

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Andrej GREGORI

**UGOTAVLJANJE VIRUSOV V GOJENIH IN
SAMONIKLIH GOBAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2004

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Andrej GREGORI

UGOTAVLJANJE VIRUSOV V GOJENIH IN SAMONIKLIH GOBAH

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF VIRUSES IN CULTIVATED AND NATIVE
MUSHROOMS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2004

Ljubezen doktorja filozofije

Mož je delal doktorat iz filozofije. Žena je ugotovila, kako resno jemlje svoj študij tistega dne, ko ga je vprašala: »Zakaj me tako zelo ljubiš?«

Kot iz puške je hitro odgovoril: »Ko rečeš 'tako zelo', ali misliš na intenzivnost, globino, kvaliteto ali trajanje?«

***Z razrezovanjem cvetnih listov
Še nihče ni spoznal lepote vrtnice.***

Anthony de Mello

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo in na Katedri za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Franca Pohlevna, za somentorja pa izr. prof. dr. Majo Ravnikar.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: prof. dr. Katja VADNAL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Franc POHLEVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
- Član: izr. prof. dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo
- Član: izr. prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 3.12.2004

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andrej GREGORI

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 582.284:635.82:578.76 (043.2)
KG	gobe/virusi/ELISA/ <i>Agaricus bisporus</i> /MV1/La France bolezen
AV	GREGORI, Andrej
SA	POHLEVEN, Franc (mentor) / RAVNIKAR, Maja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2004
IN	DOLOČANJE VIRUSOV V GOJENIH IN SAMONIKLIH GOBAH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 42 str. [8] str., 8 pregl., 8 sl., 7 pril., 39 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Visoka prisotnost MV1 (mushroom virus1) v tkivu gob nakazuje nevarnost okužbe z virusi, ki povzročajo La France bolezen pri gobah vrste <i>Agaricus bisporus</i>. S pomočjo TAS-ELISA in elektronske mikroskopije smo določali prisotnost MV1, ki ga povezujejo z La France boleznijo v gojenih gobah. Iz rezultatov TAS-ELISA primerjanih z negativno kontrolo smo ugotovili, da je pri nekaterih slovenskih gojiteljih MV1 prisoten pri vrsti <i>A. bisporus</i>. Pojavlja pa se tudi pri gobah vrste <i>Polyporus tuberaster</i>, <i>Agaricus campestris</i> ter <i>Agrocybe aegerita</i>. Ko tkivo gob prenesemo na hranilno gojišče, se prisotnost MV1 poveča, zmanjša, ali pa ostane enaka. MV1 je prisoten pri samoniklih gobah vrst <i>Russula olivacea</i>, <i>Russula albonigra</i>, <i>Lactarius vellereus</i> in <i>Collybia maculata</i>. Na hranilnem gojišču smo merili hitrost rasti podgobja <i>A. bisporus</i>, okuženega z MV1. S pomočjo elektronske mikroskopije smo opazovali 25–30 nm velike delce v podgobju in trosnjakih <i>A. bisporus</i>, kateri so bili po rezultatih ELISA testa okuženi z MV1.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 582.284:635.82:578.76 (043.2)
 CX mushrooms/viruses/ELISA/*Agaricus bisporus*/MV1/La France disease
 AU GREGORI, Andrej
 AA POHLEVEN, Franc (supervisor) / RAVNIKAR, Maja (co-supervisor)
 PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2004
 TI DETECTION OF VIRUSES IN CULTIVATED AND NATIVE MUSHROOMS
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO X, 42, [8] p., 8 tab., 8 fig., 7 ann., 39 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB High levels of MV1 (Mushroom Virus 1) in mushroom tissue are indicators for the presence of viruses associated with La France disease infecting *A. bisporus*. We determined the presence of MV1 in cultivated and native mushrooms with TAS-ELISA and electron microscopy. From results of TAS-ELISA compared with negative control, we found out presence of MV1 in same samples of *A. bisporus* collected on Slovenian mushroom farms. MV1 were also present in samples of *Polyporus tuberaster*, *Agaricus campestris* and *Agrocybe aegerita*. When mushroom tissue is transferred onto growth medium, the presence of MV1 increases, decreases or stays the same. MV1 is also present in *Russula olivacea*, *Russula albonigra*, *Lactarius vellereus* and *Collybia maculata*. We measured growth of *A. bisporus* mycelium on growth medium (PDA). With electron microscopy we observed 25–30 nm particles in *A. bisporus* mycelium and mushrooms, infected with MV1 as determined with ELISA.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 GOBJI VIRUSI	2
2.2 LA FRANCE BOLEZEN	2
2.2.1 Etiologija La France bolezni	3
2.2.2 Vloga dsRNA pri La France bolezni	4
2.2.3 Bolezenska znamenja virusne okužbe pri La France bolezni	5
2.2.4 Virusi La France bolezni	6
2.2.4.1 Virus La France bolezni (LIV)	6
2.2.4.2 Gobji baciliformni virus (MBV)	7
2.2.4.3 Vezikularni virus (VV)	7
2.2.4.4 <i>Agaricus bisporus</i> virus 1 (MV1)	8
2.2.5 Drugi virusi <i>Agaricus bisporus</i>	8
2.2.5.1 Gobji virus X (MVX)	8
2.3 NAČIN PRENOSA VIRUSOV	8
2.3.1 Vertikalni prenos	8
2.3.2 Horizontalni prenos	9
2.4 DIAGNOSTIKA	9
2.4.1 DsRNA analiza	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Glive	11
3.1.1.1 <i>Agaricus bisporus</i> (gojitveni kukmak ali šampinjon)	11

3.1.1.2	Druge glive	11
3.1.2	Sestava pufrov za elektronsko mikroskopijo	12
3.1.3	Sestava pufrov za ELISA	12
3.1.4	Sestava hranilnega gojišča s krompirjevim ekstraktom in glukozo (PDA)	13
3.2	METODE	14
3.2.1	Uporabljeni vzorci	14
3.2.2	Priprava vzorcev iz trosnjakov za ELISA test	14
3.2.3	Priprava vzorcev iz kultur na hranilnem gojišču za ELISA test	15
3.3	DOLOČANJE PRISOTNOSTI MV1 S TAS-ELISA	15
3.3.1	Postopek ELISA	16
3.3.2	Obdelava ELISA podatkov	19
3.4	DOLOČANJE VIRUSOV Z ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO	19
3.4.1	Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo	19
3.5	MERITVE HITROSTI RASTI KULTUR NA HRANILNEM GOJIŠČU	21
3.5.1	Obdelava podatkov meritev hitrosti rasti	21
4	REZULTATI	22
4.1	ELISA	22
4.2	MERITVE HITROSTI RASTI MICELIJA	31
4.3	DOLOČANJE VIRUSOV Z ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1	RAZPRAVA	34
5.2	SKLEPI	37
6	POVZETEK	38
7	VIRI	39
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo	20
Preglednica 2: Določanje prisotnosti MV1 v zmrznjenih trosnjakih <i>Agaricus bisporus</i> z ELISA	24
Preglednica 3: Določanje prisotnosti MV1 v podgobju <i>Agaricus bisporus</i> z ELISA	25
Preglednica 4: Primerjava ELISA rezultatov za MV1 pri podgobju s hranilnega gojišča in zmrznjenih trosnjakih <i>Agaricus bisporus</i>	26
Preglednica 5: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v trosnjakih in podgobju samoniklih gliv	27
Preglednica 6: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA testom pri zaprtotrosnicah	29
Preglednica 7: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA pri podgobju gojenih gliv	30
Preglednica 8: Hitrosti rasti pri kulturi <i>Agaricus bisporus</i> na hranilnem gojišču	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sektoriranje micelija <i>Agaricus bisporus</i> na hranilnem gojišču	6
Slika 2: Mesto vzorčenja tkiva trosnjaka (Stamets, 2000)	15
Slika 3: Shematski prikaz ELISA	16
Slika 4: Shematski prikaz postopka ELISA	18
Slika 5: Merjenje hitrosti rasti z MV1 okuženega micelija <i>Agaricus bisporus</i> na hranilnem gojišču	21
Slika 6: Hitrost rasti kultur <i>Agaricus bisporus</i> na hranilnem gojišču	32
Slika 7: Virusni delci velikosti 25-30 nm opazovani z elektronskim mikroskopom	32
Slika 8: Merjenje hitrosti rasti z MV1 okuženega micelija <i>Agaricus bisporus</i> na hranilnem gojišču	36

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v zmrznjenih trosiščih *Agaricus bisporus*.
- Priloga B: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih kultur gojenih in samoniklih gob na hranilnem gojišču.
- Priloga C: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih kultur gojenih in samoniklih gob na hranilnem gojišču.
- Prologa D: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih zmrznjenih trosišč samoniklih gob.
- Priloga E: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč (lističih plodišč) samoniklih gob ter kultur *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču.
- Priloga F: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč samoniklih gob, kultur *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču ter hranilnega gojišča brez kulture.
- Priloga G: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč samoniklih gob.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNA dezoksiribonukleinska kislina

dsRNA dvojna vijačnica ribonukleinske kisline

ELISA (angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - encimsko imunoserološki test

kbp kilobazni par

LIV (angl. La France disease Isometric Virus) - virus La France bolezni

MBV (angl. Mushroom Baciliform Virus) - gobji baciliformni virus

MV1 (angl. Mushroom Virus 1) - gobji virus 1

MVX (angl. Mushroom Virus X) - gobji virus X

PCR (Polimerase Chain Reaction) - verižna reakcija s polimerazo

PDA (angl. Potato Dextrose Agar) – krompir – dekstrozni agar

RdRp (angl. RNA dependent RNA polymerase) – od RNA odvisna RNA polimeraza

RNA ribonukleinska kislina

ssRNA enojna vijačnica ribonukleinske kisline

TAS-ELISA (angl. Tripple Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – trojni sendvič ELISA test

1 UVOD

Že daljše obdobje se po celem svetu v gobarnah, kjer gojijo *Agaricus bisporus* (gojitveni kukmak ali šampinjon), pojavljajo trosnjaki (gobe) deformiranih oblik. Prav tako so na gojitvenih gredicah predeli s počasno ali popolnoma zaustavljeno rastjo podgobja (micelija). Vzroki za počasno rast so lahko posledica različnih dejavnikov, kot so režim zalivanja, temperatura, zračenje (vlaga), priprava in stopnja preraščenosti komposta s podgobjem, plesni itd. Lahko pa so posledica prisotnosti povzročiteljev bolezni, med katerimi opisanim pojavom najbolj ustrezajo okužbe z virusi.

V slovenskem prostoru ni podatkov o izpadih pridelka in pojavih deformiranih trosnjakov, ki bi lahko bili znaki okuženosti z mikovirusi.

Namen diplomske naloge je uvedba različnih metod določanja virusov v gojenih in samoniklih glivah ter določitev prisotnosti virusa MV1 (Mushroom Virus 1), ki ga povezujejo z La France boleznijo pri *Agaricus bisporus*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOBJI VIRUSI

Viruse, ki okužujejo glive, imenujemo mikovirusi. Po prvih navedbah prisotnosti virusov pri nekaterih gojenih vrstah gliv se je zvrstilo še več odkritij virusov in virusom podobnih delcev v glivah in zato 60ta leta 20. stoletja veljajo za rojstvo mikovirologije (Sinden in Hauser, 1950). Le nekaj od primerov virusnih delcev je bilo podrobno opisanih in še manj je bilo prenesenih in dokazano infektivnih.

Velika večina mikovirusov je latentnih, kar pomeni, da se okužbe z njimi ne izražajo z bolezenskimi znamenji. Izjema je infektivna, degenerativna bolezen gojenih gob *Agaricus bisporus*, ki jo povzroča virusni kompleks (Hollings, 1962; Hollings in Stone, 1971; Dieleman-van Zaayen, 1972).

