožasta, kuglastog oblika i prekrivena bodljikavim izraslinama te se pri dozrijevanju ploda raspucava na četiri jednaka dijela. Vrijeme dozrijevanja plodova je početkom listopada. U povoljnim uvjetima kesten rodi plodom svake godine, a obilniji urod mu je svake dvije ili tri godine (Herman 1971). Rasprostranjen je na području južne Europe (Pirenejski poluotok, južna Francuska, te Apeninski i Balkanski poluotok), Sjeverozapadne Afrike (Maroko), sjevero-zapadne Europe (Engleska, Belgija), središnje Europe, te istočno do zapadne Azije (Turska, Armenija, Gruzija, Azerbajdžan, Sirija). Može se naći između 200 i 1800 metara nadmorske visine. Velike kontinuirane sastojine pitomoga kestena su u Europi uglavnom koncentrirane u nekoliko zemalja kao što su Italija, Francuska te u zemljama Pirinejskog poluotoka. Kao što je vidljivo na Slici 1., areal pitomoga kestena je izuzetno fragmentiran, primarno zbog specifičnih ekoloških zahtjeva ove vrste (Schütt i sur. 2006). Pitomi kesten prilagođen je umjereno-vlažnoj, oceanskoj klimi (Anić 1942) a odgovara mu prosječna temperatura od 8 do 15 °C. Vrsta je izuzetno neotporna na kasni mraz (Conedera i sur. 2016). Od ovog stabla imamo višestruku gospodarsku korist (drvo, plod, med, tanin itd.). Kestenovina se nekada koristila za gradnju kuća, gospodarskih objekata i za sitnu građu (letve, stupovi, brvna, mosnice, gredice, grede). Lišće pitomoga kestena nekoć se koristilo u narodnoj medicini te kao prostirka za stoku.



Slika 1. Područje rasprostranjenosti pitomoga kestena (*C. sativa*) u Europi (2020.). Prilagođeno prema Freitas i sur. (2021)

2.2. *Cryphonectria parasitica*

Vrsta *Cryphonectria parasitica* je gljiva iz odjeljka Ascomycota (mješinarke) te je prirodno rasprostranjena na području istočne Azije. Prvi put je opisana kao *Diaporthe parasitica* Murrill, te je kasnije prebačena u rod *Endothia* (Anderson i Anderson 1912). Današnje ime je dobila tek 1978. godine – *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. (Barr 1978). Primarni je uzročnik raka kore kestena (Mellano i sur. 2012; Milgroom i sur. 1992; Milgroom i sur. 1996; Yan i sur. 2007). Prvi put je opisana izvan svojeg prirodnog areala, kao invazivna vrsta na američkom pitomom kestenu *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh. Podložnost domaćina ovom patogenu uvelike varira ovisno o vrsti kestena. Vrste prisutne u Aziji, poput *Castanea crenata* (Siebold & Zucc.), *Castanea henryi* (Skan) Rehder & Wilson, *Castanea mollissima* (Blume) i *Castanea seguinii* (Dode), imaju razvijenu toleranciju prema gljivi *C. parasitica* zbog njihove dugotrajne zajedničke evolucije (Anagnostakis 1992). Simptomi raka kore kestena na tolerantnijim vrstama su površinske lezije na deblu, stoga stabla mogu preživjeti infekciju s minimalnim oštećenjima (Graves 1950; Griffin i Elkins 1986). Pitomi kesten (*C. sativa*) te sjevernoameričke vrste kestena (*C. dentata*, *Castanea ozarkensis* (Ashe) i *Castanea pumila* ((L.) Mill.)) su vrlo osjetljive na ovaj patogen te infekcije

rezultiraju velikom stopom sušenja (Graves 1950). Rak kore kestena je uzrokovao značajnu redukciju prirodnih populacija ovih vrsta kestena te ima negativan učinak na komercijalnu upotrebu ploda kestena (Graves 1950; Griffin i Elkins 1986; Anagnostakis 1992). Broj stabala kestena *C. dentata* u Sjevernoj Americi reduciran je za preko 99,97%; procjenjuje se da je u manje od 40 godina od trenutka unosa gljive *C. parasitica* u Sjevernu Ameriku od četiri milijarde stabala preostalo svega par tisuća zrelih jedinki (Paillet 1984). Genetske analize sjevernoameričkih populacija gljive *C. parasitica* ukazuju na opetovani unos te gljive, vjerojatno zbog trgovine, odnosno uvoza sadnica azijskih vrsta kestena iz Japana (Anagnostakis 1987; Milgroom i sur. 1996; Dutech i sur. 2012).

U Europi, ova gljiva je prvi put otkrivena 1938. godine u sjevernoj Italiji, u okolici Genove, koja je važna međunarodna luka. Istraživanja mikrosatelitnih markera ukazuju na to da je gljiva unesena iz Sjeverne Amerike (Dutech i sur. 2012). Do 1950. godine gljiva *C. parasitica* proširila se kroz sve regije Italije s većim populacijama kestena, odakle se također vrlo brzo proširila na susjedne zemlje – Francusku, Švicarku i Sloveniju (Heiniger i Rigling 1994; Krstin i sur. 2008; Prospero i Rigling 2012) te na populacije kestena središnje, jugoistočne Europe i Male Azije (Robin i Heiniger 2001). Na mnogim od ovih područja jugoistočne Europe prisutan je samo jedan, dominantan genotip gljive *C. parasitica* koji se klonalno proširio, a za koji se pretpostavlja da također potječe iz Italije (Milgroom i sur. 2008). U nekim populacijama južne Europe postoje divergentne genetske linije gljive *C. parasitica* što potencijalno ukazuje na veći broj nezavisnih unosa ove gljive u Europu. Dutech i sur. (2010, 2012) tako su otkrili dva nezavisna unosa iz Azije u jugozapadnu Francusku. Između 1920-ih i 1950-ih stabla kestena su u više navrata uvažana iz Azije i SAD-a u Europu, te je tako u Europu unesena i gljiva *C. parasitica* (Heiniger i Rigling 1994; Dutech i sur. 2012). Mnoga od ovih stabala su uvezena s ciljem uzgoja kestena otpornih na tintnu bolest. Uzročnici te bolesti su organizmi koji sliče gljivama (eng. *fungal like organisms*, FLO), pripadnici odjeljka Oomycota: *Phytophthora cambivora* i *Phytophthora cinamomi* (Vannini i Vettraino 2001; Prospero i sur. 2023). Prije pojave raka kore kestena, upravo je tintna bolest bila najznačajnija prijetnja fitosanitarnom statusu pitomoga kestena u Europi. Danas je bolest rak kore kestena prisutna u svim većim šumama kestena kontinentalne Europe, a sama bolest drastično je reducirala populacije pitomoga kestena u Europi (Robin i Heiniger 2001).

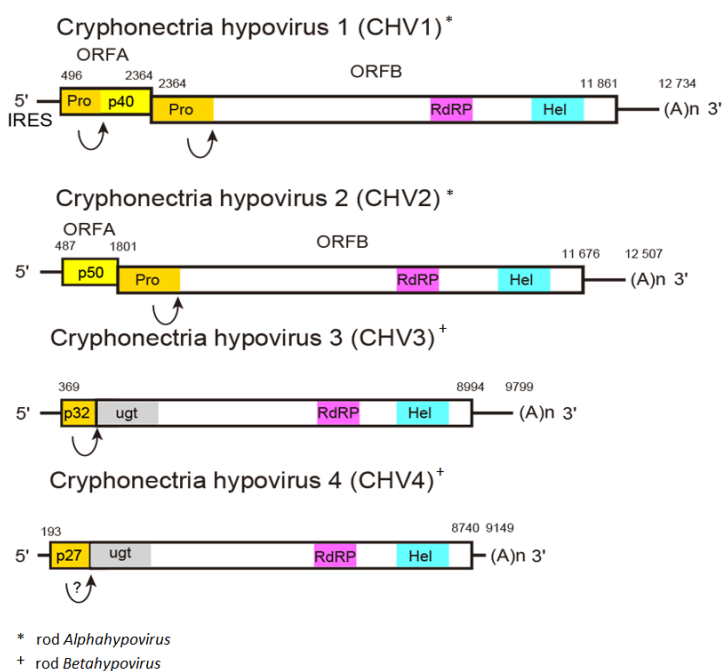
Gljiva *C. parasitica* je patogen kore te inficira nadzemne dijelove stabla (deblo, grane i grančice). Ulazi kroz rane ili pukotine na stablu i naposljetku uzrokuje tzv. rakove, zbog kojih se manje grane mogu osušiti u svega par mjeseci. Gljiva *C. parasitica* s vremenom je postala klasični primjer invazivnog stranog patogena koji je uzrokovao ozbiljnu epidemiju na autohtonoj vrsti kestena. Višegodišnji rakovi se formiraju na deblu ili debljim granama te mogu proći godine prije nego se domaćin osuši. Rakovi na mlađim stablima su narančaste do crveno-smeđe boje na površini dok je na starijim stablima obojenost manje izražena. Na području gdje je kora deblja, teško je uočiti prisutnost gljive *C. parasitica*, dok se ne pojave uzdužne pukotine (Diller 1965). Micelij gljive se lepezasto širi ispod kore te prodire kroz kambij, pritom ga uništavajući. Ako kambij odumre, kora se uvlači u stablo te se pojavljuje karakteristična udubljena morfologija raka. Rak kore kestena može brzo narasti te zahvatiti i distalne dijelove biljke. Lišće potom požuti i uvene, no ostaje na stablu. To je najizraženiji rani simptom infekcije ovom gljivom koji se može vidjeti u krošnji. Rakovi koji su nastali infekcijom stabla hipovirulentnim sojevima gljive (*C. parasitica* inficirana s CHV1) na početku liče onima uzrokovanim virulentnim sojevima gljive (*C. parasitica* bez CHV1). No vremenom, širenje hipovirulentnih sojeva se usporava i naposljetku zaustavlja. Pošto se gljiva ne širi kroz kambij, distalni dijelovi biljke preživljavaju. Morfologija raka i infekcija hipovirulentnom gljivom nisu uvijek jasno povezani, iz čega proizlazi da se infekcija hipovirulentnom gljivom može nedvojbeno pokazati samo laboratorijskim analizama (Bryner i sur. 2013).

Otkrićem prirodnog patogena ove gljive (*Cryphonectria hypovirus 1* - CHV1) koji smanjuje njenu virulentnost prema domaćinu je počela njegova upotreba u biološkoj kontroli ove bolesti diljem kontinenta. Virulentnost sojeva gljive prisutnih u Europi se tijekom godina značajno smanjila, odnosno došlo je do pojave hipovirulentnosti te je pitomi kesten i dalje komercijalno važna vrsta (Biraghi 1953; Grente 1965; Anagnostakis 1982; Robin i Heiniger 2001).

2.3. *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1)*

Cryphonectria hypovirus 1 spada u porodicu *Hypoviridae*, rod *Alphahypovirus* te virusnu vrstu *Alphahypovirus cryphonectriae* (Chiba i sur. 2023). Porodicu *Hypoviridae* čini osam rodova (*Alphahypovirus*, *Betahypovirus*, *Gammahypovirus*, *Deltahypovirus*, *Epsilonhypovirus*, *Zetahypovirus*, *Thetahypovirus*, *Etahypovirus*). Genome virusa iz porodice *Hypoviridae* čini jednolančana RNA pozitivnog smisla (+ssRNA), dugačak 7.3 – 18.3 kb, dok je genom virusa CHV1 dug oko 12,7 kb, uključujući i poliadenilatni rep na 3' kraju. Virion ne postoji, odnosno virusi ove porodice, pa tako i CHV1, nemaju proteinsku kapsidu.

Uz CHV1 do danas su poznata i opisana još tri hipovirusa koji inficiraju gljivu *C. parasitica*: CHV2, CHV3 i CHV4, svrstani u dva različita roda (Slika 2.). CHV1 i CHV2 pripadaju rodu *Alphahypovirus* dok CHV3 i CHV4 spadaju u rod *Betahypovirus*.



Slika 2. Organizacija genoma pojedinih pripadnika porodice *Hypoviridae*. Strelice predstavljaju poznata ili pretpostavljena mjesta autoproteolize. Skraćenice Pro, RdRP, Hel i ugt odnose se na proteazu, RNA polimerazu ovisnu o RNA, helikazu i UDP-glukoza/sterol glukoziltransferaznu domenu. Preuzeto s ICTV (<https://ictv.global/report/chapter/hypoviridae/hypoviridae>, pristupljeno 20.5.2025)

Virusi CHV1, CHV2, CHV3 i CHV4 se razlikuju u organizaciji genoma, utjecaju na domaćina i rasprostranjenosti (Hillman i Suzuki 2004). Infekcija virusima CHV2 i CHV3 također uzrokuju pojavu hipovirulentnog fenotipa kod domaćina dok infekcija virusom CHV4 ne uzrokuje značajne simptome. CHV2 je rasprostranjen na području Sjeverne Amerike i Azije dok su CHV3 i CHV4 rasprostranjeni samo na području Sjeverne Amerike. CHV1 (12,7 kb) i CHV2 (12,5 kb) imaju vrlo sličnu organizaciju genoma, te sadrže dva otvorena okvira čitanja (ORFA i ORFB). S druge strane, CHV3 (9,8 kb) i CHV4 (9,1 kb) imaju kraće genome i samo jedan otvoreni okvir čitanja (Dawe i Nuss 2013). ORFA virusa CHV1 je varijabilna regija na 5' kraju genoma virusa koja kodira poliprotein. Autokatalitičkim djelovanjem proteazne domene na N-kraju poliproteina oslobađaju se proteini p29 i p40. Protein p40 ima ulogu kontrole replikacije genoma virusa i njegove genske ekspresije. ORFB kodira drugi poliprotein koji također posjeduje autoproteolitičku domenu na N-kraju, koja se oslobađa tijekom translacije kao protein p48, te dvije domene, polimeraznu i helikaznu, na C-kraju poliproteina (Shapira i sur. 1991).

Virus CHV1 je rasprostranjen u Europi gdje razlikujemo nekoliko podtipova obzirom na razlike u nukleotidnoj sekvenci regije ORFA (Gobbin i sur. 2003). Podtip I (talijanski) je najrašireniji te se pojavljuje u više država kao što su Italija, Švicarska, Slovenija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Makedonija, Grčka, jugoistočna Francuska i Turska (Allemann i sur. 1999; Krstin i sur. 2008, 2011; Sotirovski i sur. 2006; Akilli i sur. 2013). Ostali podtipovi (F1, F2, D, E i G) su pronađeni uglavnom u Francuskoj (F1 i F2), Njemačkoj (D), Španjolskoj (F1, D i E), Turskoj (F2) i Gruziji (G) na ograničenom području (Zamora i sur. 2012; Akilli i sur. 2013; Feau i sur. 2014; Peters i sur. 2014; Rigling i sur. 2018). Geografska rasprostranjenost podtipova CHV1 poklapa se s rasprostranjenošću gljive *C. parasitica*, što je posljedica višestrukog unosa gljive i virusa u Europu (Rigling i Prospero, 2018). Podtipovi se međusobno također razlikuju i prema intenzitetu hipovirulentnog efekta kojeg uzrokuju te ukupnom učinku koji imaju na gljivu domaćina (Morozov i sur. 2007; Robin i sur. 2010). Primjerice, podtip I ima blaži učinak na domaćina te se stoga može uspješnije prenositi kroz populaciju gljiva prirodnim putem, bez značajnog angažmana čovjeka. Suprotno tome, francuski podtipovi (F1 i F2) snažno usporavaju rast i sporulaciju gljive te time ograničavaju vlastito širenje kroz određenu populaciju gljive *C. parasitica* (Robin i sur. 2010). Međutim, važno je istaknuti da unutar podtipa I, mutacije u ORFA regiji mogu promijeniti učinak virusa CHV1 na fenotip domaćina (Krstin i sur. 2020). Takve varijacije u virulentnosti podtipa I su nađene u brojnim područjima, primjerice Ujedinjenog kraljevstva (Romon-Ochoa i

sur. 2020), Hrvatske (Nuskern i sur. 2017; Krstin i sur. 2020) te Makedonije (Sotirovski i sur. 2011).

2.4. *Biološka kontrola mikovirusima*

Biološka kontrola ili biokontrola nekog štetnika podrazumijeva korištenje njegovih prirodnih neprijatelja (predatora ili patogena) umjesto kemijskih agensa u kontroli tog štetnika. Upotreba mikovirusa u biokontroli je predmet mnogih istraživanja zbog činjenice da mogu oslabiti svog domaćina i time smanjiti njegovu virulentnost prema drugim organizmima, ali ne toliko da bi ugrozili vlastiti opstanak i širenje u populaciji. Taj fenomen se naziva hipovirulentnost. Mikovirusi fitopatogenih gljiva koji uzrokuju hipovirulentnost posebno su zanimljivi za biokontrolu (Garcia-Pedrajas i sur. 2019). Oni mogu utjecati na virulentnost, morfologiju, sporulaciju, brzinu vegetativnog rasta te pigmentaciju svojeg domaćina. Iako su točni mehanizmi kojima uzrokuju fenomen „hipovirulentnosti“ slabo poznati, utvrđeno je da interakcijama proteina domaćina i proteina virusa te promjenama u brojnim putevima prijenosa signala dolazi do promjene fiziologije domaćina i time redukcije virulentnosti (Choi i sur. 1995; Chen i sur. 1996). Tako je primjerice u infekciji gljive *C. parasitica* virusom CHV1 zabilježeno smanjivanje pigmentacije domaćinske gljive, redukcija sporulacije, te akumulacija lakaze – simptomi koji su povezani s virusnom proteazom koji je nalik papainu, p29 (Craven i sur. 1993). Sojevi gljive *C. parasitica* inficirani s CHV1 također imaju povećanu proizvodnju proteina ATG8 koji ima ključnu ulogu u učinkovitoj replikaciji virusa. Suprotno tome, infekcija virusom CHV1 također utječe na promjene u regulaciji proteina koji sprečavaju ekspresiju virusne RNA, kao što su DNA metiltransferaze. Kao rezultat toga, rast gljive je usporen, a morfologija micelija izmijenjena. Promjenu u procesu aktivacije mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) koja uključuje CpMK-1 otkrili su Kim i sur. (2002), a Park i sur. (2004) i povećanu sintezu serin/treonin protein kinaze CpPK-1 kod hipovirulentnih sojeva gljive *C. parasitica*. Sve to utječe na pigmentaciju, stvaranje konidija te sposobnost spolnog razmnožavanja gljive domaćina. Također postoje i opsežni dokazi o prekidanju signalnih puteva posredovanih G-proteinom zbog infekcije virusom CHV1; primjerice Choi i sur. (1995) su otkrili da infekcija virusom CHV1 dovodi do smanjivanja razine $G\alpha$ podjedinice proteina G, CPG-1. Narušavanje funkcije gena koji kodira za podjedinicu CPG-1 rezultira gubitkom virulentnosti gljive *C. parasitica*, smanjenim nakupljanjem podjedinice

CPGB-1, te fenotipskim promjenama koje su slične onima uzrokovanim infekcijom virusa (Gao i Nuss 1996). Prema ovim rezultatima predložen je model prema kojem promjene u signalnim putevima gljive *C. parasitica* uzrokovane infekcijom virusom CHV1 sprječavaju širenje lezije na kori kestena, time što smanjuju mogućnost gljive da adekvatno reagira na okolišne signale važne u kolonizaciji domaćina tijekom infekcije (Nuss 1996; Dawe i Nuss 2001).

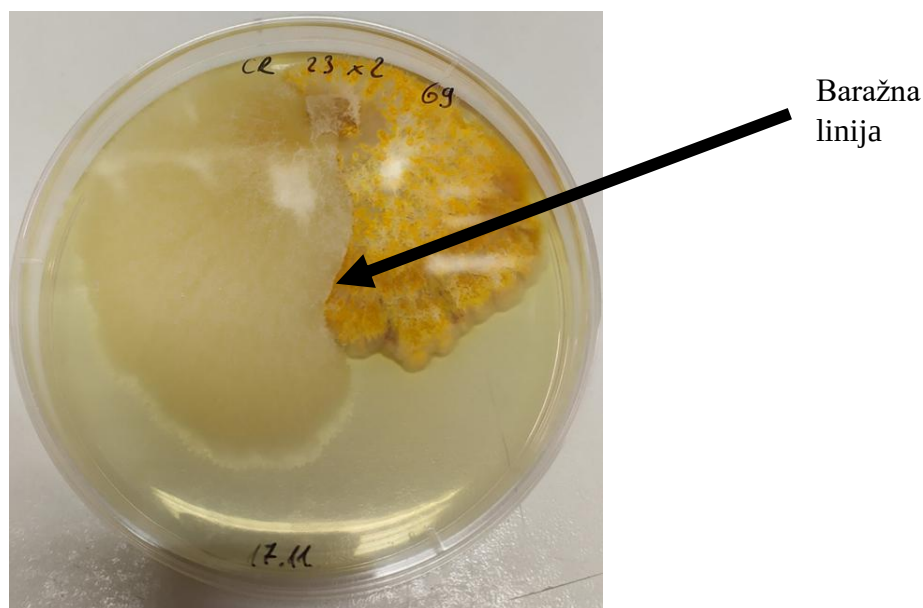
Uspješna provedba biokontrole patogenih organizama virusima uključuje nekoliko koraka: identifikacija i opisivanje virusa, razvitak protokola za inokulaciju, uspješno širenje virusa kroz populaciju domaćina, te praćenje prevalencije virusa u populaciji domaćina kroz dulji vremenski period. Unatoč velikom interesu, mali je broj primjera uspješne biokontrole primjenom virusa koji uzrokuju hipovirulentnost domaćina u prirodi (Myers i James 2022).

Kako bi se određeni mikovirus smatrao potencijalnim kandidatom za biokontrolu, mora se, uz uzrokovanje fenomena hipovirulentnost, uspješno prenijeti na novog domaćina putem anastomoze hifa, odnosno na njegovo potomstvo putem spora. Sposobnost prijenosa je ključna za dugotrajan uspjeh i učinkovitost biokontrole mikovirusima. Za neke mikoviruse, poput *Botrytis* virus X koji inficira gljivu *Botrytis cinerea* (Tan i sur. 2007), CHV1 (Peever i sur. 2000), *Fusarium graminearum* hypovirus 1 koji inficira gljivu *Fusarium graminearum* (Wang i sur. 2016) te više različitih dsRNA virusa nađenih u gljivi *Monilinia fructicola* (Tsai i sur. 2004), primarni put prijenosa je putem spora (Ghabrial i Suzuki 2009; Pearson i sur. 2009), no uspješnost samog prijenosa može jako varirati obzirom na različite tipove spora (spolne ili nespolne) u koje se virus prenosi, soj virusa ili genotip gljive.

Najpoznatiji primjer uspješne biokontrole upotrebom mikovirusa u Europi je upravo primjena *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) za smanjenje virulentnosti gljive *Cryphonectria parasitica*. CHV1 utječe na virulentnost gljive ograničavajući njen vegetativni rast i sporulaciju. Program namjernog uvođenja virusa CHV1 u prirodu je uspostavljen i još je uvijek aktivan u Europi. Time je biološka kontrola ove bolesti posredovana aktivnim angažmanom i djelovanjem čovjeka. Hipovirulentni sojevi gljive *C. parasitica* nanese se na rubove raka kore kestena gdje počinju rasti i širiti se kroz rak, pritom stvarajući anastomoze s virulentnim sojem gljive koja je već prisutna u raku i koja je uzrokovala primarnu leziju na kori stabla. Pri tome dolazi do prijenosa virusa iz inokuliranog hipovirulentnog soja gljive u virulentni soj gljive, te naposljetku do promjene

čitavog izgleda raka kore, koji iz ulegnute morfologije prelazi u natečenu. Formiraju se novi slojevi kore ispod zaraženog područja, vanjska kora puca, te dolazi do karakterističnog izgleda raka sekundarno zaraženog virusom CHV1 koji se naziva zarastajući rak. Smanjena virulentnost gljive te njen sporiji rast omogućavaju kestenu da uspije ograničiti širenje infekcije te je zbog toga i smrtnost zbog ove bolesti znatno niža. Temelj uspješne biokontrole je u tome da se, nakon namjernog uvođenja virusa, on može prirodno proširiti i da se njegova prevalencija stabilizira na određenom području. Iako funkcionalan, ovakav načina rada na velikim i posebno teško dostupnim šumskim područjima nije praktično izvediv. Daljnje ograničenje ove metode je i sustav vegetativne (somaticke) kompatibilnosti koji ograničava prijenos virusa iz jednog soja gljive u drugi. Ovaj sustav prepoznavanja i razlikovanja „sebe“ od „stranog“ vrlo je uobičajen među eukariotima, pa tako i u carstvu gljiva, te je istraživao kod vrsta *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Podospora anserina* i *C. parasitica* (Loubradou i Turcq 2000). U gljive *C. parasitica*, do danas je otkriveno šest nezvezanih, bialelnih lokusa vegetativne kompatibilnosti (*vic*) (Cortesi i Milgroom 1998). Kombinacijom alela tih šest lokusa moguće je dobiti 64 različita genotipa, tj. 64 različita tipa vegetativne kompatibilnosti (tzv. *vc* tipa). U Europi se tih 64 različita genotipa označava prefiksom EU i brojem, primjerice EU-1, EU-2 itd., te se standardni sojevi gljive *C. parasitica* koriste kao testeri kod utvrđivanja *vc* tipa klasičnom metodom zajedničkog rasta *in vitro* (Cortesi i Milgroom, 1998; Cortesi i sur. 1998). Ukoliko, dva soja gljive *C. parasitica* imaju identične alele na svih šest lokusa, to znači da imaju isti *vc* tip, te se takve gljive smatraju vegetativno kompatibilnima. Kad ih uzgajamo u laboratoriju na umjetnim podlogama *in vitro*, primjerice na Petrijevim zdjelicama s hranjivom podlogom (krumpirov dekstrozni agar, eng. *potato dextrose agar*, PDA), kompatibilni sojevi gljiva srastu, dok se na području kontakta između nekompatibilnih sojeva formira tzv. barožna linija (Slika 3.). Barožna linija je vidljiva posljedica programirane smrti stanica (apoptoze) na mjestu susreta nekompatibilnih hifa. Apoptoza hifa inicijalizira se fuzioniranjem nekompatibilnih micelija (Biella i sur. 2002). Upravo zahvaljujući ovom fenomenu – formiranju barožne linije među nekompatibilnim micelijima tijekom njihova rasta, razvijeni su testni sojevi, odnosno testeri, gljive *C. parasitica*, kojima se može utvrditi pripadnost nepoznatih sojeva određenom tipu vegetativne kompatibilnosti (Cortesi i sur. 1998). Molekularna karakterizacija svih šest *vic* lokusa, omogućila je razvoj molekularne metode određivanja genotipa vegetativne kompatibilnosti gljive *C. parasitica* koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (Short i sur. 2015).

Genska raznolikost, odnosno raznolikost vr tipova populacija gljive *C. parasitica* do danas je istražena u mnogim zemljama (Yan i sur. 2007; Ahmad i Baric 2022; Ježić i sur. 2012; Prospero i sur. 2013; Breuillin i sur. 2006). Najveća raznolikost vr tipova je prisutna, kao što je i očekivano, u autohtonim populacijama gljive *C. parasitica* u Aziji gdje je većina sojeva nekompatibilna s europskim sojevima (Liu i Milgroom 2007). Europske populacije također uglavnom imaju nižu raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti od onih u SAD-u (Milgroom i Cortesi 2004). Također, bitno je istaknuti da najstarije populacije gljive *C. parasitica*, prisutne u južnoj Švicarskoj, Hrvatskoj i sjevernoj Italiji (Prospero i Rigling 2012; Ježić i sur. 2018; Stauber i sur. 2021) imaju i najveću raznolikost vr tipova, dok ta raznolikost opada prema rubovima areala gljive *C. parasitica* u Europi, odnosno na fronti širenja bolesti raka kore kestena (Hoegger i sur. 2000; Milgroom i sur. 2008; Bryner i Rigling 2012a; Dutech i sur. 2012; Springer i sur. 2013). Mali broj polimorfnih *vic* lokusa te ograničen ulazak dodatnih *vic* genotipova su vjerojatno glavni razlozi smanjene raznolikosti u novoosnovanim populacijama gljive *C. parasitica*. Također, ograničena mogućnost spolne reprodukcije, a time i rekombinacije gena, uočena u brojnim europskim populacijama, doprinosi maloj raznolikosti vr tipova (Milgroom i Cortesi 1999).



Slika 3. Rast micelija vegetativno nekompatibilnih gljiva *C. parasitica* na Petrijevoj zdjelici s hranjivom podlogom PDA. Na mjestu kontakta stvara se baražna linija (mjesto programirane stanične smrti hifa) koja jasno odjeljuje dva micelija različitog tipa vegetativne kompatibilnosti.

Pretpostavlja se da je u Europi CHV1 prirodno unesen u populaciju gljive *C. parasitica* zajedno s domaćinom te se potom spontano proširio s domaćinskom gljivom (Bryner i sur. 2012). U USA su u pokušajima biološke kontrole korišteni i *Cryphonectria hypovirus 3* (CHV3) i CHV1. No, veća raznolikost tipova vegetativne kompatibilnosti u Sjevernoj Americi nego u Europi, otežava prirodno širenje virusa anastomozama među sojevima gljiva *C. parasitica* unutar populacije, kao i nešto veća osjetljivost američkog kestena u usporedbi s europskim kestenom na bolest rak kore kestena uzrokovala je slabiji uspjeh potpomognute biokontrole (Dawe i Nuss 2013; Milgroom i Cortesi 2004). Obećavajuća strategija za Sjevernu Ameriku je razvoj posebnog tipa gljive *C. parasitica* u kojem su geni odgovorni za vegetativnu kompatibilnost utišani. Ovakva gljiva ima genotip koji je kompatibilan s bilo kojom drugom što znači da može formirati stabilne anastomoze s drugim sojevima gljive *C. parasitica*, bez obzira na njihov tip vegetativne kompatibilnosti, te tako neometano širiti virus i uspostaviti stabilnu biokontrolu (Biella i sur. 2002). Godine 2019. razvijen je tzv. superdonor koji se sastojao od dva modificirana soja gljive *C. parasitica* (SD328/SD82) u kojima su bili utišani geni za četiri od šest *vic* lokusa koji su prenosili CHV1 u gljive svih *vc* tipova (testirano u laboratoriju), te jeabilježen prelazak virusa u 94% gljiva koje su inficirale prirodne populacije američkog kestena (Stauder i sur. 2019).

2.5. *Sekvenciranje nove generacije*

Više od 20 godina nakon otkrića strukture molekule DNA, osmišljena je prva metoda za određivanje slijeda baza, odnosno njeno sekvenciranje (Sanger i sur. 1977). Metoda se sastoji od dodavanja dideoksiribonukleotida (ddNTP) koji su radioaktivno ili fluorescentno obilježeni, čijim ugrađivanjem u rastući lanac DNA se prekida sinteza lanca tijekom polimerizacije na specifičnom mjestu. Povijesno su se koristili radioaktivno obilježeni nukleotidi u četiri zasebne reakcije, dok se danas upotrebljavaju fluorescentno obilježeni ddNTP-ovi. Time je omogućena sinteza kraćih dijelova komplementarnog lanca DNA koji su prekinuti na točno određenom mjestu gdje je ugrađen odgovarajuću ddNTP. Umnoženi dijelovi DNA se tada odvajaju na temelju veličine poliakrilamidnom elektroforezom kako bi se utvrdila točna sekvenca molekule. Poznatija pod nazivom Sangerovo sekvenciranje, ova se metoda postupno poboljšavala primjenom kapilarne elektroforeze koja je jednostavnija, brža i ima bolju razlučivost. Metodu danas smatramo tzv.

„sekvenciranjem prve generacije“ te se koristi za sekvenciranje genoma različitih veličina, od virusa i bakterija (Fleischmann i sur. 1995; Baer i sur. 1984) do ljudskog genoma (Lander i sur. 2001; Venter i sur. 2001). Također ima široku upotrebu u kliničkoj dijagnostici kao potvrda genetskih varijanti nakon novijih metoda „sekvenciranja nove generacije“ (Richards i sur. 2015), te kao rutinski dio rada u molekularnoj biologiji kako bi se potvrdili konstrukti za kloniranje te PCR-amplikoni (Crossley i sur. 2020; Bezerra i sur. 2021). Još uvijek se koristi i za identifikaciju raznih mikroorganizama (Chen i sur. 2014; Sting i sur. 2019) kao i u forenzičkim analizama (Bruijns i sur. 2018). Usprkos tome, korištenje ove metode za sekvenciranje čitavih genoma je bilo skupo, zahtjevno te vrlo sporo, čak i za relativno male genome.

Ranih 2000-tih godina uvedene su nove metode sekvenciranja poznatije pod nazivom „sekvenciranje nove generacije“ (eng. *next-generation sequencing* - NGS). Metode NGS-a su revolucionalizirale proučavanje genoma budući da brzo mogu sekvencirati milijune DNA molekula, u mnogo kraćem vremenu nego što je moguće Sangerovim sekvenciranjem. Tehnologija se kontinuirano razvija kako bi se omogućilo točnije i efikasnije analiziranje velike količine genomskih podataka. Za značajno povećanje količine dobivenih podataka tj. genoma koji se sekvenciraju i analiziraju zaslužne su inovacije koje su omogućile masivno paralelno sekvenciranje pojedinačnih DNA molekula (Satam i sur. 2023).

Tehnologije sekvenciranja se često dijele na sekvenciranje kratkih očitavanja (eng. *short read sequencing* - SRS) i sekvenciranje dugih očitavanja (eng. *long read sequencing* - LRS). Sekvenciranje kratkih očitavanja na platformama kao što su Illumina ili Ion Torrent, obično kreću s fragmentacijom DNA molekule, popravkom krajeva, spajanjem adaptera, nakon čega slijedi pričvršćivanje na površinu te *in-situ* umnožavanje. Ovakva tehnologija omogućava paralelno sekvenciranje ogromnog broja kratkih očitavanja. Međutim, ti podaci, ako se radi o dužoj molekuli DNA, moraju biti ponovno složeni u pravilan redoslijed što predstavlja velik izazov u slučaju strukturnih varijanti te regija niske složenosti (mala raznolikost nukleotida). LRS predstavljaju naprednije tehnologije koje mogu generirati očitavanja duga više tisuća parova baza, što predstavlja značajnu prednost nad SRS u detekciji određenih tipova genetskih varijanti (Logsdon i sur. 2020; Chaisson i sur. 2019). Jedna od LRS tehnologija je i SMRT (eng. *single-molecule real-time*) ili PacBio (Pacific Biosciences) sekvenciranje. Kod SMRT sekvenciranja fluorescentno se obilježava fosfatni kraj nukleotida (različito za svaku bazu). Sam uređaj ima specijalizirane protočne „bunare“ širine par nanometara. To su tzv. valovodi s nultim načinom rada (eng. *zero mode*

waveguides, ZMW), koji usmjeravaju svjetlosnu energiju u vrlo malenom volumenu te tako omogućavaju analizu pojedinačnih molekula tijekom sekvenciranja. Na dnu se nalazi DNA polimeraza koja imobilizira molekulu DNA te započinje elongaciju unutar ZMW-a. Prilikom ugradnje nukleotida u DNA molekulu, fluorescentna oznaka se odcijepi i difundira. Detektor potom očitava fluorescentni signal i identificira ugrađeni nukleotid. PacBio koristi metodu kružnog konsenzus sekvenciranja (eng. *circular consensus sequencing* – *ccs*). Nakon cirkularizacije predloška DNA polimeraza može više puta sekvencirati isti fragment, čime nastaje više neovisnih očitavanja iste molekule (Slika 4.).

SMRT predložak

Dva adaptera u obliku ukosnice koji omogućuju kontinuirano kružno sekvenciranje

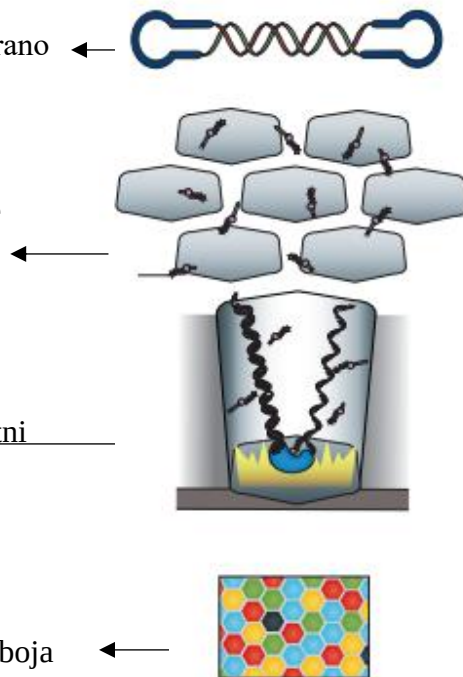
Specijalizirani protočni „bunari“ (ZMW), mjesta gdje se odvija sekvenciranje pomoću obilježenih nukleotida

DNA polimeraza na dnu

Prilikom ugradnje nukleotida, kamera bilježi fluorescentni signal

Rezultat sekvenciranja

Kamera detektira svaki signal iz svakog ZMW-a; svaka boja odgovara određenom nukleotidu



Slika 4. Shematski prikaz SMRT metode sekvenciranja (Prilagođeno prema Goodwin i sur. 2016).

Tako se dobije više očitavanja iste sekvence od kojih se onda konstruira konsenzus sekvenca te se tako eliminira većina grešaka (Carneiro i sur. 2012) čime se značajno poboljšava točnost rezultata (Travers i sur. 2010). Ovakvo tzv. HiFi (eng. *high fidelity*) sekvenciranje spaja iznimno visoku točnost (preko 99,5 %) s dugim očitanjima (10 - 25 kb) (Hon i sur. 2020.) i jednolikom pokrivenošću sekvenciranja DNA molekule (Kingan i sur. 2019). Dulja očitavanja omogućuju postizanje iste pokrivenosti genoma s manjim brojem pojedinačnih očitavanja, što može pojednostavniti sastavljanje sekvenci i smanjiti opseg bioinformatičke obrade. Koristeći ove metode sekvenciranja mogu se uspješno detektirati virusne varijante unutar domaćina, uključujući i one rijetke, što je od velikog značaja za analize raznolikosti virusnih genoma (Hamim i sur. 2022).

2.6. *Specifičnosti evolucije virusa*

Evoluciju virusa karakteriziraju veliki broj infektivnih čestica, brza replikacija i visoke stope mutacije (Southwood i Ranganathan 2019) što dovodi do ekstremno velike raznolikosti unutar virusnih populacija (Domingo i Holland 1997). Ovakve karakteristike omogućuju virusima generiranje velikog broja novih varijanti, što omogućuje brzu adaptaciju na pritiske prirodne selekcije poput obrambenih mehanizama domaćina, rezistentnosti ili terapije raznim antivirusnim lijekovima. Analize genetskih struktura i evolucije virusnih populacija su stoga vrlo bitne kod razvoja strategija za kontrolu bolesti uzrokovanih virusima. Te karakteristike čine viruse izvanrednim modelima za evolucijska istraživanja jer se u njih evolucijski procesi mogu promatrati u vrlo kratkom vremenskom periodu (Gutiérrez i sur. 2012). Tijekom replikacije virusa, vrlo brzo se generira velika genetska raznolikost virusnih populacija, no rasprostranjenost virusnih varijanti u samom domaćinu je još nedovoljno istražena. Selekcija (specifično) ili efekt genskog uskog grla (nasumično) mogu uzrokovati smanjenje učestalosti određenih mutacija u populaciji. Tako će se učestalost najprilagođenijih varijanti, odnosno onih s najvećim ekološkim fitnessom, u nekoj populaciji povećati, što nazivamo pozitivnom selekcijom, dok će se udio varijanti s manjim fitnessom smanjiti, u procesu koji zovemo negativnom selekcijom. S druge strane, učinci genskog uskog grla su stohastički događaji koji smanjuju ukupnu genetsku raznolikost populacije te mogu dovesti do genskog otklona (eng. *genetic drift*) (Ali i sur. 2006). Prilagodba (adaptacija) virusa može biti brza kada je prirodna selekcija dominantna sila koja utječe na navedene promjene. S druge strane, prilagodba ide sporije kad je genski otklon dominantna evolucijska sila, jer

rezultirajuće nasumične varijacije u frekvenciji alela mogu promijeniti smjer koji bi inače odredila selekcija (Gutiérrez i sur. 2012).

Smatra se da je unutar domaćina samo nekoliko virusnih varijanti dominantno dok se ostatak virusne populacije sastoji od rijetkih varijanti. No kod analiza populacija virusa s visokom stopom mutacije kao što je HIV-1, kvaliteta rekonstrukcije varijanti je bila uglavnom nekonzistentna i loše kvalitete (Eliseev i sur. 2020). Nadalje, genska raznolikost virusne populacije može biti nejednoliko raspoređena unutar domaćina, kao što su pokazale analize biljnih virusa. Konkretno, različiti dijelovi biljnog organizma mogu sadržavati genski različite virusne populacije oblikovane genskim otklonom i selekcijom (Pagán i García-Arenal 2018). Osim navedenog, u cijelom procesu važna je i specifična kombinacija domaćina i virusa (Li i Roossinck 2004; Alí i Roossinck 2010). U biljci, učinak opetovanog genskog uskog grla prilikom prijenosa virusa kroz razne biljne organe tijekom infekcije rezultira genskim otklonom virusne populacije tijekom trajanja infekcije, dok koinfekcija s više virusnih genotipova može rezultirati kompeticijom za resurse, stvarajući selekcijski pritisak na virusnu populaciju (Frank 2001; Holmes 2009; García-Arenal i Fraile 2013; Pagán i García-Arenal 2018).

2.7. Oksidacijski stres

Većina današnjih organizama su aerobi, što znači da im je kisik potreban za metaboličke aktivnosti. Kisik sudjeluje u raznim biokemijskim reakcijama, omogućuje potpunu oksidaciju metabolita te stvaranje energije u obliku ATP-a. Sudjeluje u imunom odgovoru organizma, u procesima biosinteze, enzimske oksidacije, a organizmima je dostupan u atmosferi kao nusprodukt fotosinteze. No iako je kisik neophodan za život, on može imati i štetne posljedice za biološke sustave. Kisik je reaktivan element i stoga može štetiti organizmu stvaranjem reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Nakupljanjem ROS u stanici oštećuju se važne biološke makromolekule poput proteina, DNA i lipida, koje zatim gube svoje funkcije. Oksidacijsko oštećenje DNA može dovesti do povećanja broja mutacija, što u konačnici može dovesti do stanične smrti i značajnih oštećenja tkiva i organa (Davies 1995). ROS su vrlo nestabilne molekule koje vrlo brzo reagiraju s drugim molekulama iz neposredne okoline. ROS i reaktivni oblici dušika (eng. *reactive nitrogen species*, RNS) su najznačajniji predstavnici slobodnih radikala, koji imaju najveći negativni učinak na biološke molekule, a oštećenje tkiva

koje tako nastaje nazivamo oksidacijsko oštećenje. No nisu svi ROS i RNS ujedno i radikali već neki od njih, primjerice vodikov peroksid, kemijski vrlo lako reagiraju s drugim molekulama i uzrokuju stanični stres. Oksidacijski stres označava stanje organizma u kojem količina oksidansa premašuje količinu antioksidansa zbog čega mehanizmi obrane nisu toliko efikasni u detoksifikaciji (Sies 1991). Važno je naglasiti da kada je koncentracija ROS-ova niska, oni imaju korisnu funkciju u mnogobrojnim važnim staničnim procesima te prijenosu signala. Tek kad je njihova koncentracija visoka dolazi do oštećenja stanice (Schieber i Chandel 2014; da Silva Caetano i sur. 2019).

Lipidna peroksidacija predstavlja lančanu oksidacijsku reakciju višestruko nezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima, potaknutu djelovanjem ROS. Ovaj proces može dovesti do narušavanja strukture i funkcionalnosti staničnih membrana te nastanka sekundarnih produkata oksidacije, među kojima je malondialdehid (MDA) jedan od najčešće korištenih pokazatelja lipidne peroksidacije. Povećane koncentracije MDA mogu ukazivati na povećano oksidacijsko oštećenje membranskih lipida i intenzivniji oksidacijski stres u stanicama (Farmer i Mueller 2013).

Antioksidansi su tvari koje neutraliziraju ROS-ove i time štite organizam od njihova štetnog učinka (Sies 1991). Antioksidansi mogu biti enzimski i neenzimski. Gljive, kao i biljke i životinje, imaju nekoliko antioksidacijskih enzima koji im pomažu u neutralizaciji ROS (Jamieson 1998; Azevedo i sur. 2007; Breitenbach i sur. 2015). Superoksid dismutaza (SOD) katalizira reakciju dismutacije dvaju superoksidnih aniona do molekularnog kisika i vodikovog peroksida kojeg zatim razgrađuju drugi enzimi. Tako katalaza (KAT) katalizira reakciju raspadanja vodikovog peroksida na vodu i kisik, dok glutathion peroksidaza uklanja vodikov peroksid te organske perokside koristeći reducirani glutathion (GSH). Glutathion reduktaza zatim obnavlja reducirani glutathion iz njegova oksidiranog oblika čineći ga pogodnim za obranu stanice od oksidacijskog stresa. Glutathion-S-transferaze (GST) predstavljaju važnu skupinu enzima uključenih u obranu gljiva od oksidacijskog stresa. Kataliziraju konjugaciju GSH s različitim reaktivnim i elektrofilnim spojevima, čime pridonose njihovoj detoksifikaciji, a pojedine GST mogu posjedovati i GSH-ovisnu peroksidaznu aktivnost te sudjelovati u uklanjanju lipidnih hidroperoksida (Wangsanut i Pongpom 2022).

No djelovanje navedenih enzima tijekom virusne infekcije gljive je još uvijek nedovoljno proučeno (Nuskern i sur. 2017). Kao obligatni unutarstanični paraziti, virusi mogu ometati

staničnu homeostazu reaktivnih oblika kisika te utjecati na antioksidacijsku obranu domaćina, što u konačnici doprinosi razvoju bolesti (Reshi i sur. 2014). Virusne infekcije uglavnom potiču proizvodnju reaktivnih oblika kisika u stanicama, što dovodi do povećane razine indikatora oksidacijskog stresa te promjene aktivnosti antioksidacijskih enzima (Reshi i sur. 2014; Camejo i sur. 2016). Povišena razina kisikovih i dušikovih radikala tijekom oksidacijskog stresa može dovesti do povećanja broja točkastih mutacija (promjena na jednom nukleotidu) u genomu RNA virusa te tako doprinosi velikoj raznolikosti virusne populacije unutar domaćina (Akaike i sur. 2000; Akaike 2001).

Neki od najvažnijih neenzimskih antioksidansa su vitamini C (askorbinska kiselina) i E, karotenoidi i flavonoidi (da Silva Caetano i sur. 2019). Nепroteinski tioli, među kojima je već spomenuti GSH najzastupljeniji, imaju važnu ulogu u antioksidacijskom sustavu gljive *C. parasitica*. Sudjeluju u održavanju unutarstanične redoks homeostaze time što GSH može izravno reagirati s ROS, a sudjeluje i u enzimskim sustavima detoksifikacije oksidansa, pri čemu se oksidirani GSH (GSSG) regenerira u reducirani oblik djelovanjem glutathion-reduktaze uz utrošak NADPH. Promjene u sadržaju ne-proteinskih tiola stoga mogu odražavati sposobnost gljive da odgovori na povećani oksidacijski stres i ograniči oksidacijsko oštećenje stanice (Pócsi i sur. 2004; Wangsanut i Pongpom 2022; Black i sur. 2025).

2.8. Utjecaj CHV1 virusa na domaćinsku gljivu

U virusa CHV1, različiti izolati virusa imaju različit učinak na domaćina, no razlog tome još uvijek nije do kraja razjašnjen. Poznato je da je pojačan hipovirulentni efekt kod prototipskog izolata EP713 popraćen značajnim promjenama u ekspresiji gena domaćinske gljive. Primjerice, geni za proteine endotripsin i d-ksiloza reduktaze II i III su utišani, dok su geni za citokrom P450 monooksigenazu, NADH oksidazu te O-metiltransferazu aktivirani (Chen i sur. 1996; Kang i sur. 2000; Allen i sur. 2003; Deng i sur. 2007). Allen i sur. (2003) su zabilježili da 13,4 % od otprilike 2200 proučavanih gena imaju promjenjenu (povećanu ili smanjenu) razinu nakupljene mRNA kao odgovor na infekciju virusom CHV1. Proučavajući proteom gljive *C. parasitica*, Kim i sur. (2012) su zabilježili nakupljanje proteina, primjerice proteina porodice toplinskog šoka 70 („heat shock protein 70“), proteina ciklusa stanične diobe 48, tropomiozina 1, metiltransferaze tipa 2 i sl. nakon infekcije virusom. Transkriptomске i proteomske analize pokazuju da geni na koje

utječe infekcija virusom CHV1 imaju ulogu u mnogim važnim biološkim procesima. Među njima su proteini uključeni u stanični odgovor na stres, kao što su već navedeni proteini toplinskog šoka i glutation S-transferaza (GST) čija je ekspresija pojačana (Allen i sur. 2003; Kim i sur. 2012) jer infekcija virusom domaćinu predstavlja biotički stres. Kako bi se mogao u potpunosti analizirati efekt infekcije virusom CHV1 na različito eksprimirane proteine domaćina, nužno je mjeriti i njihovu aktivnost jer često proteini mogu biti aktivni tek nakon post-translacijskih preinaka (Deribe i sur. 2010). Infekcija virusom CHV1 smanjuje aktivnost nekih proteina domaćina. To su, primjerice, enzimi uključeni u razgradnju stanične stijenke te enzimi povezani uz patogenost, kao što su lakaza (Rigling i sur. 1989; Kim i sur. 1995), kutinaza (Varley i sur. 1992) i poligalakturonaza (Gao i Shain, 1995). Lakaza (LAC) je polifenol oksidaza koja, kao što je spomenuto, ima važnu ulogu u patogenezi zbog sposobnosti razgradnje C-C veza u fenilpropanoidnim podjedinicama te tako cijepa makromolekulu lignina na manje, lakše razgradive molekule (Rigling i sur. 1989; Choi i sur. 1992). Za aktivnost lakaze tijekom infekcije gljive virusom dobiveni su različiti rezultati ovisno o virusnom izolatu ili o samom eksperimentalnom postavu (Rigling i sur. 1989; Rigling i Van Alfen 1991; Allen i sur. 2003, Nuskern i sur. 2021). Nuskern i sur. (2021) su koristili različite izolate virusa CHV1 te su primjetili da učinak koji virus ima na gljivu, tj. intenzitet tog učinka, ovisi o virusnom izolatu, soju gljive te kombinaciji ta dva faktora. Pokazali su da infekcija različitim virusnim izolatima u pravilu dovodi do povećane aktivnosti enzima vezanih uz obranu od oksidacijskog stresa poput GST-a, katalaze i SOD-a u najvećem broju proučavanih kombinacija gljive i virusa. Iz istraživanja Allen i Nuss (2004) poznato je da je ekspresija gena za GST povećana u gljivi inficiranoj virusnim izolatom EP713 (podtip F1), koji pokazuje jači učinak na gljivu, dok je gen za isti enzim utišan kod gljive inficirane virusnim izolatom Euro7 (podtip I), a koji ima slabiji učinak na gljivu.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Cilj ovog istraživanja je analizirati promjene u virusnim populacijama nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa te njihov utjecaj na indikatore oksidacijskog stresa u fitopatogenoj gljivi *Cryphonectria parasitica*. Specifično, u ovom radu je postavljeno više podciljeva:

1. Istražiti prisutnost virusa CHV1 u gljivi *C. parasitica* u dvije populacije šuma pitomoga kestena u Hrvatskoj te odrediti EU tipove analiziranih gljiva
2. Odrediti uspješnost vertikalnog i horizontalnog prijenosa virusa CHV1
3. Istražiti mutacijsku i gensku raznolikost prije i nakon prijenosa virusa CHV1 za dva podtipa: francuski (F1) i talijanski (I)
4. Napraviti filogenijsku rekonstrukciju odnosa između analiziranih virusnih populacija prije i nakon prijenosa
5. Izmjeriti biokemijske parametre gljive *C. parasitica* uključene u odgovor na oksidacijski stres te istražiti mogući utjecaj virusne raznolikosti na biokemijske parametre oksidacijskog stresa

Hipoteze:

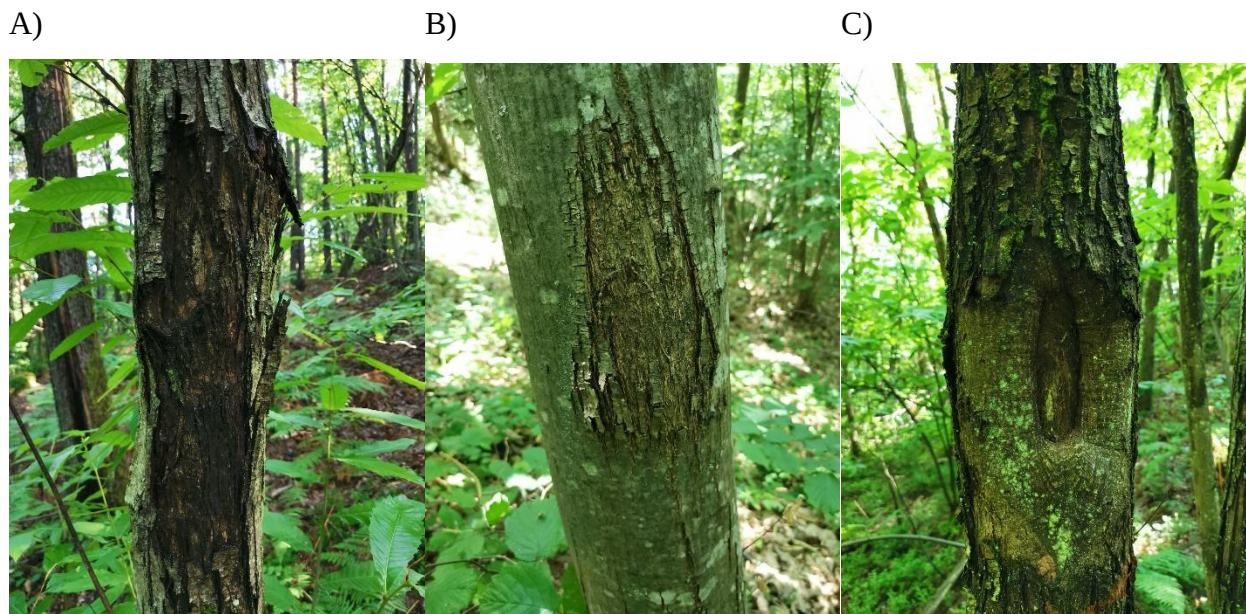
1. Tijekom prijenosa virusa dolazi do smanjenja raznolikosti i/ili promjene sastava populacije virusa unutar domaćina.
2. Te promjene se očituju promjenama u fenotipu domaćina, točnije u odgovoru gljive na oksidacijski stres.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. *Prikupljanje uzoraka gljive*

U srpnju 2019. godine prikupila sam uzorke kore pitomoga kestena (*Castanea sativa*) iz 100 rakova (Slika 5.) na području Kašta i Ozlja, na sjeverozapadu Republike Hrvatske. Selo Kašt (45.70°N, 15.36°E) se nalazi u blizini granice s Republikom Slovenijom te dijelom pripada parku prirode Žumberak, dok je grad Ozalj (45.59°N, 15.46°E) smješten na rijeci Kupi nedaleko Karlovca. Na svakom području uzorkovala sam po 50 rakova i to na način da sam 40 rakova uzorkovala tri puta (blizu gornje granice, u sredini i blizu donje granice raka), a preostalih 10 šest puta (u blizini gornje, donje, lijeve i desne granice, te dva puta u središtu raka). Uzorkovala sam iglom za biopsiju koštane srži promjera 2 mm te ukupno prikupila 360 uzoraka. Koru stabla probila sam iglom, pomoću koje sam izvadila cilindar tkiva raka dužine par milimetara. Dobivene uzorke sam privremeno pohranila u jažice mikrotitarske pločice kako bi spriječila miješanje pohranjenih uzoraka, a otvore jažica sam prekrila zaštitnom trakom. Nakon svakog uzorkovanja sterilizirala sam biopsijsku iglu uranjanjem u 96 %-tni etanol te spaljivanjem. Tako prikupljene uzorke sam privremeno pohranila na 4 °C te sam ih sljedeći dan inokulirala na krutu PDA podlogu (krumpirov dekstrozni agar, eng. *potato dextrose agar*) na Petrijevim zdjelicama (φ 90 mm). Podlogu PDA sam pripremila prema uputama proizvođača (Difco, BD) na način da sam 39 g PDA praha otopila u jednoj litri deionizirane vode i autoklavirala pri 120 °C, 20 minuta. Sve postupke provodila sam u sterilnim uvjetima u kabinetu s vertikalnim strujanjem sterilnog zraka (tzv. laminaru). Petrijeve zdjelice s podlogom pripremila sam tako da sam u svaku zdjelicu izlila oko 20 ml autoklavrane PDA hranjive podloge. Uzorci raka koje sam sakupila na terenu položila sam na PDA podlogu te sam pohranila Petrijeve zdjelice u komoru s kontroliranim uvjetima rasta (tzv. klimakomoru). Uvjeti rasta kultura gljiva kroz sve eksperimente bili su identični: 24 °C, 70 % vlažnost, u mraku, osim ako nije navedeno drugačije. Nakon što su kolonije gljiva narasle, kroz 2-3 dana, vizualno sam provjerila potencijalnu kontaminaciju drugim mikrobima, odnosno je li uzgojena samo gljiva *C. parasitica*. Ako su prisutni i drugi organizmi, sterilnim skalpelom sam pažljivo izrezala samo nekontaminirani djelić svježeg micelija gljive *C. parasitica* i precjepila na nove Petrijeve zdjelice

s PDA podlogom kako bi odvojila micelij gljive *C. parasitica* od kontaminacija. Na ovaj način dobila sam 36 hipovirulentnih kultura iz Ozlja te 27 hipovirulentnih kultura iz Kašta. Kulture sam potom narezala sterilnim skalpelom na 20-ak malih kockica te pohranila u 22 %-tnom sterilnom glicerolu na -80 °C.



Slika 5. Rak kore pitomoga kestena – izgled lezija: aktivni rak – virus CHV1 nije prisutan (A), pasivni rak – virus CHV1 je prisutan (B) te zarastajući ili kalusirajući rak – infekcija je lokalizirana pojavom kalusa zahvaljujući hipovirulentnom učinku virusa CHV1 (C).

4.2. *Određivanje prisutnosti virusa CHV1 u uzorcima gljive*

Prisutnost virusa CHV1 sam određivala morfološki te molekularnim metodama. Ako je kolonija gljive *C. parasitica* na PDA podlozi bila bijele morfologije označila sam ju kao hipovirulentnu. Uzorke koji su imali tamniju pigmentaciju (tj. bili su žute ili svijetlo narančaste boje) te nisu intenzivno sporulirali, označila sam kao potencijalno hipovirulentne uzorke prijelazne morfologije. Gljive s intenzivno narančastom pigmentacijom i izraženom sporulacijom označila sam kao virulentne uzorke. Svježi komadić micelija svih potencijalno hipovirulentnih uzoraka presadila sam na četiri Petrijeve zdjelice (φ 90 mm) s PDA podlogom prekrivenom sterilnim celofanom. Izrezala sam listove celofana prema veličini Petrijeve zdjelice, autoklavirala ih u čaši

destilirane vode pri 121 °C, 20 minuta te zatim sterilnom pincetom položila na PDA podlogu. Nakon otprilike tjedan dana, kada su uzorci narasli, sakupila sam tkivo, liofilizirala ga, usitnila do sitnog praha pomoću metalnih kuglica promjera 5 mm u uređaju TissueLyser II (Qiagen, Venlo, Nizozemska) u trajanju od 2 minute pri 30 Hz te pohranila za daljnje analize. Za izolaciju virusne dsRNA, odnosno dvolančanih RNA replikacijskih intermedijera virusa CHV1, koristila sam komercijalni paket za izolaciju Double-RNA Viral dsRNA (iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Južna Koreja) prema uputama proizvođača. Za izolaciju dsRNA koristila sam 20 do 30 miligrama liofiliziranog micelija. Tkivo sam prebacila u mikroepruvete od 2 mL te sam u svaki uzorak dodala 100 µL predpuferirajuće otopine (eng. *Pre-buffer*). Nakon usitnjavanja svakom uzorku sam dodala 1 mL otopine litičkog pufera (eng. *Lysis Buffer*), promiješala na vrtložnoj miješalici deset sekundi te inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam svakom uzorku dodala 200 µL kloroforma te opet promiješala deset sekundi na vrtložnoj miješalici i inkubirala na sobnoj temperaturi još pet minuta. Uzorke sam potom centrifugirala pri 16000 × g (Hettich Zentrifugen Mikro 220 R) tijekom deset minuta pri 4 °C. Nakon cetrifugiranja, 400 µL vodene faze svakog uzorka prebacila sam u mikroepruvetu od 1,5 mL te im dodala po 400 µL otopine vezujućeg pufera („Binding Buffer“). Potom sam uzorke nježno protresla rukom dva do tri puta te inkubirala jednu minutu na sobnoj temperaturi. Mikrokolone za centrifugu sam prethodno pripremila tako što sam ih dva puta isprala s 500 µL otopine za ispiranje (eng. *Washing Buffer*), te centrifugirala pri 16000 × g 1 minutu pri 4 °C. Uzroke sam nakon toga prenijela u pripremljene mikrokolone za centrifugu te centrifugirala pri 16000 × g 1 minutu na 4 °C. Nakon centrifugiranja, filtrat sam dekantirala i mikrokolonu sam isprala 2 puta s 500 µL otopine za ispiranje, uz centrifugiranje pri 16000 × g 1 minutu pri 4 °C. Membrane mikrokolona sam osušila centrifugiranjem pri 16000 × g 2 minute pri 4 °C. Dodala sam 40 µL otopine za eluciju (eng. *Elution Buffer*) izravno na membranu i centrifugirala pri 16000 × g 1 minutu pri 4 °C. Time sam isprala vezanu virusnu dsRNA. Čistoću i koncentraciju izolirane dsRNA provjerila sam mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Uzorke sam kratkoročno čuvala u zamrzivaču na -20 °C.

Sintezu prvog lanca komplementarne DNA (cDNA) virusa provela sam pomoću komercijalno dostupnog paketa za reverznu transkripciju GoScript™ Reverse Transcription System, prema uputama proizvođača (Promega, Madison, SAD). Pomiješala sam po 4 µL svakog uzorka izolirane dsRNA i 1 µL nasumičnih početnica i inkubirala u PCR (lančana reakcija

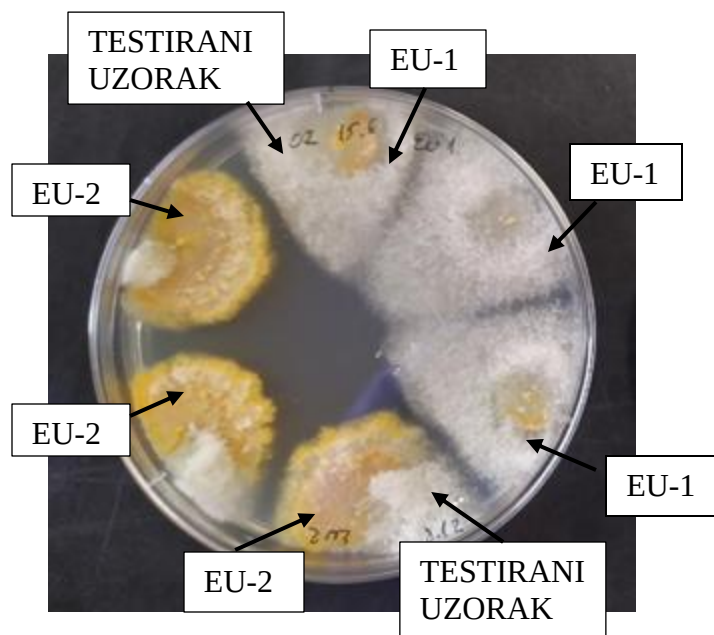
polimerazom) termobloku (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) pri 70 °C u trajanju od pet minuta. Nakon denaturacije RNA, uzorke sam brzo ohladila na ledu i inkubirala 5 minuta. Tako dobivene uzroke sam pomiješala s 15 µL reakcijske smjese za reverznu transkripciju (RT) za konačni volumen od 20 µL. Sastojci reakcijske smjese bili su: 1x GoScript reakcijski pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM mješavina deoksinukleotidtrifosfata (dNTP-a), 20 U rekombinatni Rnazin, 1 µL GoScript™ reverzna transkriptaza te destilirana voda do konačnog volumena od 15 µL. Reakciju reverzne transkripcije sam provodila u PCR termobloku pri sljedećim uvjetima: 5 minuta pri 25 °C, 60 minuta pri 42 °C, 15 minuta pri 70 °C, nakon čega su uzorci privremeno pohranjeni pri 4 °C.

Kako bih dokazala prisutnost virusa u uzorcima provela sam lančanu reakciju polimerazom (PCR) umnožavanjem genomskih regija dvaju otvorenih okvira čitanja (ORF A i ORF B) protokolom opisanim u Allemann i sur. (1999). Reakcijska smjesa je sadržavala: 1x reakcijski pufer s magnezijem (TaKaRa), 200 µM mješavina dNTP-a) 0,2 µM početnica (EP713-5 i R2280 za ORF A, EP713-6 i EP713-7 za ORF B), 1 µL TaKaRa Taq™ DNA polimeraza (5 U/ µL), 1 µL uzorka cDNA te 15,5 µL destilirane vode za ukupan reakcijski volumen od 25 µL. Sekvence (5'-3') korištenih početnica su bile: EP713-5: TTGGATTCCCGATTCTTCA, R2280: CTTACCATCTCGCTTGACAAA, EP713-6: GCCACTTCGTGGGACAATAC i EP713-7: GGGAAGAAAGTGGACTTACC. Reakciju sam provela u PCR termobloku pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 94 °C, 2 minute, nakon čega slijedi 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije pri 94 °C od 1 minute, vezanja početnica pri 55 °C u trajanju od 90 sekundi te produljivanje lanaca DNA pri 72 °C kroz 2 minute. Zadnji korak je završno produljivanje lanaca pri 72 °C u trajanju od 10 minuta. Uzorke sam privremeno čuvala pri 4 °C. Umnožene PCR produkti razdvojila sam elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu u 0,5 × TBE puferu (10 × Tris/borat/EDTA pufer: 0,89 M Tris-borat, 0,02 M EDTA (dinatrijeva sol), pH 8,3, Lonza) tijekom 60 minuta pri naponu od 5 V/cm. U gel sam dodala 0,2 × (5 µL) boje za bojanje nukleinskih kiselina GelStar™ (Lonza) (početna koncentracija 10 000 ×) . Kao molekularni standard korišten je GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Litva) prema uputama proizvođača, koji sadrži fragmente veličine 250 bp do 10 kbp. Umnoženi fragmenti DNA su vizualizirani pod UV svjetlom na transiluminatoru (Syngene).

4.3. *Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive*

4.3.1. *Određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive kokultiviranjem s EU-testerima*

Za određivanje tipa vegetativne kompatibilnosti pojedinog uzorka gljive *C. parasitica*, uzorke sam kokultivirala s EU-testerima dva vc tipa koji su najčešći na području Republike Hrvatske: EU-1 i EU-2. EU-testeri su dugoročno pohranjeni pri -80 °C u 22%-tnom glicerolu te sam ih oživila i nacijepila na PDA podlogu na Petrijevim zdjelicama i uzgajala u komori pri istim uvjetima rasta koji su opisani ranije. Osim EU-testera, na isti način uzgojila sami uzorke gljiva *C. parasitica* prikupljene terenskim istraživanjima. Kada su kolonije dovoljno porasle, sterilnim skalpelom sam izrezala komadić micelija te nacijepila u blizini ruba Petrijeve zdjelice sa svježom PDA podlogom. Na pojedinu Petrijevu zdjelicu ekvidistalno sam inokulirala šest uzoraka gljive *C. parasitica* nepoznatog vc tipa (Slika 6.). Pored tri uzorka nepoznatog vc tipa inokulirala sam prvi EU-tester – EU-1, a pored druga tri, EU-tester – EU-2, u smjeru kazaljke na satu. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice s inokuliranim uzorcima i EU-testerima inkubirala sam tijekom sedam dana u komori pri uvjetima rasta opisanim ranije. Ukoliko su uzorci i testeri gljive *C. parasitica* bili vegetativno kompatibilni, došlo je do potpunog srastanja njihovih micelija, razvoja anastomoza među njihovim hifama te formiranja heterokarionskog micelija. Samo mjesto kontakta micelija tada nije bilo vidljivo. U slučaju vegetativne nekompatibilnosti uzoraka i testera, na mjestu kontakta micelija došlo je do apoptoze hifa i formiranja tzv. barožne linije, koju sam makroskopski vidjela tj. micelij je bio jasno odjeljen na dva dijela. Uzorcima sam dodijelila određeni vc tip samo ako je u svakom triplikatu došlo do srastanja micelija, te ukoliko nije bila vidljiva barožna linija. Koinokulacija je također poslužila i kao dodatan test hipovirulentnosti određenog uzorka jer je, u slučaju vegetativne kompatibilnosti, virus CHV1 iz hipovirulentnog uzorka prešao u EU-tester i promijenio mu morfologiju iz narančaste u bijelu.



Slika 6. Testiranje vegetativne kompatibilnosti uzorka gljive *C. parasitica* prethodno sakupljenog u prirodi s testnim izolatima poznatog EU tipa (EU-1 i EU-2). Svaki test sam provela u triplikatu. Navedeni testirani uzorak je hipovirulentan (vidimo konverziju morfologije EU-testera iz narančaste u bijelu) i pripada tipu EU-1, pošto je došlo do potpunog srastanja micelija. Tester EU-2 ostaje narančast što znači da nije došlo do konverzije prilikom kokultivacije s hipovirulentnim uzorkom nepoznatog EU tipa. Također je i jasno vidljiva barazna linija između testera EU-2 i uzorka.

4.3.2. Izolacija DNA iz uzoraka gljive

Micelije uzoraka gljive *C. parasitica*, trajno pohranjene pri -80 °C u 22 %-tnom glicerolu, nasadila sam na krutu hranjivu podlogu PDA te uzgajala nekoliko dana u komori s kontroliranim uvjetima rasta pri ranije navedenim uvjetima. Nakon nekoliko dana komadić svježeg micelija s ruba rasta kolonije gljive precijepila sam u novu Petrijevu zdjelicu , ϕ 90 mm, s 20 mL podloge PDA prekrivene sterilnim celofanom. Uzorke sam uzgajala pet do sedam dana u komori s kontroliranim uvjetima rasta pri ranije navedenim uvjetima. Oko 10-20 mg svježeg micelija s ruba rasta kolonije sastrugala sam s celofana te prenijela u mikroeprovete. Izolaciju DNA sam provela korištenjem komercijalnog paketa Omni Prep for Fungus (G-Biosciences, SAD) prema uputama proizvođača. Uzorke tkiva prelila sam tekućim dušikom te usitnila tučkom. Na usitnjeni micelij

uzoraka dodala sam po 500 μ L litičkog pufera (eng. *Genomic lysis buffer*) i snažno promiješala na vrtložnoj miješalici. Za svakih 100 μ L dodanog litičkog pufera dodala sam 1 μ L otopine Proteinaze K (5 mg/mL), te sam mikroeprevete inkubirala jedan sat pri 60 °C u termobloku. Za vrijeme inkubacije mikroeprevete sam dodatno više puta promiješala rukom. Potom sam, nakon kratkotrajnog hlađenja, u svaki uzorak dodala 200 μ L kloroforma i snažno protresla rukom. Nakon toga sam uzorke centrifugirala pri 14000 $\times$ g tijekom 10 minuta pri 4 °C. Gornju (vodena) fazu sam potom prenijela u nove mikroeprevete za centrifugiranje. U mikroeprevete s uzorcima sam dodala 50 μ L otopine za odvajanje komponenti (eng. *DNA stripping solution*), te sam, nakon kratkog protresanja, inkubirala tijekom 5-10 min pri 60 °C. Nakon inkubacije u termobloku u svaki uzorak sam dodala 150 μ L precipitacijske otopine (eng. *Precipitation solution*), miješala na vrtložnoj miješalici nekoliko puta i na kraju centrifugirala pri 14000 $\times$ g tijekom 5 minuta pri 4 °C. Oko 450 μ L supernatanta prebacila sam u nove mikroeprevete te im dodala 500 μ L izopropanola. Mikroeprevete sam protresla desetak puta i centrifugirala pri 14000 $\times$ g tijekom 5 minuta pri 4 °C. Supernatant sam dekantirala te sam na dobivene taloge uzoraka dodala 700 μ L 70 %-tnog etanola nakon čega sam centrifugirala pri 14000 $\times$ g tijekom jedne minute pri 4 °C. Etanol sam dekantirala, a taloge s DNA sam ostavila da se suše na sobnoj temperaturi. Nakon što je etanol ishlapio, talogu svakog uzorka sam dodala 50 μ L sterilne deionizirane vode te resuspendirala kako bi se DNA otopila. Koncentraciju izolirane DNA sam izmjerila pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

4.3.3 Molekularno određivanje tipova vegetativne kompatibilnosti gljive

Izoliranu DNA uzoraka gljive *C. parasitica* koristila sam kako bi utvrdila vc tip pojedinog uzorka gljive u slučaju kada rezultati testa kokultiviranja nisu bili jednoznačni ili su uzorci pokazivali nekompatibilnost s oba EU-testera, što znači da pripadaju nekom od ostalim EU-tipova. Stoga sam genotipizirala svih šest poznatih *vic* lokusa prema protokolu Short i sur. (2015), odnosno Mlinarec i sur. (2018) za *vic4* lokus. Nakon izolacije DNA, detekciju pojedinih alela svakog *vic* lokusa napravila sam PCR reakcijama u kojima su umnoženi različiti *vic* lokusi korištenjem početnica navedenih u Tablici 1., a dobivene amplikone sam vizualizirala agaroznom elektroforezom. Reakcijska smjesa za PCR je sadržavala: 1 $\times$ GoTaq pufer, 1,5 mM MgCl₂, 200

μM mješavine dNTP-a, 1 U GoTaq DNA polimeraze (Promega), 0,2 μM svake početnice, 0,5 μl uzorka DNA te ultra čiste deionizirane vode do ukupnog volumena od 20 μL . Uvjeti su bili sljedeći: 95 °C, 2 min (početna denaturacija), zatim 34 ciklusa koji se sastoje od denaturacije pri 95 °C, 30 s, vezanja početnica pri odgovarajućoj temperaturi 30 s (Tablica 1.) i produljenja lanaca pri 72 °C, 1 min 45 s, te naposljetku završno produljenje lanaca pri 72 °C, 10 min. Umnožene PCR produkte sam razdvojila elektroforezom u 1,2 %-tnom agaroznom gelu u 0,5 $\times$ TBE puferu tijekom 60 minuta pri 5 V/cm. U gel sam dodala 0,2 $\times$ GelStarTM (Lonza) boje za bojanje nukleinskih kiselina. Kao molekularni standard koristila sam GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Litva) prema uputama proizvođača. Umnožene fragmenti DNA sam vizualizirala pod UV svjetlom na transiluminatoru (Syngene).

Tablica 1. Korištene početnice za lokuse *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic6*, i *vic7* prema Short i sur. (2015) te početnice za lokus *vic4* prema Mlinarec i sur. (2018).

Lokus	Veličina alela 1 (pb)	Veličina alela 2 (pb)	Ime početnice	Temperatura vezanja (°C)	Sekvenca početnice (5'-3')
<i>vic1</i>	308	1470	vic1a-F vic1a-1R vic1a-2R	65	GCTATCCACCCTCACAGAGAA CGTCCTGCCTCAAGGAGATT CATTTCGTCATCAGCACAAC
<i>vic2</i>	660	1089	vic2-F vic2-1R vic2-2R	60	TTGATGGTGGAGTGTGACAGA TCTCCCAATGACCTGAAATG GATGTTTGGCATAACATCGGC
<i>vic3</i>	538	1203	vic3a-1F vic3a-1R vic3a-2F vic3a-2R	60	CAGGTTTAGCAGGTTCTTCC GCACGACAAATGGCACTG TCCATTGTCTCTATCCCATCC GCATCAGGACTTGCCAGATA
<i>vic4</i>	386	919	vic4-F vic4-1R vic4-2R	60	GCATGGGCAATGGTCTACTT TCCATCGCATAGGTACGCTC GCAATCAACGATCATCTGTC
<i>vic6</i>	238	813	vic6-1F vic6-1R vic6-2F vic6-2R	64	CGCATACTGTGTTTCCCAACT AAGATCCTTGCGTACCTCCA ACAGGATAGCAATCACTGCC ACAGGGA ACTCTGGTCGTTG
<i>vic7</i>	728	1109	vic7-F vic7-1R vic7-2R	60	AGGTACACCCCCAAGATTCC CCACGAAGTCTCTGGCGTA CAGGCTCGATTCTCAAGGTG

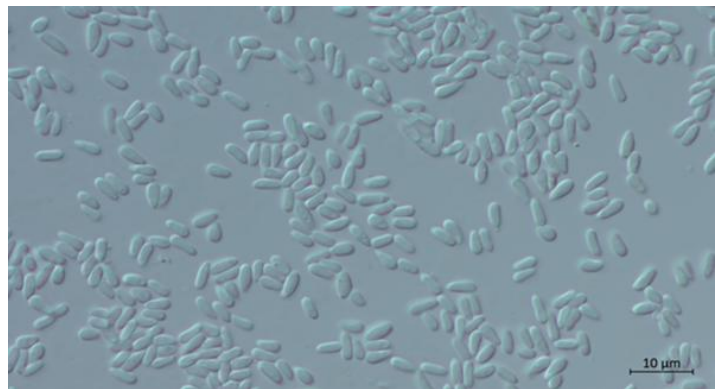
4.4. *Vertikalni prijenos virusa CHV1*

Za eksperiment vertikalnog prijenosa virusa koristila sam tri prethodno karakterizirana izolata virusa CHV1, jedan je pripadao podtipu F1: EP713, te su dva pripadala podtipu I: Euro7 i jedan izolat iz Hrvatske, CR23. Osim toga, koristila sam i nasumice odabrana tri izolata podtipa I koje sam prikupila na terenu u Ozlju i Kaštu 2019. godine: oz_08.2, ks_30.4 i ks_46.4 u kojima sam prethodno dokazala prisutnost virusa te sam tim gljivama odredila vc tip (vidi potpoglavlja 4.1., 4.2., 4.3.). Micelije gljiva, koje su rasle u komori s kontroliranim uvjetima rasta do veličine kolonije otprilike 5 cm u promjeru, sam podijelila na četiri Petrijeve zdjelice s PDA hranidbenom podlogom čija je jedna polovica bila prekrivena sterilnim celofanom. Nakon toga gljive su rasle dva tjedna u komori s kontroliranim uvjetima rasta kako bi prekrile cijelu površinu hranidbene podloge te četiri dana na laboratorijskom stolu, izložene dnevnoj svjetlosti kako bi se potaknulo stvaranje nespornih spora, odnosno konidija (Slika 7.). Konidije sam zatim sakupila u sterilnu epruvetu ispiranjem s 2 ml sterilne destilirane vode te nježnim struganjem površine micelija. Prikupljene suspenzije spora sam prebrojala pomoću komore za brojanje stanica (Neubauer-improved, Hirschmann) i razrijedila do 5 konidija u 100 μ L. Na pet Petrijevih zdjelica s PDA podlogom nacijepila sam po 100 μ L razrijeđene suspenzije konidija, kako bi po jednoj Petrijevoj zdjelici naraslo otprilike 5 kolonija. Nakon dva dana, svježe narastao micelij podijelila sam na dva dijela te sam cijele porasle kolonije precijepila na dvije nove Petrijeve zdjelice s PDA podlogom prekrivenom celofanom kako bih dobila dovoljnu količinu tkiva micelija za daljnje analize, te kako bih osigurala da je cijeli micelij gljive narastao iz jedne spore korišten za analize. Za svaki uzorak sam dobila 11-17 novih kolonija te sam iz njih izolirala dsRNA za dokazivanje prisutnosti virusa prema prethodno opisanim protokolima (vidi potpoglavlje 4.2.). Sakupila sam micelij porastao od spora u kojima je dokazana prisutnost virusa CHV1, liofilizirala te usitnila do sitnog praha pomoću metalnih kuglica promjera 5 mm u uređaju TissueLyser II (Qiagen, Venlo, Nizozemska) u trajanju od 2 minute pri 30 Hz. Tako usitnjen micelij koristila sam za daljnje analize. Popis izolata korištenih u eksperimentu vertikalnog prijenosa virusa CHV1 i njihovih skraćenica korištenih u tekstu se nalazi u Tablici 2.

A)



B)



Slika 7. Slika piknidija formiranih na površini kolonija gljive *C. parasitica* (A) te mikroskopska slika suspenzije konidiospora oslobođenih iz piknidija (B). Skala s veličinom prikazana je u donjem desnom kutu. Slike je ustupio dr. sc. Ludwig Beenken.

Tablica 2. Popis izolata korištenih u eksperimentu vertikalnog prijenosa virusa CHV1 i njihovih skraćenica korištenih u tekstu

VIRUSNI IZOLAT	SKRAĆENICA	NAZIV MICELIJA
EP713	FM	„Mother.EP713“, roditeljski izolat EP713
	FS1-FS6	Virusna populacija prve do šeste spore izolata EP713
	Spore.EP713	Sve virusne populacije navedenih spora EP713 izolata
CR23	CM	„Mother.CR23“, roditeljski izolat CR23
	CS1-CS4	Virusna populacija prve do četvrte spore izolata CR23
	Spore.CR23	Sve virusne populacije navedenih spora CR23 izolata
Euro7	EM	„Mother.Euro7“, roditeljski izolat Euro7
	ES1-ES5	Virusna populacija prve do pete spore izolata CR23
	Spore.Euro7	Sve virusne populacije navedenih spora Euro7 izolata
ks_30.4	K1M	„Mother.ks_30.4“, roditeljski izolat ks_30.4
	K1S1-K1S5	Virusna populacija prve do pete spore izolata ks_30.4
	Spore.ks_30.4	Sve virusne populacije navedenih spora ks_30.4 izolata
ks_46.4	K2M	„Mother.ks_46.4“, roditeljski izolat ks_46.4
	K2S1-K2S5	Virusna populacija prve do pete spore izolata ks_46.4
	Spore.ks_46.4	Sve virusne populacije navedenih spora ks_46.4 izolata
oz_08.2	OM	„Mother.oz_08.2“, roditeljski izolat oz_08.2
	OS1-OS6	Virusna populacija prve do šeste spore izolata oz_08.2
	Spore.oz_08.2	Sve virusne populacije navedenih spora oz_08.2 izolata

4.5. *Horizontalni prijenos virusa CHV1*

Za eksperiment horizontalnog prijenosa virusa kao donore virusa koristila sam ista tri soja gljive *C. parasitica* koji sadrže prethodno karakterizirane izolate virusa CHV1: EP713 (EU-5), Euro7 (EU-9) i CR23 (EU-1). Kako bih utvrdila učinak vegetativne nekompatibilnosti na prijenos virusa, kao primatelje virusa koristila sam EU testere koji nisu zaraženi virusom CHV1, a koji se

razlikuju u jednom alelu na jednom *vic* lokusu od izolata gljive donora. Na taj način dobila sam više parova donora i primatelja virusa (Tablica 3.). Na ovaj način analizirala sam utjecaj tri od šest poznatih *vic* lokusa, koji su se razlikovali prema jačini inhibicije prijenosa virusa CHV1: *vic2* (snažna inhibicija prijenosa), *vic3* (srednja inhibicija prijenosa) i *vic4* (slaba inhibicija prijenosa). Svakog od spomenutih parova donora i primatelja virusa inokulirala sam na Petrijeve zdjelice s PDA podlogom u 25 replika. Osim toga, u pokus sam uključila kombinacije vegetativno kompatibilnih donora i primatelja virusa tj. donore sam koinokulirala s EU testerom istog *vic* tipa. Ovakve parove prijenosa virusa testirala sam u minimalno 10 replika.