2.2 LA FRANCE BOLEZEN

Leta 1950 je bilo opisano nevarno infektivno obolenje šampinjonov *Agaricus bisporus*, ki se je pojavilo v komercialni gobarni šampinjonov v Združenih državah Amerike (Sinden in Hauser, 1950). V 70tih letih je bila ta bolezen v severni Ameriki in Evropi glaven dejavnik zmanjševanja količine komercialno pridelanih gob (Romaine, 1987).

V tej kritični situaciji je bilo potrebno za učinkovito posredovanje čim hitreje določiti povzročitelja bolezni in vire okužb. Danes se ta bolezen imenuje La France bolezen. Pojavlja se in resno ogroža pridelke šampinjonov po celem svetu. Dieleman-van Zaayen (1972) je poročala, da je od 1100 pregledanih vsaka tretja gobarna na Nizozemskem prizadeta zaradi La France bolezni.

Hollings (1962) je v svoji raziskavi predlagal vzročno opazovanje treh virusnih fragmentov v okuženih tkivih.

V naslednjih letih je bilo v podgobju in trosnjakih *A. bisporus* odkritih ogromno število različnih virusnih delcev. Nekateri virusni delci so bili odkriti tako v tkivih z bolezenskimi znamenji, kot v zdravih tkivih, kar je močno prispevalo k dvomu o La France bolezni.

Passmore in Frost (1979) sta v vseh 500 vzorcih zdravih in gob z bolezenskimi znamenji 20 različnih tipov starter kultur, zbranih v 13 različnih gobarnah (ki so predstavljale 35 % celotnega pridelka gob v Veliki Britaniji), odkrila virusom podobne delce. Vzorci zdravih trosnjakov so včasih vsebovali enako, pri nekaterih pa še celo večje število virusnih delcev, kot vzorci iz trosnjakov z znaki okužbe.

2.2.1 Etiologija La France bolezni

Vsi dokazi podpirajo vlogo LIV (La France Izometrični Virus) v etiologiji La France bolezni (Passmore in Frost, 1979; Wach in sod., 1987; Harmsen in sod., 1989; Koons in sod., 1989; Goodin in sod., 1992; Romaine in sod., 1993). Baciliformen, ssRNA virus (19×50 nm), poznan kot MBV (Mushroom Baciliform Virus - gobji baciliformni virus), spremlja LIV v nekaterih primerih bolezni, čeprav je njegova povezanost s patologijo manj jasna (Tavantzis in sod., 1980).

RT-PCR analiza izolatov iz trosnjakov nabranih na geografsko raztresenih regijah v obdobju 14 let je pokazala, da je od dveh virusov LIV prevladujoče povezan z La France boleznijo. Od 70 izolatov trosnjakov z bolezenskimi znamenji jih je bilo 100 % okuženih z LIV, medtem, ko jih je le 60 % poleg LIV vsebovalo tudi MBV. Ti podatki močno nakazujejo na to, da je LIV prvoten etiološki povzročitelj in da MBV ni potreben za patogenezo (Romaine in Schlagnhauer, 1995).

LIV in MBV med seboj nista odvisna za pomnoževanje, saj so bili odkriti tudi primeri, ko sta bila posamezno prisotna v izolatih trosnjakov (Romaine in Schlagnhauer, 1995). Izolat podgobja s posameznim virusom ostane enak tudi po več zaporednih precepitvah na hranilnih gojiščih, kar je še dodaten dokaz za to, da sta LIV in MBV med seboj neodvisna pri pomnoževanju (Romaine in Schlagnhauer, 1995). Eden od dokazov za neodvisnost pri pomnoževanju med LIV in MBV je tudi ta, da naj bi bil v genomski RNA MBV-ja zapis za replikazo, ki ni značilna za satelitske viruse brez sposobnosti za samopomnoževanje (Revill in sod., 1994).

Vprašanje je, ali okužba samo z MBV spreminja fenotip glive in slabi ali zmanjšuje simptome, povezane z LIV (Romaine in Schlagnhauer, 1995).

V raziskavi, ki sta jo opravila Romaine in Schlagnhauer leta 1989 je od 128 izolatov, za katere so sumili, da so okuženi z La France boleznijo, bil LIV klinično dokazan le v 70 izolatih, MBV pa le v treh

Ni pa znano, ali so bolezenska znamenja pri izolatih, ki niso vsebovali LIV posledica okužb z drugimi virusi, genetičnih *A. bisporus* in neugodnih dejavnikov okolja ali slabe gojitvene prakse.

Na osnovi dejstev ni mogoče sklepati o patogenosti MBV. Nadaljne raziskave so potrebne za ugotovitev, ali je MBV stranski povzročitelj La France bolezni, ali pa njegova navzočnost ne povzroča bolezenskih znamenj.

Delež okužb z MBV je skoraj 60 % pri LIV pozitivnih izolatih gob v primerjavi s 5 % okužbo pri LIV negativnih izolatih gob. Lahko bi sklepali, da MBV pridobiva prednost za preživetje v povezavi z LIV. Študije pa ne podpirajo recipročne prednosti za LIV, kajti

frekvence tega virusa v enojnih in dvojnih infekcijah, 40 % oziroma 60 %, niso bile primerljive (Romaine in Schlagnhauer, 1995).

Podrobne raziskave ultrastruktur izometričnih virusov v celicah gliv so razkrile ključen vzorec njihove lokalizacije v celici. V primeru *A. bisporus* (Dieleman-van Zaayen in Igesz, 1969; Dieleman-van Zaayen, 1972), se gosti agregati virusnih delcev pojavljajo v citoplazmi, včasih poleg sept vegetativnih celic. LIV so raztreseni v citoplazmi ali v vakuolah. Pojavljanje LIV v in okoli por sept nakazuje na medcelično migracijo. V sporah se skupine LIV nahajajo v vakuolah ali v citoplazmi.

2.2.2 Vloga dsRNA pri La France bolezni

Večina gobjih virusov ima dsRNA genom (Buck, 1986; Ghabrial, 1998) in zaradi tega je detekcija dsRNA v simptomatičnem tkivu zadosten razlog za prisotnost virusov pri La France bolezni. Več dokazov vključuje določen komplet šestih glavnih dsRNA in več stranskih segmentov v etiologiji bolezni.

- dsRNA so nenehno prisotne v plodiščih in kulturah micelija, pri katerih se kažejo simptomi bolezni (Ross in sod., 1986; Romaine, 1987; Wach in sod. 1987; Harmsen in sod., 1989; Koons in sod., 1989; Romaine in Schlagnhauer, 1989).
- dsRNA so edine molekule, ki se aktivno podvajajo v tkivih z bolezenskimi znamenji (Koons in sod., 1989).
- dsRNA zgubijo na pomenu pri kulturah micelija z izginotjem bolezenskih znamenj (Koons in sod., 1989).
- Uspešno se prenašajo s spolnimi sporami *A. bisporus* (Romaine in sod., 1993), kar se ujema z znanimi načini razširjanja povzročiteljev bolezni (Schisler in sod., 1967).

Vzorec dsRNA, ki je bil najpogostejše povezan z La France boleznijo, je sestavljen iz šestih glavnih segmentov dsRNA: L1 (3,8 kbp), L2 (3,1 kbp), L3 (3,0 kbp), L4 (2,8 kbp), L5 (2,6 kbp), in M2 (1,3 kbp) ter treh manjših dsRNA, katere se pojavljajo v submolarne količinah, M1 (1,7 kbp), S1 (0,9 kbp) in S2 (0,8 kbp) (Marino in sod., 1976; Romaine, 1987; Wach in sod., 1987; Harmsen in sod., 1989; Romaine in Schlagnhauer, 1989).

Poleg devetih najpogostejše prisotnih dsRNA, je bilo izoliranih še nekaj manjših, za to bolezen značilnih dsRNA, kot so S3 (0,5 kbp), S4 (0,48 kbp), S5 (0,4 kbp) in S6 (0,38 kbp) (Wach in sod., 1987).

Z uporabo gelske analize in barvanja z etidijevim bromidom je bila ugotovljena velika raznolikost devetih dsRNA. Varirala je od okuženega izolata, ki je vseboval vseh 13 dsRNA do izolatov, katerim so manjkali S1-S6 in dveh izolatov, katera sta kazala delečijo

M1 ali M2 (Wach in sod., 1987). Manjše razlike v velikostih različnih dsRNA, katere zasledimo pri različnih poročilih raziskovalnih skupin, najbrž izražajo elektroforetski artefakt, ne pa resnično razliko v RNA.

2.2.3 Bolezenska znamenja virusne okužbe pri La France bolezn

Obolel micelij ponavadi normalno preraste kompost, je običajne barve, vitalnosti in gostote, preden je dodana pokrivka. Rast v pokrivko je lahko šibka, odvisno od stopnje razvoja, v kateri je bil micelij okužen. Micelij se lahko postopoma razgradi ali izgine s pokrivke, prav tako s komposta. Razpad micelija je precej manj izrazit pri Golden White varieteti kot pri Snow White varieteti (Schisler in sod., 1967).

Okužene kulture micelija rastejo hitreje. Trosnjaki, izraščajoči iz okuženega podgobja zrastejo hitreje, so manjši in navadno deformirani, hitro so podvrženi razgradnji (tako nastopi razgradnja, katera hitro napreduje in trosnjaki popolnoma razpadejo v nekaj dneh). Klobuki so manjši, beti pa daljši in tanjši (sindrom bobnarskih palčk), velikokrat so prisotni pritlikavi primerki.

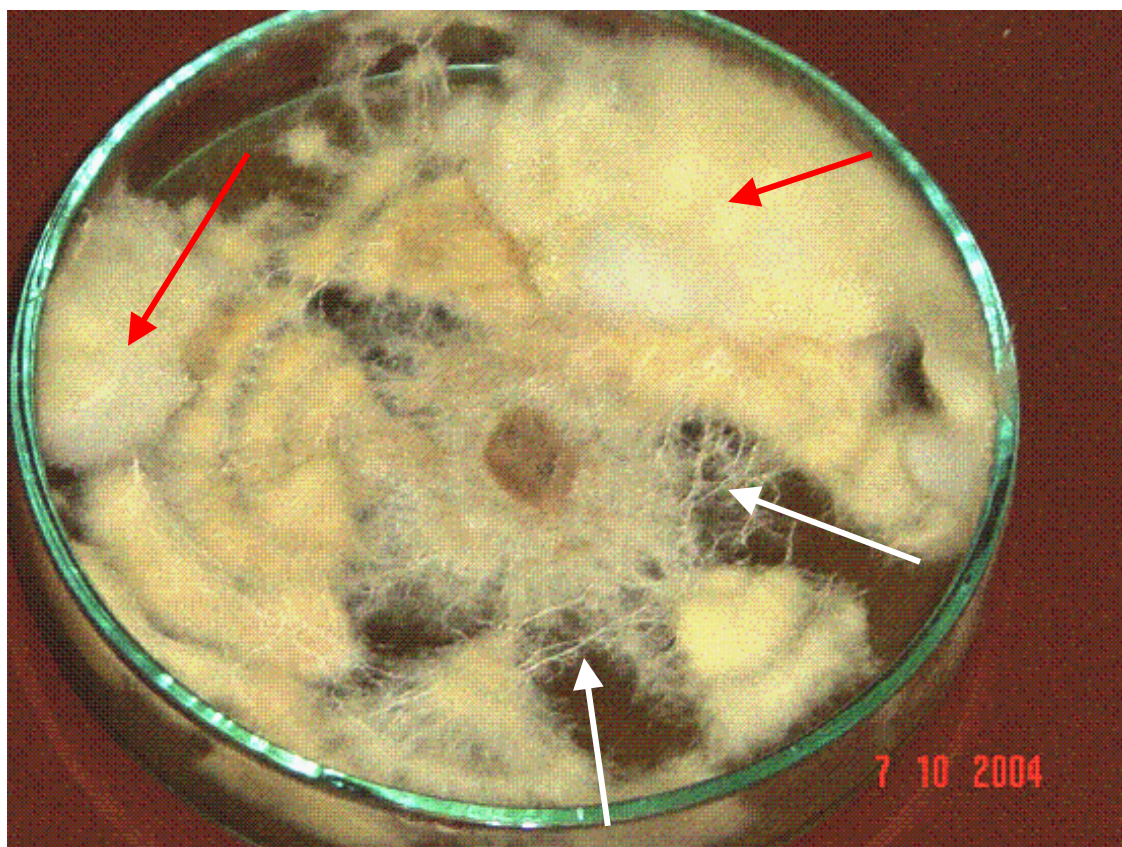
Na gojitvenih gredicah se pojavljajo neporasli predeli, na katerih ni primordijev in gob. Te predele pa obkrožajo gobe, ki so zrelejše, kot gobe na ostalih predelih gojitvene gredice. Kot znak okužbe se lahko pojavi tudi obrod pod površjem pokrivke.