Tablica 3. Prikaz EU-tipova donora i primatelja virusa s obzirom na različiti *vic* lokus

	Donori virusa (EU-tip)		
	CR23 (EU-1)	Euro7 (EU-9)	EP713 (EU-5)
Heteroalelni <i>vic</i> lokus	EU-tip primatelja virusa	EU-tip primatelja virusa	EU-tip primatelja virusa
nijedan	EU-1	EU-9	EU-5
<i>vic2</i>	EU-2 (HK22C)	EU-15	EU-6
<i>vic3</i>	EU-44	EU-36	EU-60
<i>vic4</i>	EU-5	EU-17	EU-1

Svi korišteni sojevi gljive *C. parasitica*, donori virusa CHV1, kao i primatelji, bili su dugoročno pohranjeni pri -80 °C u 22 %-tnom glicerolu prije korištenja u eksperimentu. Inokulirala sam ih na Petrijeve zdjelice (φ 60 mm) s PDA podlogom te uzgajala u komori s kontroliranim uvjetima rasta tijekom pet dana prema ranije navedenim uvjetima. Zatim sam sterilnim skalpelom izrezala kockicu s ruba rastuće kolonije donora virusa, veličine otprilike 3x3x3 mm, te inokulirala blizu ruba Petrijeve zdjelice (φ 90 mM) sa svježom PDA podlogom. Pored nje sam, na isti način, inokulirala kockicu micelija s ruba rastuće kolonije primatelja. Inokulirane Petrijeve ploče s PDA podlogom sam svaki dan pregledala kako bih procjenila je li se dogodio

prijenos virusa CHV1. Nakon dva tjedna, micelije primatelja koji su pokazali izmjenjenu, bijelu morfologiju sam izrezala na četiri dijela te sam svaki dio inokulirala na novu Petrijevu zdjelicu sa svježom PDA podlogom prekrivenom sterilnim celofanom. Podjednaku količinu micelija donora uključenog u pokus prijenosa virusa također sam na isti način inokulirala na nove četiri Petrijeve zdjelice sa svježom PDA podlogom prekrivenom sterilnim celofanom. Nakon 10 dana rasta u komori s kontroliranim uvjetima rasta, prisutnost virusa CHV1 sam dokazala molekularnim metodama, na isti način kao i u eksperimentu vertikalnog prijenosa (vidi potpoglavlje 4.2.). Osim toga, trebala sam potvrditi da je micelij u koji je prenesen virus CHV1, zaista micelij primatelja, različitog vc tipa od micelija donora, te sam stoga iz njega izolirala i DNA kako bih potvrdila ispravan genotip. Izolaciju DNA i dokazivanje vc tipa gljive napravila sam prema već opisanom protokolu (vidi potpoglavlja 4.3.2 i 4.3.3.). Nakon što sam potvrdila prijenos virusa, sakupila sam micelije svih donora i primatelja uključenih u eksperiment, liofilizirala, samljela i pohranila za daljnje analize. Kao kontrolu virusne raznolikosti u kasnijim bioinformatičkim i biokemijskim eksperimentima koristila sam micelije gljiva s virusnim izolatima Euro7, EP713 i CR23 koji nisu sudjelovali u koinokulaciji odnosno pokusu prijenosa virusa, već sam ih samostalno uzgojila na Petrijevim zdjelicama s PDA podlogom prekrivenim sterilnim celofanom.

4.6. *Bioinformatička obrada virusnih populacija*

4.6.1. *Priprema uzoraka za PacBio sekvenciranje*

Nasumično izabranim uzorcima iz uzorkovanih populacija Ozlja (10 uzoraka) i Kašta (9 uzoraka), kao i uzorcima uključenim u pokuse vertikalnog i horizontalnog prijenosa virusa CHV1 identificirala sam mutacije te haplotipove, proučila raznolikost njihovih populacija, napravila filogenijsku analizu te istražila tipove selekcije unutar domaćina. Prvo sam koncentraciju izolirane virusne dsRNA (vidi potpoglavlje 4.2.) izmjerila sam fluorometrijski (Qubit, Thermo Fischer) prema uputama proizvođača. Uzorke dsRNA sam zatim denaturirala inkubiranjem dvije minute pri 100 °C te potom ohladila na ledu. Kako bi se specifično sintetizirala cDNA virusne +RNA koja sadrži poli(A) rep, za reverznu transkripciju koristila sam oligo(dT)₁₂₋₁₈ početnice i Maxima H Minus reverznu transkriptazu (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača. Lančanu reakciju polimerazom za umnažanje dugačkih kalupa (eng. *long-range PCR*) sam provela odmah nakon

reverzne transkripcije kako bi se smanjila mogućnost stvaranja nespecifičnih sparivanja lanaca nukleinskih kiselina (eng. *heteroduplex*) tijekom samog PCR-a (Waugh i sur. 2015). Kod sekvenciranja uzoraka virusnih populacija iz Kašta i Ozlja razvijen je protokol, koji sam koristila i u ovom radu, kojim su umnožena dva segmenta genoma virusa CHV1 duljina 4.6 i 5 kilobaza koji se preklapaju (Leigh i sur. 2021). Za analizu uzoraka virusnih populacija uključenih u eksperimente prijenosa virusa koristila sam samo segment dug 5 kb koji čini otprilike 40 % virusnog genoma te se sastoji od 5' nekodirajuće regije, otvorenog okvira čitanja A (ORFA) te dijela otvorenog okvira čitanja B (ORFB) koji kodira za proteazu sličnu papainu p48. Dio u kojem se nalaze polimerazna i helikazna domena nalaze se izvan odabranog segmenta. Segment sam umnožila pomoću para početnica ATCYGGAGAARGTGATTTGC i YTTRTTGATGTAGCTGCGAGG. Na 5' kraj početnica dodala sam uzorku specifične barkodne sekvence duljine šest nukleotida, koje su omogućile identifikaciju i razvrstavanje očitavanja prema uzorcima nakon sekvenciranja. Reakciju sam provela pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija od 1 minute pri 95 °C, nakon čega slijedi 15 ciklusa koji se sastoje od dva koraka: 30 sekundi pri 95 °C i 7 minuta pri 68 °C, nakon čega slijedi završno produljivanje lanaca DNA od 10 minuta pri 68 °C. Ovaj PCR protokol sam provela za svaki uzorak u najmanje pet neovisnih reakcija koristeći tzv. „*high fidelity*“ Advantage 2 Taq polimerazu (Takara). Ovakav PCR protokol je optimiziran kako bih smanjila rizik od stvaranja PCR duplikata, tj. identičnih PCR produkata što može dovesti do precjenjivanja zastupljenosti određene sekvence te smanjila rizik od stvaranja heterodupleksa tj. molekula DNA u kojima su dva komplementarna lanca različitog podrijetla/sekvence sparena tijekom kasnijih faza PCR-a. Uzorke sam zatim objedinila i pročistila koristeći Ampure sterilne kuglice (Beckman Coulter) prema uputama proizviđača, nakon čega sam izmjerila koncentraciju DNA koristeći fluorometar (Qubit, Thermo Fischer). Prije sekvenciranja, ligirala sam adaptore u obliku ukosnica na krajeve odabranih amplikona kako bi linearna DNA molekula postala kružna te tako omogućila više prolazaka DNA polimeraze po istom dijelu molekule tijekom sekvenciranja. Nakon toga, uzorci su dalje obrađeni u Švicarskoj, točnije u centru za sekvenciranje – Functional Genomics Centre Zurich.

4.6.2. Obrada podataka sekvenciranja

Dobivene višestruke prolaze preko iste kružne molekule objedinila sam pomoću programa pbccs (Pacific Biosciences) u kružne konsenzusne sekvence (engl. *circular consensus sequences*, CCS), odnosno HiFi očitavanja. Za svaku pojedinu molekulu tako sam dobila jedno konsenzusno očitavanje visoke točnosti, čime sam smanjila udio pogrešaka sekvenciranja. Kako bi očitavanja bila uključena u daljne analize, trebali su biti zadovoljeni sljedeći uvjeti: minimalna duljina očitavanja je 3 kilobaze, minimalna kvaliteta sekvenciranja 0.99 te barem pet prolazaka DNA polimeraze preko kalupa prilikom sekvenciranja. Očitavanja sam potom razvrstala prema pripadajućim uzorcima na temelju barkodnih sekvenci pomoću alata Lima (Pacific Biosciences). Limu sam koristila s opcijom ‘peek-guess’ kako bih uklonila lažne ili pogrešno detektirane oznake, minimalna razina kvalitete oznake je iznosila 26 (otprilike 99,75 % točnosti očitane baze čime sam smanjila rizik da se sekvence s pogrešno pročitanim oznakama uključe u analize) te sam omogućila prepoznavanje različitih uzvodnih i nizvodnih oznaka.

4.6.3. Identifikacija mutacija u virusnim populacijama

Kako bi se dobivene sekvence iz analiziranih uzoraka mogle usporediti s referentnom sekvencom, prvo sam ‘bam’ format, koji sadrži sekvence nakon razdvajanja prema oznakama pretvorila u ‘fasta’ format koristeći bioinformatički alat *samtools* (v1.13, Li i sur. 2009). Kao referentnu sekvencu za podtip I virusa CHV1 koristila sam izolat EP721 (pristupni broj DQ861913, Lin i sur. 2007) a za podtip F1 koristila sam izolat EP713 (pristupni broj NC_001492, Shapira i sur. 1991). Sekvence sam poravnala pomoću programa *minimap2* (v2.19, Li 2016) koristeći opciju ‘map-pb’ dizajniranu kako bi bila kompatibilna s PacBio očitanjima. Rezultate poravnavanja sam sortirala, preimenovala i pretvorila u ‘bam’ format koristeći *samtools*. Za identifikaciju mutacija unutar domaćina, tj. u pojedinom uzorku, koristila sam dva različita programa: *Freebayes* (v.1.3.1, Garrison & Marth 2012) i *Deepvariant* (v.1.1.0, Poplin i sur. 2018) ponovno koristeći opciju prilagođenu PacBio očitanjima. Samo mutacije koje su identificirala oba programa sam koristila u daljnjim analizama. Kao mjeru mutacijske raznolikosti virusne populacije unutar domaćina koristila sam π (nukleotidna raznolikost) koji sam izračunala pomoću softvera SNPGenie (Nelson i sur. 2015). Ova mjera je prigodna zato jer se u analizama mogu koristiti sekvence koje imaju veliku razliku u pokrivenosti sekvenciranja odnosno sekvence koje

imaju manju i one koje imaju veliku pokrivenost sekvenciranja (Zhao & Illingworth 2019). Pošto SNPGenie izračunava π vrijednosti za čitav genom, te vrijednosti sam normalizirala za odabrani amplikon tako da sam prosječni zbroj nesinonimnih (N) i sinonimnih (S) razlika, odnosno polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova, *eng. single nucleotide polymorphism*) na svakoj kodirajućoj poziciji u amplikonu podijelila s ukupnim brojem pozicija unutar amplikona $\pi = (N_{\text{razlika}} + S_{\text{razlika}} / N_{\text{ukupno}} + S_{\text{ukupno}})$. Za karakterizaciju mutacija koristila sam bioinformatički alat SNPEff (v4.3, Cingolani i sur. 2012) koji mutacije razvrstava prema predviđenom učinku na funkciju gena ili proteina. Mutacije se klasificiraju kao mutacije niskog učinka (npr. sinonimne mutacije), umjerenog učinka (gotovo uvijek nesinonimne mutacije) i visokog učinka (npr. mutacije koje uzrokuju pomak okvira čitanja, prerani stop-kodon ili gubitak start/stop kodona).

4.6.4. Identifikacija virusnih varijanti (haplotipova)

S obzirom da svaka metoda sekvenciranja ima određenu razinu nepouzdanosti, HiFi očitavanja dobivena ovim eksperimentima sam pročistila i preklopila kako bih dobila točne haplotipove virusa CHV1 tj. jedinstvene sekvence, odnosno virusne varijante. Za taj proces koristila sam bioinformatički alat *Robust amplicon denoising*, RAD kompatibilan s PacBio HiFi očitanjima (Kumar i sur. 2019). Sekvence sam zatim dodatno filtrirala kako bih izbacile one kraće od 3 kb i veće od 6 kb. RAD ne uključuje orijentaciju očitavanja, a budući da PacBio očitavanja nisu usmjerena, identični haplotipovi se mogu pojaviti višekratno, u reverzno-komplementarnoj orijentaciji. Stoga sam sekvence prvo poravnala s odgovarajućom referentnom sekvencom virusa CHV1, te pretvorila u ‘fasta’ format za daljnju analizu. U programskom okružju R, koristeći paket *pegas* (v0.14, Paradis 2010) izračunala sam Hammingovu udaljenost između sekvenci u pojedinom uzorku tj. u pojedinim virusnim populacijama. Ako su dvije ili više sekvenci identične, Hammingova udaljenost iznosi 0. Zbrajanjem broja sekvenci između kojih je Hammingova udaljenost jednaka 0, dobila sam točan broj svake sekvence (varijante) prisutne u pojedinoj virusnoj populaciji. Raznolikost virusnih varijanti sam izračunala koristeći mjeru genske raznolikosti Nei’s H (Nei & Tajima 1981). Virusne varijante roditeljskih populacija i virusne varijante njihovih spora (vidi potpoglavlje 4.4.) te virusne varijante donora i virusne varijante njihovih primatelja (vidi potpoglavlje 4.5.) sam objedinila i poravnala s referentnim sekvencama za odgovarajući podtip (vidi potpoglavlje 4.7.3.). Zatim sam, koristeći paket *pegas*, izračunala

Hammingovu udaljenost između njih. Na taj sam način identificirala sekvence koje su identične među analiziranim populacijama.

4.6.5. Statistička obrada i određivanje raznolikosti virusnih populacija

U analize promjena virusnih populacija tijekom horizontalnog prijenosa virusa CHV1, ukupno je bio uključen 51 uzorak: tri uzorka kontrolne populacije svakog izolata koji nisu bili uključeni u pokuse horizontalnog prijenosa virusa (tzv. „pooled“, Pooled.EP713, Pooled.CR23, Pooled.Euro7), 12 donora, odnosno uzoraka koji su sudjelovali u prijenosu virusa (po četiri za svaki izolat) te 36 uzoraka primatelja (triplikati svakog od četiri koinokulacije za sva tri izolata). Detaljni popis izolata je u Tablici 4.

Tablica 4. Popis izolata korištenih u eksperimentu horizontalnog prijenosa virusa CHV1 i njihovih skraćenica korištenih u tekstu

VIRUSNI IZOLAT	SKRAĆENICA	NAZIV
EP713	FP	Pooled.EP713, kontrolni uzorak koji nije uključen u pokus prijenosa
	FD5,-6,-60,-1	EP713 donor (EU-5) koinokuliran s testerima EU-5, EU-6, EU-60, EU-1
	F51-F53, 61-63, 601-603, 11-13	EP713 virusni izolat prenesen u testere EU-5, EU-6, EU-60, EU-1 (tri replike za svaki koinokulirani par)
	Donor.EP713	Sve virusne populacije navedenih donora EP713 izolata
	Recipijent.EP713	Sve virusne populacije navedenih primatelja EP713 izolata
CR23	CP	Pooled.CR23, kontrolni uzorak koji nije uključen u pokus prijenosa
	CD1, -2, -44, -5	CR23 donor (EU-1) koinokuliran s testerima EU-1, HK22C (EU-2), EU-44, EU-5
	C11-C13, 21-23, 441-443, 51-53	CR23 virusni izolat prenesen u testere EU-1, HK22C (EU-2), EU-44, EU-5 (tri replike za svaki koinokulirani par)
	Donor.CR23	Sve virusne populacije navedenih donora CR23 izolata
	Recipijent.CR23	Sve virusne populacije navedenih primatelja CR23 izolata
Euro7	EP	Pooled.Euro7, kontrolni uzorak koji nije uključen u pokus prijenosa
	ED9, -15, -36, -17	Euro7 donor (EU-9) koinokuliran s testerima EU-9, EU-15, EU-36, EU-17
	E91-E93, 151-153, 361-363, 171-173	Euro7 virusni izolat prenesen u testere EU-9, EU-15, EU-36, EU-17 (tri replike za svaki koinokulirani par)
	Donor.Euro7	Sve virusne populacije navedenih donora Euro7 izolata
	Recipijent.Euro7	Sve virusne populacije navedenih primatelja Euro7 izolata

Neparametrijski Wilcoxon test koji uspoređuje dva uzorka koristila sam kako bih odredila razliku između virusnih populacija: roditeljskih i njihovih spora, kao i donora i njihovih primatelja. U tu svrhu izračunala sam zastupljenost svake pojedine virusne varijante u pojedinim uzorcima kako bi se dobio sastav virusnih populacija. Test sam napravila pomoću statističkog paketa PAST 4.03 (Paleontological Statistics). Također sam, koristeći isti statistički test, procijenila utjecaj

razlike u pojedinom *vic* lokusu između donora i primatelja, te razlike u virusnom izolatu (CR23, Euro7 ili EP713) na raznolikost virusnih populacija, grupirajući pojedine uzorke prema navedenim karakteristikama.

Također, pomoću generaliziranog linearnog modela (eng. *general linear model*) u programskom okružju R (R verzija 4.0.5 koristeći lme4 v1.1–35.1, Bates i sur. 2015), procijenila sam ima li statistički značajne razlike u raznolikosti virusnih populacija: roditeljskih i njihovih spora, kao i donora i njihovih primatelja te virusnih populacija koje nisu sudjelovale u eksperimentima prijenosa, nego sam ih koristila kao kontrolu, koristeći mjeru raznolikosti (π) i broj virusnih varijanti. Mutacijsku raznolikost (π) i broj virusnih varijanti sam logaritamski transformirala kako bi ih mogla uklopiti u statistički model. Kao dodatnu mjeru genetske raznolikosti virusnih populacija koristila sam i Shannonov indeks raznolikosti (H') koji sam izračunala u statističkom paketu PAST koristeći zastupljenost pojedinih virusnih varijanti u svakom uzorku.

Fisherov test sam koristila kako bih utvrdila postoji li razlika u učestalosti uspješnog vertikalnog prijenosa iz različitih roditeljskih izolata (CR23, Euro7, EP713, oz_08.2, ks_30.4 i ks_46.4) na njihovo potomstvo (spore), koristeći broj virulentnih i hipovirulentnih izolata dobivenih u pokusima vertikalnog prijenosa virusa. Pomoću ovog testa utvrdila sam uspješnost vertikalnog prijenosa, odnosno uspješnost pojedinog izolata virusa CHV1 da se prenese u spore. Fisherov test sam također koristila i kako bih utvrdila postoji li razlika u učestalosti uspješnog horizontalnog prijenosa između različitih donorskih izolata ovisno o virusnom soju (CR23, Euro7, EP713) ili o razlikovnom *vic* lokusu između donora i primatelja virusa.

4.6.5.1. Filogenijska rekonstrukcija virusnih populacija

4.6.5.1.1. RAxML-NG analiza

Filogenijsku rekonstrukciju odnosa virusnih populacija između različitih domaćina napravila sam pomoću metode najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*) koristeći bioinformatički alat RAxML-NG (v0.9.0, Kozlov i sur. 2019). Virusne populacije sam za ovu analizu podijelila prema podtipu virusa (I ili F1) i prema vrsti prijenosa (vertikalni ili horizontalni). Za svaku analiziranu virusnu populaciju konstruirala sam tzv. konsenzus sekvencu koristeći bioinformatički alat *bcftools* (v1.15, Li i sur. 2009) koji generira konsenzus sekvencu koristeći

referentni genom kao okosnicu te identificirane mutacije unutar domaćina. Koristila sam GTR+G model koji uzima u obzir promjene nukleotida kroz vrijeme i razlike u brzini tih promjena u ovisnosti o položaju nukleotida unutar sekvence. Pouzdanost grana filogenijskog stabla procijenila sam bootstrap metodom opetovanog uzorkovanja ($n = 1000$ ponavljanja). Mjeru potpore grana temeljila sam na tzv. metodi TBE (*eng. transfer bootstrap expectation*) te sam izračunate vrijednosti vizualizirala pomoću online alata za izradu filogenijskih stabala iTOL (v.6.9, Letunic & Bork 2024).

4.6.5.1.2. PopNetD3 analiza

Odnose između različitih virusnih populacija sam vizualizirala pomoću alata *PopNetD3* (Zhang & Parkinson 2019) koji omogućuje prikaz međuodnosa pojedinih populacija u obliku mreže. Ulazni podaci su SNP podaci dobiveni u programu SNPGenie. Analizirane virusne populacije sam grupirala prema podtipu virusa (I ili F1) ili prema vrsti prijenosa (vertikalni ili horizontalni). Za analizu su korištene samo varijante jednog nukleotida (SNV), koje su određene mapiranjem očitavanja na odgovarajuće referentne sekvence CHV1 (vidi potpoglavlje 4.7.3.).

4.6.5.2. Određivanje tipova selekcije unutar domaćina

Mutacije koje sam identificirala alatima SNPGenie (Nelson i sur. 2015) i SNPEff (Cingolani i sur. 2012) (vidi potpoglavlje 4.7.3.), karakterizirala sam kao sinonimne (koje ne mijenjaju aminokiselinu) ili nesinonimne (koje mijenjaju aminokiselinu). Za procjenu tipa selekcije uspoređene su nukleotidna raznolikost na nesinonimnim mjestima (π_N) i nukleotidna raznolikost na sinonimnim mjestima (π_S). Odnos tih dviju mjera korišten je za procjenu prevladavajućeg selekcijskog pritiska unutar domaćina. Usporedbu sam napravila zasebno za svaki tip prijenosa virusa. Također sam istražila ima li razlike u tipovima selekcije između roditeljskih virusnih populacija i virusnih populacija njihovih spora kao i između virusnih populacija donora i njihovih primatelja. Usporedbe sam napravila za cijeli segment od 5 kb kao i za specifični dio genoma, ORFA i početni dio ORFB koji je istražen.

4.7. *Određivanje biokemijskih parametara oksidacijskog stresa gljive*

Istim nasumično izabranim uzorcima iz uzorkovanih populacija Ozlja (10 uzoraka) i Kašta (9 uzoraka), kao i uzorcima uključenim u pokuse vertikalnog i horizontalnog prijenosa virusa CHV1 izmjerila sam aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST), superoksid dismutaze (SOD) i lakaze (LAC), te razine ne-proteinskih tiola i lipidne peroksidacije kako bih odredila razinu oksidacijskog stresa. Za sva mjerenja koristila sam mikrotitarske pločice s 96 jažica s ravnim dnom (Nunc MaxiSorp™, Thermo Scientific™) i spektrofotometar Multiscan Sky (Thermo Scientific™, verzija 5.0).

4.7.1. *Priprema proteinskih ekstrakata*

Za pripremu proteinskih ekstrakata koristila sam usitnjene liofilizirane uzorke micelija gljive *C. parasitica* uključenih u ranije navedene pokuse. Iz svakog usitnjenog uzorka, odvagala sam tri replike. Usitnjeno tkivo svih uzoraka stavila sam na led i u svaki uzorak sam dodala 1750 µL hladnog pufera za ekstrakciju (100 mM kalij-fosfatni pufer, 0,1 mM EDTA, pH 7,0), promiješala sam uzorke mikro tučkom te izmiješala na vrtložnoj miješalici u trajanju otprilike 10 sekundi, odnosno dok se sav prah nije disperzirao u puferu. Homogenate sam centrifugirala pri brzini od $20000 \times g$, 20 minuta pri 4 °C. Supernatante sam potom izdvojila u zasebne mikroeprovete te sam ih pospremila na -20 °C i koristila za daljnje analize.

4.7.2. *Mjerenje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST)*

Za mjerenje aktivnosti enzima GST, koristila sam metodu prema Bocchetti i Regoli (2006). Metoda se temelji na konjugaciji tiolne skupine GSH na supstrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) pri čemu nastaje GS-DNB konjugat, što sam izmjerila kao povećanje apsorbancije otopine analiziranog uzorka pri 340 nm kroz 10 ciklusa po 10 sekundi na spektrofotometru. Priredila sam reakcijsku smjesu (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 6,4, 1 mM CDNB) te sam dodala 277,5 µL te reakcijske smjese u jažice mikrotitarske pločice. Zatim sam u svaku jažicu dodala 7,5 µL 100 mM GSH (konačna koncentracija je bila 2,5 mM) te na kraju po 15 µL uzorka proteinskog

ekstrakta (ukupan volumen reakcijske bio je 300 μL). Za kalibriranje instrumenta, umjesto uzorka, koristila sam 15 μL čistog ekstrakcijskog pufera. Aktivnost enzima GST sam izrazila u nanomolima stvorenog GS-DNB-a u minuti po miligramu suhe mase, koristeći Beer-Lambertov zakon i odgovarajući ekstinkcijski koeficijent GS-DNB-a ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.7.3. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Za mjerenje aktivnosti enzima SOD koristila sam metodu prema Beauchamp i Fridovich (1971) koja se temelji na inhibiciji fotokemijske redukcije spoja nitro plavog tetrazolija (NBT) pri 560 nm. Superoksidni ioni, koje generira sustav ksantin-ksantin oksidaza (XOD), reduciraju supstrat (NBT) u NBT-diformazan koji apsorbira svjetlost valne duljine 560 nm. SOD smanjuje koncentraciju superoksidnih iona i tako smanjuje količinu nastalog NBT-diformazana, što dovodi do smanjenog porasta apsorbancije. Stoga u odsutnosti SOD-a reakcija nastanka NBT-diformazana teče maksimalnom brzinom. U jažice mikrotitarske ploče dodala sam po 247,5 μL reakcijske otopine (50 mM kalij fosfatni pufer, pH 7,8, 75 μM NBT i 0,1 mM EDTA, pH 7,8). Zatim sam dodala 22,5 μL 10,8 mM ksantina (konačna koncentracija 0,81 mM), 10 μL ekstrakcijskog pufera, 15 μL 0,05 U/mL XOD do konačne koncentracije 2,5 mU/mL i naposljetku 5 μL uzorka. Kao kontrolu, koristila sam neinhibiranu reakciju (maksimalna brzina redukcije NBT-a u NBT-diformazan) koja je sadržavala 15 μL ekstrakcijskog pufera umjesto uzorka. Nakon što sam dodala sve reaktante, stavila sam mikrotitarsku pločicu u spektrofotometar gdje je prvo miješana 5 minuta pri niskoj brzini, te je nakon 10 minuta mjerena apsorbancija. Inhibiciju reakcije sam izračunala pomoću formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_{\text{max}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{max}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

pri čemu je:

A_{max} – maksimalna apsorbancija, tj. apsorbancija neinhibirane reakcije

A_{blank} – apsorbancija smjese s ekstrakcijskim puferom umjesto uzorka i vodom umjesto XOD

A_{sample} – apsorbancija uzorka.

Aktivnost enzima SOD sam izračunala pomoću kalibracijske krivulje, dobivene iz podataka o inhibiciji i koncentraciji samog enzima (na logaritamskoj skali), koristeći goveđi rekombinantni

SOD (ekspimiran u bakteriji *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) kao standard. Napravila sam niz standardnih otopina enzima SOD koncentracija: 0,0002 U/ μ L, 0,001 U/ μ L, 0,002 U/ μ L, 0,005 U/ μ L, 0,01 U/ μ L, 0,02 U/ μ L, 0,025 U/ μ L, 0,04 U/ μ L, 0,05 U/ μ L, 0,08 U/ μ L, 0,1 U/ μ L, 0,2 U/ μ L, 0,5 U/ μ L, i 1 U/ μ L te su standardi korišteni u prethodno spomenutoj reakciji umjesto uzoraka. Jedna jedinica aktivnosti enzima je definirana kao količina enzima koja uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT-a. Rezultati su prikazani kao jedinice enzima po miligramu suhe mase.

4.7.4. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost enzima lakaze sam izmjerila kao povećanje apsorbancije pri 468 nm. To povećanje je rezultat oksidacije 2,4-dimetoksifenola (DMOP) u 3,3',5,5'-tetrametoksidifenilkvion (DMOPox, $\epsilon = 14.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a koristila sam kombinaciju metoda opisanih u Rigling i sur. (1989) te u Palmieri i sur. (1997). Reakcijska smjesa sastojala se od 240 μ L citrat-fosfatnog pufera (0,1 M Na_2HPO_4 i 0,05 M limunske kiseline, pH 3,4), 15 μ L 50 mM DMOP (pripremljen u istom citrat-fosfatnom puferu, konačne koncentracije 2,5 mM) i 45 μ L proteinskog ekstrakta. Za kalibriranje instrumenta, umjesto uzorka, koristila sam 45 μ L čistog ekstrakcijskog pufera. Aktivnost enzima sam izrazila u nanomolima nastalog DMOPox u minuti po miligramu suhe tvari.

4.7.5. Mjerenje ukupnih ne-proteinskih tiola

Za mjerenje ukupnih ne-proteinskih tiola koristila sam Ellmanovu metodu (Ellman, 1959). Usitnjeno liofilizirano tkivo sam homogenizirala pomoću 1 mL 6,67 % sulfosalicilne kiseline, inkubirala na ledu 30 minuta te centrifugirala 10 minuta na $13000 \times g$ pri 4 °C. Izdvojila sam supernatante izdvojeni te sam na 600 μ L supernatanta dodala 150 μ L 5 mM 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeve kiseline), (DTNB; konačna koncentracija 1 mM). Reakcijske smjese sam inkubirala 15 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega sam svakom uzorku izmjerila apsorbanciju pri 412 nm. Sadržaj ne-proteinskih tiola odredila sam korištenjem Beer-Lambertovog zakona, koristeći ekstincijski koeficijent za DTNB $\epsilon = 14.53 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i izrazila u nanomolima stvorenog DTNB-a po miligramu suhe tvari.

4.7.6. Mjerenje lipidne peroksidacije

Lipidnu peroksidaciju sam odredila procjenjivanjem udjela malondialdehida (MDA) pomoću tiobarbiturne kiseline, metodom opisanom u Heath i Packer (1968) uz modifikacije. Po 500 μL homogenata micelija svakog uzorka pomiješala sam s 100 % (w/v) trikloroctene kiseline (TCA) kako bi dobila konačnu koncentraciju od 10 % TCA. Potom sam otopinu inkubirala 30 minuta na ledu te centrifugirala 10 minuta na $13000 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se istaložili proteini. Nakon toga sam 500 μL supernatanta pomiješala s 500 μL MDA reagensa (0,5 % (w/v) TBA (tiobarbiturna kiselina) u 10 % (w/v) TCA; konačna koncentracija TBA 0,25% (w/v)). Otopinu sam zagrijavala 30 minuta pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sušioniku te zatim brzo ohladila na ledu. Ohlađenu smjesu sam centrifugirala 10 minuta na $10000 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi uklonila precipitat. Apsorbanciju dobivenog supernatanta izmjerila sam pri 532 i 600 nm. Koncentraciju malondialdehida sam izračunala primjenom Beer-Lambertovog zakona i molarnog ekstincijskog koeficijenta MDA $\varepsilon = 155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pri čemu sam od apsorbancije pri 532 nm oduzela apsorbanciju pri 600 nm radi korekcije nespecifične mutnoće. Rezultate sam izrazila kao nmol MDA po mg suhe tvari.

4.7.7. Statistička obrada biokemijskih parametara oksidacijskog stresa

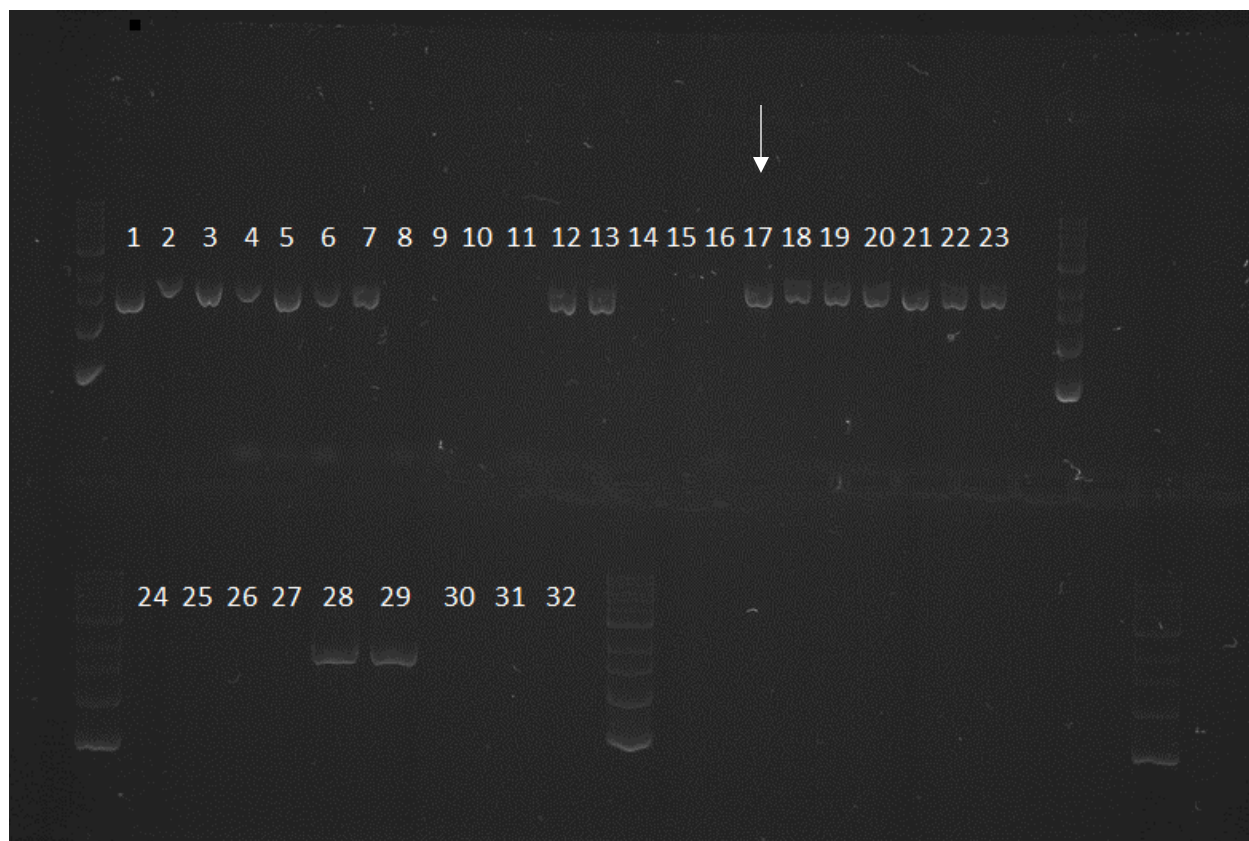
Statističku obradu podataka biokemijskih parametara oksidacijskog stresa gljive *C. parasitica* sam napravila u programima Statistica 14 (StatSoft Inc.) i PAST 3.26b (Hammer i sur. 2001). Podatke sam prikazala kao srednje vrijednosti tri replike $\pm$ standardna pogreška. Normalnost distribucije podataka testirala sam Shapiro-Wilks-ovim testom. Budući da podaci nisu slijedili normalnu distribuciju, testirala sam ih Kruskal-Wallis-ovim testom. Razinu značajnosti postavila sam na $p < 0,05$. Kako bi analizirala postoji li značajna korelacija između aktivnosti parametara uključenih u oksidacijski stres i raznolikosti virusnih populacija u domaćinu koristila sam neparametrijski Spearmanov ρ koeficijent korelacije.

5. REZULTATI

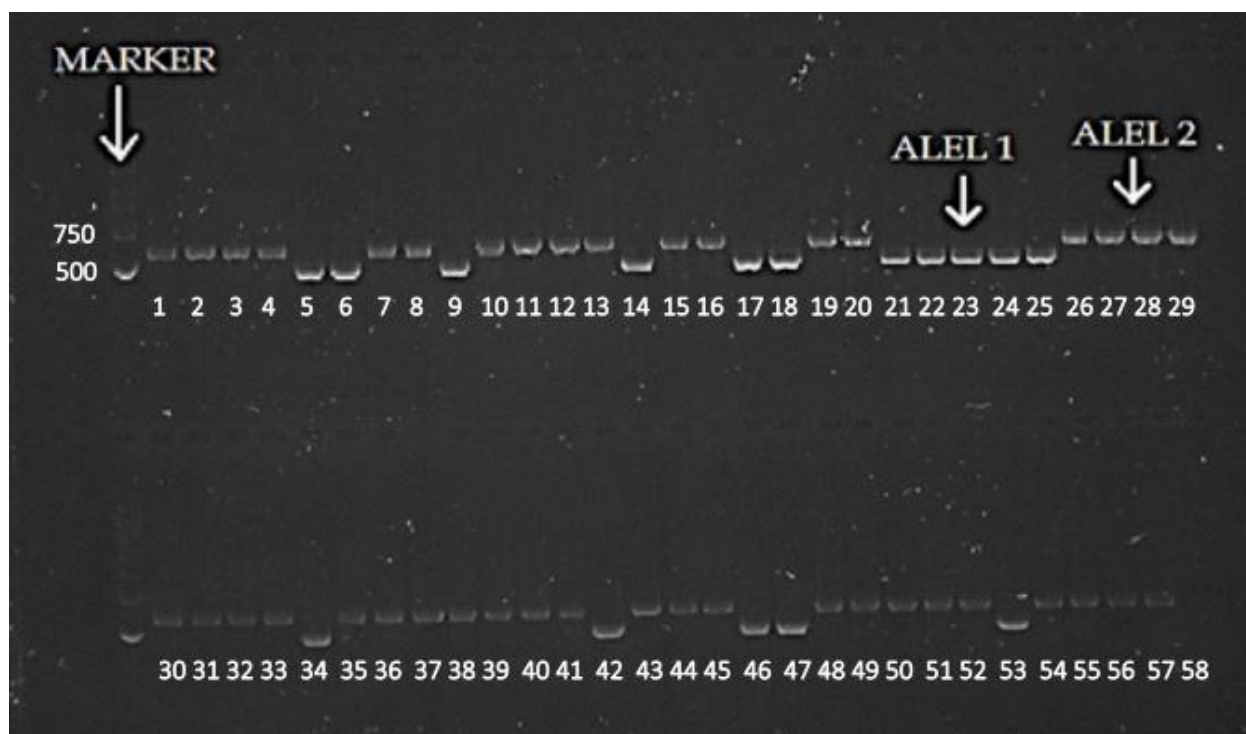
5.1. *Prisutnost virusa CHV1 u različitim EU-tipovima gljive*

U Ozlju je, od 36 analiziranih rakova kore kestena iz kojih je uspješno izolirana gljiva *C. parasitica*, identificirano 17 hipovirulentnih (onih u kojima je potvrđena gljiva *C. parasitica* zaražena virusom CHV1) što čini 47,2 %. Sličan postotak hipovirulentnih rakova nađen je i u Kaštu (40,7 %), odnosno od 27 rakova iz kojih je izolirana gljiva *C. parasitica*, njih 11 je bilo hipovirulentno (Slika 8.).

Izolatima gljive *C. parasitica* dobivenima iz analiziranih rakova zatim je određen tip vegetativne kompatibilnosti sparivanjem s EU testerima i molekularnim metodama. Primjer određivanja pojedinog vic lokusa molekularnom metodom prikazan je na slici 9. U Ozlju je identificirano ukupno devet EU-tipova a u Kaštu ih je pronađeno 11 (Tablica 5.).



Slika 8. Primjer elektroforeze amplicona dobivenih reverznom transkripcijom i PCR-om dsRNA izolirane iz micelija gljive *Cryphonectria parasitica* zaražene virusom CHV1 sakupljenim u Ozlju (oz) i Kaštu (ks). Uzorci su označeni brojevima 1-32 redom: oz_03.2, oz_11.3, oz_15.6, oz_24.2, oz_42.3, oz_45.6, ks_29.1, ks_43.2 (nije hipovirulentan), ks_44.1 (nije hipovirulentan), ks_46.6 (nije hipovirulentan), oz_45.4 (nije hipovirulentan), ks_46.2, EP713, EU1, negativna kontrola reakcije reverzne transkripcije, negativna kontrola reakcije PCR-a. Kao pozitivna kontrola korišten je izolat dsRNA prototipskog soja EP713, kao negativna kontrola izolat dsRNA testera EU-1, a kao kontrole reakcije reverzne transkripcije i PCR-a, ultračista voda. Od prve do 16. jažice su uzorci umnoženi parom početnica za ORFA. Molekularni standard veličina DNA je GeneRuler 1kb DNA Ladder. Od 17. jažice (označene strelicom) uzorci su isti ali su umnoženi drugim parom početnica, za ORFB.



Slika 9. Primjer agaroznog gela za određivanje genotipa lokusa *vic4* micelija gljive *Cryphonectria parasitica* zaražene virusom CHV1 sakupljenim u Ozlju (oz) i Kaštu (ks). Na početku svakog retka nalaze se molekularni standardi za određivanje veličine fragmenta (MARKER). Uzorci su označeni brojevima 1-58 redom: ks_02.1, ks_05.1, ks_07.1, ks_09.2, ks_10.1, ks_10.3, ks_10.4, ks_10.6, ks_09.3, ks_19.2, ks_22.1, ks_23.2, ks_27.2, ks_29.1, ks_30.2, ks_30.5, ks_31.1, ks_33.1, ks_36.2, ks_36.3, ks_46.1, ks_46.3, ks_46.4, ks_48.2, ks_46.6, ks_50.3, ks_08.2, ks_20.2, ks_08.1, ks_08.3, oz_04.3, oz_08.1, oz_08.2, oz_10.4, oz_10.5, oz_14.2, oz_15.1, oz_15.4, oz_19.3, oz_20.3, oz_20.6, oz_22.3, oz_23.3, oz_32.3, oz_34.3, oz_35.5, oz_39.1, oz_40.5, oz_40.6, oz_41.3, oz_42.3, oz_45.4, oz_47.1, oz_12.2, oz_20.2, oz_13.2, oz_19.2, ultračista voda kao kontrola.

Tablica 5. Prikaz zastupljenosti EU-tipova u terenskim izolatima iz Ozlja i Kašta 2019.

EU tip	Ozalj	Kašt
EU-1	20	10
EU-2	9	5
EU3	1	0
EU-7	0	1
EU-13	1	3
EU-14	1	0
EU-15	0	1
EU-17	1	2
EU-19	1	0
EU-21	0	1
EU-22	1	1
EU-24	0	1
EU-28	1	0
EU-29	0	1
EU-44	0	1

5.2. *Uspješnost vertikalnog prijenosa virusa CHV1*

Prosječna uspješnost vertikalnog prijenosa virusa (putem nespolnih spora) bila je iznad 75 %. Za tri prethodno karakterizirana izolata virusa CHV1, CR23, Euro7 i EP713 te jedan izolat iz Kašta (ks_46.4) uspješnost prijenosa je iznosila 100 %. Za izolat iz Ozlja (oz_08.2) uspješnost je iznosila 77 %, a za drugi izolat iz Kašta (ks_30.4) uspješnost je iznosila 92 %.

5.3. *Uspješnost horizontalnog prijenosa virusa CHV1*

Prilikom horizontalnog prijenosa virusa CHV1 istražen je utjecaj heteroalelizma na odabranim *vic* lokusima (*vic2*, *vic3* i *vic4*) između sojeva gljive *C. parasitica* donora i primatelja virusa. Heteroalelizam na lokusu *vic2* je najviše ograničavao prijenos (uspješnost prijenosa oko 6 %), na lokusu *vic3* utjecaj je bio nešto slabije izražen (uspješnost prijenosa 12 - 25 %), dok

heteroalelizam na lokusu *vic4* nije značajno smanjio uspješnost prijenos virusa CHV1 između donora i primatelja u odnosu na izogene izolate. U koinokulacijama testiranih izolata s istim EU-tipom, tj. među izogenim izolatima gljiva, prijenos virusa je bio uspješan u 100 % slučajeva (Tablica 6).

Na uspješnost horizontalnog prijenosa virusa CHV1 (Tablica 6.) nije utjecao donorski izolat virusa što je pokazano Fisherovim testom (Tablica 7.). Heteroalelizam na lokusima *vic2* i *vic3* imao je različiti učinak na prijenost virusa CHV1 između donora i primatelja no ta razlika nije bila statistički značajna za pojedine virusne izolate Euro7 i EP713 (Tablica 8.).

Tablica 6. Postotak uspješnosti horizontalnog prijenosa virusa CHV1 iz donora (CR23, Euro7 i EP713) u primatelje ovisno o postojanju heteroalelnih *vic* lokusa. EU-tipovi donora su naznačeni u zagradama.

	VIRUSNE POPULACIJE DONORA (EU-TIP) SKRAĆENICE DONORA					
	CR23 (EU-1) CD1, CD2, CD44, CD5		Euro7 (EU-9) ED9, ED15, ED36, ED17		EP713 (EU-5) FD5, FD6, FD60, FD1	
HETEROALELNI VIC LOKUS	EU-TIP PRIMATELJA	USPJEŠNOST PRIJENOSA (SKRAĆENICE PRIMATELJA)	EU-TIP PRIMATELJA	USPJEŠNOST PRIJENOSA (SKRAĆENICE PRIMATELJA)	EU-TIP PRIMATELJA	USPJEŠNOST PRIJENOSA (SKRAĆENICE PRIMATELJA)
NIJEDAN	EU-1	100 % (C11, C12, C13)	EU-9	100 % (E91, E92, E93)	EU-5	100% (F51, F52, F53)
<i>vic2</i>	EU-2*	5.9 % (C21, C22, C23)	EU-15	5.6 % (E151, E152, E153)	EU-6	6.1 % (F61, F62, F63)
<i>vic3</i>	EU-44	25 % (C441, C442, C443)	EU-36	14.3 % (E361, E362, E363)	EU-60	12.5 % (F601, F602, F603)
<i>vic4</i>	EU-5	97.8 % (C51, C52, C53)	EU-17	96 % (E171, E172, E173)	EU-1	98.6 % (F11, F12, F13)

*Izolat HK22C (EU-2) je korišten umjesto standardnog testera.

Tablica 7. Rezultati Fisherovog testa razlike u uspješnosti horizontalnog prijelaza virusa CHV1 između različitih hipovirulentnih donorskih izolata

razlikovni vic lokus između donora i primatelja	Primatelj nakon pokusa	Hipovirulentan donor			p-vrijednost Fisherovog testa		
		CR23	Euro7	EP713	CR23/Euro7	CR23/EP713	Euro7/EP713
vic2	hipovirulentan	8	7	10	1	1	1
	virulentan	126	119	154			
vic3	hipovirulentan	10	10	20	0,20088	0,07947	0,67738
	virulentan	30	60	140			
vic4	hipovirulentan	44	24	71	1	1	0,45103
	virulentan	1	1	1			
niti jedan (isti genotip donora i primatelja)	hipovirulentan	10	10	10	1	1	1
	virulentan	0	0	0			

Tablica 8. Rezultati Fisherovog testa razlike u uspješnosti horizontalnog prijelaza virusa CHV1 u pokusima između micelija gljive *C. parasitica* heteroalelnih na različitim *vic* lokusima

Virusni izolat	Primatelj nakon pokusa	razlikovni <i>vic</i> lokus između donora i primatelja				p-vrijednost Fisherovog testa					
		<i>vic2</i>	<i>vic3</i>	<i>vic4</i>	nijedan	<i>vic2/vic3</i>	<i>vic2/vic4</i>	<i>vic2/same</i>	<i>vic3/vic4</i>	<i>vic3/same</i>	<i>vic4/same</i>
CR23	hipovirulentan	8	10	44	10	0,001574	2,04x10 ⁻³²	5,70x10 ⁻¹¹	2,59x10 ⁻¹³	0,000018	1,000000
	virulentan	126	30	1	0						
Euro7	hipovirulentan	7	10	24	10	0,060641	1,35x10 ⁻²⁰	4,58x10 ⁻¹¹	1,45x10 ⁻¹³	1,12x10 ⁻⁷	1,000000
	virulentan	119	60	1	0						
EP713	hipovirulentan	10	20	71	10	0,055572	4,67x10 ⁻⁴⁸	3,43x10 ⁻¹¹	6,41x10 ⁻⁴⁰	7,08x10 ⁻⁹	1,000000
	virulentan	154	140	1	0						
Svi zajedno	hipovirulentan	25	40	139	30	0,000146	2,10x10 ⁻¹⁰¹	4,23x10 ⁻³²	4,10x10 ⁻⁶⁸	3,20x10 ⁻²²	1,000000
	virulentan	399	230	3	0						

5.4. *Populacije virusa CHV1 u gljivi*

5.4.1. Promjene u sastavu i raznolikosti virusnih populacija prilikom vertikalnog prijenosa virusa CHV1

U analizu virusnih populacija uključeno je istih 37 uzoraka kao i za biokemijske parametre. Uključeni su izolati: i) roditeljski EP713 i šest populacija iz spora, ii) roditeljski CR23 i 4 populacije iz spora, iii) roditeljski Euro7 i 5 populacija iz spora, iv) roditeljski ks_46.4 i 5 populacija iz spora, v) roditeljski ks_30.4 i 5 populacija iz spora te vi) roditeljski oz_08.2 i 6 populacija iz spora (Tablica 2.).

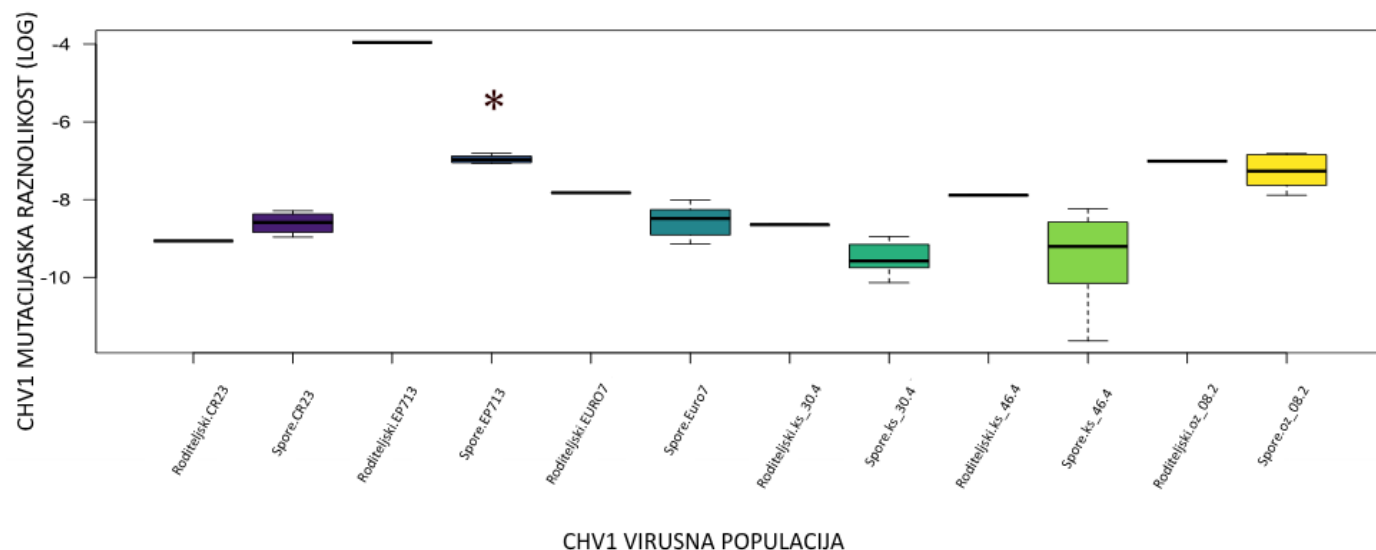
Sastav virusnih populacija (odnosno zastupljenost virusnih varijanti) prije i nakon vertikalnog prijenosa je u mnogim slučajevima bio statistički značajno različit, s iznimkom izolata CR23. Sve virusne populacije spora ks_30.4 (K1S1-5) značajno su se razlikovale od svoje roditeljske populacije po zastupljenosti virusnih varijanti (K1M). Za ostale izolate uključene u vertikalni prijenos, sastav virusnih populacija pojedinih spora značajno se razlikovalo od svojih roditeljskih populacija, ali to nije vrijedilo za sve spore istog roditelja (Tablica 9.)

Tablica 9. Razlike u sastavu virusnih populacija, temeljeno na brojnosti pojedinih virusnih varijanti, između roditeljskih populacija za izolate CR23, EP713, Euro7, te izolate iz Kašta (ks) i Ozlja (oz) i njihovih spora nakon vertikalnog prijenosa koristeći Wilcoxonov test. Statistički značajne razlike su označene zvjezdicama: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

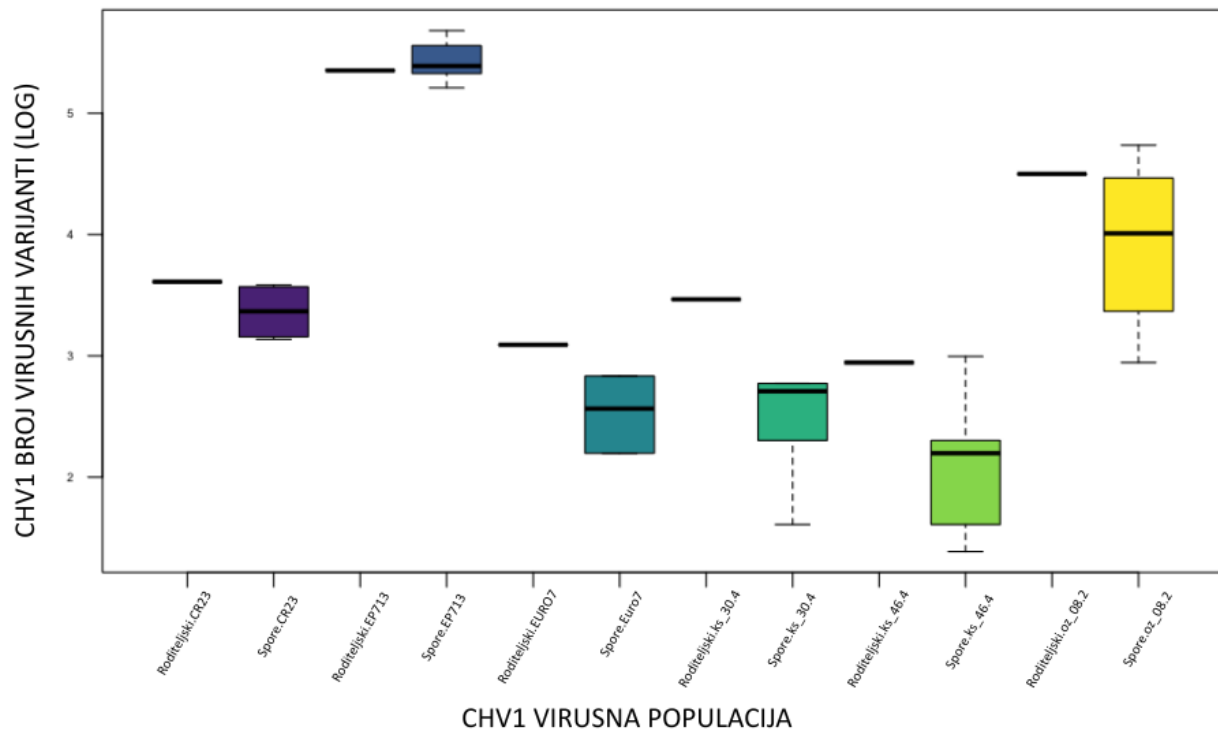
		RODITELJSKA VIRUSNA POPULACIJA (SKRAĆENICA)											
REPLIKA (VIRUSNA POPULACIJA SPORE)		CR23 (CM)	p- vrijednost	EP713 (FM)	p-vrijednost	Euro7 (E7)	p- vrijednost	ks_30,4 (K1M)	p- vrijednost	ks_46,4 (K2M)	p- vrijednost	oz_08,2 (OM)	p- vrijednost
1	SKRAĆENICA SPORE	CS1	0,97483	FS1	0,57251	ES1	0,027084*	K1S1	0,020715*	K2S1	0,14276	O1S1	4,67E-06**
2		CS2	0,50037	FS2	0,0007386**	ES2	0,003502*	K1S2	0,005632*	K2S2	0,003304*	O1S2	0,00101*
3		CS3	0,4006	FS3	0,0041852*	ES3	0,1584	K1S3	0,005663*	K2S3	0,97017	O1S3	3,44E-05***
4		CS4	0,054659	FS4	0,18563	ES4	0,20589	K1S4	0,019342*	K2S4	0,007834*	O1S4	0,11396
5				FS5	2,22E-05***	ES5	0,081742	K1S5	9,75E-06***	K2S5	0,19188	O1S5	1,67E-09***
6				FS6	0,0001249**							O1S6	0,19879

Pad ukupne mutacijske raznolikosti vidljiv je nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1 između virusnih populacija roditeljskih izolata i njihovih spora u svim izolatima izuzev CR23 no taj pad nije statistički značajan kod podtipa I (Euro7, ks_30.4, ks_46.4 i oz_08.2). Međutim, populacijsko usko grlo je bilo vidljivo nakon prijenosa virusnih populacija roditeljskog izolata francuskog podtipa F1 EP713 u spore (p vrijednost <0,001), za mutacijsku raznolikost (π) (Slika 10 A), ali ne i za broj virusnih varijanti (Slika 10 B). Kod podtipa I (Slika 10 A). Utjecaj uskog grla je također vidljiv i u smanjenju broja virusnih varijanti identificiranih u sporama za sve izolate podtipa I (Slika 10 B) iako nije bio statistički značajan.

A)



B)



Slika 10. Promjene u mutacijskoj raznolikosti (π) (A) i u broju virusnih varijanti (B) nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1. Na kutijastom dijagramu prikazani su medijan (linija unutar pravokutnika), interkvartilni raspon (IKR), dok linije izvan pravokutnika predstavljaju vrijednost od 1,5 x IKR. Zvezdicom je označena statistički značajna promjena (p vrijednost <0,001).

Među analiziranim virusnim izolatima nije bilo statistički značajne razlike u raznolikosti virusnih populacija između roditeljskih izolata i njihovih spora. Populacija virusa CHV1 izolata EP713 te populacije njegovih spora imale su najviši Shannonov indeks raznolikosti (H') od svih

analiziranih populacija uključenih u eksperiment vertikalnog prijenosa virusa CHV1. Virusne populacije podtipa I imaju niže vrijednosti H' od francuskog podtipa F1 (EP713) (Tablica 10.)

Tablica 10. Shannonov indeks raznolikosti (H') za roditeljske virusne populacije CR23, EP713, Euro7, te izolate iz Kašta (ks) i Ozlja (oz) te populacije njihovih spora. U zagradama je prikazan 95%-tni interval pouzdanosti.

H'	VIRUSNE POPULACIJE					
	CR23	EP713	Euro7	ks_30.4	ks_46.4	oz_08.2
RODITELJSKI	0,6329 (0,6294-0,6364)	3,892 (3,882-3,9)	1,031 (1,021-1,04)	0,5426 (0,5312-0,5535)	0,6874 (0,677-0,6968)	2,016 (2,001-2,029)
S1	1,793 (1,782-1,804)	3,456 (3,442-3,467)	0,8036 (0,7975-0,8095)	0,594 (0,5825-0,6052)	1,11 (1,104-1,115)	1,089 (1,078-1,1)
S2	1,325 (1,314-1,336)	3,946 (3,928-3,958)	0,8695 (0,8642-0,8743)	0,2779 (0,27-0,2853)	0,5584 (0,5526-0,564)	1,841 (1,831-1,851)
S3	1,531 (1,52-1,542)	3,904 (3,886-3,916)	1,091 (1,082-1,101)	0,7572 (0,7472-0,7667)	1,354 (1,345-1,362)	1,269 (1,257-1,28)
S4	1,206 (1,196-1,216)	3,85 (3,838-3,859)	0,9512 (0,9419-0,9602)	0,9186 (0,9108-0,9262)	1,131 (1,125-1,137)	1,174 (1,159-1,188)
S5	N/A	3,8 (3,782-3,813)	0,8121 (0,8055-0,8183)	0,6729 (0,6692-0,6766)	0,6225 (0,6162-0,6288)	0,9532 (0,945-0,9608)
S6	N/A	4,077 (4,062-4,088)				1,34 (1,325-1,354)

5.4.2. Promjene u sastavu i raznolikosti virusnih populacija prilikom horizontalnog prijenosa virusa CHV1

Heteroalelizam na *vic2* lokusu između donora i primatelja uzrokovao je promjene u sastavu virusnih populacija nakon prijenosa kod izolata Euro7 i EP713 u po dva od tri pokusa prijenosa, no nije utjecao na promjene kod izolata CR23. Heteroalelizam na *vic3* lokusu je značajno promijenio sastav sedam od devet populacija primatelja dok je heteroalelizam na *vic4* lokusu uzrokovao promjene na samo dvije od devet analiziranih populacija primatelja i to kod izolata Euro7 i EP713 (Tablica 11.). Zanimljivo, značajna promjena u sastavu virusnih populacija je utvrđena nakon horizontalnog prijenosa virusnih populacija u isti vc tip (isti EU-tip) u jednom od tri pokusa prijenosa kod izolata CR23 te u dva od tri pokusa prijenosa kod izolata EP713 (Tablica 11.).

Tablica 11. Razlike u sastavu virusnih populacija između donora i primatelja virusa CHV1, na temelju broja i zastupljenosti virusnih varijanti, uzrokovane efektom vegetativne nekompatibilnosti (*vic2*, *vic3* i *vic4*) tijekom prijenosa virusa koristeći Wilcoxonov test. Uzorci

uključuju tri izolata kao donore (CR23, Euro7, EP713) s po četiri uzorka za svaki donor (CD, ED, FD) ovisno o koinokulacijom s različitim testerima, te uzorke primatelja (triplikati svakog od četiri koinokulacije za sva tri izolata) što je detaljno opisano u Tablici 4. Statistički značajne razlike u primateljskim populacijama u odnosu na donorske su označene zvjezdicama: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

	VIRUSNA POPULACIJA DONORA (SKRAĆENICA)					
	CR23 (CD1, CD2, CD44, CD5)		Euro7 (ED9, FD15, FD36, FD17)		EP713 (FD5, FD6, FD60, FD1)	
Heteroalelni vic lokus	SKRAĆENICA PRIMATELJA	p-vrijednost	SKRAĆENICA PRIMATELJA	p-vrijednost	SKRAĆENICA PRIMATELJA	p-vrijednost
isti EU-tip	C11	0,94095	E91	0,68033	F51	0,00051403**
	C12	0,056327	E92	0,40088	F52	0,20737
	C13	0,012894*	E93	0,092453	F53	0,0074259*
vic2	C21	0,068489	E151	0,12239	F61	0,34679
	C22	0,15736	E152	0,033798*	F62	0,0082071*
	C23	0,60562	E153	0,0057488*	F63	0,00263*
vic3	C441	0,027187*	E361	0,013637*	F601	0,80436
	C442	0,059553	E362	0,0037761*	F602	8,06E-05***
	C443	0,0058834*	E363	0,0012588*	F603	9,66E-06***
vic4	C51	0,76879	E171	0,0026511*	F11	0,46126
	C52	0,67455	E172	0,24744	F12	7,26E-11***
	C53	0,11271	E173	0,59812	F13	0,42594

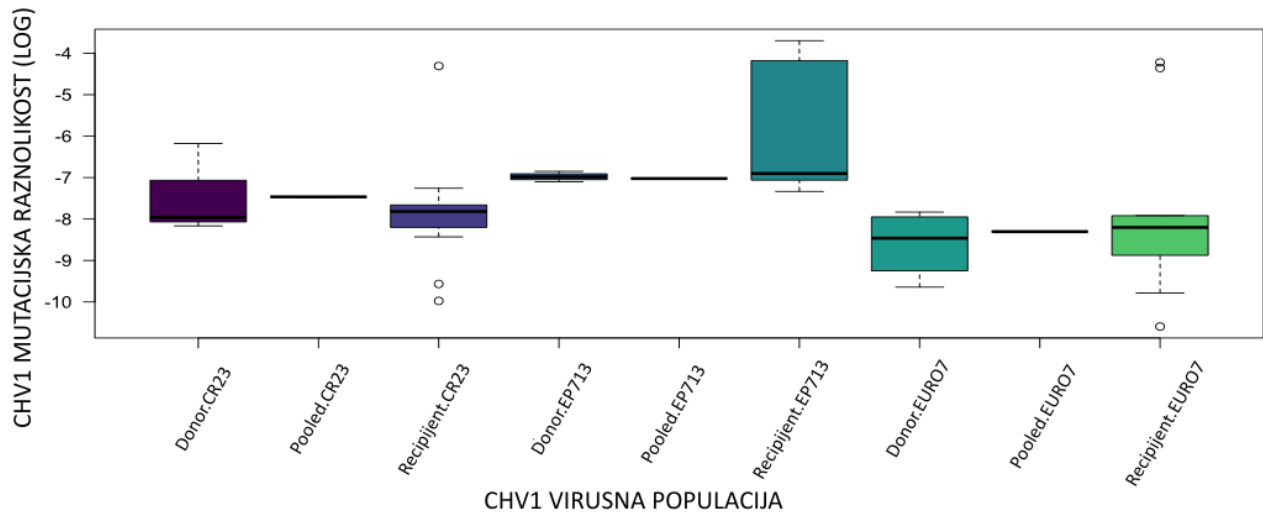
Wilcoxonov test pokazao je da se virusne populacije primatelja (CR23, Euro7 i EP713) proizašle iz izogenog prijenosa virusa, ne razlikuju od populacija primatelja gdje je postojala razlika u *vc* tipu između donora i primatelja virusa (Tablica 12. *isti/vic2*, *isti/vic3*, *isti /vic4*). No postoji statistički značajna razlika između sastava virusnih populacija primatelja koji su heteroalelni na *vic2* lokusu u usporedbi s onima heteroalelnim na *vic3* , odnosno *vic4* lokusu , a koje su proizašle iz istog micelija donora (Tablica 12.).

Tablica 12. Razlike u sastavu virusnih populacija između pojedinih primatelja obzirom na razliku u *vic* lokusu između pojedinih pokusa prijenosa, na temelju broja i zastupljenosti virusnih varijanti, tijekom prijenosa virusa koristeći Wilcoxonov test. Statistički značajne razlike između primateljskih populacija su označene zvjezdicama: * $p < 0,05$.

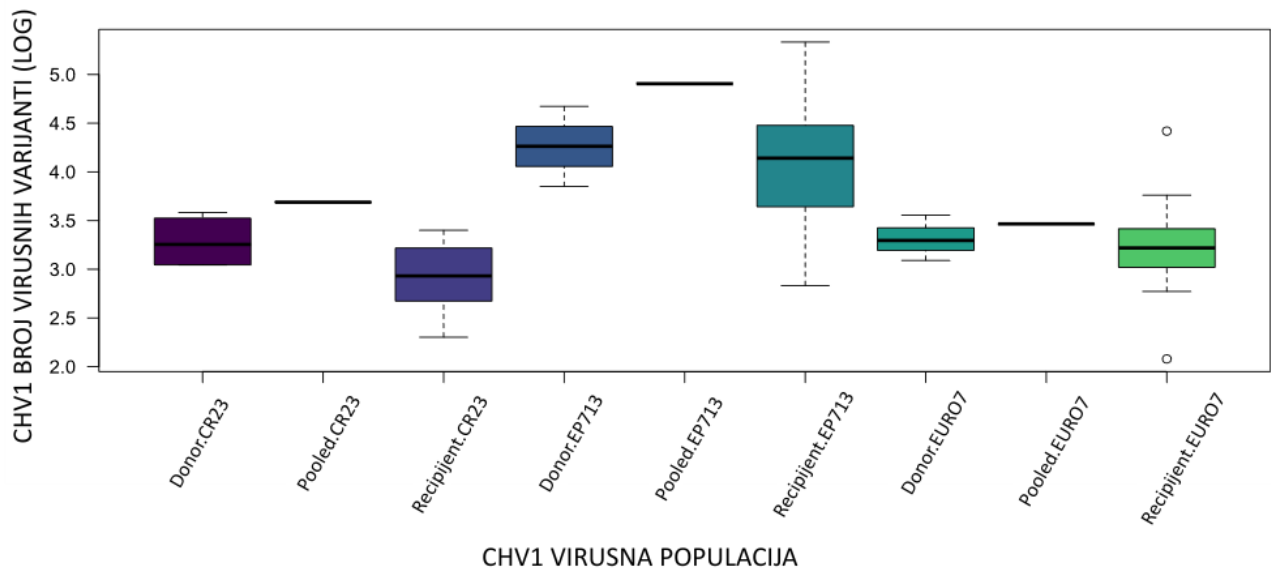
Razlika u <i>vic</i> lokusu primatelja	<i>isti/vic2</i>	<i>isti/vic3</i>	<i>isti/vic4</i>	<i>vic2/vic3</i>	<i>vic2/vic4</i>	<i>vic3/vic4</i>
p-vrijednost (Wilcoxonov test)	0,20398	0,29974	0,12843	0,03945*	0,02761*	0,36118

Prema rezultatima generaliziranog linearnog modela ne postoji statistički značajna razlika u virusnoj raznolikosti (opisano pomoću mjere mutacijske raznolikosti te broja virusnih varijanti) niti između jedne od analiziranih virusnih populacija, tj. heteroalelizam ni na jednom od testiranih *vic* lokusa nije rezultirao značajnom promjenom virusne raznolikosti prilikom horizontalnog prijenosa (Slika 11).

A)



B)



Slika 11. Promjene u mutacijskoj raznolikosti (π) (A) i u broju virusnih varijanti (B) nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1. Niti u jednoj populaciji nije bilo značajne razlike prije i nakon prijenosa virusa. Na kutijastom dijagramu prikazani su medijan (linija unutar pravokutnika), interkvartilni raspon (IKR), dok linije izvan pravokutnika predstavljaju vrijednost od 1,5 x IKR.

Shannonov indeks raznolikosti virusnih populacija (H') je u sedam od 12 slučajeva bio veći u virusnim populacijama donora nego u primateljima za sve izolate gljiva, osim u osam od devet izolata heteroalelnih na *vic4* lokusu (Tablica 13.) gdje je bio veći u virusnim populacijama primatelja. Ukupno je vrijednost indeksa raznolikosti u replikama primatelja C11, C22, C51, C52 i C53 za izolat CR23; E92, E153, E171, E172, E173 za Euro7 te F51, F601, F603, F12, F13 za EP713 izolat, bila veća od donorske

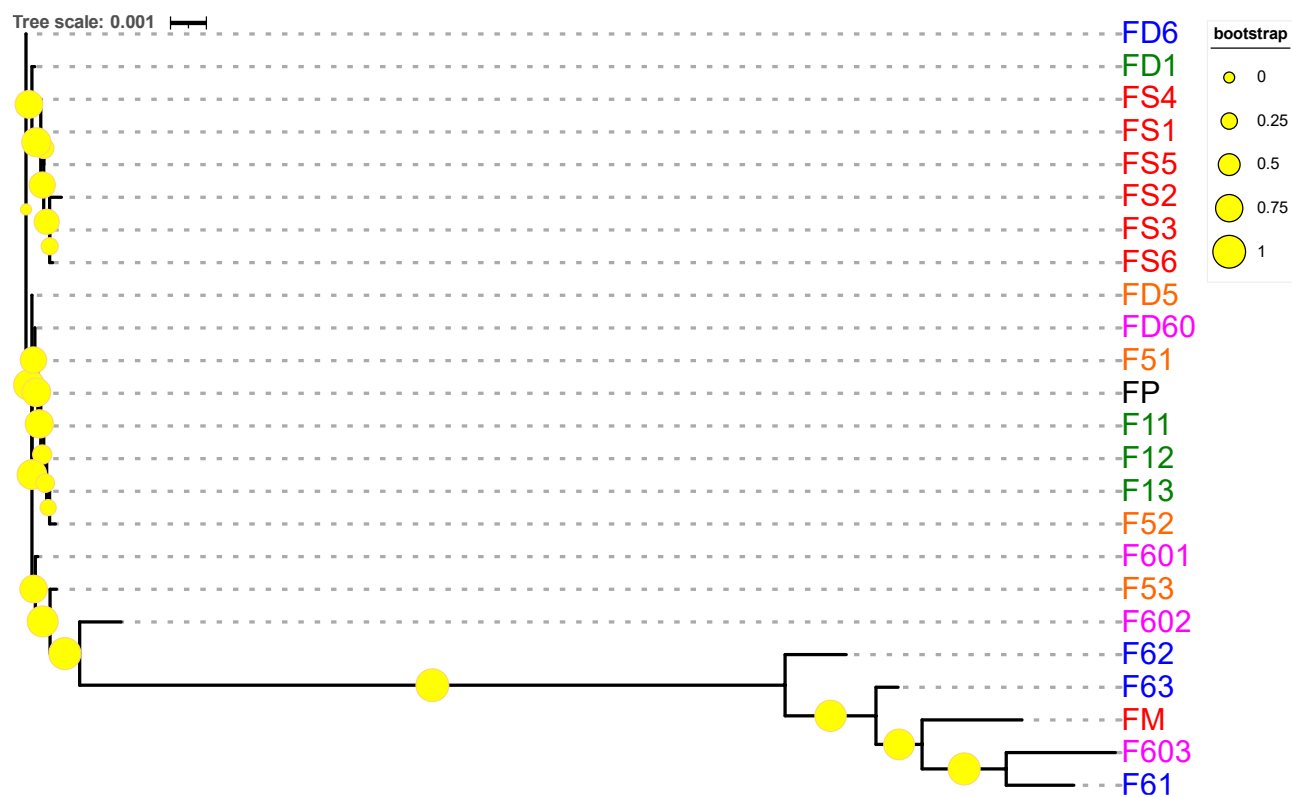
Tablica 13. Shannonov indeks raznolikosti (H') za virusne populacije iz gljiva donora i primatelja (heteroalelnih na *vic2*, *vic3*, *vic4* ili istog EU-tipa). 95%-tni interval pouzdanosti naveden je u zagradama. Zeleno su označene vrijednosti primatelja koje su manje od donora (7/12) za svaki izolat, dok su ružičasto označene vrijednosti primatelja više od donora ali samo u slučaju heteroalelizma na *vic4* (8/9).

	VIRUSNA POPULACIJA DONORA (SKRAĆENICA)					
	CR23 (CD1, CD2, CD44, CD5)		Euro7 (ED9, FD15, FD36, FD17)		EP713 (FD5, FD6, FD60, FD1)	
DONOR H'	1.24		1.76025		2.35275	
Heteroalelni <i>vic</i> lokus	SKRAĆENICA PRIMATELJA	H' (95%)	SKRAĆENICA PRIMATELJA	H' (95%)	SKRAĆENICA PRIMATELJA	H' (95%)
isti EU-tip	C11	1,242 (1,226-1,258)	E91	1,389 (1,368-1,408)	F51	2,67 (2,648-2,688)
	C12	1,117 (1,156-1,184)	E92	2,078 (2,065-2,089)	F52	2,348 (2,321-2,372)
	C13	0,9675 (0,9547-0,9798)	E93	1,186 (1,173-1,198)	F53	1,896 (1,879-1,911)
<i>vic2</i>	C21	0,2436 (0,2325-0,2543)	E151	0,5856 (0,568-0,6018)	F61	2,211 (2,198-2,224)
	C22	1,664 (1,651-1,676)	E152	0,5168 (0,4999-0,5327)	F62	1,464 (1,451-1,477)
	C23	1,208 (1,195-1,22)	E153	2,781 (2,767-2,794)	F63	1,266 (1,248-1,283)
<i>vic3</i>	C441	0,9803 (0,9676-0,9926)	E361	0,953 (0,9377-0,9677)	F601	2,741 (2,72-2,759)
	C442	0,6853 (0,6723-0,6979)	E362	0,6055 (0,5921-0,6187)	F602	1,983 (1,966-1,998)
	C443	0,7741 (0,7614-0,7858)	E363	0,2488 (0,2381-0,2596)	F603	2,646 (2,605-2,678)
<i>vic4</i>	C51	1,338 (1,327-1,349)	E171	2,364 (2,351-2,376)	F11	2,198 (2,171-2,223)
	C52	1,821 (1,783-1,855)	E172	2,018 (2,004-2,031)	F12	2,638 (2,622-2,651)
	C53	1,489 (1,475-1,501)	E173	1,778 (1,764-1,791)	F13	2,638 (2,614-2,658)

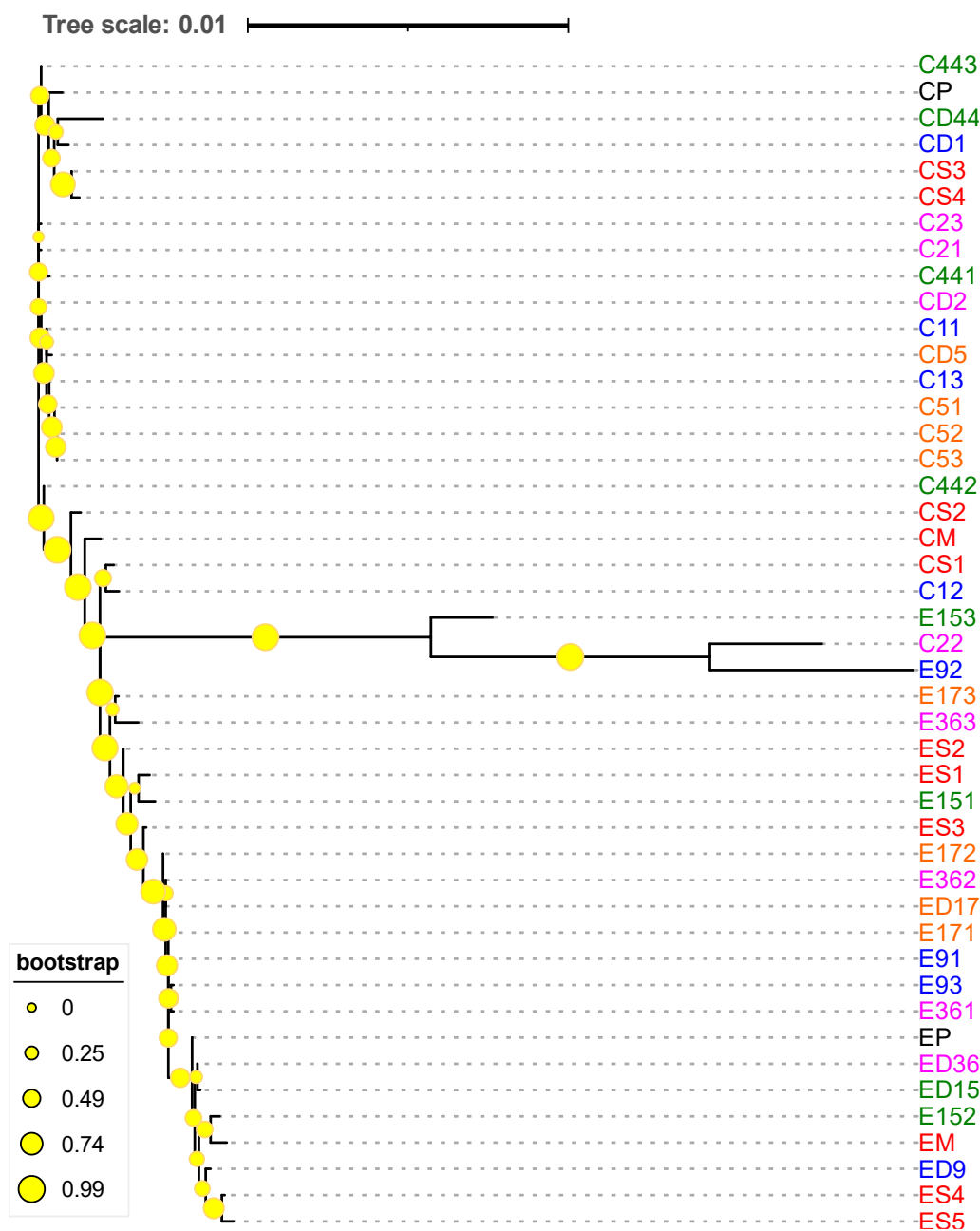
5.4.3. Struktura virusnih populacija

Filogenijske analize strukture virusnih populacija napravljene su pomoću bioinformatičkog alata RAxML-NG, uzorci su grupirani prema vrsti prijenosa (vertikalni ili horizontalni) te prema njihovom podtipu (podtip I i F1). Rezultati su prikazani u obliku filogenijskog stabla te pokazuju da se, u većini slučajeva, populacije virusa CHV1 proizašle iz ishodišne populacije grupiraju zajedno, u pokusima horizontalnog i vertikalnog prijenosa virusa (Slika 12.). Jedina iznimka su populacije primatelja (F61-F63) koje se nisu grupirale s njihovom donorskom populacijom - FD6 (Slika 12A) i virusna populacija primatelja C22 koja se grupirala s populacijama primatelja Euro7, a ne s donorskom populacijom CD2 (Slika 12B). U oba slučaja, riječ je o prijenosima koji su uključivali heteroalelni lokus *vic2*. Općenito govoreći, u eksperimentima vertikalnog prijenosa virusa CHV1, virusne populacije proizašle iz spora izolata EP713 (podtip F1) su blisko grupirane (Slika 12A), dok to nije bio slučaj s izolatima Euro 7 i CR23 (podtip I) (Slika 12B). Kod horizontalnog prijenosa virusa CHV1 utvrđen je sličan obrazac, naime, virusne populacije primatelja virusa izolata EP713 su srodnije (Slika 12A) nego virusne populacije primatelja izolata CR23 i Euro7 (Slika 12B).

A)



B)

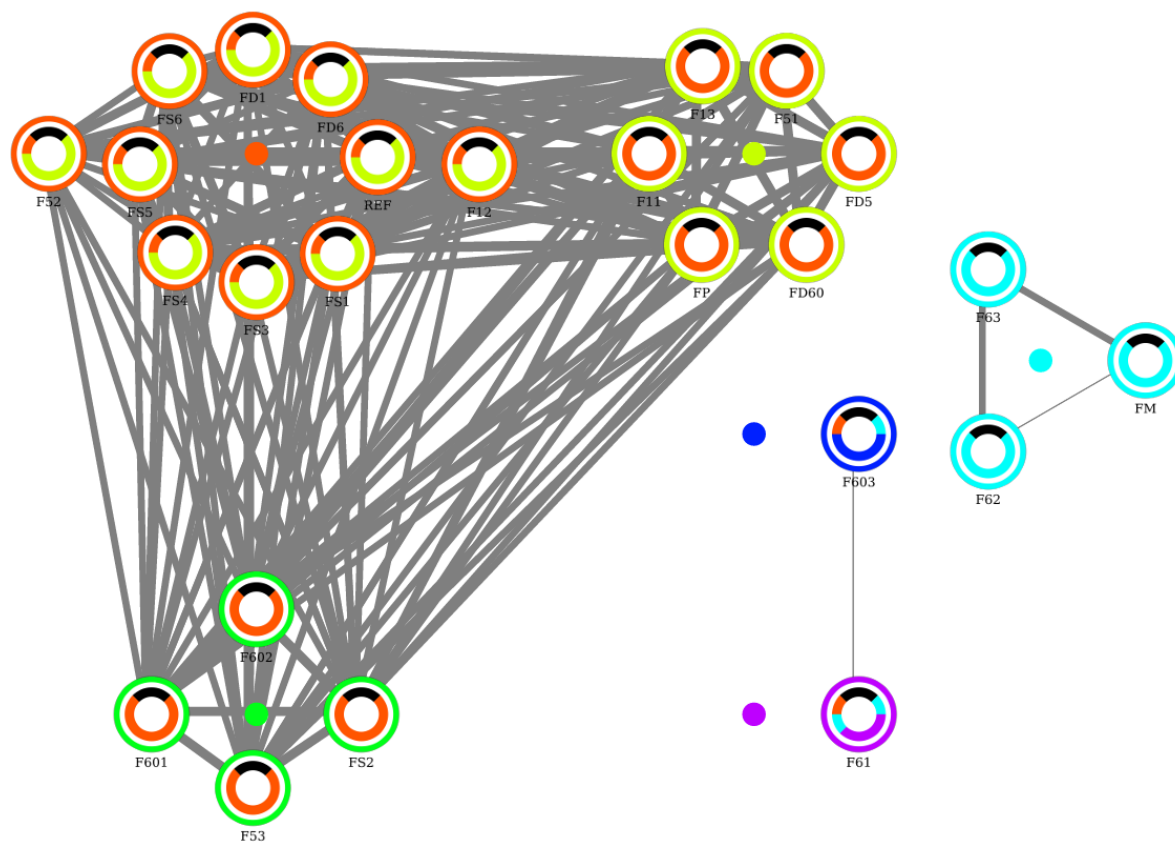


Slika 12. Filogenijska rekonstrukcija odnosa virusnih populacija između različitih domaćina: A) EP713 nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa, B) CR23 i Euro7 nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa. Filogenijsko stablo je neukorijenjeno, te su bootstrap vrijednosti prikazane pomoću krugova na čvorovima stabla. Crvenom bojom su označeni uzorci korišteni u vertikalnom eksperimentu, crnom su tzv. „pooled“ populacije, tj. miceliji gljiva koje nisu

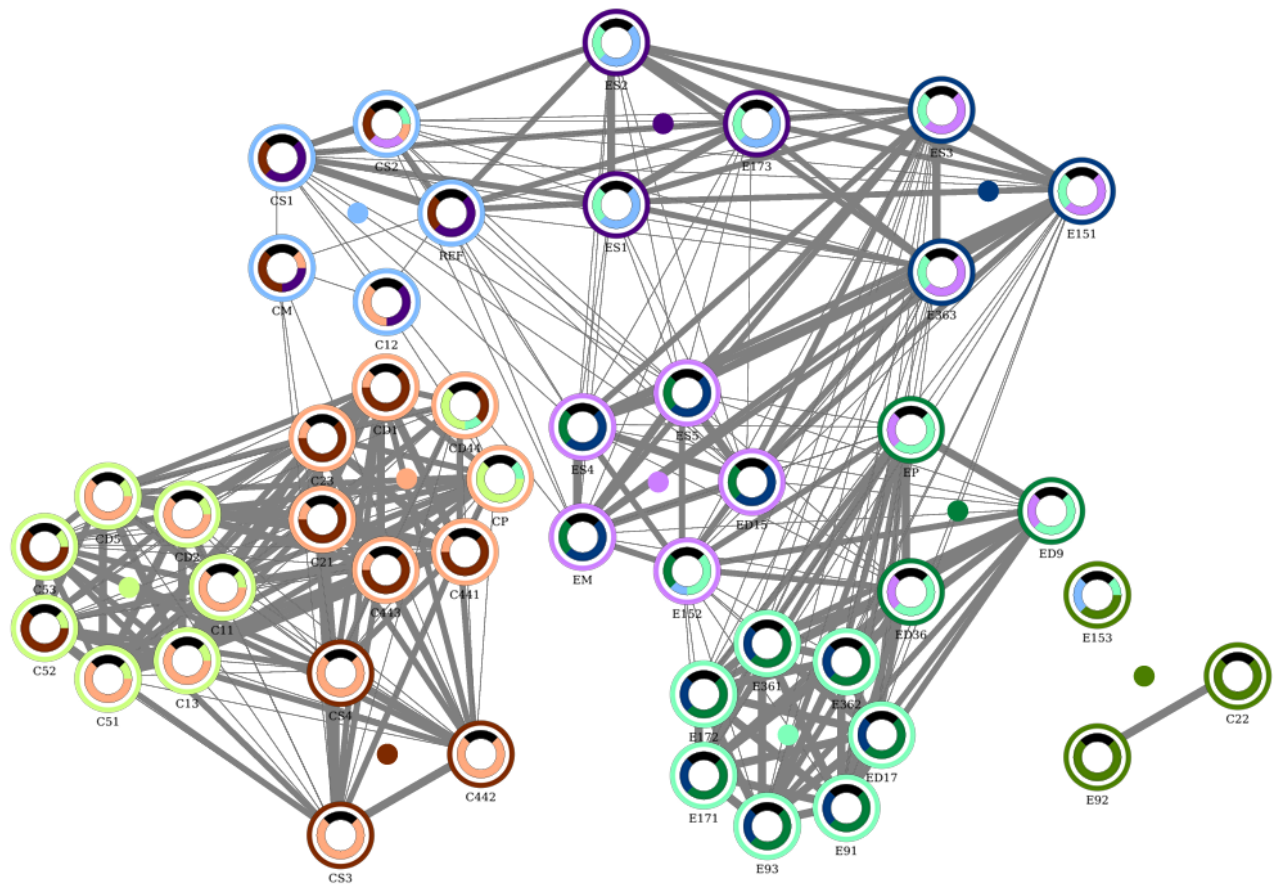
sudjelovale u koinokulacijama. Određenom bojom su označeni donori i primatelji koji su skupa koinokulirani u horizontalnom eksperimentu prijenosa virusa (Tablice 2. i 4.). Na slici A) donor i primatelji istog EU tipa su označeni narančastom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic2* su označeni plavom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic3* su označeni ružičastom bojom a donor i primatelji heteroalelni na *vic4* su označeni zelenom bojom. Na slici B), za izolat CR23 donor i primatelji istog EU tipa su označeni plavom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic2* su označeni ružičastom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic3* su označeni zelenom bojom a donor i primatelji heteroalelni na *vic4* su označeni narančastom bojom. Na slici B), za izolat Euro7, donor i primatelji istog EU tipa su označeni plavom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic2* su označeni zelenom bojom, donor i primatelji heteroalelni na *vic3* su označeni ružičastom bojom a donor i primatelji heteroalelni na *vic4* su označeni narančastom bojom.