Spore pri okuženih gobah se pojavijo prej, vendar je njihovo število manjše. Klijoče spore iz zdravih trosnjakov kažejo tipične znake močne, vataste rasti micelija, medtem ko spore iz okuženih trosnjakov tvorijo šibek, ob podlago pritisnjen micelij, značilen za La France bolezen. Kulture iz okuženih spor se razlikujejo v hitrosti in vitalnosti rasti glede na varieteto gobe, nekatere pa so popolnoma identične zdravim kulturam (Schisler in sod., 1967).

Pogosto se na pokrivki in na kompostu pojavlja tekmovalna plesen *Geotrichium spp.* Okužba se hitro širi po gobarni in razširjanje med bližnjimi gobarnami je možno, še posebej med tistimi, ki uporabljajo glive s kompatibilnimi hifami (Romaine in sod., 1993). Virus se širi vertikalno in horizontalno.

Okužbe močno zmanjšujejo količino pridelkov, kar pa je zelo odvisno od gojene varietete in od stopnje razvoja, v kateri je prišlo do okužbe.

Rast okuženega micelija na hranilnem gojišču je redka ter počasna, micelij je pritisnjen ob podlago. Kolonije imajo zrnast videz in ne tvorijo rizomorfov. Opazno je rahlo rjavo obarvanje. Robovi kolonij so neenakomerni, z določeno mero razbrazdanja (Romaine in sod., 1993). Neokužen micelij tvori rizomorfe ter vataste predele rasti in raste hitreje (slika 1).



Slika 1: Sektoriranje micelija *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču (vidni so vatasti (rdeče puščice) in rizomorfni (bele puščice) predeli razrasti).

2.2.4 Virusi La France bolezni

2.2.4.1 Virus La France bolezni

LIV je bil prvi virus, vzročno povezan z La France boleznijo. Ponekod ga imenujejo ABV1 (*A. bisporus* virus 1), ker še vedno ni dokazana vzročna povezava med virusom in La France boleznijo.

LIV je sestavljen iz devetih dsRNA, velikosti od 0,8 do 3,8 kbp, katere se nahajajo v 36 nm velikih izometričnih delcih (Barton in Hollings, 1979).

Kot je tipično za dsRNA viruse, vsebuje LIV od RNA odvisno RNA polimerazo (RdRp), ki sintetizira ssRNA ustrezno vsaki posamezni dsRNA.

Informacija o sekvencah je na voljo za nekaj dsRNA. 3,8 kbp dsRNA nosi zapis za RdRp, 3,0 kbp dsRNA kodira glavni ključni virusni protein in 1,3 kbp dsRNA kodira citoplazmatski protein. Raziskave z radioaktivnimi metodami so pokazale, da so dsRNA virusa LIV edine dvojne molekule RNA, ki se aktivno pomnožujejo v tkivih z bolezenskimi znamenji (Koons in sod., 1989). LIV se uspešno prenaša s spolnimi sporami *A. bisporus* (Romaine in sod., 1993). Ta način prenosa se sklada s prepoznanim načinom prenosa domnevnih povzročiteljev bolezenskih znamenj (Schisler in sod., 1967).

Micelij, okužen z LIV na hranilnem gojišču, raste trikrat počasneje, je nižje rasti in močno obarvan (Koons in sod., 1989).

2.2.4.2 Gobji baciliformni virus (MBV)

Virus, imenovan gobji baciliformni virus, vsebuje genom sestavljen iz ene linearne pozitivno orientirane RNA molekule (Molin in Lapierre, 1973) velikosti 4 kbp. Virus dimenzij 19×50 nm je v baciliformne oblike. Je enkratni med mikovirusi višjih gliv, saj ima ssRNA genom, medtem ko imajo vsi drugi mikovirusi dsRNA genome (Buck, 1986; Ghabrial, 1998).

Genom MBV vsebuje štiri glavne bralne okvire, od katerih eden kodira protein kapside, drugi pa domnevno RdRp. Pregled izolatov gob s PCR je pokazal, da MBV ni nujen za patogenost, je pa v približno 60 % primerov La France bolezni prisoten poleg LIV. Močno očiščeni virioni MBV-ja ne vsebujejo dsRNA, ampak 4,4 kbp ssRNA, katera ne kaže močne sekvenčne ustreznosti v razvoju in poteku z za bolezen značilnimi dsRNA (Romaine in Schlaghauser, 1991).

2.2.4.3 Vezikularni virus (VV)

Vezikularni virus (VV) je sestavljen iz treh dsRNA velikosti 2,4, 5,2 in >13 kbp vsebovanih v 75 nm velikem membranskem veziklu (Barton in Hollings, 1979). VV je množično razširjen v sevih komercialnih hibridov gob, vendar ga še niso povezali z določenim fenotipom. Prisoten je tako v zdravih, kot v gobah z bolezenskimi znamenji.

2.2.4.4 *Agaricus bisporus* virus 1 (MV1)

Delci MV1 so izometrični, premera 25nm in se vsedajo pri 90 - 100 S. Posamezen protein ovojnice obdaja dve dsRNA, dolžine približno 2 kbp. Virus je prisoten v zdravih gobah, njegovo število pa se poveča ob prisotnosti La France bolezni.

2.2.5 Drugi virusi *Agaricus bisporus*

2.2.5.1 Gobji virus X (MVX)

Leta 1996 se je pojavila v večih gobarnah v Veliki Britaniji virusna bolezen, pri kateri ni bila ugotovljena prisotnost LIV virusa. Ko je postal problem bolj razširjen in brez določenega jasnega vzroka, so bili opravljeni mnogi testi za ugotavljanje prisotnosti virusov.

Ugotovili so, da vsebujejo vzorci gob nove dsRNA, ki še niso bile prej določene (Grogan in sod., 2003). Prisotnost novih dsRNA so povezali s simptomi virusne okužbe v gobarnah Velike Britanije in povzročitelja bolezni poimenovali gobji virus X (MVX).

Okužbe z MVX povzročajo obsežne neporasle predele na gojitvenih gredicah ter zaostanek v razvoju gob. Zaradi tega so veliki izpadi pridelka (40 - 80 %) (Grogan in sod., 2003).

2.3 NAČIN PRENOSA VIRUSOV

2.3.1 Vertikalni prenos

Virusi preidejo v razmnoževalne dele gliv in zato se pojavljajo tudi v naslednji generaciji. Vertikalna širitev je povezana z zgodnjim pojavom in izločanjem spor z okuženih trosnjakov. Spore se tvorijo manj pogosto, vendar pa jih vzklije več in vzniknejo hitreje (Schisler in sod., 1967; Dieleman-van Zaayen, 1970). Spore so zaradi visoke koncentracije, s katero se srečamo v gobarnah, primarni izvor okužbe in širjenja (Romaine in sod., 1993). Ocenjeno je, da naj bi z izpihanim zrakom iz gobarn prihajalo približno 3,7 milijona spor na minuto (Schisler in sod., 1967; Passmore in Frost, 1979).

Za prenos okužbe na zdrav pridelek zadostuje že deset bazidiospor (Schisler in sod., 1967).

Spore se po kalitvi povezujejo z zdravimi hifami in jih okužijo z virusom. Z LIV je okuženih okoli 70 % živih bazidiospor, izločenih s trosnjakov z bolezenskimi znamenji (Romaine in sod., 1993).

Okužene spore kalijo hitreje in bolj pogosto, kar igra pomembno vlogo pri prenosu virusa (Dieleman-van Zaayen, 1972). Prenos s sporami je edini način za obstoj virusa v

nevegetativni fazi gobjega gostitelja. V primeru, da gojitelji gob uporabljajo samo en sev gliv je možnost okužbe večja, saj so hife bolj kompatibilne. Uporaba različnih sevov zmanjša verjetnost prenosa. Vendar je možnost, da imajo tudi nesorodne vrste nizko stopnjo kompatibilnosti hif, kar pomeni, da lahko tu in tam pride do anastomoze in z njo do prenosa virusa. Popolna nekompatibilnost je redka in zato ostaja okužba z virusi potencialna nevarnost za vse gobarne. Zaradi tega je za kontrolo okužb najučinkovitejša izločitev bazidiospor iz zraka, vpihanega v gobarno.

Pomembno vlogo pri prenosu igrajo vegetativno agresivne okužene spore, ker rastejo hitreje in s tem se poveča možnost, da pridejo v stik s konico zdravega micelija (Romaine in sod., 1993).

2.3.2 Horizontalni prenos

Pri združitvi dveh kompatibilnih hif se prenesejo virioni do neokuženega micelija preko citoplazme, ki vsebuje viruse. To pomeni, da lahko majhna količina okuženega podgobja hitro okuži celotno gojitveno gredico. Kompatibilnost hif igra tukaj odločilno vlogo, saj določa, ali se bo virus prenesel ali ne. Zato je izredno pomembna pri etiologiji virusa, še posebno, če ta povzroča bolezen.

2.4 DIAGNOSTIKA

Diagnostika virusnih infekcij gob je v preteklosti temeljila na treh tehnikah – pregledu bolezenskih znamenj na pridelku, meritvah zavrnosti rasti micelija in na opazovanju virusnih delcev z elektronskim mikroskopom.

Prvi način diagnosticiranja je pomanjkljiv, ker je izražanje okužbe odvisno od posameznih virusov, hibrida gobe ali okoljskih dejavnikov.

Drugi način je na začetku veliko obetal (Gandy, 1962; Hollings in sod., 1963), vendar se je kasneje izkazal za nezanesljivega (Last in sod., 1967; Hollings in sod., 1970; Last in sod., 1974).

Tretji način, vizualizacija virusnih delcev v ekstraktih plodišč, se je v preteklosti izkazal za najzaneslivejšega. Največje probleme so predstavljali ostanki delcev gostitelja v ekstraktih, zaradi katerih svež sok iz plodišč ni bil uporaben in je bilo potrebno čiščenje le-tega. Za pridobitev vzorcev z visoko vsebnostjo virusnih delcev in čim manjšo vsebnostjo gostiteljskega materiala, se je najbolje izkazalo standardno obarjanje s citronsko kislino. Bistrenje homogenata s pomočjo kloroforma pred ali po obarjanju je odstranilo veliko večino gostiteljskega materiala, vendar je prišlo tudi do izgube virusnih delcev (Passmore in Frost, 1979). Opazovali so virusne delce, velikosti 34 nm, ki so se nahajali v citoplazmi celic (Schmidt, 1985).

Od različnih vrst kemikalij, katere so bile dodane ekstrakcijskemu pufru z namenom preprečitve izgube virusnih delcev zaradi fenolnih spojin, se je najboljše izkazal 2-merkaptetoetanol.

Moffit in Lister (1973) sta poročala o uspešni uporabi antiseruma za dsRNA pri detekciji virusom podobnih delcev v več vrstah *Penicillium* in predlagala, da je ta tehnika vesplošno sprejemljiva za pregledovanje kultur gob za mikoviruse z dsRNA genomom. V kasnejšem obdobju so bile na področju diagnostike virusov narejene mnoge raziskave.