Prikaz međuodnosa pojedinih populacija u obliku mreže haplotipova otkriva da se, za oba podtipa virusa CHV1, virusne populacije u kojima je nađen velik broj mutacija (E92, E153 te C22) grupiraju zajedno tj. da dijele više virusnih varijanti međusobno nego s ostalim populacijama (Slika 13.). Virusne populacije izolata gljive *C. parasitica* iz Ozlja i Kašta se uglavnom grupiraju s populacijama izolata svojih spora. Zanimljivo je istaknuti, da iako njihove roditeljske populacije (OM, K1M, K2M) pokazuju određene sličnosti, populacije njihovih spora su uglavnom grupirane bliže s roditeljskim populacijama (Slika 13.). Kod prototipskog izolata EP713 mnoge populacije virusa grupiraju se zajedno te dijele mnogo virusnih varijanti, izuzev F61, F62, F63 i F603 uključenih u pokus horizontalnog prijenosa i FM u pokusu vertikalnog prijenosa virusa koje formiraju zasebnu skupinu (Slika 13A). Virusne populacije podtipa I su formirale nekoliko odvojenih grupa, te se ne čini da formiraju jasne skupine obzirom na pojedini virusni izolat (Slika 13B). Virusne populacije iz Ozlja i Kašta su također razdijeljene, s time da su dvije populacije iz Kašta također većinom odijeljene i spadaju u posebnu grupu (Slika 13C).

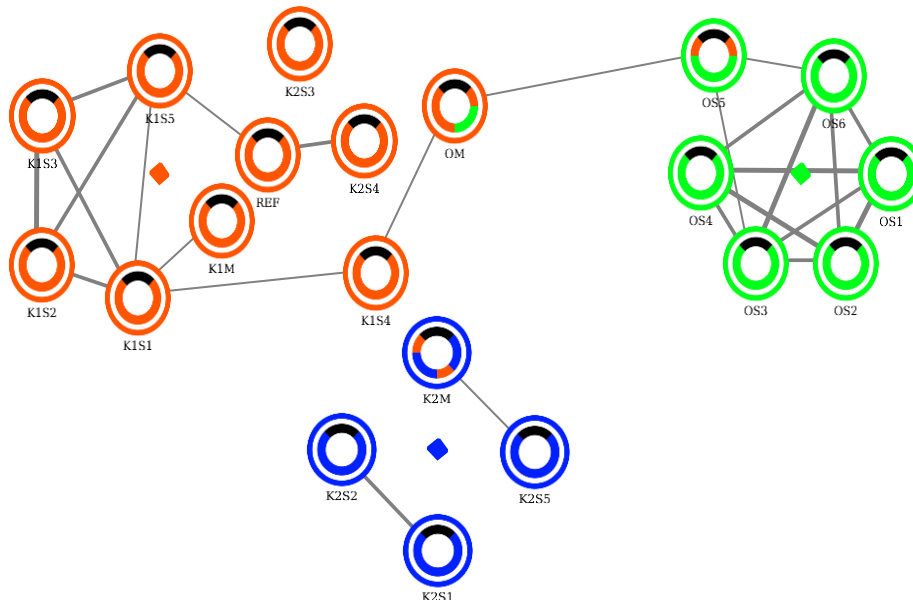
A)



B)



C)



Slika 13. Prikaz međuodnosa pojedinih populacija virusa CHV1 u obliku mreže haplotipova napravljen pomoću alata PopNetD3 nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa za virusni izolat EP713 (A), izolate CR23 i Euro7 nakon vertikalnog i horizontalnog prijenosa (B) te izolate iz Ozlja i Kašta (koji su bili uključeni samo u pokuse vertikalnog prijenosa (C)). Stupanj sličnosti sekvenci je prikazan debljinom linije koja povezuje populacije. Boja vanjskog kruga pokazuje pripadnost određenoj grupi dok boje unutarnjeg kruga predstavljaju regije odnosno postotak zajedničkog podrijetla koji pojedine grupe dijele s ostalim grupama. Detaljniji opisi kratica su u tablicama 2 i 4.

Kako bi istražila sastav virusnih varijanti, zbrojila sam iste haplotipove nađene u jednom uzorku te dobila njihov ukupan broj u tom uzorku. Kod virusnog izolata EP713 korištenog u vertikalnom prijenosu, u roditeljskom izolatu i šest populacija proizašlih iz spora, nađeno je ukupno 1150 različitih virusnih varijanti s prosjekom od pet varijanti koje su zastupljene s najmanje 5 % ukupnog broja virusnih varijanti dok je kod izolata CR23 nađena ukupno 91 različita virusna varijanta s prosjekom od 3 varijante zastupljene s najmanje 5 % ukupnog broja virusnih varijanti (Tablica 14.). Naposljetku, u izolatu Euro7, pronađeno je ukupno 51 različitih virusnih varijanti, a prosjek broja varijanti zastupljenih s najmanje 5 % ukupnog broja iznosio je 2,5.

Proučavajući izolate uključene u horizontalni prijenos virusa, pronađene su u prosjeku četiri varijante zastupljene s najmanje 5 % ukupnog broja virusnih varijanti, kojih je bilo 811 u virusnom izolatu EP713. Za izolat CR23, taj broj iznosi 2,8 od ukupno 222 varijante, a za virusni izolat Euro7 taj broj je 3,3 od 309 pronađenih virusnih varijanti. Broj različitih varijanti kao i broj najčešćih varijanti je prikazan u Tablici 14.

Tablica 14. Ukupan broj različitih virusnih varijanti nađenih u određenom izolatu za vertikalni (EP713, CR23, Euro7, ks_30.4, ks_46.4 i oz_08.2; ver) i horizontalni (EP713, CR23 i Euro7; hor) prijenos. Srednja vrijednost broja varijanti svih uzoraka uključenih u određeni eksperiment je vidljiva u zagradama. Također je prikazana i srednja vrijednost broja najučestalijih varijanti, tj. onih koje su prisutne u barem 5 % ukupnog broja svih nađenih varijanti u određenom izolatu.

	EP713		CR23		Euro7		ks_30.4	ks_46.4	oz_08.2
	ver	hor	ver	hor	ver	hor	ver	ver	ver
Broj varijanti (srednja vrijednost)	1150 (227,1)	811 (77,4)	91 (30,8)	222 (22,8)	51 (19,7)	309 (30,4)	63 (15,7)	46 (11,2)	362 (64,3)
Broj varijanti nađen u barem 5% ukupnog broja	5	4	3	2,8	2,5	3,3	1,7	2,85	2,7

5.4.4. Tipovi selekcije unutar domaćina

Tipovi selekcije karakterizirani su pomoću sinonimnih i nesinonimnih mutacija, odnosno uspoređena je mutacijska raznolikost (π) između sinonimnih (π_S) i nesinonimnih (π_N) mutacija u analiziranom 5 kb dugom segmentu genoma virusa CHV1.

Od 88 analiziranih populacija, uključujući vertikalni i horizontalni prijenos, π_S bio je veći od π_N za 79 virusnih populacija a kod preostalih 9 π_N je bio veći od π_S ($\pi_S = 0,002321 \pm 0,006485$, $\pi_N = 0,000356 \pm 0,000654$, t-test = -3,1328, srednja razlika = 0,001965, p-vrijednost = 0,002359) (Prilog 1.). Analiza je napravljena zasebno na oba ORF-a te je većina populacija imala $\pi_S > \pi_N$, točnije 60 na ORFA i 58 na ORFB od ukupno 88 populacija. Kod vertikalnog prijenosa π_S je bio veći od π_N u 29 od 37 analiziranih virusnih populacija ali razlika nije bila statistički značajna (π_S

= 0,000905 $\pm$ 0,003988, πN = 0,000224 $\pm$ 0,00045, t-test = -1,1458, srednja razlika = 0,000681, p-vrijednost = 0,25944). Samo jedna od 6 roditeljskih virusnih populacija, ona iz Ozlja (OZM) te 7 od 31 virusnih populacija proizašlih iz spora su imale $\pi N > \pi S$. U horizontalnom prijenosu πS je bio statistički značajno veći od πN u 50 od 51 virusnih populacija (πS = 0,003348 $\pm$ 0,00765, πN = 0,000451 $\pm$ 0,000755, t-test = -2,9634, srednja razlika = 0,002897, p-vrijednost = 0,004649). Nijedna od donorskih virusnih populacija nije imala $\pi N > \pi S$, dok je samo jedna virusna populacija primatelja (E173) imala $\pi N > \pi S$.

Za mutacije koje mijenjaju kodon a time i aminokiselinu, pretpostavlja se da imaju umjeren učinak tj. da mogu promijeniti funkcionalnost proteina. Takve tzv. missense mutacije su nađene u svim istraživanim virusnim populacijama. Mutacije gdje dolazi do pomaka okvira čitanja, za koje se smatra da imaju velik učinak, pošto mogu dovesti do skraćivanja proteina, koji tako mogu u potpunosti izgubiti svoju funkciju, pronađene su u nekim uzorcima. Takve mutacije su nađene na pet različitih pozicija u genomu roditeljskog virusnog izolata EP713 (FM) korištenog u vertikalnom prijenosu, kao i u sve tri primateljske populacije proizašle nakon horizontalnog prijenosa virusa u micelij heteroalelan na *vic2* lokusu te jednoj primateljskoj populaciji nakon prijenosa u micelij heteroalelan na *vic3* lokusu proizašle iz navedene donorske populacije. Još jedna takva mutacija je nađena i u dvije virusne populacije primatelja – F61 i F63. Kod virusnih izolata CR23 i Euro7 nađeno je devet mutacija koje mijenjaju okvir čitanja u svim analiziranim populacijama (pokus horizontalnog i vertikalnog prijenosa virusa, uključujući i donore i roditeljske populacije). Osim navedenih, nađene su i delecije genoma virusa CHV1 koje najvjerojatnije predstavljaju defektne virusne RNA molekule. Na poziciji 4672 (ORFB), delecija duga 237 parova baza bila je prisutna u gotovo svim virusnim populacijama izolata EP713, uključujući roditeljsku i populacije donora, točnije, od 24 ukupno analiziranih virusnih populacija izolata EP713 (pokus vertikalnog i horizontalnog prijenosa virusa). Od tih 24 analiziranih virusnih populacija, u njih 21 ta delecija je imala visoku učestalost unutar domaćina od ~65 %. Ista delecija (duga 237 parova baza) pronađena je na poziciji 4671 (ORFB) u jednom primatelju virusnog izolata Euro7 (E153), no tu je delecija imala nižu učestalost: 13,3 %. U istom virusnom izolatu (Euro7) uočena je velika delecija duga 978 parova bazana na poziciji 2389 (ORFB). Ova delecija je pronađena u svim izolatima uključenim u vertikalni prijenos gdje je njezina učestalost bila ~65 %, te u jednoj virusnoj populaciji donora (ED15) s učestalošću od 13 %. Posljednja uočena velika delecija od

915 parova baza na poziciji 2409 (ORFB) pronađena je u samo jednoj populaciji proizašloj iz spore (K2S1) s učestalošću 45,1 %.

U pokusu horizontalnog prijenosa virusa CHV1, primjećena je i razlika u uspješnosti prijenosa određenih virusnih varijanti ovisno o heteroalelizmu različitih *vic* lokusa. Kad su aleli na svim *vic* lokusima bili isti (isti EU-tip) ili kad je razlika bila u *vic4* alelu, broj prenesenih varijanti (nađenih i u donorskom i primateljskom izolatu) je bio viši, redom, za EP713 39 % i 45 %, za CR23 31 % i 30 %, te za Euro7 38 % i 53 % u usporedbi s heteroalelizmom na *vic2* ili *vic3* lokusu, redom za EP713 13 % i 20 %, za CR23 29 % i 19 %, te za Euro7 23 % i 17 %.

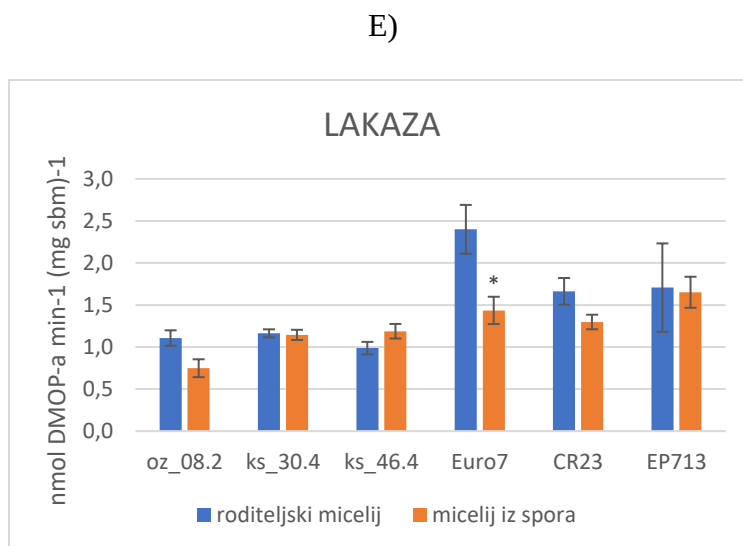
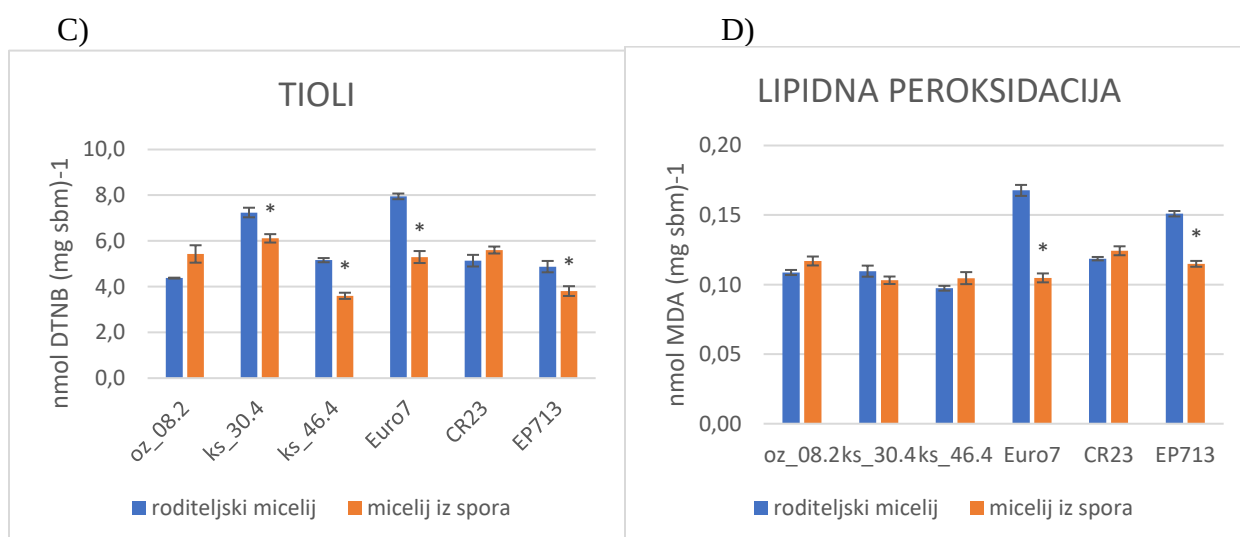
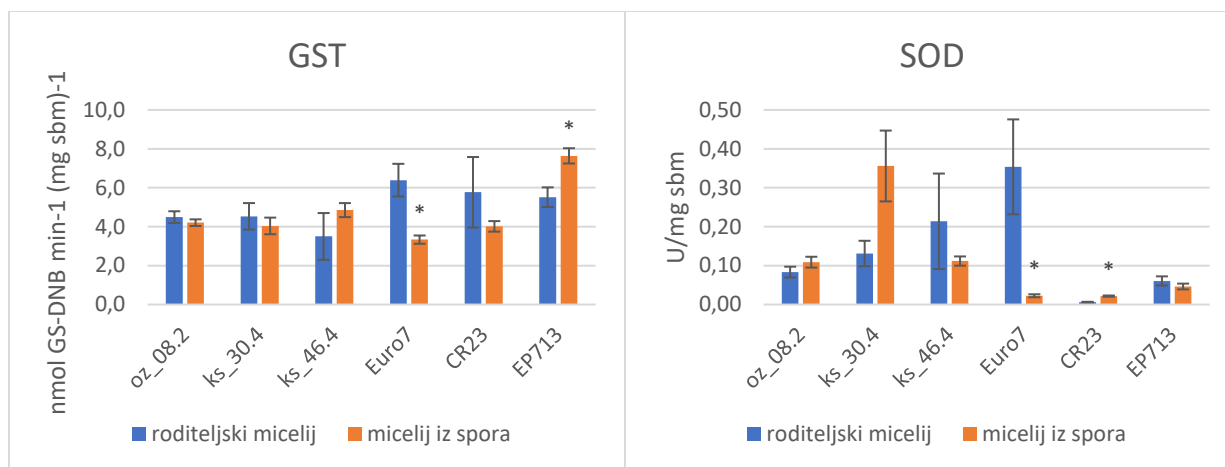
5.5. Oksidacijski stres u gljive

5.5.1. Oksidacijski stres u gljive nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1

U analizu biokemijskih parametara uključeno je ukupno 37 uzoraka: micelij roditeljskog uzorka svakog korištenog izolata (EP713, CR23, Euro7, ks_30.4, ks_46.4 i oz_08.2) te micelij njihovih spora (4-6 spora po svakom prijenosu). Za početak testirala sam razlikuju li se značajno biokemijski parametri oksidacijskog stresa micelija gljive *C. parasitica* porijeklom od spora u koje je vertikalno prenesen virus CHV1 od micelija njihovih roditeljskih izolata koristeći neparametrijski Kruskal Wallis test (Slika 14.). Prema dobivenim rezultatima, u terenskim izolatima iz Kašta (ks_30.4 i ks_46.4), ukupni sadržaj tiola se smanjuje u miceliju porijeklom od spora u odnosu na roditeljski micelij. Nadalje, svi mjereni parametri bili su značajno niži u miceliju podrijetlom iz spora izolata Euro7, nakon vertikalnog prijenosa virusa iz roditeljskog izolata. U miceliju spora izolata CR23 značajno je bilo samo povećanje aktivnosti SOD enzima nakon prijenosa, dok je u miceliju spora izolata EP713 vidljivo značajno povećanje aktivnosti enzima GST te smanjenje sadržaja tiola i razine lipidne peroksidacije.

A)

B)



Slika 14. Promjene parametara oksidacijskog stresa gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) aktivnost enzima GST, B) aktivnost enzima SOD, C) sadržaj ne-proteinskih tiola, D) razina lipidne peroksidacije, E) aktivnost enzima lakaze. Objedinjene su srednje vrijednosti micelija podrijetlom iz spora te su podaci prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) $\pm$ standardna pogreška. Statistički značajno različite promjene između svakog pojedinačnog roditeljskog micelija i micelija pripadajućih spora ($p < 0,05$) su prikazane zvjezdicom; sbm – suha biomasa.

Razlike u biokemijskim parametrima između micelija roditeljskih izolata i micelija izolata porijeklom od pojedinih spora u koje je vertikalno prenesen virus CHV1 (Prilozi 2.-6.) utvrđene su za tirole između roditeljskog micelija i micelija jedne spore za uzorke iz Kašta (K1S5) te između micelija dviju spora iz Ozlja, OS2 i OS3 (Prilog 4.). Zanimljivo je istaknuti da se kod uzorka iz Ozlja aktivnost enzima GST statistički značajno razlikovala između micelija porijeklom od dvije spore, OS2 i OS5, u koje je prenesen virus CHV1 (Prilog 2.), dok je kod izolata iz Kašta ks_30.4 postojala značajna razlika u aktivnostima enzima GST (Prilog 2.) i lipidne peroksidacije između micelija porijeklom iz dviju spora: K1S1 i K1S5 (Prilog 5.).

Statistički značajna razlika utvrđena je u biokemijskim parametrima između micelija izolata Euro7 i micelija spora u koje je prenesen virus CHV1: za GST (Prilog 2.) i tirole (Prilog 4.) između roditeljskog micelija EM i micelija spora ES5 te za lipidnu peroksidaciju (Prilog 5.) između roditeljskog micelija EM i micelija spore ES1, gdje su se vrijednosti za sva tri parametra smanjile nakon prijenosa.

Kod izolata EP713 utvrđeno je smanjenje razine lipidne peroksidacije između roditeljskog micelija FM i micelija spore FS1 (Prilog 5.), dok je za izolat CR23 utvrđeno statistički značajno povećanje aktivnosti enzima SOD između roditeljskog micelija CM i micelija spore CS4 nakon prijenosa (Prilog 3.) i razlika u razini lipidne peroksidacije između micelija dviju spora: CS1 i CS2 (Prilog 5.).

5.5.2. Oksidacijski stres u gljive nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1

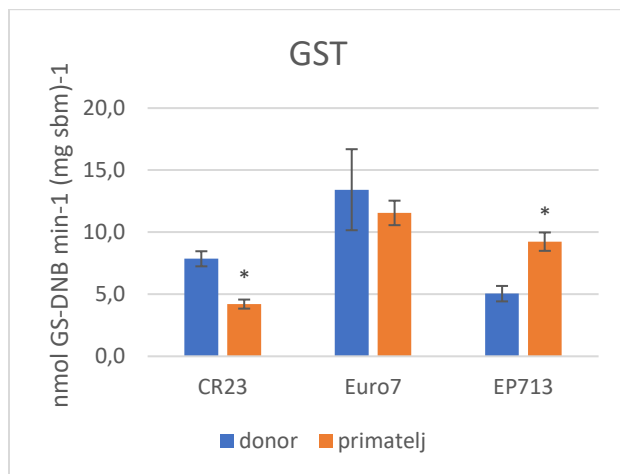
Neparametrijski Kruskal Wallis test korišten je za ispitivanje statistički značajnih razlika u biokemijskim parametrima oksidacijskog stresa između micelija izolata uključenih u pokuse horizontalnog prijenosa virusa CHV1. Kod izolata CR23 nađene su statistički značajne razlike za sve promatrane parametre oksidacijskog stresa između donora virusa CHV1 i njihovih objedinjenih primatelja. Za aktivnost enzima GST, sadržaj tiola, razinu lipidne peroksidacije te aktivnost lakaze vrijednosti su manje u miceliju primatelja, dok je aktivnost enzima SOD veća u miceliju primatelja. Kod izolata EP713 mjerene vrijednosti su značajno veće u miceliju primatelja za svaki parametar osim za razinu lipidne peroksidacije. Kod izolata Euro7 razlike su pronađene za svaki parametar osim za aktivnost enzima GST i lakaze pa je tako aktivnost enzima SOD veća kod primatelja, dok je u slučaju tiola i lipidne peroksidacije veća razina u donorskom miceliju (Slika 15.).

Kad su primatelji virusa CHV1 grupirani prema razlikama u *vic* lokusu između micelija donora i primatelja, u pokusu horizontalnog prijenosa virusa CR23 nađene su sljedeće promjene: aktivnost GST se smanjila u primateljima u odnosu na donor međusobno različitima na lokusu *vic3* i *vic4* (Prilog 7.); aktivnost SOD je porasla u primateljima u odnosu na donor međusobno različitima na lokusima *vic2*, *vic4* te izogenim primateljima (Prilog 8.). Nadalje, sadržaj tiola se smanjio u primateljima u odnosu na donor različitima na lokusima *vic2* i *vic4* (Prilog 9.) dok se razina lipidne peroksidacije smanjila u primateljima različitima na lokusima *vic2* i *vic3* (Prilog 10.). Osim navedenog, utvrđene su i razlike u biokemijskim parametrima oksidacijskog stresa među pojedinim primateljima virusa CHV1 kod izolata CR23: aktivnost SOD je bila najniža kod izolata heteroalelnih na *vic3* te se statistički razlikovala od izolata heteroalelnih na *vic2* i *vic4*; koncentracija tiola je bila najniža kod izolata heteroalelnih na *vic4* te se značajno razlikovala od izogenih primatelja; lipidna peroksidacija je bila najmanja kod izolata heteroalelnih na *vic2* i *vic3* te se značajno razlikovala od lipidne peroksidacije utvrđene kod izolata izogenih primatelja.

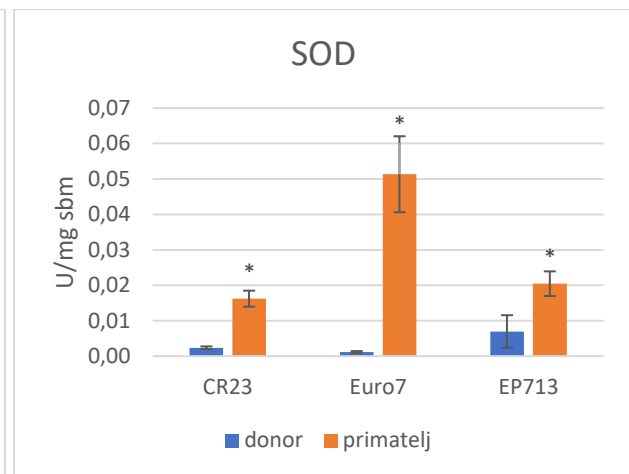
Kad su primatelji grupirani prema razlikama u *vic* lokusu između micelija donora i primatelja, u pokusu horizontalnog prijenosa virusa za izolat Euro7 nađene su sljedeće promjene: aktivnost SOD je porasla u primateljima u odnosu na donor različitima na lokusima *vic2* i *vic3* (Prilog 7.); koncentracija tiola se smanjila u primateljima u odnosu na donor različitima na lokusu *vic2* (Prilog 8.); lipidna peroksidacija se smanjila u primateljima u odnosu na donor različitima na lokusu *vic2* (Prilog 9.); aktivnost lakaze se smanjila u primateljima u odnosu na donor različitima na lokusu *vic4* (Prilog 10.). Osim navedenog, utvrđene su i razlike u biokemijskim parametrima oksidacijskog stresa među pojedinim primateljima virusa CHV1: aktivnost SOD je bila najviša kod izolata heteroalelnih na *vic2* te se statistički razlikovala od izogenih izolata; koncentracija tiola je bila najviša kod izogenih izolata te se značajno razlikovala od izolata heteroalelnih na *vic2*, *vic3* i *vic4*; aktivnost lakaze je najniža u izolatima heteroalelnim na *vic4* te se značajno razlikovala od izolata heteroalelnih na *vic2* te izolata izogenih primatelja.

I za kraj, kad su primatelji grupirani prema razlikama u *vic* lokusu između micelija donora i primatelja, u pokusu horizontalnog prijenosa virusa EP713 nađene su sljedeće promjene: aktivnost GST se povećala u primateljima u odnosu na donor različitih na lokusu *vic3* i *vic4* te u izogenih primatelja (Prilog 6.); aktivnost SOD je porasla u primateljima u odnosu na donor različitih na lokusu *vic2* (Prilog 7.); koncentracija tiola se povećala u izogenim primateljima u odnosu na donor (Prilog 8.); lipidna peroksidacija se povećala u izogenim primateljima u odnosu na donor (Prilog 9.); aktivnost lakaze se povećala u primateljima u odnosu na donor različitih na lokusu *vic2* i *vic4* (Prilog 10.). Osim navedenog, utvrđene su i razlike u biokemijskim parametrima oksidacijskog stresa među pojedinim primateljima virusa CHV1: aktivnost SOD je bila najviša kod izolata heteroalelnih na *vic2* te se statistički razlikovala od izogenih izolata i izolata heteroalelnih na *vic3*; koncentracija tiola je bila najviša kod izogenih izolata, te se značajno razlikovala od izolata heteroalelnih na *vic2*; lipidna peroksidacija je bila najmanja kod izolata heteroalelnih na *vic2* i *vic4* te se značajno razlikovala od lipidne peroksidacije utvrđene kod izolata izogenih primatelja te izolata heteroalelnih na *vic3*; aktivnost lakaze je bila najviša u izolatima heteroalelnim na *vic2* te se značajno razlikovala od izolata heteroalelnih na *vic3* te izolata izogenih primatelja. Također su visoku aktivnost lakaze imali izolati heteroalelni na *vic4* koji su bili statistički značajno različiti od izolata heteroalelnih na *vic3*.

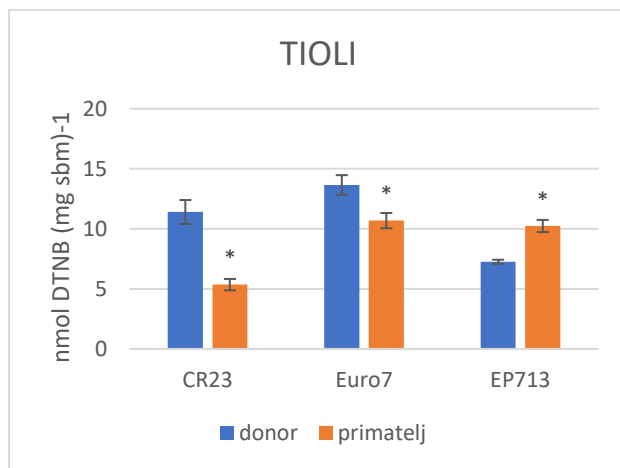
A)



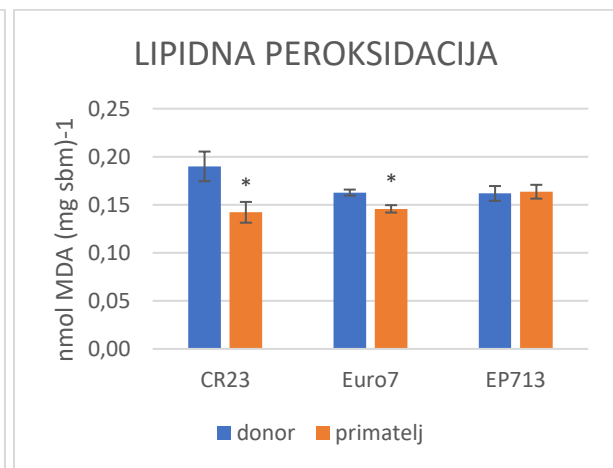
B)



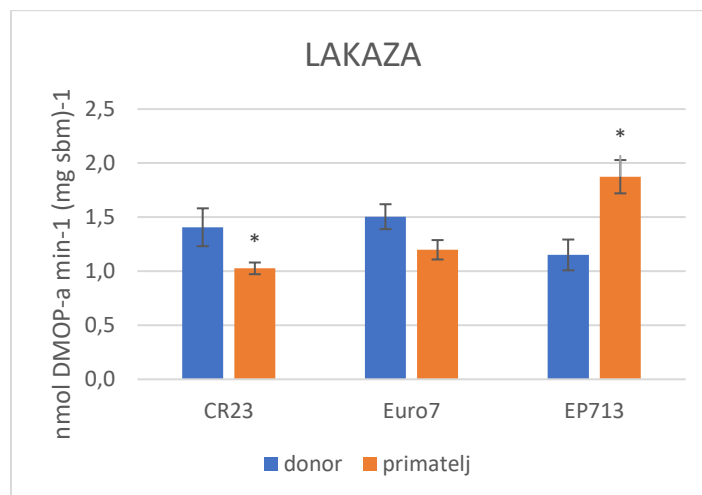
C)



D)



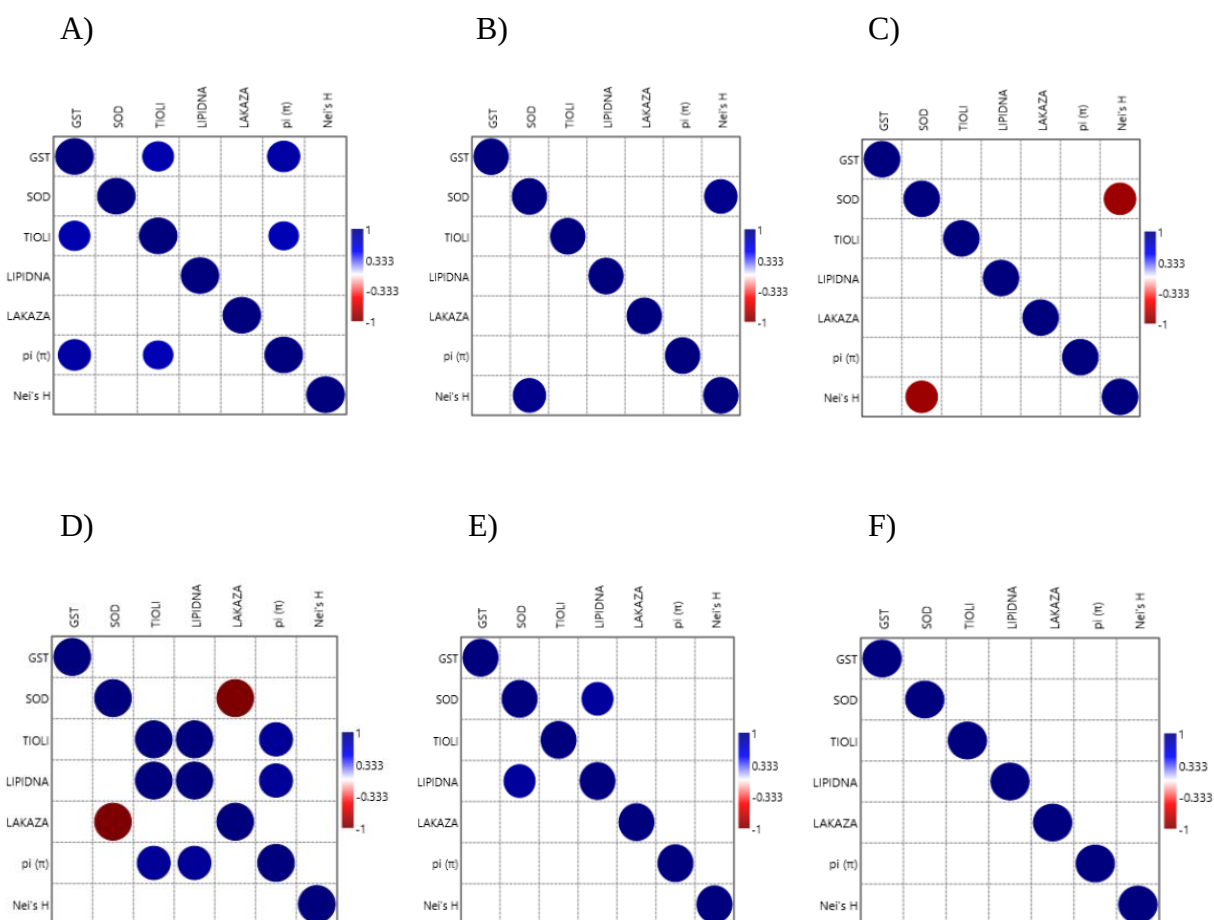
E)



Slika 15. Promjene parametara oksidacijskog stresa gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirani su svi donori i svi primatelji određenog izolata: A) aktivnost enzima GST, B) aktivnost enzima SOD, C) sadržaj ne-proteinskih tiola, D) razina lipidne peroksidacije, E) aktivnost enzima lakaze. „Donor“ predstavlja objedinjene srednje vrijednosti podrijetlom iz micelija svih donora a „primatelj“ objedinjene srednje vrijednosti podrijetlom iz micelija svih primatelja određenog izolata. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci označeni zvjezdicom statistički različiti između svakog pojedinačnog donorskog micelija i micelija pripadajućih primatelja ($p < 0,05$); sbm – suha biomasa.

5.6. Interakcije između parametara oksidacijskog stresa te raznolikosti virusnih populacija prema mjerama raznolikosti Nei's H i π

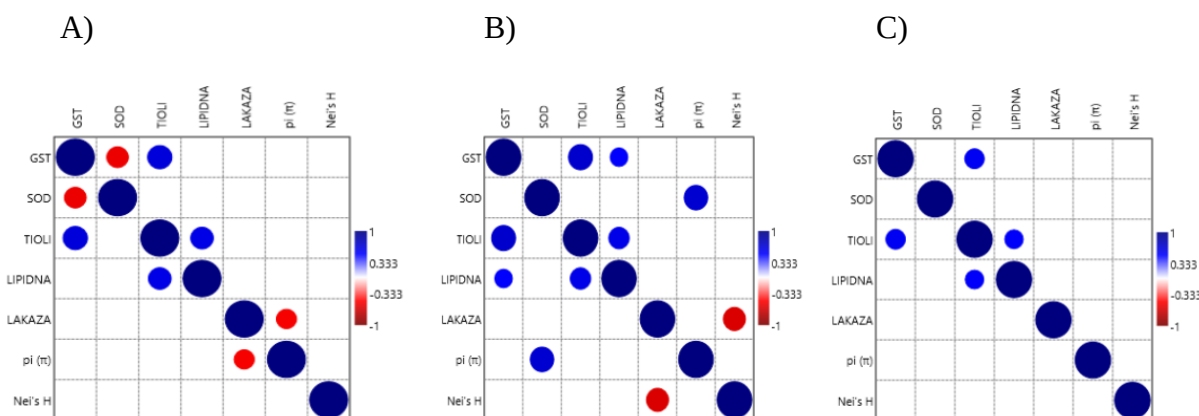
Naposljetku, korišten je neparametrijski Spearmanov ρ koeficijent korelacije kako bi se utvrdilo postoji li značajna korelacija između vrijednosti mjerenih parametara oksidacijskog stresa i raznolikosti virusnih populacija (Nei's H i mutacijska raznolikost π) u određenim izolatima (Slika 16.). Što se tiče uzoraka prikupljenih na terenu, kod izolata oz_08.2 postoji značajno pozitivna korelacija između aktivnosti enzima GST, sadržaja ne-proteinskih tiola i mutacijske raznolikosti (π) populacija virusa CHV1. Zanimljivo, kod izolata ks_30.4 postoji pozitivna korelacija a kod izolata ks_46.4 negativna korelacija između genske raznolikosti (prema Nei's H) populacija virusa CHV1 i aktivnosti enzima SOD. Za izolat CR23 značajno pozitivne korelacije su nađene između razine lipidne peroksidacije, sadržaja ne-proteinskih tiola i mutacijske raznolikosti (π) populacija virusa CHV1, dok negativno koreliraju aktivnosti enzima lakaze i SOD. Za Euro7 jedina značajna pozitivna korelacija je nađena između razine lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima SOD dok za izolat EP713 uključen u vertikalni prijenos nije nađena nikakva korelacija između mjerenih parametara (Slika 16.).



Slika 16. Prikaz korelacija, izračunat Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ , između vrijednosti mjerenih parametara oksidacijskog stresa i raznolikosti virusnih populacija u izolatima uključenima u eksperiment vertikalnog prijenosa virusa CHV1, roditeljski izolat i sve spore: A) oz_08.2, B) ks_30.4, C) ks_46.4, D) CR23, E) Euro7 i F) EP713. Značajno pozitivne korelacije, $p < 0,05$, označene su plavom bojom, dok su značajno negativne korelacije, $p < 0,05$ označene crvenom bojom, veći krug znači veća korelacija.

Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ također su analizirani parametri oksidacijskog stresa i mjere raznolikosti virusnih populacija (Nei's H i π) nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1 (Slika 17.). Za izolat CR23 nađene su značajno pozitivne korelacije između razine lipidne peroksidacije i sadržaja ne-proteinskih tiola, između sadržaja ne-proteinskih tiola i aktivnosti enzima GST, negativne korelacije između aktivnosti enzima SOD i GST te između aktivnosti lakaze i mutacijske raznolikosti (π) populacija virusa CHV1. U slučaju izolata EP713, pozitivno

su korelirane razine lipidne peroksidacije, sadržaja ne-proteinskih tiola te aktivnosti enzima GST, te između mutacijske raznolikosti (μ) populacija virusa CHV1 i aktivnosti enzima SOD dok se negativno korelirale aktivnost lakaze i Nei'H populacija virusa CHV1. Na kraju, za izolat Euro7, značajne pozitivne korelacije utvrđene su između razine lipidne peroksidacije i sadržaja ne-proteinskih tiola te između sadržaja ne-proteinskih tiola i aktivnosti enzima GST (Slika 17.).



Slika 17. Prikaz korelacija, izračunat Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ , između aktivnosti mjerenih parametara oksidacijskog stresa (GST, SOD tioli, lipidna peroksidacija i lakaza) i raznolikosti virusnih populacija (π i Nei's H) u izolatima uključenima u eksperiment horizontalnog prijenosa virusa CHV1, „pooled“, donori i primatelji: A) CR23, B) EP713 i C) Euro7. Značajno pozitivne korelacije, $p < 0,05$, označene su plavom bojom, dok su značajno negativne korelacije, $p < 0,05$ označene crvenom bojom, veći krugovi označavaju veću korelaciju.

6. RASPRAVA

Kao obvezatni unutarstanični parazit, mikovirus CHV1 mora se uspješno prenositi sa zaraženih na nezaražene domaćine kako bi se održao u prirodi. Jedan od načina prijenosa mikovirusa u prirodi je vertikalni prijenos u spore gljiva (Buck, 1998). Virus CHV1 prenosi se isključivo u nespolne spore, tzv. konidije (Anagnostakis, 1988, Prospero i sur. 2006). U ovom istraživanju praćena je uspješnost prijenosa virusa u konidije za više različitih izolata virusa CHV1: ks_30.4, ks_46.4, oz_08.2, Euro7, CR23 te EP713. Rezultati su pokazali da je uspješnost prijenosa bila između 77 % i 100 % za različite virusne izolate što je u skladu s rezultatima objavljanim u radu Peever i sur. (2000), gdje je utvrđeno da je stopa uspješnog vertikalnog prijenosa virusa CHV1 veća od 95 % te da nema značajne razlike između različitih izolata virusa. Sličan postotak uspješnosti vertikalnog prijenosa primjećen je i za druge mikoviruse. Primjerice, Wang i sur. (2016) su zabilježili uspješnost od 100 % prijenosa u askospore virusa *Fusarium graminearum* hypovirus 1, dok je uspješnost vertikalnog prijenosa drugih dsRNA mikovirusa izoliranih iz istog domaćina (*Fusarium graminearum*) varirala između 30 % i 100 % (Chu i sur. 2004). Kod gljiva stapčarki (Basidiomycota) su također primjećeni visoki postoci uspješnosti prijenosa virusa u spore, npr. mikovirus vrste gljive *Lentinula edodes* (eng. *Lentinula edodes spherical virus*) je uspješno prenesen u 9 od 10 spora (Won i sur. 2013). CHV1 se prenosi samo u nespolne spore, tj. konidije, iako je zabilježeno da se domaćin, gljiva *C. parasitica*, može i spolno razmnožavati (Dutech i sur. 2010). Spolno razmnožavanje prema tome negativno utječe na uspješnost prijenosa virusa CHV1 u prirodi. Također, spolno razmnožavanje pridonosi nastanku novih EU-tipova gljive domaćina koji, pomoću sustava vegetativne (ne)kompatibilnosti, mogu smanjiti uspješnost horizontalnog prijenosa virusa unutar populacija gljiva.

U ovom pokusu horizontalnog prijenosa virusa CHV1, uspješnost je bila oko 100 % kad su miceliji donora virusa i primatelja imali isti vc tip (iste rezultati su vidljivi i u radovima Cortesi i Milgroom 1998; Cornejo i sur. 2019), dok je taj broj bio značajno niži kada su donorski micelij i micelij primatelja bili različitog vc tipa (0 % – 50 %). Ovaj efekt je pod utjecajem lokusa vegetative kompatibilnosti (*vic*), te je posebno izražen kad se micelij donora i primatelje razlikuju na *vic2* lokusu (Liu i Milgroom 1996). Cortesi i sur. (2001) su pokazali da je uspješnost prijenosa virusa CHV1 između nekompatibilnih micelija oko 21 % kad je heteroalelni lokus između donora i primatelja bio *vic2*, 76 % kad je heteroalelni lokus bio *vic3*, dok prijenos virusa CHV1 između donora i primatelja heteroalelnih na lokusu *vic4* ili u slučaju izogenih micelija (tj. onih koji su imali iste alele na svim *vic* lokusima) nije bila ograničena. Sličan trend je primijećen i u rezultatima ovog istraživanja gdje je heteroalelizam na *vic2* lokusu uzrokovao najjaču inhibiciju prijenosa, *vic3* srednju, a *vic4* slabu ili nikakvu inhibiciju. Međutim iako je trend sličan, srednje vrijednosti postotka uspješnosti prijenosa su ipak bile znatno niže u slučaju heteroalelizma za pojedine *vic* lokuse nego u prijašnjim istraživanjima. Kod ovog istraživanja, uspješnost prijenosa virusa u slučaju heteroalelizma na *vic2* lokusu iznosila je svega 5,8 % što je znatno niže od dobivene vrijednosti zabilježene u radu Cortesi i sur. (2001), gdje je uspješnost 21 % te niže od 10,2 % zabilježeno u radu Papazova-Anakieva i sur. (2008). Što se tiče heteroalelizma na *vic3*, ovim istraživanjem utvrđena je srednja vrijednost uspješnosti prijenosa od 17,3 %, što je ekstremno niska vrijednost uspoređujući s 76 % uspješnosti prijenosa virusa zabilježenih u radu Cortesi i sur. (2001). Ovim rezultatima potvrđen je već prije primijećen restriktivni učinak pojedinog *vic* lokusa na prijenos virusa (Cortesi i sur. 2001, Papazova-Anakieva i sur. 2008) no zbog vrlo niske uspješnosti prijenosa virusa zabilježene u ovom istraživanju, dolazimo do zaključka da sama razlika u pojedinim *vic* lokusima možda nije jedini faktor koji utječe na horizontalni prijenos virusa. Navedeni autori sugeriraju da postoji mogućnost da i drugi geni domaćina također mogu utjecati na uspješnost prijenosa, osim dominantnih *vic* gena.

Jedna od prvih kvantitativnih procjena učinka uskog grla na virusne populacije tijekom prijenosa virusa napravljena je za biljni Y-virus krumpira (eng. *Potato virus Y*) koji se prenosi kukcima točnije lisnim ušima. U istraživanju je korišten stohastični model kojim je procijenjeno da svaka jedinka lisne uši može prenijeti, u prosjeku, 0,5–3,2 virusnih genoma (Moury i sur. 2007). Slično je za virus mozaika rajčice procijenjeno da je broj virusnih genoma koji započinju infekciju između 1 i 4 (Sacristán i sur. 2011). Što se tiče virusa CHV1, prosječan broj varijanti koje inficiraju gljivu *C. parasitica* unutar raka kore kestena i započinju novu populaciju virusa unutar domaćina je $1,99 \pm 1,51$ (Leigh i sur. 2021). Većina virusnih varijanti prisutnih unutar pojedine lezije raka kore kestena je vrlo srodna što dovodi do zaključka da virusne varijante prolaze kroz značajan efekt uskog grla prilikom prijenosa nakon čega dolazi do proširenja virusne populacije nakon prijenosa. Slično tome, i u ovom istraživanju je primjećeno smanjenje virusne raznolikosti unutar domaćina nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1, tj. i mutacijska raznolikost (π) i broj virusnih varijanti su smanjeni nakon prelaska u spore u odnosu na roditeljsku populaciju, što je utvrđeno analizom roditeljskih i virusnih populacija proizašlih iz spora, primjerice, mutacijska raznolikost je smanjena u sporama proizašlim iz izolata EP713 te za većinu spora proizašlih iz izolata podtipa I (Euro7, ks_30.4, ks_46.4, i oz_08.2).

Nadalje, prenesene virusne varijante bile su vrlo slične među sobom odnosno, između spora, čak i sličnije nego kad ih se usporedi s roditeljskim populacijama iz kojih su proizašle. Tijekom horizontalnog prijenosa virusa mozaika krastavca (CMV) putem lisnih uši (Ali i sur. 2006) utvrđeno je da se populacijsko usko grlo događa tijekom faze inokulacije virusa iz kukca u novog biljnog domaćina, a ne tijekom faze stjecanja virusa od strane vektora. U ovom istraživanju, tijekom vertikalnog prijenosa virusnih populacija, utvrđeno je značajno smanjenje broja mutacija i ukupnog broja virusnih varijanti, koje je bilo manje izraženo, odnosno nije bilo statistički značajno, u horizontalnom prijenosu. Ovaj rezultat upućuje na činjenicu da se najizraženiji pad raznolikosti virusnih populacija događa tijekom prijenosa virusnih varijanti u spore, dok je tijekom horizontalnog prijenosa anastomozom hifa između dviju jedinki gljive taj učinak znatno slabije izražen.

U prirodi, virus CHV1 se uglavnom prvo rasprostranjuje vertikalno tj. virusni inokulum se sporama unosi u micelij gljive *C. parasitica* unutar raka kore kestena, nakon čega se infekcija virusom nastavlja horizontalno širiti unutar samog raka. Prijenos virusa unutar samoga raka može biti otežan zbog prisutnosti miješane infekcije izolatima gljive *C. parasitica* različitih tipova vegetativne kompatibilnosti. No čini se da je prijenos virusa u uvjetima u prirodi lakši nego što bi se moglo zaključiti iz laboratorijskih pokusa. Uzimajući u obzir i istraživanje Leigh i sur. (2021), koje pokazuje da nove virusne populacije u hipovirulentnim rakovima (tj. onima u kojima su nađeni izolati gljive *C. parasitica* prirodno zaraženi virusom CHV1) najčešće potječu od veoma malog broja virusnih genoma, a s obzirom na rezultate ovog istraživanja u kojem je utvrđeno da je populacijsko usko grlo karakterizirano smanjenjem raznolikosti virusnih populacija nakon vertikalnog prijenosa virusa, nameće se zaključak da rezultati ovog istraživanja podupiru pretpostavku da je širenje putem konidija dominantan mehanizam prirodnog rasprostranjenja virusa CHV1.

Kako bi istražili evoluciju virusa tijekom sistemskog širenja kroz biljku, Dunham i sur. (2014) sekvencirali su ukupno 24 lista biljke *Cucurbita pepo* zaražene virusom žutog mozaika tikvice (eng. *zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV). Pronađeno je ukupno 112 virusnih varijanti u mehanički inokuliranom listu te u ostalim listovima gdje se virus proširio duž iste stabljike. Međutim, nakon uspostave infekcije, zadržan je tek manji broj virusnih varijanti što sugerira da je sistemsko širenje virusa obilježeno uzastopnim populacijskim uskim grlima. Nije posve jasno je li ovakav obrazac rezultat djelovanja selekcije (otklanjanje štetnih mutacija), genskog otklona ili kombinacije oba procesa. Moguće objašnjenje jest da je većina genotipova nastalih tijekom infekcije bila štetna te je stoga brzo izgubljena. Ipak, autori su zaključili da su glavni pokretači genetske raznolikosti ZYMV-a neutralna evolucija i genski otklon, budući da je većina uočenih mutacija bila sinonimna.

Slični evolucijski procesi mogu se očekivati i u virusnim populacijama mikovirusa jer je rasprostranjivanje virusa kroz hife micelija slično onome kod biljaka. Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je raznolikost populacija virusa CHV1 unutar domaćina ponajprije oblikovana negativnom selekcijom jer je u većini virusnih populacija vrijednost π_S (raznolikost sinonimnih mutacija) bila veća od π_N (raznolikosti nesinonimnih mutacija). Virusne populacije kod kojih su zabilježene vrijednosti $\pi_N > \pi_S$ (mogućnost djelovanja pozitivne selekcije) bile su rjeđe (Nelson i

sur. 2015). Alternativno, takav obrazac može ukazivati i na akumulaciju mutacijskog opterećenja ili jednostavno odražavati činjenicu da selekcija virusnih varijanti nije imala dovoljno vremena djelovati. Naime, u našim je pokusima takav odnos najčešće zabilježen u virusnim populacijama poteklim iz spora. Te su populacije relativno mlade, jer se pretpostavlja da nastaju iz vrlo malog broja virusnih varijanti koje se zatim brzo umnožavaju, stvarajući novu virusnu populaciju unutar rastućeg micelija. Kod horizontalnog prijenosa virusa samo je jedna replika primatelja imala $\pi N > \pi S$ što upućuje na snažnu negativnu selekciju koja djeluje na virusne populacije nakon horizontalnog prijenosa. Pretpostavlja se da takva selekcija održava virus optimalno prilagođenim domaćinu tako što sprječava nakupljanje štetnih mutacija (Simmonds i sur. 2019). Zanimljivo je napomenuti da iako negativna selekcija uklanja štetne mutacije, među analiziranim populacijama virusa CHV1 su nađene tri velike delecije dijelova virusnih genoma čija se učestalost u domaćinu kretala u rasponu od 13 do 80 % u izolatima Euro7, EP713 te ks_46.4. Dvije od tri delecije su utvrđene i u roditeljskoj i u donorskoj virusnoj populaciji, kao i u populacijama proizašlim iz spora te analiziranim populacijama primatelja virusa. Treća velika delecija je bila prisutna samo u jednoj spori izolata ks_46.4: K2S1.

Tijekom replikacije virusa ponekad u njihovim populacijama mogu nastati značajno promijenjene varijante, što im pomaže u prilagodbi na razne okolišne uvjete. Defektne virusne RNA molekule već su nađene u nekim laboratorijskim izolatima CHV1 virusa, te se smatra da se pojavljuju tek nakon relaksacije selekcijskog pritiska i opetovanih efekata populacijskog uskog grla zbog produljenog čuvanja, opetovanog presađivanja domaćinske gljive iz manje mase zaraženog micelija i dugoročnog uzgajanja kultura gljiva (Shapira i sur. 1991.) kao što je slučaj s prototipskim izolatima korištenim i u ovom istraživanju: Euro7 i EP713.

Molekularna karakterizacija RNA molekula virusa CHV1 utvrdila je nakupljanje značajne razine defektnih interferirajućih RNA (eng. *defective interfering* – DI) (Tartaglia i sur. 1986, Shapira i sur. 1991). DI RNA molekule su rezultat rekombinacije i/ili delecije dijelova virusnog genoma. Njihova prisutnost smanjuje nakupljanje virusne genomske RNA što dovodi do ublažavanja simptoma zaraze virusom (Simon i sur. 2004) i perzistentnih infekcija (Huang i Baltimore 1970). Nađena delecija u uzorku ks_46.4, prikupljenom terenskim istraživanjem, bi mogla, u skladu s prijašnjim istraživanjima, uzrokovati smanjenje virulentnosti virusa CHV1, i time utjecati na njegov lakši prijenos i održavanje u domaćinu.

U vertikalnom prijenosu virusa primjećeno je da je manje virusnih varijanti preneseno u spore proizašle iz uzoraka prikupljenih na terenskom istraživanju (12 – 20 %) u usporedbi s prijenosom virusnih varijanti u spore prototipskih izolata (24 - 33 %). Moguće objašnjenje je manja količina virusa u prirodnim populacijama u usporedbi s dugotrajno pohranjenim prototipskim izolatima u kojima je moguća već spomenuta relaksacija selekcijskog pritiska. Nadalje, u horizontalnom prijenosu je utvrđena razlika u postotku virusnih varijanti koje dijele donor i primatelj ovisno o razlikama u *vic* lokusu. Za sve uzorke, kad je virus prenesen u izogene primatelje ili kad je razlika bila u *vic4* lokusu, postotak varijanti koje su prisutne u donoru i primatelju se kretao između 30 – 53 %. Kod heteroalelizma na *vic2* ili *vic3* lokusu, taj postotak pada, redom, za EP713: 13 i 20 %, za Euro7: 23 i 17 % te za CR23: 29 i 19 % što dodatno potvrđuje restriksijski učinak ovih lokusa na prijenos virusa (Cortesi i sur. 2001).

Prijenos virusa nije uvijek praćen uskim grlom, npr. u slučaju virusa denga, Aaskov i sur. (2006) su pokazali da se i defektni virusni genotipovi prenose između ljudi i komaraca. Ti defektni virusi su nađeni na različitim mjestima (udaljeni kilometrima) te tijekom dužeg perioda što znači da se učestalo prenose. Predloženo objašnjenje je da se takvi genotipovi prenose zajedno s funkcionalnim genotipovima i tako ponekad mogu selektivno doprinositi fitnessu virusne populacije, pošto mogu predstavljati izvor genotipova prilagođenih specifičnom domaćinu (čovjeku ili komarcu) te tako mogu izbjeći odgovor imunosnog sustava.

S obzirom da je u ovom istraživanju primjećen efekt uskog grla tijekom vertikalnog prijenosa a nije tijekom horizontalnog, može se zaključiti da je broj virusnih varijanti koje se prenose vertikalno ograničen tijekom stvaranja spora. S druge strane, u procesu spajanja hifa miceliji donora i primatelja potencijalno su u dužem kontaktu, što omogućava prijenos više varijanti, osobito u slučajevima stvaranja stabilne anastomoze hifa. Zanimljivo, iako je zabilježeno smanjivanje mutacijske raznolikosti i broja virusnih varijanti u vertikalnom prijenosu virusa, virusne populacije u sporama većinom nisu bile značajno različite od onih u njihovim roditeljskim populacijama, što upućuje na činjenicu da je ubrzo nakon prijenosa ponovno, došlo do povećanja raznolikosti.

U ovom istraživanju primjećeno je par dominantnih virusnih varijanti koji su se opetovano pojavljivale u većini uzoraka. Ove varijante su najčešće i bile prenošene, dok su ostale varijante

bile vrlo rijetke, odnosno pojavljivale su se u manjem broju uzoraka i s manjom učestalošću. Slično tome, u istraživanju virusa SARS-CoV-2, Lythgoe i sur. (2021) identificirali su uglavnom samo jednu ili dvije virusne varijante u većini uzoraka, dok je kod svega nekolicine uzoraka bilo prisutno i više različitih varijanti. U slučaju kada je nađen veći broj varijanti, nakon prijenosa virusa, uglavnom se prenosi najučestalija varijanta, dok se rjeđe virusne varijante izgube tijekom prijenosa te nisu prisutne u novom domaćinu. U rijetkim slučajevima neka od rjeđih virusnih varijanti započne infekciju te se počne širiti dalje kroz populaciju. Suprotno tome, kod virusa gripe tipa A, uočena je velika genska raznolikost te je u istraživanju Poon i sur. (2016) ista varijanta nađena u nekoliko članova zajednice. Dok je učestalost varijanti bila različita među pojedincima, obrasci genske varijacije su bili sličniji unutar nego između kućanstava. Što se tiče ovog istraživanja, primjećeno je par dominantnih virusnih varijanti koji su se opetovano pojavljivale u većini uzoraka. Ove varijante su najčešće i bile prenošene, dok su ostale varijante bile vrlo rijetke, odnosno pojavljuju se u manjem broju uzoraka i s manjom učestalošću.

Dosadašnja istraživanja oksidacijskog stresa uzrokovanog infekcijom virusom CHV1 gljive *C. parasitica* koristeći različite virusne izolate (primjerice različitih podtipova CHV1) su otkrila da infekcija virusom CHV1 ograničava vegetativni rast gljive te dovodi do povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima poput GST i SOD u većini proučavanih kombinacija genotipova gljive i virusa. Također, važno je istaknuti da jačina tih učinaka ne ovisi samo o podtipu virusa već i o konkretnom izolatu virusa, genotipu gljive, te kombinaciji ta dva faktora (Nuskern i sur. 2017). Prema istraživanju provedenom na uzorcima prikupljenim na istom terenskom istraživanju i na istim prototipskim izolatima – Euro7, EP713 i CR23 kao i u ovom radu, primjećena je razlika između njih u fiziološkom odgovoru gljive na oksidacijski stres (Popović i sur. 2023). U tom istraživanju, prototipski izolati, dugotrajno pohranjeni na -80 °C, imali su nižu aktivnost enzima SOD i GST koji ukazuju na smanjen kapacitet staničnog antioksidacijskog enzimatskog sustava (Almeida i sur. 2020) te viši udio MDA tj. kod njih je primjećena viša razina lipidne peroksidacije potaknuta reaktivnim oblicima kisika (Birben i sur. 2012) kao i ukupnih ne-proteinskih tiola što sugerira da su navedeni prototipski izolati gljive *C. parasitica* zaraženi raznim podtipovima virusa CHV1 izloženi većem oksidacijskom stresu od gljiva prikupljenih u prirodi. Ovi rezultati pokazuju da, iako infekcija virusom nedvojbeno dovodi do povećanja razine oksidacijskog stresa, oksidacijski stres nije posljedica samo virusne infekcije, pošto bi u tome slučaju razina oksidacijskog stresa i kod prototipskih izolata, kao i kod onih koji su prikupljeni na

terenu bila podjednaka. Pošto su izolati gljive *C. parasitica* prikupljeni terenskim istraživanjima recentno i prirodno inficirani virusom CHV1, za razliku od prototipskih izolata koji su zaraženi i uzgajani u laboratorijskim uvjetima više desetljeća, jedno od mogućih objašnjenja je starenje i propadanje prototipskih izolata zbog njihovog dugotrajnog korištenja i uzgoja u laboratorijskim uvjetima, kao i opetovanih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja prilikom uobičajenih laboratorijskih procedura, što je primjećeno i kod drugih gljiva kao npr. *Saccharomyces cerevisiae* (Jakubowski i sur. 2000) te *Aspergillus nidulans* (Li i sur. 2014). Iako su primjećene određene razlike između razine oksidacijskog stresa populacija Ozlja i Kašta, čini se da raznolikost virusnih populacija u tim izolatima nije imala učinak na te razlike već su one vjerojatno uzrokovane nekim drugim čimbenicima kao što su nakupljanje virusnih genoma u citoplazmi gljive, genotip gljive ili čak kestena s kojeg su navedeni izolati sakupljeni (Dutech i sur. 2010; Heller i Tudzynski 2011; Ježić i sur. 2014; Montibus i sur. 2015; Ortiz-Urquiza i Keyhani 2015; Poljak i sur. 2017; Ježić i sur. 2021).

U ovom istraživanju uspoređivani su isti parametri oksidacijskog stresa uzrokovanog virusom CHV1, no za razliku od prethodnog istraživanja (Popović i sur. 2023), ovdje je naglasak bio na utjecaju vertikalnog i horizontalnog prijenosa (i s tim povezanim promjenama strukture i raznolikosti populacija virusa CHV1) na parametre oksidacijskog stresa gljive domaćina. Što se tiče izolata prikupljenih na terenu, analiziranih nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1 u nespodne spore (konidije), utvrđena je značajna razlika samo u sadržaju ne-proteinskih tiola između roditeljskog izolata te micelija njegovih spora za jedan izolat (ks_30.4). Kod prototipskih izolata uočena je značajna razlika u svim parametrima oksidacijskog stresa za Euro7, u većini za EP713 te u jednom za CR23 između roditeljskog micelija i micelija spora. Ovi rezultati sugeriraju da postoji značajnija promjena biokemijskih parametara oksidacijskog stresa u dugotrajno pohranjenim prototipskim izolatima nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1, što nije utvrđeno za terenske izolate. Ovo opažanje je u skladu s prethodnim istraživanjem (Popović i sur. 2023) te sugerira da su prototipski izolati osjetljiviji na oksidacijski stres i snažnije reagiraju na efekt vertikalnog prijenosa virusa CHV1.

Biokemijski odgovor parametara oksidacijskog stresa nakon vertikalnog prijenosa bio je specifičan za pojedini izolat i nije pokazivao zajednički trend među analiziranim izolatima. Kod izolata Euro7 svi mjereni biokemijski parametri bili su veći u roditeljskom izolatima što ukazuje da je micelij gljive u višem oksidacijskom stresu nego micelij njegovih spora, odnosno sljedeće

generacije u koje je vertikalno prenesen virus. Za izolat EP713 primjećeno je povećanje aktivnosti enzima GST te smanjenje razine lipidne peroksidacije i ukupnih tiola u miceliju spora u odnosu na roditeljski micelij što bi pak moglo indicirati veću razinu stresa nakon prijenosa virusa u spore. Za enzim GST se smatra da može štititi patogene od obrambenih spojeva domaćina (Calmes i sur. 2015) odnosno od štetnih tvari iz okoliša (Wangsanut i Pongpom, 2022) jer kataliziraju konjugaciju GSH s različitim reaktivnim i elektrofilnim spojevima, čime pridonose njihovoj detoksifikaciji. U svom istraživanju Allen i sur. (2003) su iznijeli pretpostavku da je indukcija transkripcije gena za GST pod utjecajem virusa CHV1, te ne predstavlja obrambeni mehanizam gljive, već mehanizam kojim virus oslabljuje gljivu domaćina i olakšava svoje umnažanje. Za izolat CR23, aktivnost enzima SOD se povećala nakon prijenosa što također ukazuje na veću razinu stresa u miceliju spora. SOD je antioksidacijski enzim čija je aktivnost povećana kad se stanica nađe u uvjetima oksidacijskog stresa (Bai i sur. 2003; Angelova i sur. 2005; Nuskern i sur. 2017). Njegova uloga je smanjivanje koncentracije superoksidnih iona pretvarajući ih u manje štetne molekule kao što su vodikov peroksid i kisik.

Zanimljivo, između analiziranih biokemijskih parametara u istraživanim uzorcima uglavnom ne postoji jasno vidljiva korelacija, bilo negativna ili pozitivna te se čini da i raznolikost virusnih populacija također nema konzistentan efekt na razinu oksidacijskog stresa. Ovakvi rezultati potvrđuju dosadašnja istraživanja (Nuskern i sur. 2017; Popović i sur. 2023) te kompleksan odnos genotipa gljive s određenim virusom zbog kojeg uglavnom nema jedinstvenog fiziološkog odgovora gljive *C. parasitica* na oksidacijski stres uzrokovan virusom CHV1.

Kod horizontalnog prijenosa virusa CHV1, utvrđene su značajne razlike svih analiziranih biokemijskih parametara za prototipske izolate CR23 i EP713 ili većine za izolat Euro7. Razina oksidacijskog stresa uglavnom je bila veća nakon prijenosa virusa tj. u miceliju primatelja. Jedan od proučavanih enzima bila je i lakaza čija je bitna uloga razgradnja lignina (komponente biljne stanične stijenke) čime je olakšan rast micelija gljive kroz tkivo domaćina (Rigling i sur. 1989; Choi i sur. 1992). Lakaze također pomažu u detoksikaciji ROS-a i toksičnih fenolnih skupina proizvedenih u uvjetima stresa, time što kataliziraju redukciju kisika do vode uz paralelnu oksidaciju supstrata, najčešće raznih fenolnih spojeva. Rigling i Van Alfen (1991) te Choi i sur. (1992) pokazali su da infekcija virusom CHV1 smanjuje akumulaciju mRNA gena za izvanstaničnu lakazu što dovodi do prethodno opažene smanjene aktivnosti ovog enzima u

hipovirulentnim izolatima gljive (Rigling i sur. 1989). Suprotno tome, Nuskern i sur. (2017) su za većinu analiziranih uzoraka gljive *C. parasitica* zaražene virusom CHV1 utvrdili povećanu aktivnost ovog enzima. To znači da utjecaj infekcije virusom CHV1 na aktivnost lakaza gljive *C. parasitica* ovisi o pojedinačnom virusnom izolatu i genotipu gljive, odnosno o njihovoj kombinaciji. U ovom istraživanju, slično kao i kod Nuskern i sur. (2017), je utvrđen i porast i smanjenje aktivnosti lakaze nakon prijenosa virusa CHV1, no samo u manjem broju analiziranih izolata ta promjena je bila značajna.

Kod horizontalnog prijenosa je također analiziran potencijalni utjecaj heteroalelizma na određenom *vic* lokusu na pokazatelje oksidacijskog stresa. U svim izolatima, nakon prijenosa virusa u micelij heteroalelan na lokusu *vic2*, dolazi do povećanja razine oksidacijskog stresa što se vidi prema značajnom povećanju aktivnosti enzima SOD te smanjenju sadržaja ukupnih ne-proteinskih tiola u miceliju primatelja. Tioli, uglavnom GSH, imaju važnu ulogu u održavanju stanične redoks ravnoteže (Grant i sur. 2001) te njihovo smanjenje može ukazivati da stanica iscrpljuje svoje antioksidacijske obrambene mehanizme, ponajprije GSH, tijekom detoksikacije reaktivnih oblika kisika. Za ostale prijenose (heteroalelizam na *vic3*, *vic4* te prijenos u izogeni izolat gljive *C. parasitica*) primjećeni su pokazatelji više razine oksidacijskog stresa u primateljskom miceliju no rezultati nisu bili jednoznačni i konzistentni kao za heteroalelizam na lokusu *vic2*. Kada se među sobom usporede miceliji primatelja, najviša razina aktivnosti SOD enzima nakon prijenosa virusa utvrđena je u miceliju heteroalelnom na *vic2* lokusu u prijenosima koji su uljučivali EP713 i Euro7 u odnosu na druge prijenose. Razina aktivnosti enzima SOD je, kod oba navedena izolata, bila znatno drugačija od aktivnosti tog enzima u miceliju primatelja izogenih izolata, što dodatno potvrđuje restriktivni učinak heteroalelizma na *vic2* lokusu na prijenos virusa, kao i na promjenjenu fiziologiju gljive primatelja. U pokusu prijenosa virusa kod istih izolata (EP713 i Euro7) izmjeren je najviši sadržaj ne-proteinskih tiola u izogenim primateljima koji je značajno različit od njihovog sadržaja u miceliju primatelja heteroalelnom na *vic2*. Ovi rezultati idu u prilog hipotezi da heteroalelizam na *vic2* lokusu rezultira najvećom razinom oksidacijskog stresa.

U svim analiziranim prototipskim izolatima uključenim u horizontalni prijenos, nađena je značajna pozitivna korelacija između aktivnosti enzima GST te sadržaja tiola, kao i između sadržaja tiola i razine lipidne peroksidacije. Pozitivna korelacija između sadržaja tiola i aktivnosti enzima GST upućuje na aktivaciju antioksidacijskog obrambenog mehanizma, odnosno pokušaj

inficiranog micelija pod oksidacijskim stresom da obnovi svoj antioksidacijski kapacitet i ponovno uspostavi redoks ravnotežu. Odnosno, GST enzim koristi GSH kao supstrat u reakcijama detoksikacije elektrofilnih spojeva pa povećana dostupnost tiolnih spojeva, posebice GSH, može omogućiti učinkovitije reakcije detoksikacije posredovane GST ezimom. Pozitivna korelacija između sadržaja tiola i lipidne peroksidacije također može ukazivati da je zbog pojačanog oksidacijskog oštećenja membranskih sustava, uslijed i nakon horizontalnog prijenosa virusa, došlo do aktivacije obrane micelija zaraženog virusom CHV1 (Grant i sur. 2001; Sies 1997). Virusna raznolikost je u nekim izolatima korelirala s određenim biokemijskim parametrima oksidacijskog stresa, ponekad pozitivno, a ponekad negativno. Unatoč tome nije utvrđen nikakav jasan obrazac na temelju kojega bi se dalo zaključiti da raznolikost virusnih varijanti virusa CHV1 ima ikakav konkretan ili konzistentan utjecaj na razinu oksidacijskog stresa uzrokovanog prijenosom virusa.

7. ZAKLJUČCI

1. Prisutnost virusa CHV1 u terenskim izolatima iz Ozlja iznosila je 47,2 % a iz Kašta 40,7 %. U Ozlju je pronađeno devet različitih EU-tipova gljive *C. parasitica* dok ih je u Kaštu pronađeno 11.
2. Uspješnost vertikalnog prijenosa virusa CHV1 iznosila je 77-100 %, što je i očekivano. Uspješnost horizontalnog prijenosa između dva micelija heteroalelna na *vic4* te između izogenih izolata bila je skoro 100 %, no neočekivano manja za micelije heteroalelne na lokusima *vic2* (oko 6 %) i *vic3* (12 - 25 %).
3. Kod vertikalnog prijenosa virusa CHV1 bio je vidljiv značajan efekt uskog grla na virusne populacije, dok za horizontalni prijenos taj efekt nije bio značajan. Ovaj rezultat ukazuje da je broj virusnih varijanti koje se prenose ograničen tijekom stvaranja spora, dok je prilikom stvaranja anastomoze hifa, gdje je omogućen dulji period kontakta između dva micelija, moguć prijenos većeg broja virusnih varijanti.
4. Raznolikost populacija virusa CHV1 unutar domaćina je bila poglavito oblikovana negativnom selekcijom ($\pi_S > \pi_N$).
5. Populacije virusa CHV1 su se uglavnom sastojale od manjeg broja dominantnih varijanti koje se najčešće prenose dok su ostale varijante većinom rijetke.
6. Biokemijski parametri stresa su u nekim slučajevima ukazivali na višu razinu oksidacijskog stresa nakon prijenosa virusa CHV1.
7. Nije nađena jasna poveznica između analiziranih biokemijskih parametara oksidacijskog stresa i raznolikosti populacija virusa CHV1.

8. LITERATURA

Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H. M., Lowry, K., i Holmes, E. C. (2006). Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and mosquitoes. *Science*, 311, 236–238.

Ahmad, F., i Barić, S. (2022). Vegetative compatibility diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in European chestnut stands. *Forest Pathology*, 52, e12775.

Akaike, T. (2001). Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Reviews in Medical Virology*, 11, 87–101

Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y., i Maeda, H. (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *The FASEB Journal*, 14, 1447–1454.

Akilli, S., Katircioğlu, Y. Z., Maden, S., i Rigling, D. (2013). Characterization of *Cryphonectria hypovirus 1* in Turkey. *Forest Pathology*, 43, 105–113.

Ali, A., Li, H., Schneider, W. L., Sherman, D. J., Gray, S., Smith, D., i Roossinck, M. J. (2006). Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 80, 8345–8350.

Ali, A., i Roossinck, M. J. (2010). Genetic bottlenecks during systemic movement of Cucumber mosaic virus vary in different host plants. *Virology*, 404, 279–283.

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

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., i Rigling, D. (1999). Genetic variation of *Cryphonectria hypovirus 1* in European populations of *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 28, 91–99.

Allen, T. D., Dawe, A. L., i Nuss, D. L. (2003). Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulence-attenuating hypoviruses. *Eukaryotic Cell*, 2, 1253–1265.

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

Almeida, L. T., Ferraz, A. C., da Silva Caetano, C. C., da Silva Menegatto, M. B., dos Santos Pereira Andrade, A. C., Lima, R. L. S., Camini, F. C., Pereira, S. H., da Silva Pereira, K. Y., de

- Mello Silva, B., Perucci, L. O., Talvani, A., de Magalhães, J. C., de Brito Magalhães, C. L. (2020). Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities *in vitro* and *in vivo*. *Virus Research*, 286, 198084.
- Anagnostakis, S. L. (1987). Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79, 23–37.
- Anagnostakis, S. L. (1988). *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology*, 6, 123–136.
- Anagnostakis, S. L. (1992). Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 999–1003.
- Anderson, P. J., i Anderson, H. W. (1912). *Endothia parasitica* (Murrill). *Phytopathology*, 2, 261–262.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., i Slokoska, L. S. (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*, 109, 150–158.
- Anić, M. (1942). *O rasprostranjenosti evropskog pitomog kestena s osobitim obzirom na Nezavisnu Državu Hrvatsku i susjedne zemlje*. Zagreb: Tiskara C. Albrecht (P. Acinger).
- Azevedo, M. M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rodriguez, F., i Cassio, F. (2007). Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Science of the Total Environment*, 377, 233–243.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Séguin, C., Tuffnell, P. S., i Barrell, B. G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. *Nature*, 310, 207–211.
- Bai, Z., Harvey, L. M., i McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 267–302.
- Barr, M. E. (1978). The Diaporthales of North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. *Mycologia Memoirs*, 7, 1–232.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., i Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48.
- Beauchamp, C., i Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.
- Bezerra, M. F., Machado, L. C., Carvalho, V. C. V. D., Docena, C., Brandão-Filho, S. P., Ayres, C. F. J., Paiva, M. H. S., i Wallau, G. L. (2021). A Sanger-based approach for scaling up

screening of SARS-CoV-2 variants of interest and concern. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104910.

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

Biraghi, A. (1953). Possible active resistance to *Endothia parasitica* in *Castanea sativa*. In *Proceedings of the 11th IUFRO Congress* (pp. 643–645).

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., i Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9–19.

Black, B., Kussat, T., i Kronstad, J. W. (2025). Balancing act: Thiol-based redox regulation drives fungal pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 33, 1317–1330.

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

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

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

Breuillin, F., Dutech, C., i Robin, C. (2006). Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in western Europe. *Molecular Ecology*, 15, 3421–3433.

Bruijns, B., Tiggelaar, R., i Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39, 2642–2654.

Bryner, S. F., i Rigling, D. (2012a). Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica* populations at the disease expansion front. *Forest Pathology*, 42, 13–20.

Bryner, S. F., Rigling, D., i 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, 3227–3241.

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

Bruijns, B., Tiggelaar, R., i Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39, 2642–2654.

Buck, K. W. (1998). Molecular variability of viruses of fungi. In A. D. M. Rayner, C. M. Brasier, i D. Moore (ur.), *Evolutionary biology of fungal and fungal-like viruses* (pp. 53–72). Cambridge University Press.

Bull, R. A., Luciani, F., McElroy, K., Gaudieri, S., Pham, S. T., Chopra, A., ... i Lloyd, A. R. (2011). Sequential bottlenecks drive viral evolution in early acute hepatitis C virus infection. *PLoS pathogens*, 7, e1002243.

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

Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., i Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 1–7.

Carneiro, M. O., Russ, C., Ross, M. G., Gabriel, S. B., Nusbaum, C., i DePristo, M. A. (2012). Pacific Biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics*, 13, 1–7.

Chaisson, M. J. P., Sanders, A. D., Zhao, X., Malhotra, A., Porubsky, D., Rausch, T., Gardner, E. J., Rodriguez, O. L., Guo, L., Collins, R. L., Fan, X., Wen, J., Handsaker, R. E., Fairley, S., Kronenberg, Z. N., Kong, X., Hormozdiari, F., Lee, D., Wenger, A. M., ... i Lee, C. (2019). Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nature Communications*, 10, 1784.

Chen, B., Chen, C. H., Bowman, K. D., i Nuss, D. L. (1996). Phenotypic stability of a hypovirus-infected strain of *Cryphonectria parasitica* is mediated by the viral double-stranded RNA genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 222–229.

Chen, B., Gao, S., Choi, G. H., i Nuss, D. L. (1996). Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated cAMP levels by a virulence-attenuating hypovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 7996–8000.

Chen, L., Cai, Y., Zhou, G., Shi, X., Su, J., Chen, G., i Lin, K. (2014). Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens. *PLOS ONE*, 9, e88886.

Chiba, S., Suzuki, N., Pearson, M. N., i ICTV Report Consortium. (2023). Family Hypoviridae. In M. J. Adams, E. J. Lefkowitz, i A. M. Q. King (ur.), *ICTV Virus Taxonomy Profile. Journal of General Virology*, 104, 001848.

Choi, G. H., Larson, T. G., i Nuss, D. L. (1992). Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in a isogenic hypovirulent strain.. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 119–128.

- Choi, G. H., Nuss, D. L., i Nuss, D. L. (1995). Hypovirulence-associated traits induced by viral dsRNA in *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 85, 1173–1178.
- Chu, Y. M., Lim, W. S., Yea, S. J., Cho, J. D., Lee, Y. W., i Kim, K. H. (2004). Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes*, 28, 135–143.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., i Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6, 80–92.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., i Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, i A. Mauri (ur.), *European Atlas of Forest Tree Species* Publications Office of the European Union.
- Cornejo, C., Šever, B., Kupper, Q., Prospero, S., i Rigling, D. (2019). A multiplexed genotyping assay to determine vegetative incompatibility and mating type in *Cryphonectria parasitica*. *European Journal of Plant Pathology*, 155, 81–91.
- 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.
- Cortesi, P., i Milgroom, M. G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2988–2994.
- Craven, M. G., Pawlyk, D. M., Choi, G. H., i Nuss, D. L. (1993). Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of Virology*, 67, 6513–6521.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., i Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32, 767–775.
- da Silva Caetano, A. C., da Silva, A. S., i de Almeida, E. A. (2019). Non-enzymatic antioxidant defense systems in biological organisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 16824–16836.
- Davies, K. J. A. (1995). Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1–31.
- Dawe, A. L., i Nuss, D. L. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: Exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics*, 35, 1–29.

Dawe, A. L., i Nuss, D. L. (2013). Hypovirus molecular biology. From Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission. In S. A. Ghabrial (ur.), *Advances in Virus Research* (Vol. 86, pp. 109–147). Academic Press.

Deng, F., Allen, T. D., Hillman, B. I., i Nuss, D. L. (2007). Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryotic Cell*, 6, 1286–1298.

Deribe, Y. L., Pawson, T., i Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 666–672.

Diller, J. D. (1965). A progress report on attempts to bring back the chestnut tree in the eastern United States, 1954–1964. *Journal of Forestry*, 63, 186–188.

Domingo, E., i Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, 51, 151–178.

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.

Dutech, C., Fabreguettes, O., Capdevielle, X., i Robin, C. (2010). Multiple introductions of divergent genetic lineages in an invasive fungal pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in France. *Heredity*, 105, 220–228.

Dunham, J. P., Simmons, H. E., Holmes, E. C., i Stephenson, A. G. (2014). Analysis of viral (zucchini yellow mosaic virus) genetic diversity during systemic movement through a Cucurbita pepo vine. *Virus research*, 191, 172–179.