Z RT-PCR analizo so določali dva virusa z RNA genomom, La France izometričnega virusa (LIV) in baciliformnega gobjega virusa (MBV), v povezavi z La France boleznijo (Romaine in Schlagnhauser, 1995).

2.4.1 DsRNA analiza

Aplikacija dsRNA analize (Franklin, 1966; Bishop in Koch, 1969) kot raziskovalnega orodja je bila glavni dejavnik, ki je prispeval k napredku razumevanja etologije La France bolezni. Ta metoda je izkoriščala dejstvo, da ima večina virusov dsRNA genom in da ima vsak virus zanj značilen profil dsRNA, sestavljen iz različnega števila segmentov različnih velikosti. DsRNA analizi je uspelo tam, kjer je elektronski mikroskopiji spodletelo: pri razlikovanju med morfološko podobnimi virusi, ki pa se genetsko razlikujejo.

Leta 1976 so Marino in sodelavci prvič odkrili prisotnost številnih dsRNA v izolatih *A. bisporus* z bolezenskimi znamenji. Krajša različica tega postopka (Morris in Dodds, 1979) je omogočila analizo večjih populacij gob. Namen analize pa je bil raziskovanje razširjenosti in raznovrstnosti virusov v *A. bisporus*. Pregled, ki so ga izvedli v obdobju 1980 - 90 na gojenih gobah v ZDA in Evropi, je razkril povezavo med La France boleznijo in skupino dsRNA. Ta skrajno ohranjena skupina dsRNA je bila različna od tiste, ki se je pojavljala v zdravih primerkih (Romaine, 1987; Harmsen in sod., 1989; Koons in sod., 1989; Romaine in Schlagnhauser, 1989; Romaine in sod., 1994). Podatki z različnih koncev sveta, kateri so povezovali isto skupino dsRNA z nepravilnim razvojem gob, so prispevali dovolj močan dokaz, da gre za eno bolezen z eno virusno etiologijo, ki okužuje gojene gobe.

Ugotovljeno je bilo tudi, da ima temperatura velik vpliv na količino dsRNA v miceliju z bolezenskimi znamenji. Največja količina dsRNA je bila v kulturah, katere so rasle pri 21 in 24 °C. V enem poskusu v kulturah, inkubiranih pri 30 °C, niso našli dsRNA (Koons in sod., 1989).

Passmore in Frost (1979) sta ugotovila, da zamrzovanje plodišč pri -20 °C povzroča izgube virusnih delcev, daljše shranjevanje pri -20 °C pa močno zmanjša število virusnih delcev v ekstraktih trosnjakov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Glive

3.1.1.1 *Agaricus bisporus* (gojitveni kukmak ali šampinjon)

Agaricus bisporus je ena od najpogostejših gojenih gob, še posebno v Evropi in Severni Ameriki. Ima okroglast ali polkrožen, nato vbočen in končno sploščen klobuk bele, rožnate, sivkaste ali rjavkaste barve. Bet je čokat, pri nezrelih belkaste, pri zrelih trosnjakih rjavkaste barve. Lističi so gosti, rožnate, kasneje pa rjavkaste barve. Meso je bele barve, čvrsto in trdo. Trosnjaki imajo zastiralce bele barve. Trosi so čokoladno rjave barve.

Gojijo ga na kompostiranih organskih odpadkih (najpogosteje na mešanici gnoja in slame). Kompost po preraščanju z micelijem prekrijejo s pokrivko (pokrivni substrat), iz katere kasneje izraščajo gobe.

Uporabili smo štirinajst vzorcev (trosnjakov) vrste *A. bisporus*, nabranih v osmih slovenskih gobarnah na področju Notranjske, Štajerske in Koroške. Od tega je bilo enajst vzorcev bele in trije vzorci rjave različice *A. bisporus*. Iz trosnjakov smo izolirali tkivo in ga prenesli na hranilno gojišče, prav tako smo na hranilno gojišče prenesli izvirno kulturo bele različice *A. bisporus*. Trosnjake smo do uporabe hranili na -20 °C.

Za nadaljne delo smo uporabljali tkivo zamrznjenih trosnjakov in podgobje s hranilnega gojišča.

3.1.1.2 Druge glive

Uporabili smo sveže in zmrznjene trosnjake 62 vrst samoniklih gliv. Večino smo zbrali na gobarskih razstavah in determinacijah. Točna nahajališča pri večini niso znana. Na nekaterih lokacijah smo zbrali več primerkov iste vrste (*A. campestris*). Do uporabe smo nekatere hranili na -20 °C.

Za raziskave smo uporabili tudi podgobje samoniklih in gojenih gliv vzgojeno na hranilnem gojišču. Pri večini je bil znan vir kulture. Uporabili smo podgobje 26 različnih vrst gojenih in samoniklih gliv.

3.1.2 Sestava pufrov za elektronsko mikroskopijo

0.1M fosfatni pufer (PB)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$3,12 g

Na_2HPO_44,26 g

dodana bidestilirana voda do 500 ml
umerjeno na pH 7

3.1.3 Sestava pufrov za ELISA

10 × PBS pufer:

Natrijev klorid.....80 g

Kalijev dihidrogen ortofosfat.....2 g

Dinatrijev hidrogen ortofosfat (Na_2HPO_4).....11,5 g

Kalijev klorid (KCl).....2 g

dodano 1000 ml bidestilirane vode

ekstrakcijski pufer:

Polivinilpirolidon (PVP).....20 g

Ovalbumin.....2 g

Natrijev sulfit (brezvoden).....1,3 g

Tween 20.....0,5 ml

Natrijev klorid (NaCl).....8 g

Kalijev dihidrogen ortofosfat (KH_2PO_4).....0,2 g

Dinatrijev hidrogen ortofosfat (Na_2HPO_4).....1,15 g

Kalijev klorid (KCl).....0,2 g

dodana bidestilirana voda do volumna 1000 ml
umerjeno na pH 7,4

pufer za spiranje ploščic z vzorci:

10 × PBS.....100 ml

Tween 20.....0,5 ml

razredčen z 900ml destilirane vode
umerjeno na pH 7,4

coating pufer:

Natrijev karbonat1,59 g

Natrijev hidrožen katrbonat.....2,93 g

dodana bidestilirana voda do volumna 1000 ml

pH 9,6; umerjanje ni potrebno

konjugatni pufer:

Bovin serum albumin.....0,2 g

PBST.....100 ml

substratni pufer:

Dietanolamin.....90,39 g

Dietanolamin-HCl.....19,82 g

Magnezijev klorid.....0,1 g

dodana bidestilirana voda do volumna 1000 ml

pH 9,8; umerjanje ni potrebno

substrat:

1mg p-nitrofenil fosfata na 1ml substratnega pufra

3.1.4 Sestava hranilnega gojišča s krompirjevim ekstraktom in glukozo (PDA)

agar.....17 g

glukoza.....20 g

krompirjev ekstrakt.....4 g

Uporabljali smo že pripravljeno mešanico PDA proizvajalca Difco (Detroit, ZDA).

39 g mešanice PDA smo raztopili v 1 litru vode, avtoklavirali 45 minut pri 121 °C ter nalili v sterilne petrijeve posodice.

3.2 METODE

3.2.1 Uporabljeni vzorci

Uporabili smo več različnih vzorcev gob. Nekateri so bili pripravljene neposredno iz tkiva trosnjakov (svežih in zamrznjenih), nekateri pa iz micelija rastočega na hranilnem gojišču PDA. Podgobje na hranilnem gojišču je bilo inkubirano pri 24 °C.

Pri *A. bisporus* smo uporabljali trosnjake, vzgojene v slovenskih gobarnah s komposta, inokuliranega s starter kulturo sorte A15 (Sylvan) ter trosnjake rjave različice *A. bisporus* istega proizvajalca.

Trosnjaki samoniklih gliv so bili nabrani na področju Slovenije in Hrvaške. Pri večini točno nahajališče ni znano. Uporabljali smo sveže in zamrznjene trosnjake. Pri zamrzovanju trosnjakov smo pazili, da smo jih zamrznili v najkrajšem možnem času.

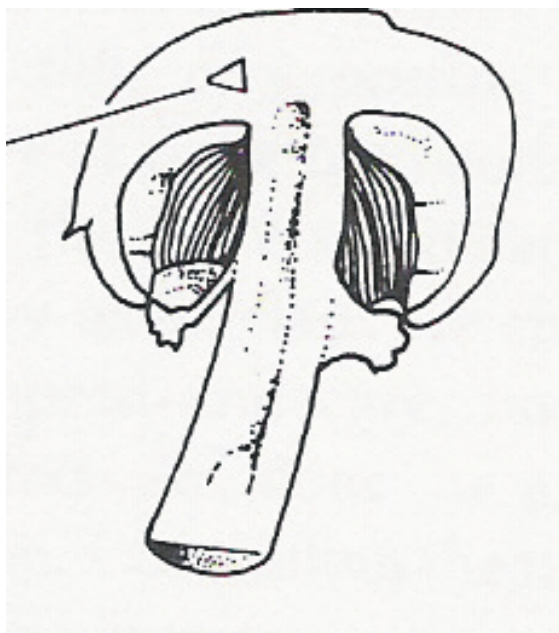
Večino kultur gojenih gob smo dobili iz banke gliv, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Ker se pri gojenju gob pogostokrat pojavljajo okužbe z glivami zaprtotrosnicami, smo kot vzorce uporabili tudi slednje (*Aspergillus sp.* ter mešanico zaprtotrosnic na hranilnem gojišču). Kot vzorec smo uporabili tudi čisto hranilno gojišče brez kulture, inkubirano pri 24 °C.

3.2.2 Priprava vzorcev iz trosnjakov za ELISA test

Uporabljali smo sveže in zamrznjene (-20 °C) trosnjake različnih vrst gojenih in samoniklih gliv. Trosnjake smo po dolgem prelomili in iz notranjosti odrezali delčke tkiva (slika 2). Na ta način smo se zavarovali pred možnostjo prisotnosti nečistoč iz okolja. Pri nekaterih trosnjakih smo za vzorec namesto notranjosti vzeli lističe trosišča.

Vzorec iz trosnjaka ali lističev trosišča smo prelili z ekstrakcijskim pufrom v razmerju 1ml pufra/0,1g vzorca, ga razdrobili s pomočjo paličice ter dobro premešali. Vzorec smo centrifugirali 13 minut pri 1000g in 4 °C. Supernatant smo uporabili pri TAS-ELISA.



Slika 2: Mesto vzorčenja tkiva trosnjaka (Stamets, 2000).

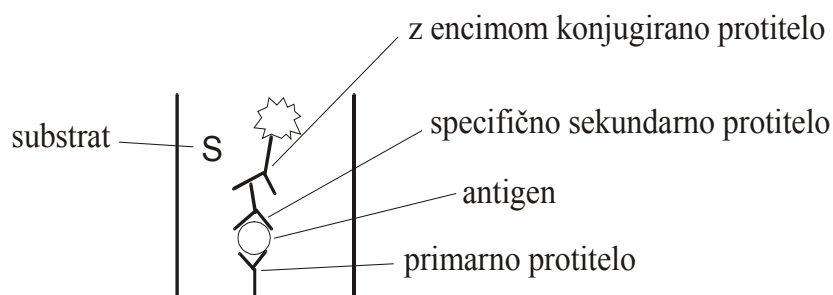
3.2.3 Priprava vzorcev iz kultur na hranilnem gojišču za ELISA test

Podgobje smo s pomočjo spatule previdno postrgali s površine hranilnega gojišča. Pri tem smo pazili, da smo zajeli čim manjšo količino gojišča. To bi namreč lahko vplivalo na rezultate. Pri nekaterih kulturah je podgobje zrastle po robu petrijeve posode, tako da smo ga dobili brez primesi gojišča.