Eliseev, A., Gibson, K. M., Avdeyev, P., Novik, D., Bendall, M. L., Pérez-Losada, M., Alexeev, N. i Crandall, K. A. (2020). Evaluation of haplotype callers for next-generation sequencing of viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 82, 104277.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.

Farmer, E. E., i Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 429–450.

Feau, N., Dutech, C., Brusini, J., i Robin, C. (2014). Multiple introductions and recombination in populations of *Cryphonectria hypovirus 1* in Europe. *Molecular Ecology*, 23, 2618–2633.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., ... i Venter, J. C.

(1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496–512.

Frank, S. A. (2001). Multiplicity of infection and the evolution of hybrid incompatibility in segmented viruses. *Heredity*, 87, 522–529.

Freitas, T. R., Santos, J. A., Silva, A. P., i Fraga, H. (2021). Influence of climate change on chestnut trees. *Plants*, 10, 1463.

Fulbright, D. W., Jarosz, A. M., i Double, M. L. (2011). Natural recovery of American chestnut in Michigan associated with hypovirulence of *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 312–320.

Gao, S., i Nuss, D. L. (1996). Disruption of a G protein α subunit gene reduces virulence and alters growth and development in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *EMBO Journal*, 15, 5677–5686.

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

García-Arenal, F., i Fraile, A. (2013). Trade-offs in host range evolution of plant viruses. *Plant Pathology*, 62, 2–9.

García-Pedrajas, M. D., Nadal, M., i Gutiérrez, S. (2019). Mycoviruses in biological control of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 237–258.

Garrison, E., i Marth, G. (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv preprint arXiv:1207.3907*.

Ghabrial, S. A., i Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 353–384.

Gijsbers, E. F., Schuitemaker, H., i Kootstra, N. A. (2012). HIV-1 transmission and viral adaptation to the host. *Future Virology*, 7, 63–71.

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

Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39, 533–541.

Graves, A. H. (1950). Relative susceptibility of chestnut species and hybrids to chestnut blight. *Phytopathology*, 40, 112–116.

Grete, J. (1965). Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 51, 1033–1037.

Griffin, G. J., i Elkins, J. R. (1986). Chestnut blight in the United States: ecological and genetic aspects of disease resistance. *Plant Disease*, 70, 593–596.

Gutiérrez, S., Michalakakis, Y., i Blanc, S. (2012). Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Current opinion in virology*, 2, 546–555.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., i Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.

Hamim, I., Sekine, K. T., i Komatsu, K. (2022). How do emerging long-read sequencing technologies function in transforming the plant pathology research landscape? *Plant Molecular Biology*, 110, 469–484.

Heath, R. L., i Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198.

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

Heller, J., i Tudzynski, P. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 369–390.

Herman, J. (1971). *Šumarska dendrologija*. Zagreb: Stanbiro.

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

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

Holmes, E. C. (2009). *The evolution and emergence of RNA viruses*. Oxford University Press.

Hon, T., Mars, K., Young, G., Tsai, Y.-C., i Karalius, J. W. (2020). Highly accurate long-read HiFi sequencing data for genome assembly. *Nature Methods*, 17, 123–132.

Huang, A. S., i Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature*, 226, 325–327.

Jakubowski, W., Bilinski, T., i Bartosz, G. (2000). Oxidative stress during aging of stationary cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 659–664.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *14*, 1511–1527.

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

Ježić, M., Mlinarec, J., Vuković, R., Katanić, Z., Krstin, L., Nuskern, L., Poljak, I., Idžojtić, 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, L., Katanić, Z., Maleničić, E., Poljak, I., Idžojtić, M., i Rigling, D. (2021). Temporal and spatial genetic population structure of *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus across an invasive range of chestnut blight in Europe. *Phytopathology*, *111*, 1327–1337.

Jridi, C., Martin, J. F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., i Blanc, S. (2006). Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *Journal of Virology*, *80*, 2349-2357.

Kang, H. S., Choi, J. W., Park, S. M., Cha, B., Yang, M. S., i Kim, D. H. (2000). Ordered differential display from *Cryphonectria parasitica*. *Plant Pathology Journal*, *16*, 142–146.

Kim, D. H., Choi J.W., Park S.M., Cha B.J., Yang M.S., Kim D.H. (2002) Characterization of a fungal protein kinase from *Cryphonectria parasitica* and its transcriptional upregulation by hypovirus. *Molecular Microbiology*, *45*, 933–941.

Kim, M. J., Park, J.A., Kim, D.H. (2012). Comparative proteomic analysis of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, under tannic-acid-inducing and hypovirus-regulating conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, *58*, 863–871.

Kim, D. H., Rigling, D., Zhang, L., i van Alfen, N. K. (1995). A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of *Lac1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *8*, 259–266.

Kingan, S. B., Heaton, H., Cudini, J., Lambert, C. C., Baybayan, P., Galvin, B. D., Durbin, R., Korlach, J., i Lawniczak, M. K. (2019). A high-quality de novo genome assembly from a single mosquito using PacBio sequencing. *Genes*, *10*, 62.

- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., i Stamatakis, A. (2019). RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35, 4453-4455.
- Krstin, L., Katanić, Z., Repar, J., Ježić, M., Kobaš, A., i Ćurković-Perica, M. (2020). Genetic diversity of *Cryphonectria hypovirus 1*, a biocontrol agent of chestnut blight, in Croatia and Slovenia. *Microbial Ecology*, 79, 148–163.
- 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.
- Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M., i Ćurković Perica, M. (2008). Chestnut blight fungus in Croatia: Diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology*, 57, 1086–1096.
- Kumar, V., Vollbrecht, T., Chernyshev, M., Mohan, S., Hanst, B., Bavafa, N., Lorenzo, A., Kumar, N., Ketteringham, R., Eren, K., Golden, M., Oliveira, M. F., i Murrell, B. (2019). Long-read amplicon denoising. *Nucleic acids research*, 47, e104-e104.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., ... i Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860–921.
- Lang, P., Dane, F., Kubisiak, T. L., i Huang, H. (2007). Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 49–59.
- Leigh, D. M., Peranić, K., Prospero, S., Cornejo, C., Ćurković-Perica, M., Kupper, Q., Nuskern, L., Rigling, D., i Ježić, M. (2021). Long-read sequencing reveals the evolutionary drivers of intra-host diversity across natural RNA mycovirus infections. *Virus evolution*, 7, veab101.
- Letunic, I., i Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic acids research*, 52, W78-W82.
- Li, H. (2016). Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics*, 32, 2103-2110.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., i Durbin, R. i 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *bioinformatics*, 25, 2078-2079.
- Lin, H., Lan, X., Liao, H., Parsley, T. B., Nuss, D. L., i Chen, B. (2007). Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV1-EP721. *Journal of virology*, 81, 1813-1820.

- Li, H., i Roossinck, M. J. (2004). Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *Journal of Virology*, 78.
- Li, L., Hu, X., Xia, Y., Xiao, G., Zheng, P., i Wang, C. (2014). Linkage of oxidative stress and mitochondrial dysfunctions to spontaneous culture degeneration in *Aspergillus nidulans*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 449–461.
- Liu, Y. C., i Milgroom, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86, 79–86.
- Liu, Y. C., i Milgroom, M. G. (2007). High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia*, 99, 279–284.
- Logsdon, G. A., Vollger, M. R., i Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics*, 21, 597–614.
- Loubradou, G., i Turcq, B. (2000). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: A roundabout way of understanding the phenomenon. *Research in Microbiology*, 151, 239–245.
- Lythgoe, K. A., Hall, M., Ferretti, L., de Cesare, M., MacIntyre-Cockett, G., Trebes, A., Andersson, M., Otecko, N., Wise, E. L., Moore, N., Lynch, J., Kidd, S., Cortes, N., Mori, M., Williams, R., Vernet, G., Justice, A., Green, A., Nicholls, S. M., ...i Golubchik, T. (2021). SARS-CoV-2 within-host diversity and transmission. *Science*, 372, eabg0821.
- Mellano, M. G., Panzavolta, T., Tiberi, R., i Tosi, L. (2012). Biological control of chestnut blight. *Forest Pathology*, 42, 167–176.
- Milgroom, M. G., i Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10518–10523.
- Milgroom, M. G., i Cortesi, P. (1996). Biological control of chestnut blight with hypovirulence. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 541–562.
- Milgroom, M. G., i Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 311–338.
- Milgroom, M. G., Cortesi, P., i MacDonald, W. L. (1992). Evolution of hypovirulence and its impact on chestnut blight epidemics. *Phytopathology*, 82, 761–767.
- 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.

- Milgroom, M. G., Wang, K., Zhou, Y., Lipari, S. E., i Kaneko, S. (1996). Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 88, 179-190.
- Mlinarec, J., Ježić, M., Ćosić, 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, 741-749.
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., i Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, 41, 295–308.
- Morozov, A. Y., Robin, C., i Franc, A. (2007). A simple model for the dynamics of a host-parasite-hyperparasite interaction. *Journal of Theoretical Biology*, 249, 246–253.
- Moury, B., Fabre, F., i Senoussi, R. (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17891-17896.
- Myers, J. M., i James, T. Y. (2022). Mycoviruses. *Current Biology*, 32, R150–R155.
- Nei, M., i Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97, 145-163.
- Nelson, C. W., Moncla, L. H., i Hughes, A. L. (2015). SNPGenie: estimating evolutionary parameters to detect natural selection using pooled next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 3709-3711.
- Nuskern, L., Tkalec, M., Ježić, M., Katanić, Z., Krstin, L., i Ćurković-Perica, M. (2017). *Cryphonectria hypovirus 1*-induced changes of stress enzyme activity in transfected phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *Microbial Ecology*, 74, 302–311.
- Nuskern, L., Tkalec, M., Srezović, B., Ježić, M., Gačar, M., i Ćurković-Perica, M. (2021). Laccase activity in fungus *Cryphonectria parasitica* is affected by growth conditions and fungal–viral genotypic interactions. *Journal of Fungi*, 7, 958
- Nuss, D. L. (1996). Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. *The Plant Cell*, 8, 1845–1853.
- Ortiz-Urquiza, A., i Keyhani, N. O. (2015). Stress response signaling and virulence: Insights from entomopathogenic fungi. *Current Genetics*, 61, 239–249.
- Pagán, I., García-Arenal, F. (2018). Population Genomics of Plant Viruses. In: Polz, M., Rajora, O. (ur.) *Population Genomics: Microorganisms*. Population Genomics. Springer, Cham.

- Paillet, F. L. (1984). Growth form and ecology of American chestnut sprouts in the presence of the chestnut blight fungus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 111, 397–403.
- Palmieri, G., Giardina, P., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G., i Bianco, C. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 31301–31307.
- Papazova-Anakieva, I., Sotirovski, K., Cortesi, P., i Milgroom, M. G. (2008). Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 35–42.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419–420.
- Park, S. M., Choi, E. S., Kim, M. J., Cha, B. J., Yang, M. S., i Kim, D. H. (2004). Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. *Molecular Microbiology*, 51, 1267–1277.
- Pearson, M. N., i Suzuki, N. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10, 115–128.
- Peever, T. L., Liu, Y. C., Cortesi, P., i Milgroom, M. G. (2000). Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and environmental microbiology*, 66, 4863–4869.
- Peters, F. S., Rigling, D., i Prospero, S. (2014). Genetic structure of *Cryphonectria hypovirus 1* in Germany and surrounding regions. *Forest Pathology*, 44, 123–132.
- Pócsi, I., Prade, R. A., i Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1–76.
- Poljak, I., Idžojić, M., Šatović, Z., Ježić, M., Čurković-Perica, M., Simovski, B., Acevski, J., i Liber, Z. (2017). Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genetics & Genomes*, 13, 18.
- Poon, L. L. M., Song, T., Rosenfeld, R., Lin, X., Rogers, M. B., Zhou, B., Sebra, R., Halpin, R. A., Guan, Y., Twaddle, A., DePasse, J. V., Stockwell, T. B., Wentworth, D. E., Holmes, E. C., Greenbaum, B., Peiris, J. S. M., Cowling, B. J., i Ghedin, E. (2016). Quantifying influenza virus diversity and transmission in humans. *Nature Genetics*, 48, 195–200.
- Poplin, R., Chang, P. C., Alexander, D., Schwartz, S., Colthurst, T., Ku, A., Newburger, D., Dijamco, J., Nguyen, N., Afshar, P. T., Gross, S. S., Dorfman, L., McLean, C. Y., i DePristo, M. A. (2018). A universal SNP and small-indel variant caller using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 36, 983–987.

Popović, M., Nuskern, L., Peranić, K., Vuković, R., Katanić, Z., Krstin, L., Ćurković-Perica, M., Leigh, D. M., Poljak, I., Idžojić, M., Rigling, D., i Ježić, M. (2023). Physiological variations in hypovirus-infected wild and model long-term laboratory strains of *Cryphonectria parasitica*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1192996.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., i Rigling, D. (2013). Population structure of *Cryphonectria parasitica* in Europe inferred by vegetative compatibility types and genetic markers. *Phytopathology*, 103, 1080–1088.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., i Rigling, D. (2006). Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology*, 96, 1337-1344.

Prospero, S., Heinz, M., Augustiny, E., Chen, Y.-Y., Engelbrecht, J., Fonti, M., Hoste, A., Ruffner, B., Sigrist, R., van den Berg, N., i Fonti, P. (2023). Distribution, causal agents, and infection dynamic of emerging ink disease of sweet chestnut in Southern Switzerland. *Environmental Microbiology*, 25, 2250–2265.

Prospero, S., i Rigling, D. (2012). Invasion genetics of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. *Phytopathology*, 102, 73-82.

Reshi, M. L., Su, Y.-C., i Hong, J.-R. (2014). RNA viruses: ROS-mediated cell death. *International Journal of Cell Biology*, 467452.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., i Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17, 405–423.

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

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

Rigling, D., Prospero, S., i Heiniger, U. (2018). *Cryphonectria* hypovirus 1 diversity and distribution in Europe and western Asia. *Forests*, 9, 513.

Rigling, D., i van Alfen, N. K. (1991). Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *Journal of Bacteriology*, 173, 8000–8003.

Robin, C., i Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76, 355–368.

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

Romon-Ochoa, P., Gorton, C., Lewis, A., van der Linde, S., Webber, J., i Pérez-Sierra, A. (2020). Hypovirulent effect of *Cryphonectria hypovirus 1* in British isolates of *Cryphonectria parasitica*. *Pest Management Science*, 76, 1333–1343.

Sacristán, S., Díaz, M., Fraile, A., i García-Arenal, F. (2011). Contact transmission of Tobacco mosaic virus: a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. *Journal of Virology*, 85, 4974–4981.

Sanger, F., Nicklen, S., i Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5463–5467.

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., i Malonia, S. K. (2023). Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. *Biology*, 12, 997–1022.

Schieber, M., i Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24, R453–R462

Schütt, P., Weisgerber, H., Schuck, H. J., Lang, U., Stimm, B., i Roloff, A. (2006). *Enzyklopädie der Laubbäume: Die große Enzyklopädie*. Hamburg: Nikol Verlag.

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

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

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91, S31–S38.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82, 291–295.

Simon, A. E., Roossinck, M. J., i Havelda, Z. (2004). Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 415–437.

Simmonds, P., Aiewsakun, P., i Katzourakis, A. (2019). Prisoners of war—Host adaptation and its constraints on virus evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 321–328.

- Sotirovski, K., Milgroom, M. G., Rigling, D., Heiniger, U., i Cortesi, P. (2006). Genetic structure of *Cryphonectria hypovirus 1* in European populations of the chestnut blight fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2747–2754.
- Sotirovski, K., Rigling, D., Heiniger, U., i Milgroom, M. G. (2011). Variation in virulence of *Cryphonectria hypovirus 1* in Macedonia. *Forest Pathology*, 41, 59–65.
- Southwood, D., i Ranganathan, S. (2019). Host-pathogen interactions. In *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology: ABC of bioinformatics* (pp. 103-112). Elsevier.
- Springer, J. C., Gilbert, G. S., i Milgroom, M. G. (2013). Spatial distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* at invasion fronts. *Phytopathology*, 103, 340–347.
- Staerck, C., Yaakoub, H., Vandeputte, P., Tabiasco, J., Godon, C., Gastebois, A., Giraud, S., Guillemette, T., Calenda, A., Delneste, Y., Fleury, M., i Bouchara, J.-P. (2021). The glycosylphosphatidylinositol-anchored superoxide dismutase of *Scedosporium apiospermum* protects the conidia from oxidative stress. *Journal of Fungi*, 7, 575.
- Stauber, L., Badet, T., Feurtey, A., Prospero, S., i Croll, D. (2021). Emergence and diversification of a highly invasive chestnut pathogen lineage across southeastern Europe. *eLife*, 10, e56279.
- Stauder, C. M., Nuss, D. L., Zhang, D.-X., Double, M. L., MacDonald, W. L., Metheny, A. M., i Kasson, M. T. (2019). Enhanced hypovirus transmission by engineered super donor strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, into a natural population of strains exhibiting diverse vegetative compatibility genotypes. *Virology*, 528, 1–6.
- Sting, R., Eisenberg, T., i Hrubenja, M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 148–156.
- Tan, C. M. C., Pearson, M. N., Beever, R. E., i Parkes, S. L. (2007). Why fungi have sex? Abstract presented at the XIVth International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa.
- Tartaglia, J., Paul, C. P., Fulbright, D. W., i Nuss, D. L. (1986). Structural properties of double-stranded RNAs associated with biological control of chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 9109-9113.
- Travers, K. J., Chin, C. S., Rank, D. R., Eid, J. S., i Turner, S. W. (2010). A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Research*, 38, e159.
- Tsai, P. F., Pearson, M. N., i Beever, R. E. (2004). Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycological Research*, 108, 907–912.

- Vannini, A., i Vettraino, A. M. (2001). Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut. *Forest Snow and Landscape Research*, 76, 345–350.
- Varley, D. A., Podila, G. K., i Hiremath, S. T. (1992). Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: Suppression of cutinase gene expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 4539–4544.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ...i Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304–1351.
- Wang, S., Zhang, J., Li, P., Qiu, D., i Guo, L. (2016). Transcriptome-based discovery of *Fusarium graminearum* stress responses to FgHV1 infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-15.
- Wangsanut, T., i Pongpom, M. (2022). The role of the glutathione system in stress adaptation, morphogenesis and virulence of pathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 10645.
- Waugh, C., Cromer, D., Grimm, A., Chopra, A., Mallal, S., Davenport, M., i Mak, J. (2015). A general method to eliminate laboratory induced recombinants during massive, parallel sequencing of cDNA library. *Virology Journal*, 12, 55.
- Won, H. K., Park, S. J., Kim, D. K., Shin, M. J., Kim, N., Lee, S. H., Kwon, Y. C., Ko, H. K., Ro, H. S., i Lee, H. S. (2013). Isolation and characterization of a mycovirus in *Lentinula edodes*. *Journal of Microbiology*, 51, 118-122.
- Yan, X., Wang, W., Xie, Y., i Liu, J. (2007). Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in China. *Forest Ecology and Management*, 242, 574–580.
- Zamora, P., Rigling, D., i Díez, J. J. (2012). Diversity of *Cryphonectria hypovirus 1* in Spanish populations of *Cryphonectria parasitica*. *Forest Pathology*, 42, 203–209.
- Zhang, J., i Parkinson, J. (2019). PopNetD3—A network-based web resource for exploring population structure. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 1730–1735.
- Zhao, L., i Illingworth, C. J. (2019). Measurements of intrahost viral diversity require an unbiased diversity metric. *Virus Evolution*, 5, vey041.

9. PRILOZI

Prilog 1. Usporedba mutacijske raznolikosti (π) između sinonimnih (π_S) i nesinonimnih (π_N) mutacija za virusne populacije u različitim uzorcima

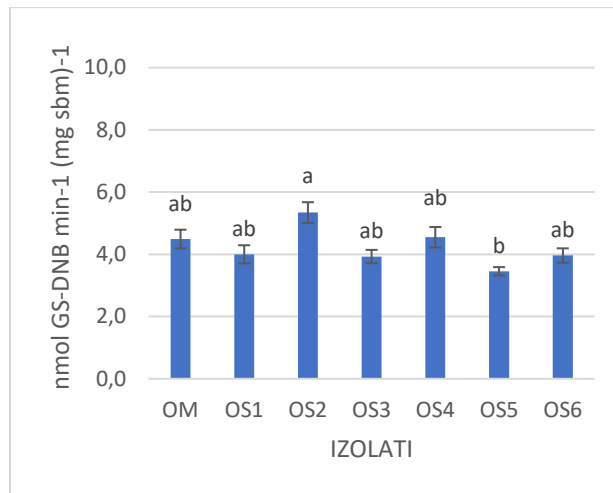
Uzorak	Donor (D)/roditeljski (M) izolat, primatelj (R)/spora (S) ili pooled isolate (P)	π_N	π_S	Veća π vrijednost
CP	P	0,000174	0,000456	S
C11	R	0,000161	0,000178	S
C12	R	0,000105	0,000336	S
C13	R	0,00013	0,000407	S
C51	R	0,000143	0,000294	S
C52	R	0,0001	0,000289	S
C53	R	0,000105	0,000306	S
C441	R	0,000141	0,000795	S
C442	R	7,17E-05	0,000156	S
C443	R	2,33E-05	4,91E-05	S
C21	R	1,42E-05	3,69E-05	S
C22	R	0,00172	0,018248	S
C23	R	0,000167	0,000306	S
CD1	D	8,38E-05	0,000234	S
CD5	D	0,000123	0,000229	S
CD44	D	0,00049	0,002087	S
CD2	D	7,43E-05	0,000372	S
ED9	D	0,000101	0,000231	S
ED15	D	3,43E-05	0,000142	S
ED17	D	1,6E-05	6,34E-05	S
ED36	D	0,000128	0,00029	S
EP	P	8,89E-05	0,000152	S
E91	R	0,000123	0,000251	S
E92	R	0,002014	0,019452	S
E93	R	8,27E-05	9,53E-05	S
E151	R	0,000112	0,000282	S

E152	R	6,58E-05	0,000273	S
E153	R	0,001442	0,018018	S
E171	R	0,000106	0,000145	S
E172	R	1,21E-05	6,04E-05	S
E173	R	5,06E-05	1,72E-05	N
E361	R	7,2E-05	0,00011	S
E362	R	9,12E-05	0,000322	S
E363	R	5,38E-06	2,71E-05	S
FD1	D	0,000341	0,000365	S
FD5	D	0,000312	0,00061	S
FD6	D	0,000362	0,000503	S
FD60	D	0,000381	0,000649	S
FP	P	0,000271	0,000703	S
F11	R	0,000189	0,000547	S
F12	R	0,000252	0,000582	S
F13	R	0,00028	0,000578	S
F51	R	0,000307	0,000611	S
F52	R	0,00036	0,000478	S
F53	R	0,000412	0,000611	S
F601	R	0,000271	0,000682	S
F602	R	0,000714	0,000863	S
F603	R	0,003715	0,03172	S
F61	R	0,002207	0,023801	S
F62	R	0,002537	0,024735	S
F63	R	0,001734	0,018019	S
FM	M	0,002747	0,024812	S
FS1	S	0,00038	0,00044	S
FS2	S	0,000425	0,000585	S
FS3	S	0,000317	0,000488	S
FS4	S	0,000373	0,000339	N
FS5	S	0,000369	0,000476	S
FS6	S	0,00042	0,000473	S
CM	M	3,18E-05	0,000103	S
CS1	S	3,56E-05	0,000111	S
CS2	S	5,07E-05	0,000281	S
CS3	S	1,89E-05	0,000227	S
CS4	S	3,5E-05	0,000264	S
EM	M	0,000139	0,000263	S
ES1	S	9,12E-05	0,000166	S
ES2	S	5,43E-05	1,48E-05	N

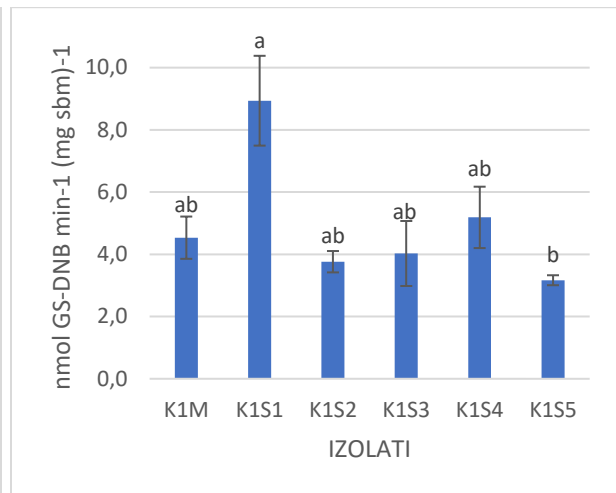
ES3	S	6,41E-05	3,35E-05	N
ES4	S	6,47E-05	0,000157	S
ES5	S	0,000115	0,000221	S
K1M	M	4,78E-05	0,000158	S
K1S1	S	9,54E-06	3,94E-05	S
K1S2	S	1,61E-05	5,1E-05	S
K1S3	S	1,56E-05	0,000179	S
K1S4	S	3,53E-05	9,36E-06	N
K1S5	S	3,84E-06	0,000174	S
K2M	M	0,000112	0,000306	S
K2S1	S	2,56E-05	9,53E-05	S
K2S2	S	1,08E-05	3,45E-05	S
K2S3	S	5,54E-05	0,000291	S
K2S4	S	9,24E-07	1,27E-05	S
K2S5	S	3,45E-05	0,000221	S
OM	M	0,000381	0,000371	N
OS1	S	0,000434	0,00034	N
OS2	S	0,000451	0,000493	S
OS3	S	0,000125	0,000263	S
OS4	S	0,000474	0,000364	N
OS5	S	0,000123	0,000483	S
OS6	S	0,000219	0,000158	N

Prilog 2. Promjene aktivnosti enzima GST u gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) izolat iz Ozlja oz_08.2 (O), B) izolat iz Kašta ks_30.4 (K1), C) izolat iz Kašta ks_46.4 (K2), D) izolati CR23 (C), E) izolati Euro7 (E), F) izolati EP713 (F). Uzorci OM, K1M, K2M, CM, EM i FM predstavljaju roditeljski micelij, dok uzorci S1-S6 predstavljaju micelije proizašle iz pojedinih spora u koje je prenesen virus CHV1. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci označeni različitim slovom statistički značajno različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

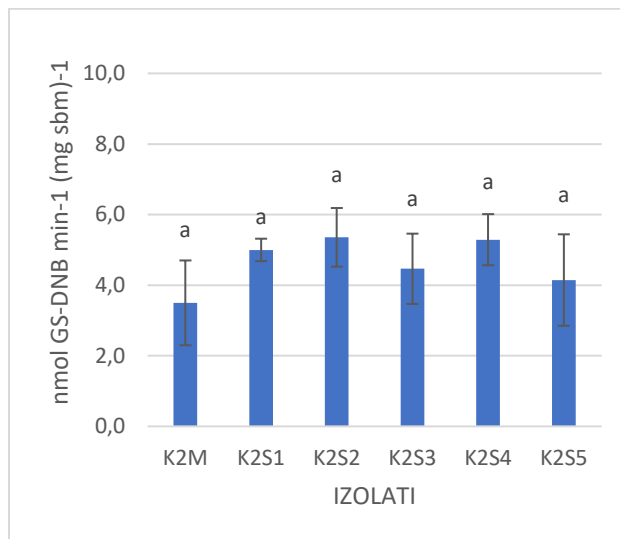
A)



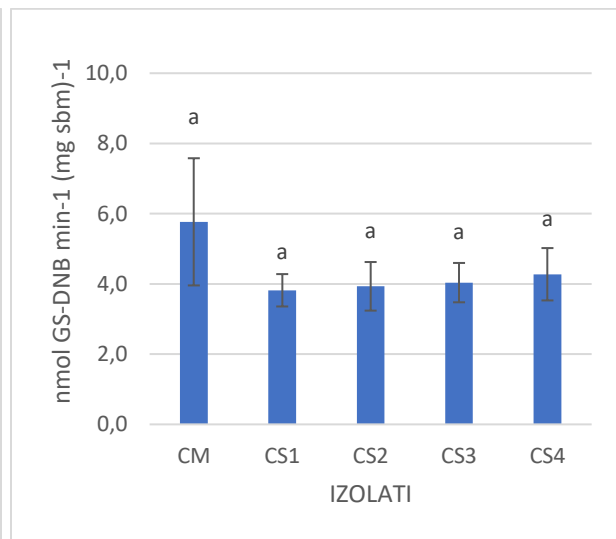
B)



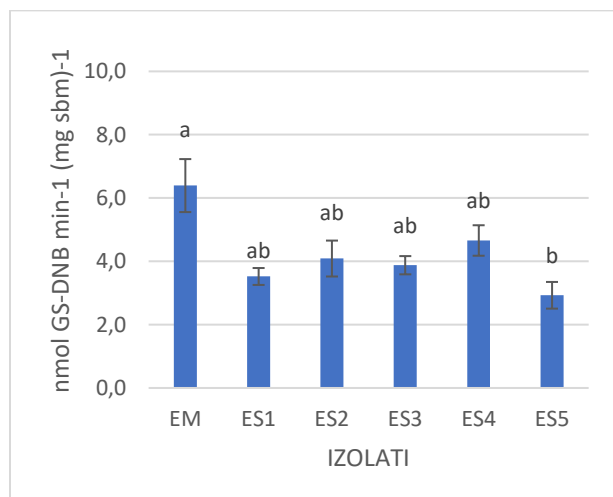
C)



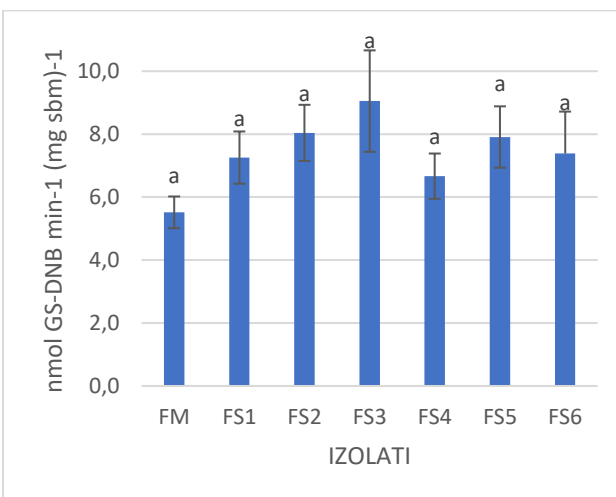
D)



E)

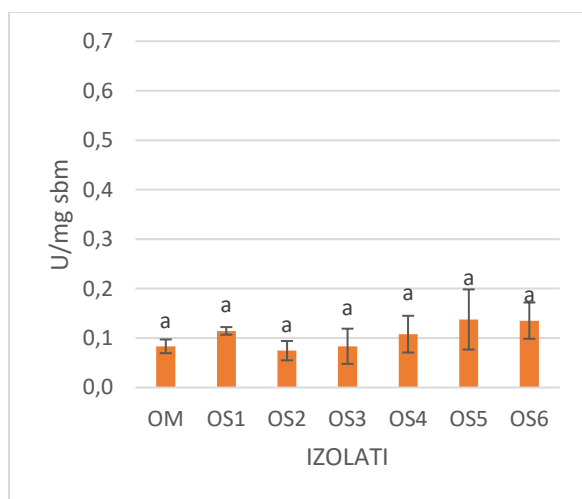


F)

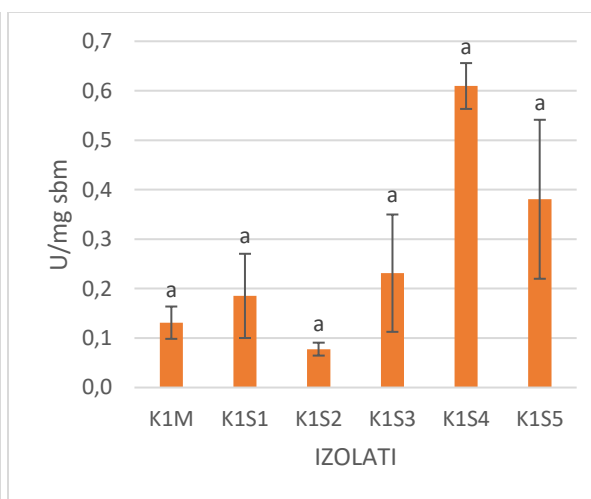


Prilog 3. Promjene aktivnosti enzima SOD gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) izolat iz Ozlja oz_08.2 (O), B) izolat iz Kašta ks_30.4 (K1), C) izolat iz Kašta ks_46.4 (K2), D) izolati CR23 (C), E) izolati Euro7 (E), F) izolati EP713 (F). Uzorci OM, K1M, K2M, CM, EM i FM predstavljaju roditeljski micelij, dok uzorci S1-S6 predstavljaju micelije proizašle iz pojedinih spora u koje je prenesen virus CHV1. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci označeni različitim slovom statistički značajno različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu

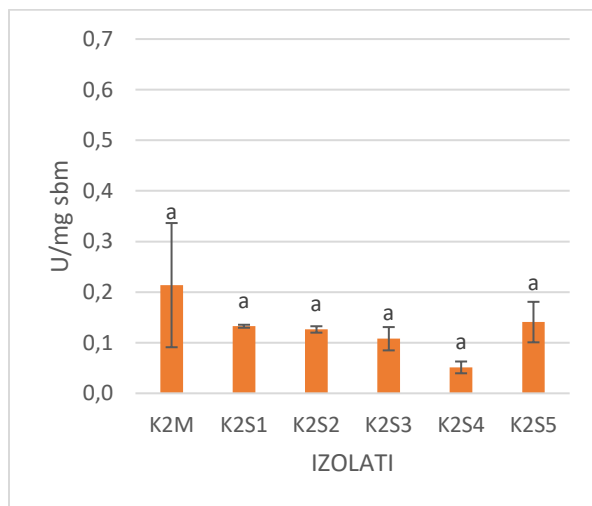
A)



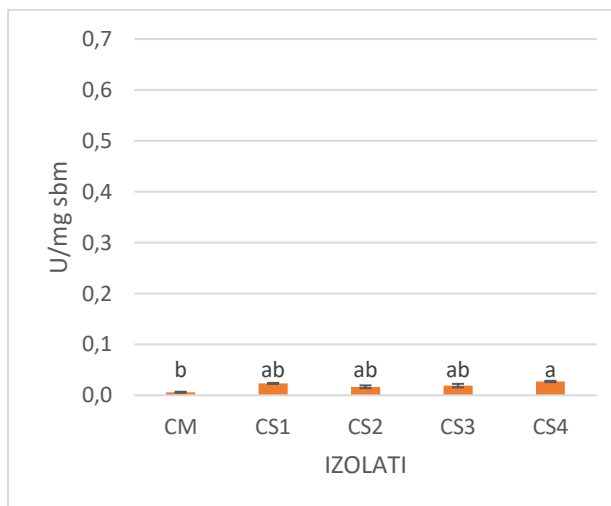
B)



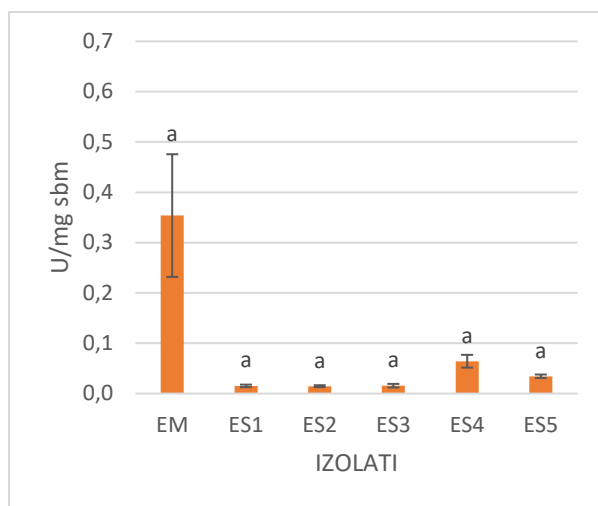
C)



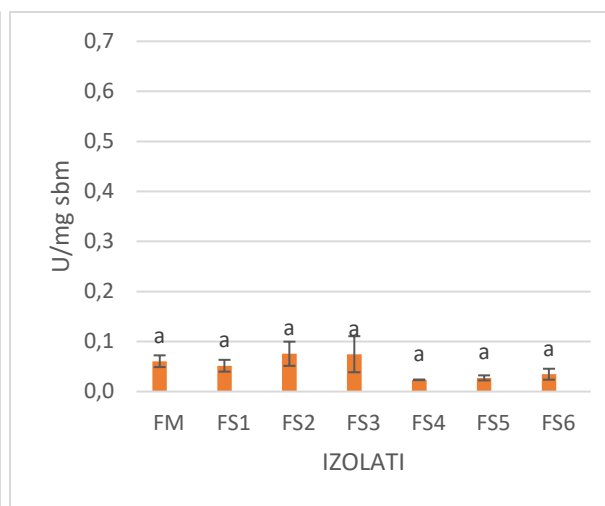
D)



E)

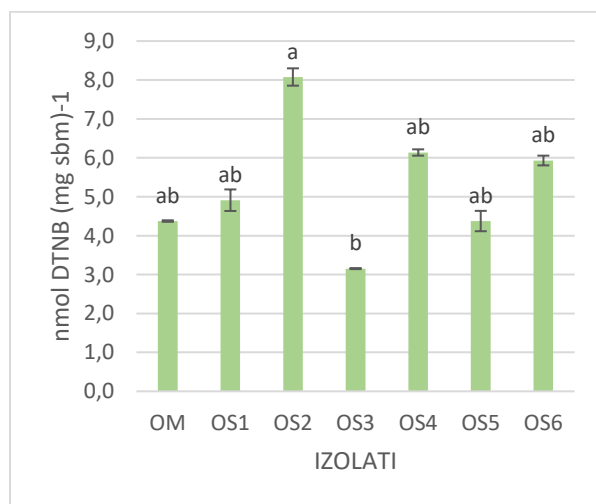


F)

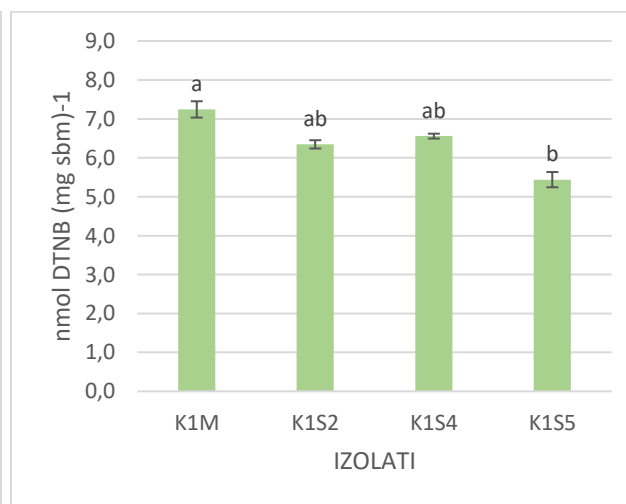


Prilog 4. Promjene sadržaja neproteinskih tiola gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) izolat iz Ozlja oz_08.2 (O), B) izolat iz Kašta ks_30.4 (K1), C) izolat iz Kašta ks_46.4 (K2), D) izolati CR23 (C), E) izolati Euro7 (E), F) izolati EP713 (F). Uzorci OM, K1M, K2M, CM, EM i FM predstavljaju roditeljski micelij, dok uzorci S1-S6 predstavljaju micelije proizašle iz pojedinih spora u koje je prenesen virus CHV1. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci označeni različitim slovom statistički značajno različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

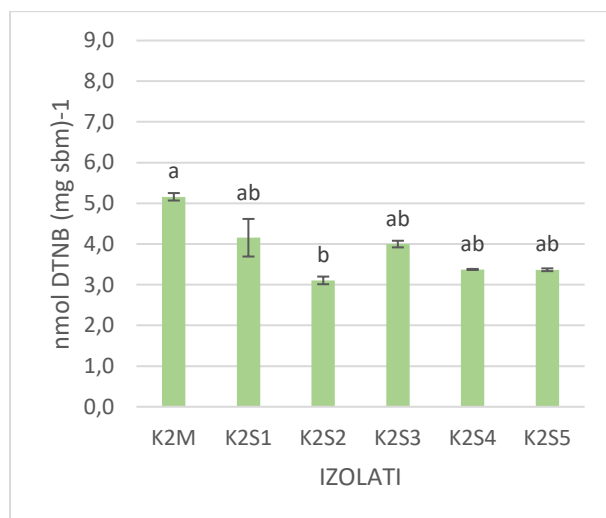
A)



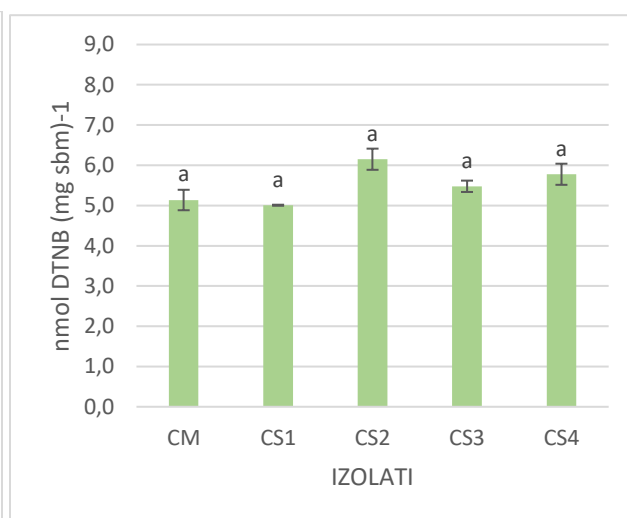
B)



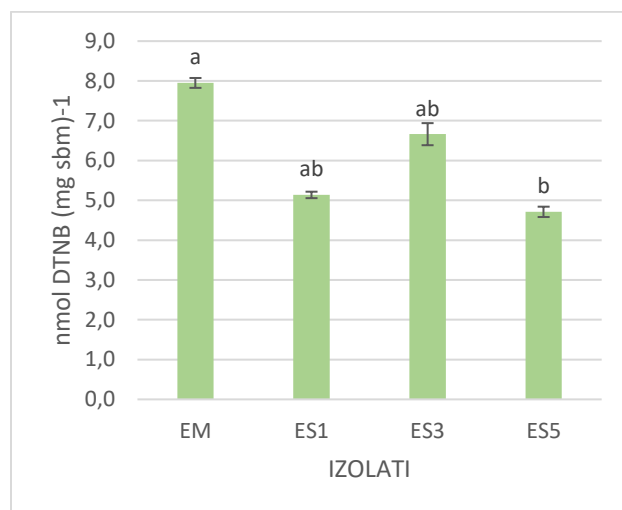
C)