Micelij smo prelili z ekstrakcijskim pufrom v razmerju 1ml pufra/0,1 g vzorca, ga zdrobili s pomočjo paličice ter dobro premešali. Vzorec smo centrifugirali 13 minut pri 1000g in 4 °C. Supernatant smo uporabili pri TAS-ELISA.

3.3 DOLOČANJE PRISOTNOSTI MV1 S TAS-ELISA

ELISA je serološka diagnostična metoda, pri kateri obstaja več različnih izvedb. Uporabili smo TAS-ELISA tehniko (v nadaljevanju ELISA). Pri tem postopku vezemo antigen neposredno na primarna specifična protitelesa, ki so vezana na nosilec. Po nanosu z encimom konjugiranih sekundarnih specifičnih protiteles, se le-ta vežejo na antigene, ki so prisotni le v primeru, če so se vezali na primarna protitelesa. Terciarna protitelesa se vežejo na sekundarna, če so se le-ta vezala na antigen. Po vsaki fazi z spiranjem namreč odstranimo preostale nevezane snovi, ki se lahko nabirajo na reakcijskem mestu. Tako zagotovimo, da ostanejo tam le specifično vezani reaktanti (slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz ELISA.

Uporabljali smo monoklonska primarna protitelesa za detekcijo MV1 (ADGEN, 1120), specifična sekundarna protitelesa in z encimom (alkalna fosfataza) konjugirana terciarna protitelesa.

Po trditvah proizvajalca ADGEN so protitelesa za ELISA specifična za MV1 ali za protein povezan z MV1 infekcijo.

Kot substrat smo uporabljali p-nitrofenil fosfat (Sigma, ZDA) v koncentraciji 1mg/ml substratnega pufra. Mikrotiterske ploščice (F. Microton, Greiner) smo med inkubacijo pri 37 °C pokrivali z drugo mikrotitersko ploščico, s čimer smo preprečili izhlapevanje vsebine iz luknjic v ploščici. Robnih luknjic nismo uporabljali za testiranje. Vanje smo namesto razredčenih protiteles in vzorcev nanašali bidestilirano vodo. Na vsaki mikrotiterski ploščici smo imeli tudi pozitivno (ADGEN, 1120 - 11) in negativno (ADGEN, 1120 - 12) pufersko kontrolo. Optično gostoto smo odčitavali z ELISA čitalcem Dynatech MR 5000, s programom BioLinx, pri valovni dolžini 405nm (slika 4).

3.3.1 Postopek ELISA

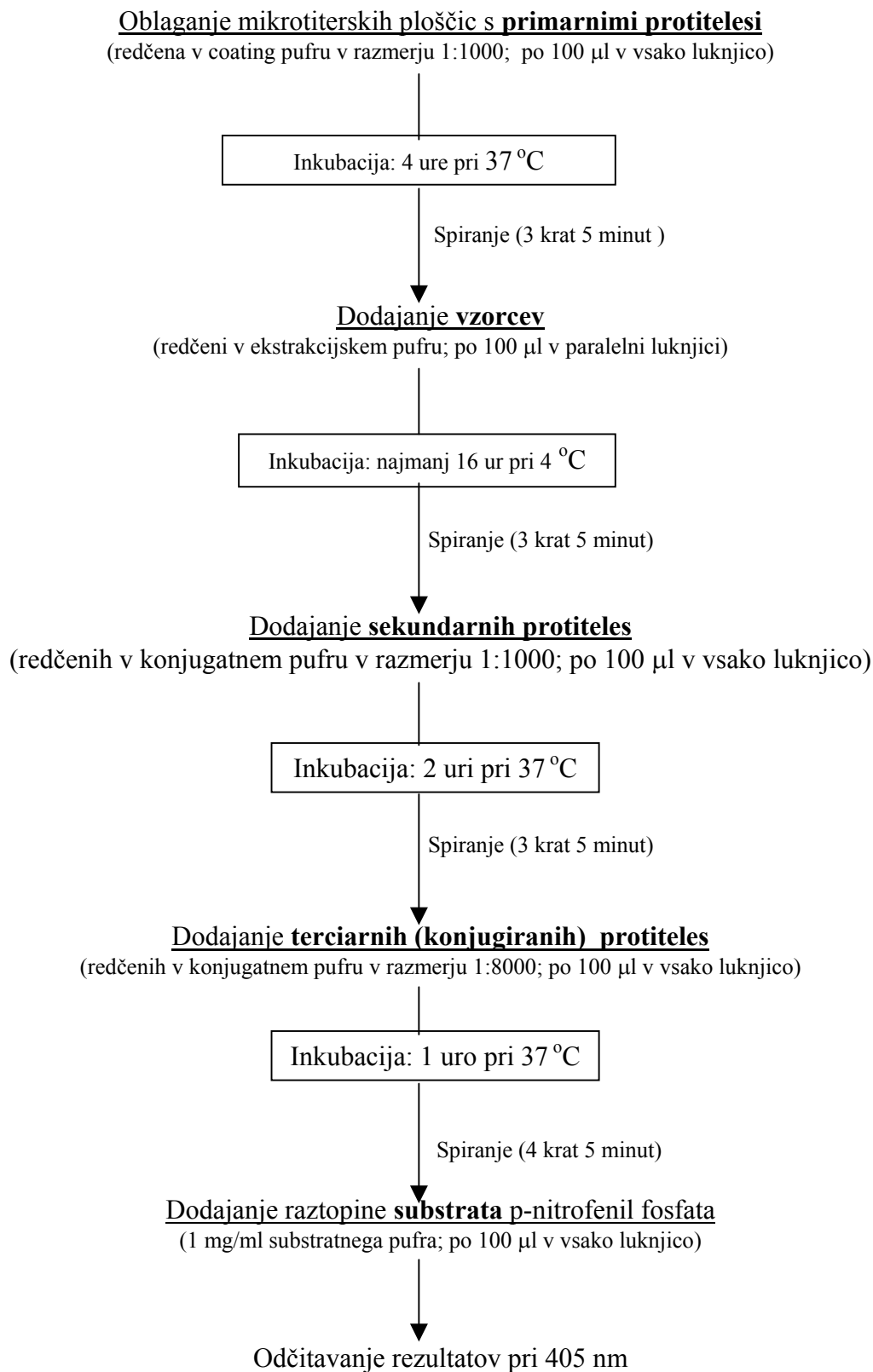
V luknjice mikrotiterskih ploščic smo nanесли po 100 µl raztopine poliklonskih primarnih protiteles (ADGEN, 1120 - 06), redčenih v coating pufru v razmerju 1 : 1000, ter ploščice inkubirali štiri ure pri 37 °C.

Po inkubaciji smo ploščice trikrat po pet minut spirali s pufrom za spiranje (1 × PBS in tween). Nanesli smo 100 µl vzorca (v dvojicah) ter inkubirali pri 4 °C čez noč (vsaj 16ur). Po inkubaciji smo ploščice trikrat po pet minut spirali s pufrom za spiranje (1 × PBS in tween), nanesli po 100 µl raztopine sekundarnih monoklonskih protiteles (ADGEN, 1120) v konjugatnem pufru v razmerju 1:1000 ter inkubirali dve uri pri 37 °C.

Po dveh urah smo spirali trikrat po pet minut s pufrom za spiranje, nanесли 100 μ l raztopine terciarnih protiteles (ADGEN, 1120), redčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 8000, ter inkubirali eno uro pri 37°C.

Po inkubaciji smo spirali ploščice štirikrat po pet minut s pufrom za spiranje, dodali v vsako luknjico po 100 μ l raztopine substrata (p-nitrofenil fosfat), razredčenega v substratnem pufru, ter inkubirali v temi pri sobni temperaturi.

Po dodajanju substrata smo merili optično gostoto v časovnih intervalih 15, 30, 45 minut, ena ura, dve uri in več.



Slika 4: Shematski prikaz postopka ELISA.

3.3.2 Obdelava ELISA podatkov

Razmerje med vrednostmi optične gostote pri negativni in pozitivni kontroli se s časom spreminja. Kadar je to razmerje največje, najlažje uvrstimo posamezne vrednosti vzorcev nad ali pod prag okuženosti.

Na ploščice smo vzorce nanašali v ponovitvah. Za rezultate meritve optične gostote smo vzeli povprečje vrednosti med ponovitvami posameznega vzorca. Rezultate smo primerjali z rezultati negativnih kontrol (ADGEN, 1120-12) in v primeru *A. bisporus* tudi z rezultati negativnih vzorcev.

Rezultate meritev optične gostote smo razdelili po sledečem kriteriju:

N - odčitki optične gostote, manjši od dvakratne vrednosti negativnega vzorca/ negativne kontrole proizvajalca ADGEN

PN - odčitki optične gostote, večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti negativnega vzorca / negativne kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote, večji od trikratne vrednosti negativnega vzorca/ negativne kontrole proizvajalca ADGEN

3.4 DOLOČANJE VIRUSOV Z ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Preizkusili smo različne načine priprave mrežic za elektronsko mikroskopijo in primerjali uporabo zamrznjenih (-20 °C) in svežih vzorcev gob ter podgobja s hranilnega gojišča.

3.4.1 Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo

Iz vzorcev svežih in zamrznjenih šampinjonov smo z različnih predelov v notranjosti in na površini odvzeli več vzorcev tkiva od vsake gobe. Viruse smo ekstrahirali z 0,1 M fosfatnim pufrom za elektronsko mikroskopijo (PB). Tkivo trosnjakov smo prelili s fosfatnim pufrom (PB) in ga zmacerirali. 20 µl macerata smo nanесли na parafilm in nanj položili mrežice za elektronsko mikroskopijo (400 mesh, 2 r = 3 mm), vse skupaj smo zaščitili pred izsušitvijo. Preizkusili smo štiri načine priprave mrežic:

A inkubacija eno uro, sprano z bidestilirano vodo (40 kapljic), kontrastirano s 7 kapljicami 1 % uranil acetata (UA)

B inkubacija eno uro, brez spiranja z vodo, kontrastirano s tremi kapljicami 2 % UA

C inkubacija dve uri, sprano z bidestilirano vodo (40 kapljic), kontrastirano s 7 kapljicami 1 % UA

D inkubacija dve uri, brez spiranja z vodo, kontrastirano s tremi kapljicami 2 % UA

Po spiranju z bidestilirano vodo in kontrastiranjem z uranil acetatom smo robove mrežic rahlo osušili s filtrirnim papirjem.

Mrežice smo pregledali pod elektronskim mikroskopom Philips CM 100.

Optimiranje postopka: vsi vzorci so vsebovali veliko nečistoč (ostankov gostiteljskega tkiva), vzorci kontrastirani z 2 % uranil acetatom so bili preveč kontrastirani; razlika pri vzorcih z različnim časom inkubacije ni bila izrazita, zato smo se odločili da vzorce inkubiramo eno uro.

Glede na rezultate opazovanja vzorcev, pripravljenih po zgornjem postopku, smo se odločili, da bi bilo potrebno sok iztisniti iz tkiva, da bi le-ta vseboval kar najmanj primesi gostiteljskega tkiva in ga prečistiti s centrifugiranjem.

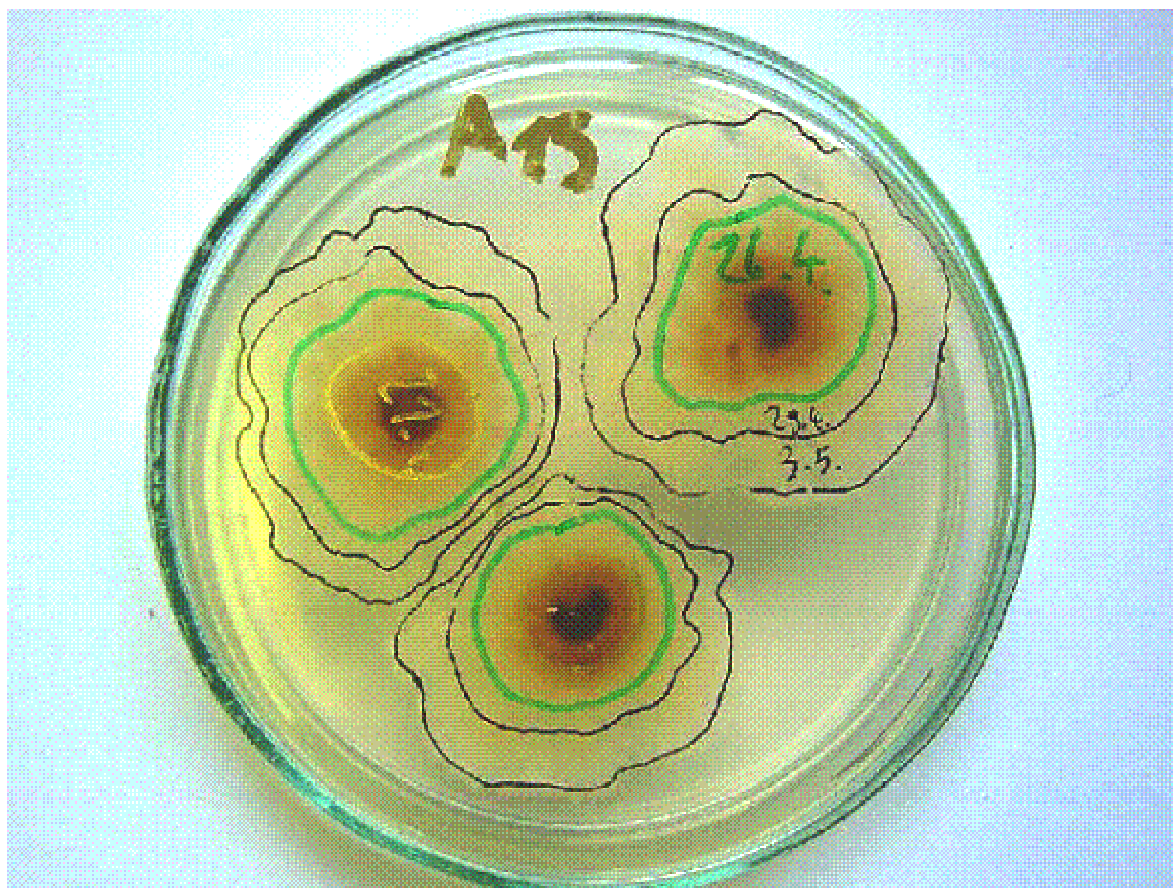
Izvedli smo poskuse s centrifugiranjem pri 4 °C in brez nje. Uporabili smo različno število kapljic 1 % uranil acetata (UA) in različne razredčitve vzorca s PB. Vse poizkuse smo izvedli s sokom iztisnjenim iz svežega tkiva.

Preglednica 1: Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo.

Št. preizkusa	Centrifugiranje iztisnjenega soka obrati/s	Redčitev vzorca s fosfatnim pufrom (PB)	Spiranje vzorcev z mrežice	Kontrastiranje z 1 % UA (št. kapljic)
1.	10 000, eno minuto	1 : 11	da	7
2.	10 000, eno minuto	1 : 11	ne	4
3.	10 000, eno minuto	1 : 11	da	4
4.	10 000, eno minuto	1 : 1	da	4
5.	15 000, 15 minut	1 : 1	da	4
6.	15 000, 15 minut	1 : 11	ne	7
7.	brez	1 : 1	da	7
8.	brez	1 : 11	da	7
9.	brez	1 : 11	ne	7

3.5 MERITVE HITROSTI RASTI KULTUR NA HRANILNEM GOJIŠČU

Pri podgobjih *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču smo merili hitrost rasti, da bi ugotovili morebitno povezavo med prisotnostjo virusov in hitrostjo rasti. Na hranilno gojišče, ob robove petrijevih posodic, smo precepili po tri vzorce enakih velikosti. Kulture smo inkubirali pri 24 °C. Hitrost rasti smo merili na treh najhitreje rastočih predelih kulture, od mesta precepljanja do roba kulture. Meritve smo opravili 5, 10, 13 in 17 dni od dneva prenosa kulture na hranilno gojišče (sliki 5 in 8).



Slika 5: Merjenje hitrosti rasti z MV1 okuženega micelija *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču.

3.5.1 Obdelava podatkov meritev hitrosti rasti

Iz meritev smo izračunali povprečno hitrost rasti. Kulture smo glede na rezultate meritev razdelili na počasi (do 6 mm v 17 dneh), srednje hitro (med 6 in 12 mm v 17 dneh) in hitro rastoče (nad 12 mm v 17 dneh).

4 REZULTATI

4.1 ELISA

Vzorci gojenih in samoniklih gob smo testirali po postopku ELISA na prisotnost virusa MV1.

Pri primerjavi rezultatov meritev nismo imeli zanesljive lastne negativne kontrole (vzorca trosnjaka ali izolata brez prisotnosti MV1), zato smo vzorce primerjali z negativno kontrolo proizvajalca ADGEN in v primeru *A. bisporus* tudi s povprečjem negativnih vzorcev, ki smo jih iz opazovanj ELISA rezultatov določili sami.

Vrednosti optične gostote pri vrsti *A. bisporus* so povišane v primerjavi z negativno kontrolo (ADGEN 1120 – 12) v izhodiščni kulturi (AA0, preglednica 3), pri vseh vzorcih trosnjakov (pri vseh gojiteljih) in pri enajstih od štirinajstih vzorcev podgobj s hranilnega gojišča (pri vseh gojiteljih) (preglednici 2 in 3).

Glede na povprečje vzorcev z nizko vrednostjo optične gostote (v nadaljevanju negativni vzorci) je MV1 prisoten v izhodiščni kulturi (AA0, preglednica 3), pri dveh od štirinajstih vzorcev trosnjakov (pri dveh gojiteljih od osmih) in pri šestih izmed štirinajstih vzorcev podgobj s hranilnega gojišča (pri petih od osmih gojiteljev) (preglednici 2 in 3).

Prisotnost MV1 smo ugotovili pri podgobju dveh od 26 vrst gojenih in samoniklih gliv (*Polyporus tuberaster* in *Agrocybe aegerita*) (preglednica 7). MV1 je prisoten tudi pri trosnjakih petih od 62 vrst samoniklih gliv (*Russula olivacea*, *Russula albonigra*, *Agaricus campestris*, *Lactarius vellereus* in *Collybia maculata*) (preglednica 5). Pri nekaterih od teh trosnjakov je bila notranjost napadena od žuželk.

Prisotnost je bila večja pri vrsti *A. bisporus* in *A. campestris*.

Prisotnost MV1 se pri vrsti *A. campestris* spreminja v različnih predelih trosnjaka. Pri nekaterih so bile opazne razlike med vzorci lističev trosišča in tkiva trosnjaka. Prisotnost se je razlikovala tudi med gobami *A. campestris* nabranimi na isti lokaciji (preglednica 5) ne glede na starost trosnjakov.

Pri vrsti *Polyporus tuberaster* so rezultati pokazali prisotnost MV1 pri podgobjih, starejših od dveh mesecev medtem, ko prisotnosti ni bilo pri podgobjih mlajših od dveh mesecev (preglednica 7).

Koncentracija MV1 v podgobju *A. bisporus* se je spremenila, ko smo kulture prenesli na hranilno gojišče (preglednica 4).

MV1 smo lahko določili v nekaterih trosnjakih *A. bisporus*, tudi po petmesečnem hranjenju pri -20 °C (vzorec A14, priloga C).

Pri vzorcih okužb gojišča z *Aspergillus sp.* nismo zasledili povečane prisotnosti MV1 (preglednica 6).

Iz rezultatov (preglednici 2 in 3) je razvidno, da je MV1 predvsem prisoten v trosnjakih *A. bisporus* na Štajerskem medtem, ko je manjša prisotnost MV1 na Notranjskem. Za koroško regijo smo imeli premalo podatkov.

Imeli smo premalo podatkov, da bi zanesljivo lahko sklepali o vplivu pokrivke in urejenosti gobarn na prisotnost MV1 v trosnjakih *A. bisporus*.

GREGORI A. Ugotavljanje virusov v gojenih in samoniklih gobah.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2004

Preglednica 2: Določanje prisotnosti MV1 v zmrznjenih trosnjakih *Agaricus bisporus* z ELISA.

Oznaka	Vzorec	Gojitelj	Pogoji gojenja	Lokacija	Rezultat ELISA		Pokrивka	Opombe
					glede na povprečje neg. vzorcev	glede na negativno kontrolo		
A01	<i>A. bisporus</i>	št. 2	tuneli	Notranjska	N	PN	ni podatka	
A02	<i>A. bisporus</i>	št. 3/1	hlev	Notranjska	N	P	ni podatka	
A03	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 3/2	hlev	Notranjska	N	PN	ni podatka	
A04	<i>A. bisporus</i>	št. 4	rudnik	Notranjska	N	PN	ni podatka	
A05	<i>A. bisporus</i>	št. 5/1	hlev	Štajerska	N	PN	ni podatka	
A06	<i>A. bisporus</i>	št. 5/2	hlev	Štajerska	N	PN	ni podatka	
A08	<i>A. bisporus</i>	št. 4/1	rudnik	Notranjska	N	PN	ni podatka	
A09	<i>A. bisporus</i>	št. 4/2	rudnik	Notranjska	N	PN	ni podatka	zdravi trosnjaki enaki kot A08
A10	<i>A. bisporus</i>	št. 6/1	klet	Štajerska	N	PN	Bioland	
A11	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 6/2	klet	Štajerska	N	P	Bioland	
A12	<i>A. bisporus</i>	št. 7	hlev	Koroška	N	P	Topterra (Nizozemska)	
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	namenski prostori	Štajerska	ni podatka	P		zmrznjeno 5 mesecev
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	namenski prostori	Štajerska	P	P	Bioland	
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9/0	klet	Štajerska	ni podatka	P		zmrznjeno 5 mesecev
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9/1	klet	Štajerska	P	P	Topterra (Nizozemska)	
A16	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 9/2	klet	Štajerska	N	P	Topterra (Nizozemska)	

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

PN - odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

GREGORI A. Ugotavljanje virusov v gojenih in samoniklih gobah.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2004

Preglednica 3: Določanje prisotnosti MV1 v podgobju *Agaricus bisporus* z ELISA.

Oznaka	Vzorec	Gojitelj	Pogoji gojenja	Lokacija	Rezultat ELISA		Hitrost rasti	Opombe
					glede na povprečje neg. vzorcev	glede na negativno kontrolo		
A00	<i>A. bisporus</i>	št. 1	(starter kultura)	Koroška	PN	P	Hitra	
A01	<i>A. bisporus</i>	št. 2	tuneli	Notranjska	N	N	Srednja	
A02	<i>A. bisporus</i>	št. 3/1	hlev	Notranjska	N	N	Srednja	
A03	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 3/2	hlev	Notranjska	N	PN	Počasna	
A04	<i>A. bisporus</i>	št. 4	rudnik	Notranjska	PN	P	ni podatka	
A05	<i>A. bisporus</i>	št. 5/1	hlev	Štajerska	N	PN	Srednja	
A06	<i>A. bisporus</i>	št. 5/2	hlev	Štajerska	N	P	Počasna	
A08	<i>A. bisporus</i>	št. 4/1	rudnik	Notranjska	N	PN	Srednja	
A09	<i>A. bisporus</i>	št. 4/2	rudnik	Notranjska	N	PN	Hitra	zdrav trosnjak enak kot A08
A10	<i>A. bisporus</i>	št. 6/1	klet	Štajerska	P	P	Srednja	
A12	<i>A. bisporus</i>	št. 7	hlev	Koroška	P	P	Hitra	
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	namenski prostori	Štajerska	ni podatka	N	Srednja	zmrznjen vzorec v ekstrakcijskem pufru
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	namenski prostori	Štajerska	PN	P	Srednja	
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9	klet	Štajerska	ni podatka	N	Hitra	zmrznjen vzorec v ekstrakcijskem pufru
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9/1	klet	Štajerska	P	P	Hitra	
A16	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 9/2	klet	Štajerska	N	N	Hitra	

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

PN - odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativnega vzorca / kontrole proizvajalca ADGEN

Preglednica 4: Primerjava ELISA rezultatov za MV1 pri podgobju s hranilnega gojišča in zamrznjenih trosnjakih *Agaricus bisporus*.