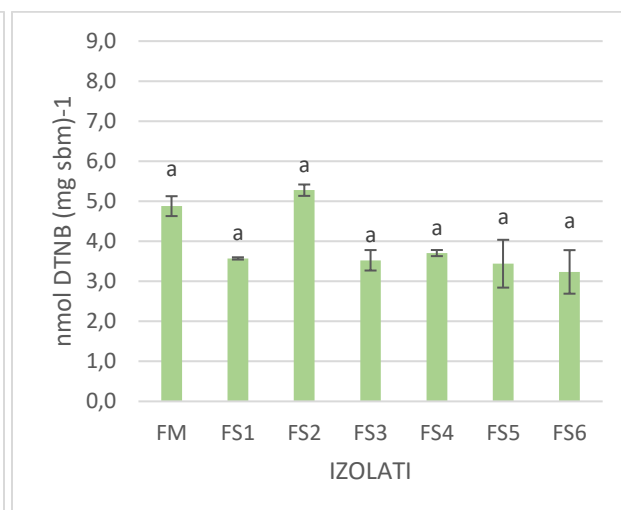
D)



E)

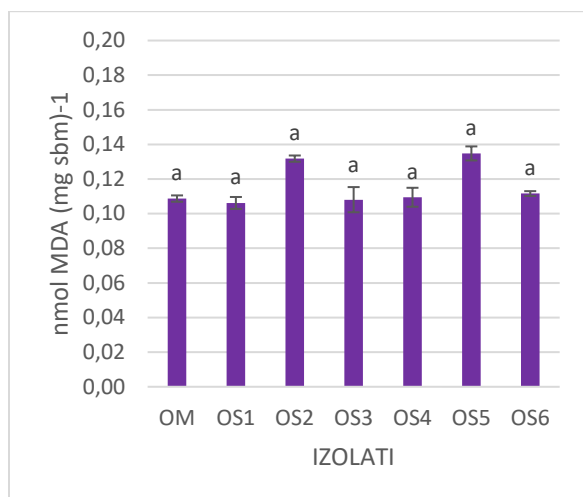


F)

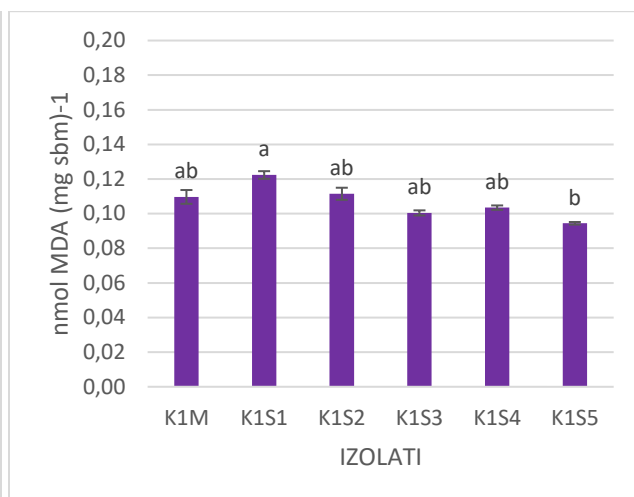


Prilog 5. Promjene razine lipidne peroksidacije gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) izolat iz Ozlja oz_08.2 (O), B) izolat iz Kašta ks_30.4 (K1), C) izolat iz Kašta ks_46.4 (K2), D) izolati CR23 (C), E) izolati Euro7 (E), F) izolati EP713 (F). Uzorci OM, K1M, K2M, CM, EM i FM predstavljaju roditeljski micelij, dok uzorci S1-S6 predstavljaju micelije proizašle iz pojedinih spora u koje je prenesen virus CHV1. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) ± standardna pogreška dok su uzorci označeni različitim slovom statistički značajno različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

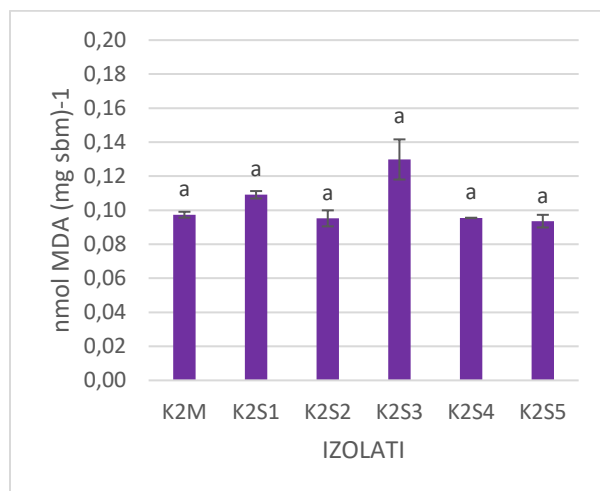
A)



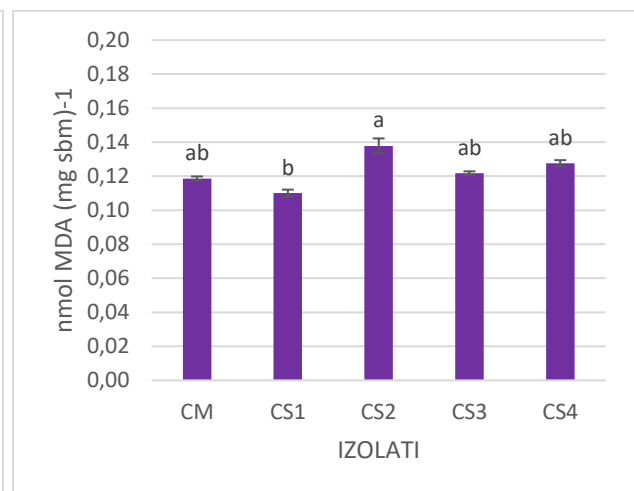
B)



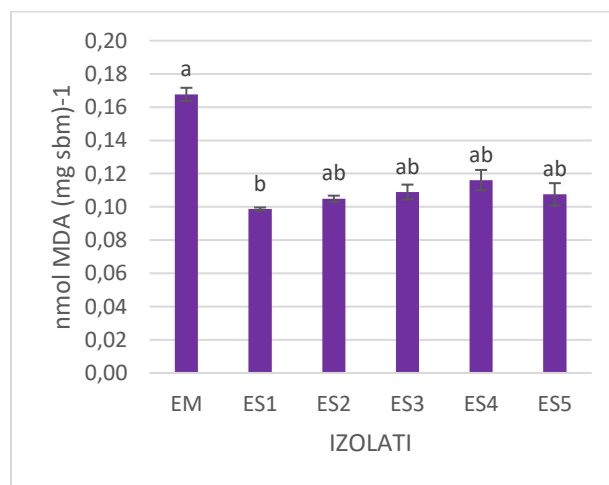
C)



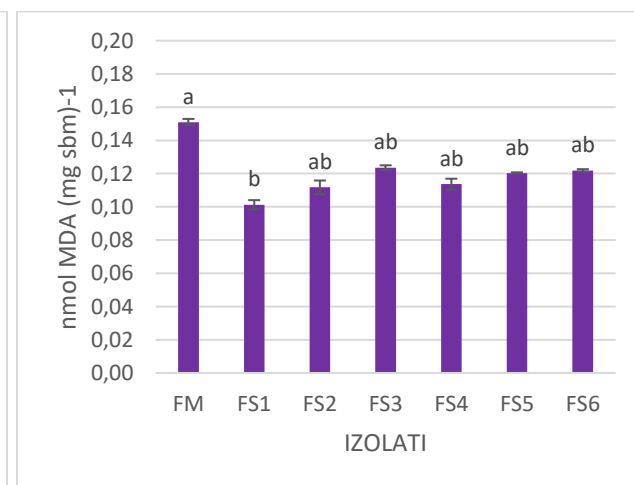
D)



E)

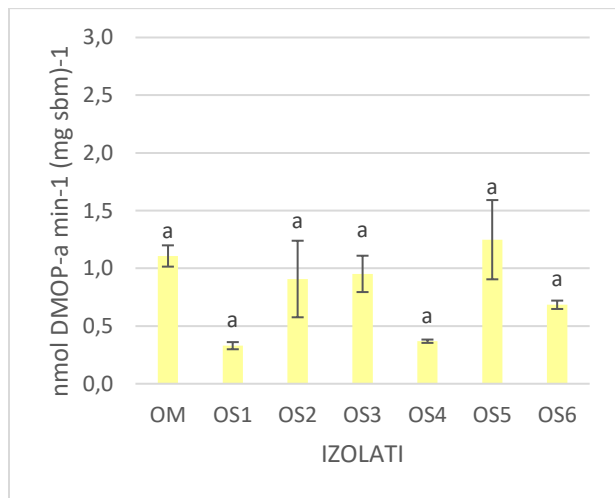


F)

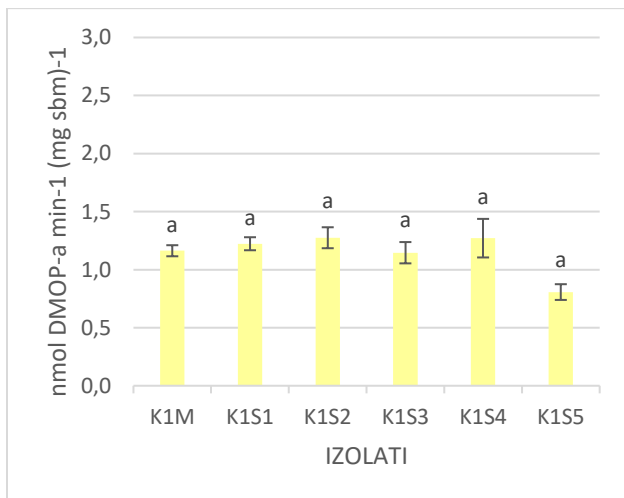


Prilog 6. Promjene aktivnosti enzima lakaze gljive *C. parasitica* nakon vertikalnog prijenosa virusa CHV1: A) izolat iz Ozlja oz_08.2 (O), B) izolat iz Kašta ks_30.4 (K1), C) izolat iz Kašta ks_46.4 (K2), D) izolati CR23 (C), E) izolati Euro7 (E), F) izolati EP713 (F).. Uzorci OM, K1M, K2M, CM, EM i FM predstavljaju roditeljski micelij, dok uzorci S1-S6 predstavljaju micelije proizašle iz pojedinih spora u koje je prenesen virus CHV1. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (svaka spora je imala tri replike) $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci označeni različitim slovom statistički značajno različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu

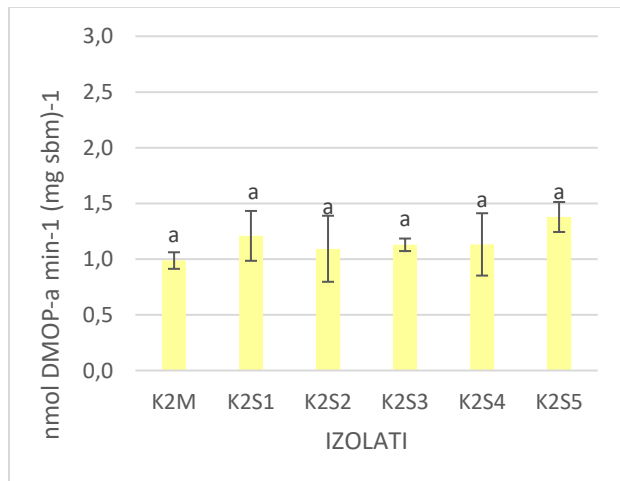
A)



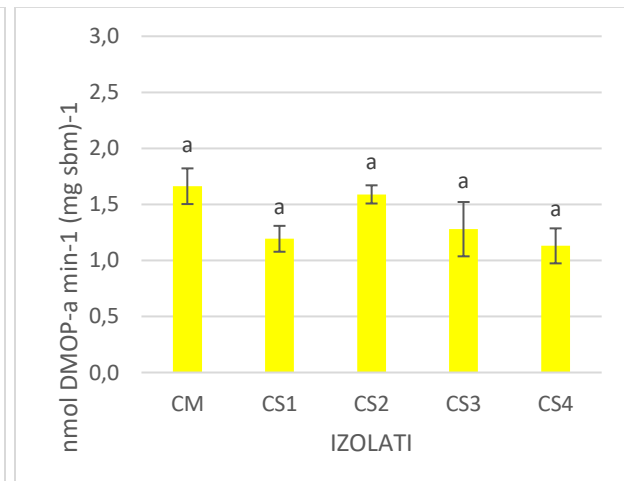
B)



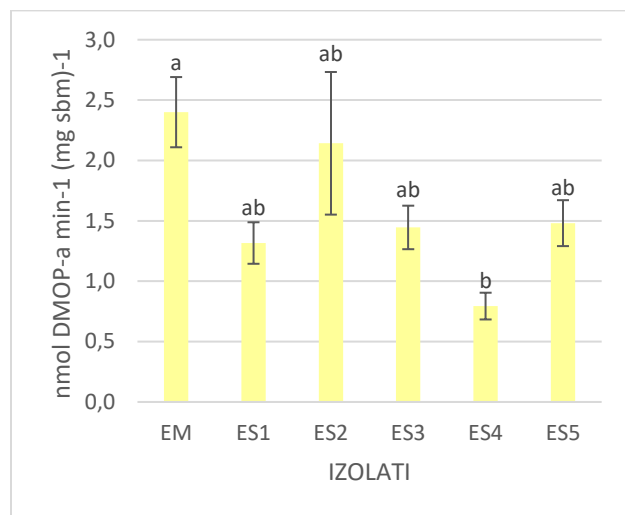
C)



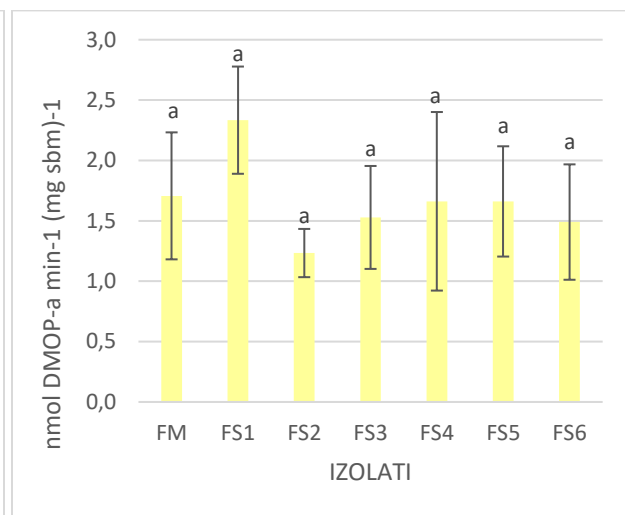
D)



E)

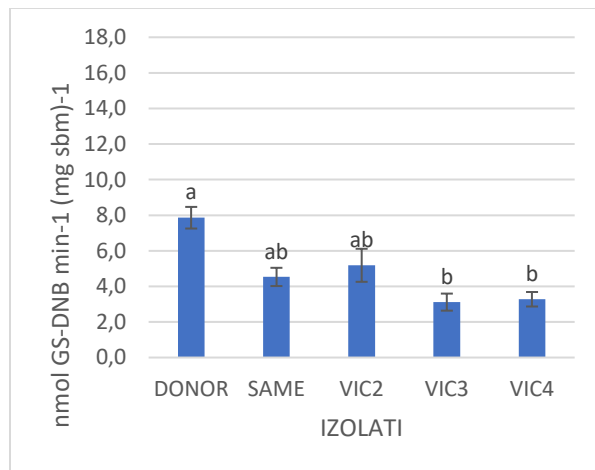


F)

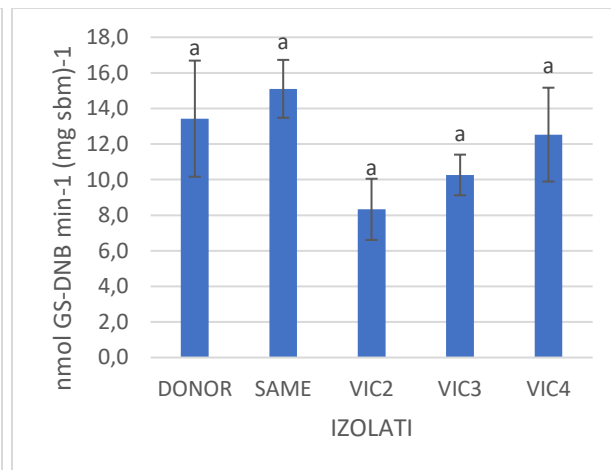


Prilog 7. Promjene aktivnost enzima GST gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirano prema heteroalelizmu na *vic* lokusu uključenom u pojedini pokus prijenosa: A) CR23, B) Euro7, C) EP713. Uzorci „donor“ predstavljaju micelije svih donora određenog izolata, uzorci „same“ su miceliji izogenih primatelja, dok su *vic2*, *vic3* i *vic4* miceliji primatelja koji su heteroalelni s obzirom na donor na navedenim *vic* lokusima. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci s drukčijim slovom statistički različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

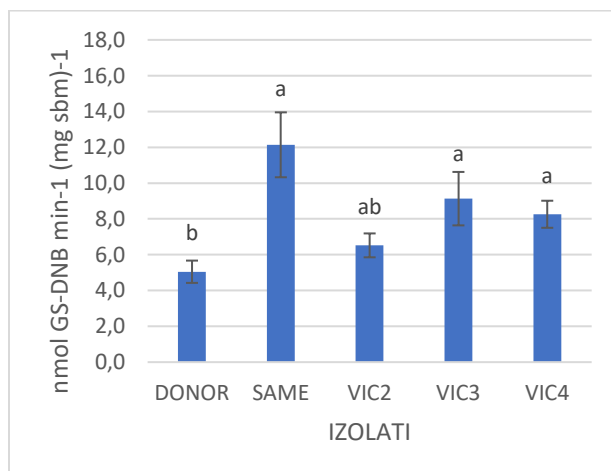
A)



B)

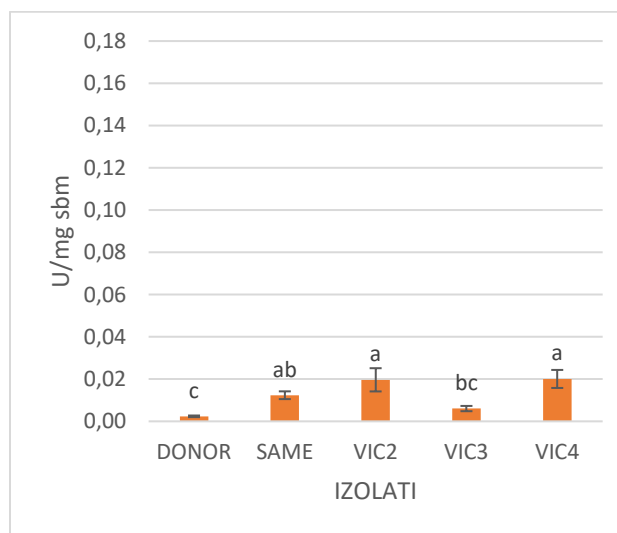


C)

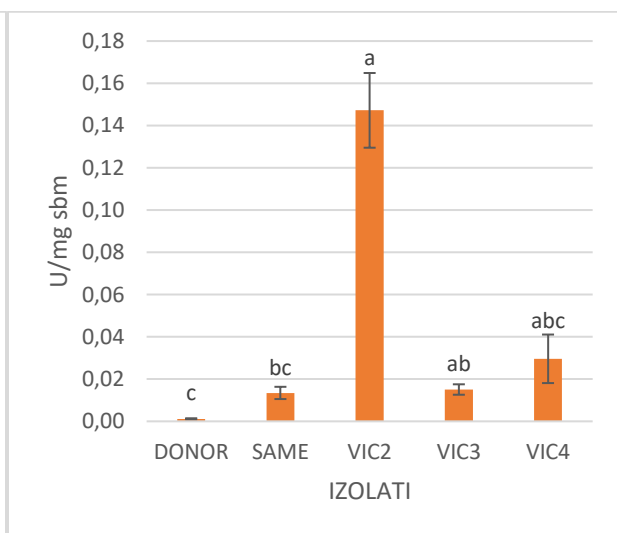


Prilog 8. Promjene aktivnost enzima SOD gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirano prema heteroalelizmu na *vic* lokusu uključenom u pojedini pokus prijenosa: A) CR23, B) Euro7, C) EP713. Uzorci „donor“ predstavljaju micelije svih donora određenog izolata, uzorci „same“ su miceliji izogenih primatelja, dok su *vic2*, *vic3* i *vic4* miceliji primatelja koji su heteroalelni s obzirom na donor na navedenim *vic* lokusima. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci s drukčijim slovom statistički različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

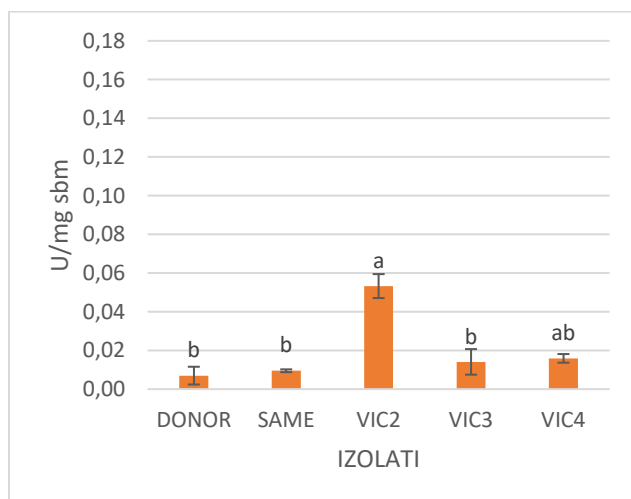
A)



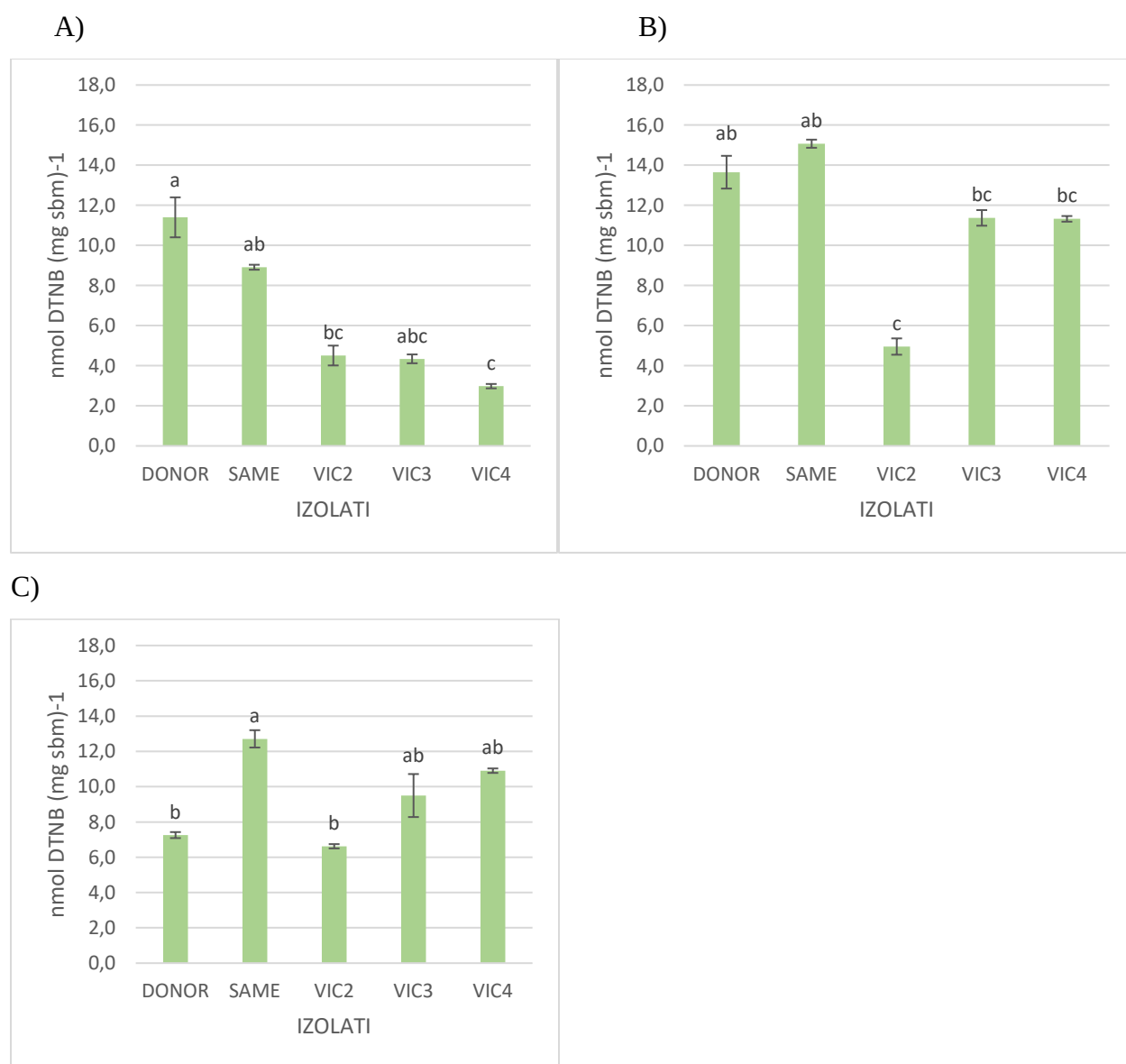
B)



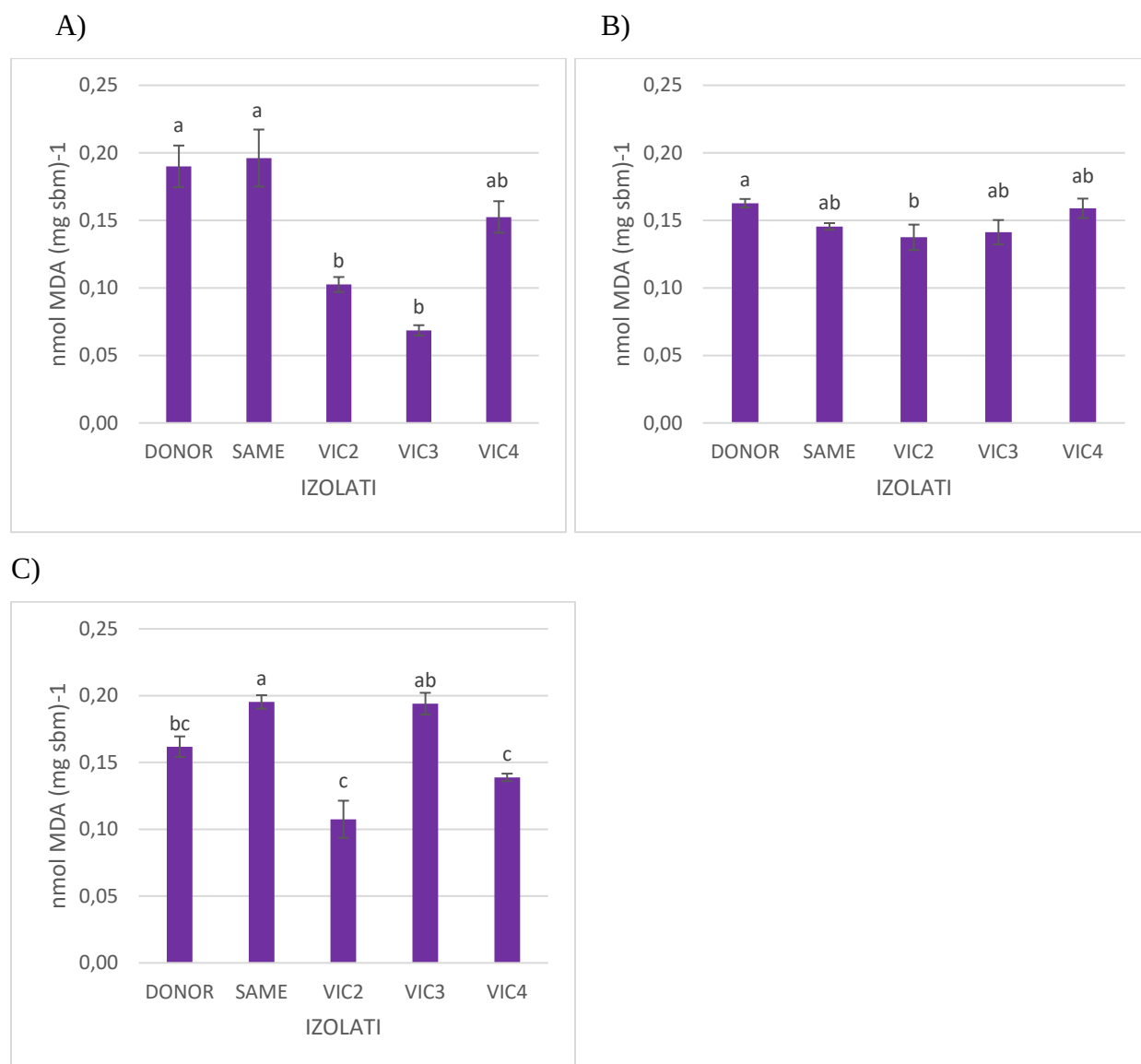
C)



Prilog 9. Promjene sadržaja neproteinskih tiola gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirano prema heteroalelizmu na *vic* lokusu uključenom u pojedini pokus prijenosa: A) CR23, B) Euro7, C) EP713. Uzorci „donor“ predstavljaju micelije svih donora određenog izolata, uzorci „same“ su miceliji izogenih primatelja, dok su *vic2*, *vic3* i *vic4* miceliji primatelja koji su heteroalelni s obzirom na donor na navedenim *vic* lokusima. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci s drukčijim slovom statistički različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

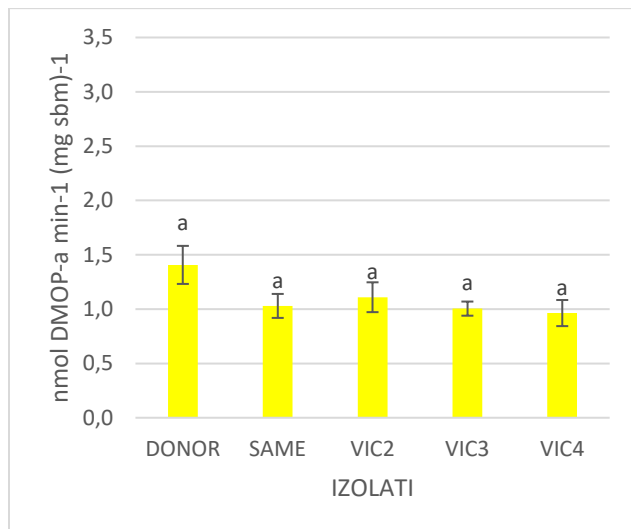


Prilog 10. Promjene razine lipidne peroksidacije gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirano prema heteroalelizmu na *vic* lokusu uključenom u pojedini pokus prijenosa: A) CR23, B) Euro7, C) EP713. Uzorci „donor“ predstavljaju micelije svih donora određenog izolata, uzorci „same“ su miceliji izogenih primatelja, dok su *vic2*, *vic3* i *vic4* miceliji primatelja koji su heteroalelni s obzirom na donor na navedenim *vic* lokusima. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci s drukčijim slovom statistički različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

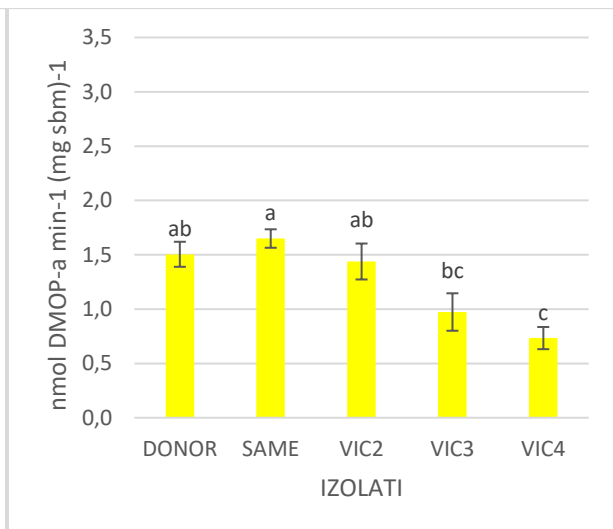


Prilog 11. Promjene aktivnost enzima lakaze gljive *C. parasitica* nakon horizontalnog prijenosa virusa CHV1, grupirano prema heteroalelizmu na *vic* lokusu uključenom u pojedini pokus prijenosa: A) CR23, B) Euro7, C) EP713. Uzorci „donor“ predstavljaju micelije svih donora određenog izolata, uzorci „same“ su miceliji izogenih primatelja, dok su *vic2*, *vic3* i *vic4* miceliji primatelja koji su heteroalelni s obzirom na donor na navedenim *vic* lokusima. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok su uzorci s drukčijim slovom statistički različiti ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallis testu.

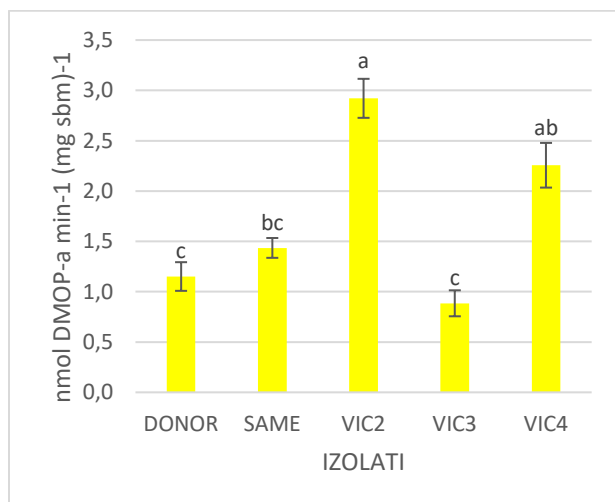
A)



B)



C)



10. ŽIVOTOPIS

Karla Peranić je završila prijediplomski studij biologije (2014.) te diplomski studij eksperimentalne biologije – modul Zoologija (2017.) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom “Utjecaj veličine kaveza na kemoosjetilno traženje i aktivnost nakon predatorskog ugriza zmije siktalice (*Bitis arietans*, MEEREM 1820)” izradila je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zorana Tadića. Stručno osposobljavanje za rad je odradila u Zoološkom vrtu u Zagrebu na poziciji edukatora. Doktorski studij biologije upisuje 2019. godine pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marina Ježića u sklopu bilateralnog švicarsko-hrvatskog projekta “DynaMyco - Dynamics of virus infection in mycovirus-mediated biological control of a fungal pathogen”. Također, iste godine se zapošljava kao asistent na Zavodu za mikrobiologiju pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. U sklopu projekta sudjelovala je na domaćim i međunarodnim kongresima: Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a (2020. – postersko izlaganje, 2022. – usmeno izlaganje, 2024. – usmeno izlaganje), 7th Croatian Congress of Microbiology with International Participation (2022. – usmeno izlaganje), FEMS online conference on Microbiology (2020. – usmeno i postersko izlaganje). Za oba posterska izlaganja je dobila nagradu za najbolji poster. Bila je na stručnom usavršavanju na WSL institutu u Zürichu u trajanju od 5 tjedana gdje je održala usmeno izlaganje u sklopu WABIO seminara. Od 2024. godine je zaposlena kao viši tehničar na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka PMF-a.

Popis izvornih znanstvenih radova:

1. Peranić, Karla; Leigh, Deborah M; Popović, Maja; Nuskern, Lucija; Ćurković-Perica, Mirna; Kupper, Quirin; Rigling, Daniel; Ježić, Marin: Changes in intra-host mycovirus population diversity after vertical and horizontal transmission // *Virus evolution*, 11 (2025), 1; veaf082, 15. doi: 10.1093/ve/veaf082
2. Ježić, Marin; Nuskern, Lucija; Peranić, Karla; Popović, Maja; Ćurković-Perica, Mirna; Mendaš, Ozren; Škegro, Ivan; Poljak, Igor; Vidaković, Antonio; Idžojtić, Marilena:

Regional Variability of Chestnut (*Castanea sativa*) Tolerance Toward Blight Disease // Plants, 13 (2024), 21; 3060-3073. doi: 10.3390/plants13213060

3. Leigh, Deborah M. ; Peranić, Karla ; Prospero, Simone ; Cornejo, Carolina ; Ćurković-Perica, Mirna ; Kupper, Quirin ; Nuskern, Lucija ; Rigling, Daniel ; Ježić, Marin: Long-read sequencing reveals the evolutionary drivers of intra-host diversity across natural RNA mycovirus infections // Virus evolution, 7 (2021), 1-14. doi: 10.1093/ve/veab101
4. Popović, Maja; Nuskern, Lucija; Peranić, Karla; Vuković, Rosemary; Katanić, Zorana; Krstin, Ljiljana; Ćurković-Perica, Mirna; Leigh, Deborah Marie; Poljak, Igor; Idžojtić, Marilena et al. Physiological variations in hypovirus-infected wild and model long-term laboratory strains of *Cryphonectria parasitica* // Frontiers in microbiology, 14 (2023), 1192996, 13. doi: 10.3389/fmicb.2023.1192996

Popis sažetaka sa skupova:

1. Morić, Maja; Nuskern, Lucija; Peranić, Karla; Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin Oxidative stress parameters in *Cryphonectria parasitica* naturally infected with CHV1 // 7th Croatian Congress of Microbiology with International Participation - Book of Abstracts. 2022. str. 63-63
2. Ježić, Marin; Leigh, Deborah M.; Peranić, Karla; Prospero, Simone; Cornejo, Carolina; Ćurković-Perica, Mirna; Kupper, Quirin; Nuskern, Lucija; Rigling, Daniel HiFi sequencing of *Cryphonectria hypovirus 1* intra-host populations uncovers dynamic evolution of viral variants in natural infections // V- International Mycovirus Symposium, Abstracts. 2022. str. 74-74
3. Peranić, Karla; Leigh, Deborah; Popović, Maja; Nuskern-Karaica, Lucija; Ćurković-Perica, Mirna; Cornejo, Carolina; Kupper, Quirin; Rigling, Daniel; Ježić, Marin Long read sequencing reveal mutational bottleneck after vertical transmission of *Cryphonectria hypovirus 1* // 6. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a – Book of abstracts/ Schneider, Petra (ur.)

4. Peranić, Karla; Leigh, Deborah; Popović, Maja; Nuskern-Karaica, Lucija; Ćurković-Perica, Mirna; Cornejo, Carolina; Kupper, Quirin; Rigling, Daniel; Ježić, Marin Before and after: a virus's journey from host to host // 8th Faculty of Science PhD Student Symposium: Book of Abstracts / Posarić, Laura; Gmižić, Daria; Ostojić, Tea et al. (ur.). Zagreb: Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, 2024. str. 20-20
5. Ježić, Marin; Peranić, Karla; Deborah, Marie Leigh; Popović, Maja; Ćurković-Perica, Mirna; Cornejo, Carolina; Kupper, Quirin; Nuskern Karaica, Lucija; Rigling, Daniel; Prospero, Simone Viral population diversity changes after vertical and horizontal transmission // Power of Viruses 2024: Book of abstracts / Tabain, Irena; Jagušić, Maja; Ivančić Jelečki, Jelena, Vilibić Čavlek, Tatjana et al. (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2018. str. 102-102
6. Peranić, Karla; Ogresta, Lovro; Ježić, Marin Raznolikost tipova vegetativne nekompatibilnosti gljive *Cryphonectria parasitica* te učestalost hipovirulentnosti na području Ozlja i Kašta // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, 2020. str. 98-98
7. Peranić, Karla; Ogresta, Lovro; Ćurković Perica, Mirna; Nuskern, Lucija; Krstin, Ljiljana; Katanić, Zorana; Poljak, Igor; Idžojtić, Marilena; Ježić, Marin Dynamics of *Cryphonectria Parasitica* Populations and Associated Cryphonectria Hypovirus 1 Prevalence in North-Western Croatia // FEMS 2020 Online Conference - Abstract Book. 2020. str. 80-80
8. Peranić, Karla; Leigh, Deborah M; Morić, Maja; Nuskern, Lucija; Ćurković-Perica, Mirna; Kupper, Quirin; Cornejo, Carolina; Rigling, Daniel; Ježić, Marin Long read sequencing characterization of intra-host viral variants following vertical transmission of *Cryphonectria hypovirus 1* // 7th Croatian Congress of Microbiology with International Participation - Book of Abstracts. 2022. str. 40-40
9. Ježić, Marin; Ćurković-Perica, Mirna; Nuskern Karaica, Lucija; Peranić, Karla; Leigh, Deborah Marie; Riglin, Daniel; Prospero, Simone; Poljak, Igor; Idžojtić, Marilena *Cryphonectria hypovirus 1* spread across its host populations in Europe // Bio-X Croatia & scientific mission Zagreb, Hrvatska, 28.05.2024-04.06.2024
10. Ježić, Marin; Peranić, Karla; Leigh, Deborah Marie; Popović, Maja; Ćurković-Perica, Mirna; Cornejo, Carolina; Kupper, Quirin; Nuskern Karaica, Lucija; Rigling, Daniel;

Prospero, Simone Viral population diversity changes after vertical and horizontal transmission // Power of Viruses 2024: Book of abstracts / Tabain, Irena; Jagušić, Maja; Ivančić Jelečki, Jelena, Vilibić Čavlek, Tatjana et al. (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2024. str. 102-102

11. Ježić, Marin; Peranić, Karla; Leigh, Deborah M; Popović, Maja; Ćurković-Perica, Mirna; Kupper, Quirin; Nuskern-Karaica, Lucija; Rigling, Daniel Horizontal and vertical transmission of mycovirus CHV1 differently affect viral populations // VI International Mycovirus Symposium, Abstracts / N/A (ur.). Helsinki: N/A, 2025. str. 57-57
12. Ćurković-Perica, Mirna; Ježić, Marin; Krstin, Ljiljana; Katanić, Zorana; Nuskern Karaica, Lucija; Poljak, Igor; Liber, Zlatko; Peranić, Karla; Popović, Maja; Vidaković, Antonio et al. Trilateral interaction between chestnut, chestnut blight fungus and the biocontrol agent *Cryphonectria hypovirus 1*: the role of chestnut // VI International Mycovirus Symposium, Abstracts / N/A (ur.). Helsinki: N/A, 2025. str. 51-51
13. Ježić, Marin; Ćurković-Perica, Mirna; Poljak, Igor; Idžojtić, Marilena; Nuskern Karaica, Lucija; Krstin, Ljiljana; Katanić, Zorana; Liber, Zlatko; Peranić, Karla et al. Variability in sweet chestnut susceptibility to chestnut blight disease // Forest Protection and Today's Challenges - Switzerland, Slovenia and Croatia, book of abstracts. Zagreb: Šumarski fakultet, 2025. str. 11-11