Oznaka	Vzorec	Gojitelj	Oblika kulture	Rezultat ELISA	
				glede na povprečje neg. vzorcev	glede na negativno kontrolo
A00	<i>A. bisporus</i> (starter kultura)	št. 1	PO	PN	P
A01	<i>A. bisporus</i>	št. 2	ZT	N	PN
A01	<i>A. bisporus</i>	št. 2	PO	N	N
A02	<i>A. bisporus</i>	št. 3/1	ZT	N	P
A02	<i>A. bisporus</i>	št. 3/1	PO	N	N
A03	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 3/2	ZT	N	PN
A03	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 3/2	PO	N	PN
A04	<i>A. bisporus</i>	št. 4	ZT	N	PN
A04	<i>A. bisporus</i>	št. 4	PO	PN	P
A05	<i>A. bisporus</i>	št. 5/1	ZT	N	PN
A05	<i>A. bisporus</i>	št. 5/1	PO	N	PN
A06	<i>A. bisporus</i>	št. 5/2	ZT	N	PN
A06	<i>A. bisporus</i>	št. 5/2	PO	N	P
A08	<i>A. bisporus</i>	št. 4/1	ZT	N	PN
A08	<i>A. bisporus</i>	št. 4/1	PO	N	PN
A09	<i>A. bisporus</i>	št. 4/2	ZT	N	PN
A09	<i>A. bisporus</i>	št. 4/2	PO	N	PN
A10	<i>A. bisporus</i>	št. 6/1	ZT	N	PN
A10	<i>A. bisporus</i>	št. 6/1	PO	P	P
A11	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 6/2	ZT	N	P
A12	<i>A. bisporus</i>	št. 7	ZT	N	P
A12	<i>A. bisporus</i>	št. 7	PO	P	P
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	ZT	P	P
A14	<i>A. bisporus</i>	št. 8	PO	PN	P
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9/1	ZT	P	P
A15	<i>A. bisporus</i>	št. 9/1	PO	P	P
A16	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 9/2	ZT	N	P
A16	<i>A. bisporus</i> (rjava različica)	št. 9/2	PO	N	N

PO - podgobje na hranilnem gojišču

ZT - zamrznjen trosnjak

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

PN - odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

Preglednica 5: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v trosnjakih in podgobju samoniklih gliv.

Oznaka	Vzorec	Lokacija	Rezultat ELISA	Oblika kulture	Starost kulture
Ag.silva.	<i>Agaricus silvaticus</i>	Slovenija	N	ST	
Al.pes.1	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	Slovenija	N	ST	
Al.sub.	<i>Albatrellus subrubescens</i>	Slovenija	N	ST	
Am.ci.	<i>Amanita citrina</i>	Slovenija	N	ST	
Am.mu.	<i>Amanita muscaria</i>	Podkoren, Slovenija	N	PO	več kot dva meseca
Arm.mell.	<i>Armillaria mellea</i>	Slovenija	N	PO	manj kot dva meseca
Bo.ed.	<i>Boletus edulis</i>	Slovenija	N	ST	
Bo.pi.	<i>Boletus pinophilus</i>	Slovenija	N	ST	
Co.ma.	<i>Collybia maculata</i>	Slovenija	PN	ST	
COCO1	<i>Coprinus comatus</i>	Podkoren, Slovenija	N	PO	manj kot dva meseca
Hy.su.1	<i>Hypholoma. sublateralitium</i>	Slovenija	N	PO	ni podatka
La.co.	<i>Lactarius controversus</i>	Slovenija	N	ST	
La.ve.	<i>Lactarius vellereus</i>	Slovenija	P	ST	
Le.au.	<i>Leccinum aurantiacum</i>	Slovenija	N	ST	
Le.hol.	<i>Leucoagaricus holosericeus</i>	Slovenija	N	ST	
Le.qu.	<i>Leccinum quercinum</i>	Slovenija	N	ST	
Mo.es.	<i>Morchella esulenta</i>	Gozd Martuljek, Slovenija	N	PO	več kot dva meseca
Morch.esc.	<i>Morchella esculenta</i>	ni podatka	N	PO	več kot dva meseca
Pl.ab.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Slovenija	N	PO	manj kot dva meseca
Po.ci.	<i>Polyporus ciliatus</i>	Podkoren, Slovenija	N	PO	manj kot dva meseca
Ps.ge.	<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Slovenija	N	ST	
Ru.ac.	<i>Russula acrifolia</i>	Slovenija	N	ST	
Ru.al.1	<i>Russula albonigra</i>	Slovenija	P	ST	
Ru.cup.	<i>Russula cuprea</i>	Slovenija	N	ST	
Ru.em.	<i>Russula emetica</i>	Slovenija	N	ST	
Ru.fa.	<i>Russula fageticola</i>	Slovenija	N	ST	
Ru.ol.	<i>Russula olivacea</i>	Slovenija	P	ST	
Ru.ps.	<i>Russula pseudointegra</i>	Slovenija	N	ST	
Sp.cr.	<i>Sparassis crispa</i>	Mostec, Ljubljana	N	PO	manj kot dva meseca
Sp.cr.	<i>Sparassis crispa</i>	Mostec, Ljubljana	N	PO	več kot dva meseca
TRAVE.	<i>Trametes versicolor</i>	Ljubljana, Slovenija	N	PO	manj kot dva meseca
Tu.bl.	<i>Tuber blotii</i>	Slovenija	N	PO	več kot dva meseca
Tu.bl.	<i>Tuber blotii</i>	Slovenija	N	PO	ni podatka

(se nadaljuje)

(nadaljevanje)

Oznaka	Vzorec	Lokacija	Rezultat ELISA	Oblika kulture
Ag.silva.1	<i>Agaricus silvaticus</i>	Radomlje, Slovenija	N	ST
Ag.silvi.	<i>Agaricus silvicola</i>	Slovenija	N	ST
Al.pes.2	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	Slovenija	N	ZT
Am.mu.1	<i>Amanita muscaria</i>	Slovenija	N	ZT
Am.ph.	<i>Amanita phalloides</i>	Slovenija	N	ZT
Am.ru.	<i>Amanita rubescens</i>	Slovenija	N	ZT
Am.str.	<i>Amanita strobiliformis</i>	Slovenija	N	ST
Ca.ci.	<i>Cantharellus cibarius</i> var. <i>amethysteus</i>	Slovenija	N	ZT
Cl.od.	<i>Clitocybe odora</i>	Slovenija	N	ZT
Cl.pi.	<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	Slovenija	N	ZT
Co.vi.	<i>Corthinarius violaceus</i>	Slovenija	N	ZT
Hi.re.	<i>Hydnum repandum</i>	Slovenija	N	ZT
Hy.fa.	<i>Hypholoma fasciculare</i>	Slovenija	N	ZT
Hy.su.	<i>Hypholoma sublateritium</i>	Slovenija	N	ZT
La.de.	<i>Lactarius deterrimus</i>	Slovenija	N	ZT
La.qu.	<i>Lactarius quietus</i>	Slovenija	N	ZT
La.ve.	<i>Lactarius vellereus</i>	Slovenija	N	ZT
Le.sc.	<i>Leccinum scabrum</i>	Slovenija	N	ST
Ly.pe.	<i>Lycoperdon perlatum</i>	Slovenija	N	ZT
Pa.in.	<i>Paxillus involutus</i>	Slovenija	N	ZT
Ra.au.	<i>Ramaria aurea</i>	Slovenija	N	ZT
Ra.ca.	<i>Rozites caperata</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.al.	<i>Russula albonigra</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.he.	<i>Russula heterophylla</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.in.	<i>Russula integra</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.la.	<i>Russula laurocerasi</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.ni.	<i>Russula nigricans</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.oc.	<i>Russula ochroleuca</i>	Slovenija	N	ZT
Ru.pa.	<i>Russula paludosa</i>	Slovenija	N	ZT
Sa.im.	<i>Sarcodon imbricatus</i>	Slovenija	N	ZT
Su.bo.	<i>Suillus bovinus</i>	Slovenija	N	ZT
Tr.co.	<i>Tricholoma columbetta</i>	Slovenija	N	ZT
Tr.pa.	<i>Tricholoma pardinum</i>	Slovenija	N	ZT
Tr.sc.	<i>Trycholoma sciodes</i>	Slovenija	N	ZT
Ag.ca.1	<i>Agaricus campestris</i> 1	Logatec, Slovenija	N	ST
Li-Ag.ca.1	<i>Agaricus campestris</i> 1	Logatec, Slovenija	N	Lističi s trosišča Ag.ca.1
Ag.ca.2	<i>Agaricus campestris</i> 2	Logatec, Slovenija	PN	ST
Li-Ag.ca.2	<i>Agaricus campestris</i> 2	Logatec, Slovenija	P	Lističi s trosišča Ag.ca.2
Ag.ca.3	<i>Agaricus campestris</i> 3	Logatec, Slovenija	N	ST
Ag.ca.4	<i>Agaricus campestris</i> 4	Logatec, Slovenija	N	ST

(se nadaljuje)

(nadaljevanje)

Oznaka	Vzorec	Lokacija	Rezultat ELISA	Oblika kulture
Ag.ca.5	<i>Agaricus campestris</i> 5	Logatec, Slovenija	N	ST
Li-Ag.ca.5	<i>Agaricus campestris</i> 5	Logatec, Slovenija	PN	Lističi s trosišča Ag.ca.5
Ag.ca.6	<i>Agaricus campestris</i> 6	Logatec, Slovenija	N	ST
Li-Ag.ca.6	<i>Agaricus campestris</i> 6	Logatec, Slovenija	N	Lističi s trosišča Ag.ca.6
Ag.sp.	<i>Agaricus sp.</i>	otok Krk, Hrvaška	N	ST
Li-Ag.sp.	<i>Agaricus sp.</i>	otok Krk, Hrvaška	N	Lističi s trosišča Ag.sp.
Am.st.	<i>Amanita strobiliformis</i>	Slovenija	N	ST
Arm.mell.1	<i>Armillaria mellea</i>	Slovenija	N	ST
He.pa.	<i>Hebeloma pallidoluctuosum</i>	Slovenija	N	ST
Hi.ne.	<i>Higrophorus nemoreus</i>	Slovenija	N	ST
Hi.po.	<i>Higrophorus poetarum</i>	Slovenija	N	ST
Hy.su.1	<i>Hypholoma sublateritium</i>	Slovenija	N	PO
La.pal.	<i>Lactarius pallidus</i>	Slovenija	N	ST
La.s.1	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Slovenija	N	ST
La.to.	<i>Lactarius torminosus</i>	Slovenija	N	ST
Li-Ag.ess.	<i>Agaricus essettei</i> (lističi trosišča)	Slovenija	N	ST
Li-Ag.sp.1	<i>Agaricus sp.</i> (lističi trosišča)	Slovenija	N	ST
Tr.colu.	<i>Tricholoma columbetta</i>	Slovenija	N	ST
Tr.sa.	<i>Tricholoma saponaceum</i>	Slovenija	N	ST
Tr.te.	<i>Tricholoma terreum</i>	Slovenija	N	ST
Tu.bl.1	<i>Tuber blotii</i>	Slovenija	N	PO

PO – podgobje na hranilnem gojišču

ST - svež trosnjak

ZT - zmrznjen trosnjak

N- odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

PN- odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

P- odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

Preglednica 6: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA pri zaprtotrosnicah.

Oznaka	Vzorec	Rezultat ELISA	Oblika kulture
PDA	brez kulture	N	PO
Asp.	<i>Aspergillus sp.</i>	N	PO
Asko.	mešanica zaprtotrosnic	N	PO

PO - podgobje

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole

Preglednica 7: Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA pri podgobju gojenih gliv.

Oznaka v zbirki	Vzorec	Lokacija/vir	Rezultat ELISA	Starost kulture
Aa3	<i>Agrocybe aegerita</i>	ni podatka	P	ni podatka
AUR P3	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Australija	N	manj kot dva meseca
Fv2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ni podatka	N	več kot dva meseca
G.f. 1	<i>Grifola frondosa</i>	Kitajska	N	več kot dva meseca
G.f. Chen	<i>Grifola frondosa</i>	Kitajska	N	manj kot dva meseca
G.f.2	<i>Grifola frondosa</i>	Kitajska	N	več kot dva meseca
Ga.l.5	<i>Ganoderma lucidum</i>	Fungi.co. ZDA	N	manj kot dva meseca
Ga.l.5	<i>Ganoderma lucidum</i>	Fungi.co. ZDA	N	več kot dva meseca
H35	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ni podatka	N	manj kot dva meseca
H35	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ni podatka	N	več kot dva meseca
He.a.	<i>Hericiium abietes</i>	Fungi.co. ZDA	N	manj kot dva meseca
Hy.ulm.1	<i>Hypsizygus ulmarius</i>	Fungi.co. ZDA	N	manj kot dva meseca
La.s.	<i>Laetiporus sulphureus</i>	ni podatka	N	več kot dva meseca
Le.chen.1	<i>Lentinula edodes</i>	Kitajska	N	manj kot dva meseca
Le.chen.2	<i>Lentinula edodes</i>	Kitajska	N	več kot dva meseca
Le.chen.3	<i>Lentinula edodes</i>	Kitajska	N	več kot dva meseca
Le.chen.4	<i>Lentinula edodes</i>	Kitajska	N	več kot dva meseca
Le.chen.5	<i>Lentinula edodes</i>	Kitajska	N	manj kot dva meseca
Le.nunl.	<i>Lepista nuda</i>	Nizozemska	N	ni podatka
Lef.bb.1	<i>Lentinula edodes</i>	Filipini	N	manj kot dva meseca
Lef.bb.2	<i>Lentinula edodes</i>	Filipini	N	manj kot dva meseca
Lef.bb.3	<i>Lentinula edodes</i>	Filipini	N	več kot dva meseca
Lef.bb.4	<i>Lentinula edodes</i>	Filipini	N	več kot dva meseca
Morch.ang.	<i>Morchella angusticeps</i>	Fungi.co. ZDA	N	manj kot dva meseca
Morch.ang.	<i>Morchella angusticeps</i>	Fungi.co. ZDA	N	več kot dva meseca
PAP2	<i>Agrocybe aegerita</i>	Italija	N	manj kot dva meseca
Ph.n.	<i>Pholiota nameko</i>	ni podatka	N	več kot dva meseca
Pl.flnl.	<i>Pleurotus flabellatus</i>	Nizozemska	N	več kot dva meseca
Pl.tub.	<i>Pleurotus tuberregium</i>	Fungi.co. ZDA	N	več kot dva meseca
Po.tub.1	<i>Polyporus tuberaster</i>	Fungi.co. ZDA	PN	več kot dva meseca
Po.tub.1	<i>Polyporus tuberaster</i>	Fungi.co. ZDA	PN	več kot dva meseca
Po.tub.2	<i>Polyporus tuberaster</i>	Fungi.co. ZDA	N	manj kot dva meseca
POC5	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	ni podatka	N	manj kot dva meseca
POE1	<i>Pleurotus eryngii</i>	Kingspawn	N	več kot dva meseca
PP3	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Madžarska	N	manj kot dva meseca
Pp3	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Madžarska	N	več kot dva meseca
ZR1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Italija	N	manj kot dva meseca

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca
ADGEN

PN - odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca
ADGEN

4.2 MERITVE HITROSTI RASTI MICELIJA

Pri kulturah *A. bisporus* na hranilnem gojišču smo merili hitrost rasti, da bi ugotovili povezavo med prisotnostjo MV1 in hitrostjo rasti micelija.

Iz rezultatov meritev (slika 6, preglednica 8) je razvidno, da je pri kulturah *A. bisporus* z visoko vsebnostjo MV1 v večini primerov hitrost rasti micelija srednja do hitra (več kot 6 mm v sedemnajstih dneh), v povprečju pa hitrejša, kot pri kulturah z nizko vsebnostjo MV1. Rast kultur je hitrejša tako na začetku, kot na koncu poizkusa.

Pri večini kultur z nizko vsebnostjo MV1 je rast počasnejša, v primerjavi s kulturami z visokimi vsebnostmi MV1 (slika 6, preglednica 8).

Od povprečja kultur z nizko vsebnostjo MV1 pa močno odstopa kultura A09, pri kateri je rast hitrejša od vseh pri meritvah uporabljenih kultur bele različice *A. bisporus* (slika 6, preglednica 8).

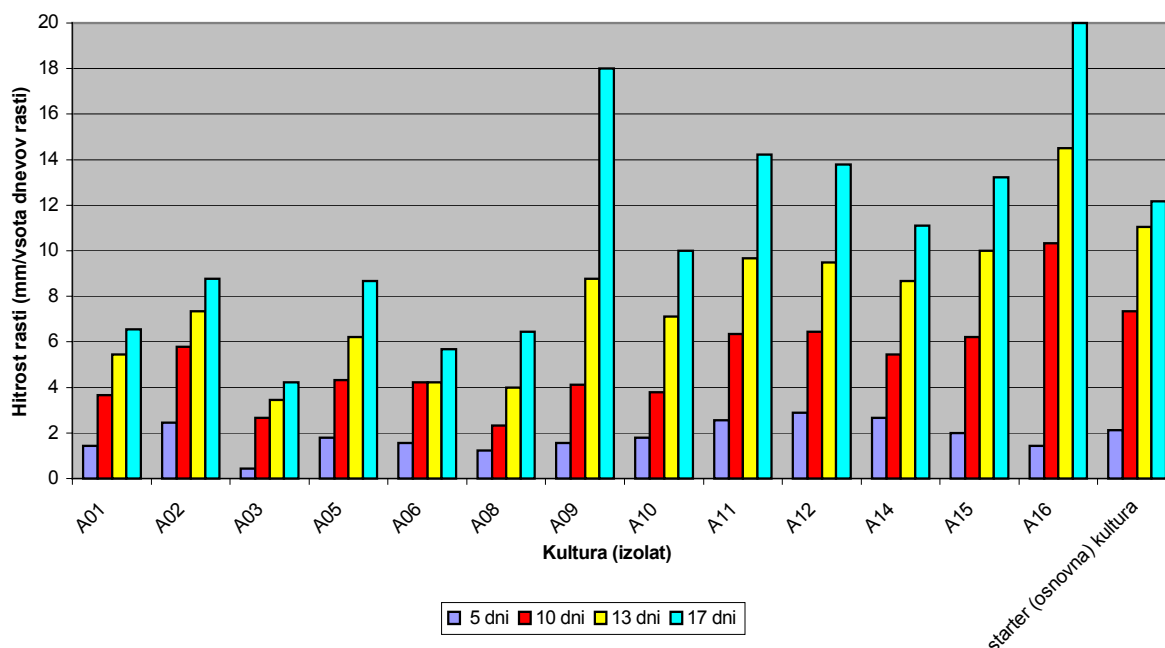
Preglednica 8: Hitrosti rasti pri kulturi *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču.

Vzorec Čas rasti (dnevi)	A01 (mm)	A02 (mm)	A05 (mm)	A06 (mm)	A08 (mm)	A09 (mm)	A10 (mm)	A11 (mm)	A12 (mm)	A14 (mm)	A15 (mm)	Starter kultura (mm)
5 dni	1,4	2,4	1,8	1,6	1,2	1,6	1,8	2,6	2,9	2,7	2,0	2,1
10 dni	3,7	5,8	4,3	4,2	2,3	4,1	3,8	6,3	6,4	5,4	6,2	7,3
13 dni	5,4	7,3	6,2	4,2	4,0	8,8	7,1	9,7	9,5	8,7	10,0	11,1
17 dni	6,6	8,8	8,7	5,7	6,4	18,0	10,0	14,2	13,8	11,1	13,2	12,2
Hitrost rasti	srednja	srednja	srednja	počasna	srednja	hitra	srednja	hitra	hitra	srednja	hitra	hitra
Rezultat ELISA glede na povprečje negativnih vzorcev	N	N	N	N	N	N	P	ni podatka	P	PN	P	PN

N - odčitki optične gostote manjši od dvakratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

PN - odčitki optične gostote večji od dvakratne in manjši od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

P - odčitki optične gostote večji od trikratne vrednosti glede na povprečje negativne kontrole proizvajalca ADGEN

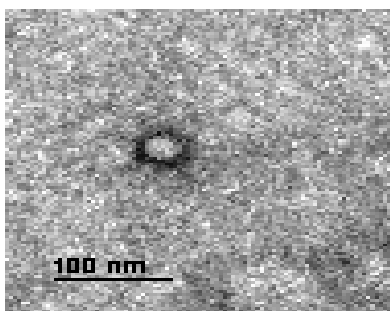


Slika 6: Hitrost rasti kultur *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču.

Na podlagi opravljenih meritev predvidevamo, da hitrost rasti kultur *A. bisporus* v povprečju narašča sorazmerno s prisotnostjo MV1 v teh kulturah. Za trdnjši dokaz bi bilo potrebno uporabiti večje število vzorcev. Merjenje hitrosti rasti ni zanesljiva metoda za določanje prisotnosti MV1 v kulturah, saj prihaja do močnih odstopanj (preglednica 8, vzorec A09).

4.3 DOLOČANJE VIRUSOV Z ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

S pomočjo elektronske mikroskopije smo opazovali virusne delce velikosti 25 – 30 nm pri *A. bisporus*.



Slika 7: Virusni delci velikosti 25 - 30 nm opazovani z elektronskim mikroskopom.

Med izdelanimi preparati za elektronsko mikroskopijo so bile nekatere pretemne za opazovanje (poizkus št. 9 in 7 v preglednici 1), nekatere so bile primerne za opazovanje, vendar na njih ni bilo virusov (poizkus št. 1 v preglednici 1), pri nekaterih pa so bili v izredno nizkih koncentracijah vidni delci velikosti 25 – 30 nm, za katere lahko predvidevamo, da so virusi (preglednica 1, poizkus št. 8 in 6).

Kot najboljši se je izkazal postopek izolacije, pri katerem smo uporabili 0,1 M fosfatni pufer za ekstrahiranje ter centrifugacijo vzorca pri 10 000 obratih/sekundo. Vzorce smo inkubirali eno uro in kontrastirali s 4 - 7 kapljicami 1 % UA. Vzorcev nismo spirali z bidestilirano vodo. Uporabili smo podgobje *A.bisporus* s hranilnega gojišča, katero je pri ELISA kazalo močno prisotnost MV1 (vzorec A15 v preglednici 3).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Gobe vrste *A. bisporus* v Sloveniji bi bile, upoštevajoč rezultate ELISA lahko okužene z virusi, ki jih povezujejo z La France boleznijo. Potrebne so nadaljne študije, s pomočjo katerih bi bolj zanesljivo lahko dokazali prisotnost te bolezni.

Koncentracija MV1 v podgobju *A. bisporus* se je spremenila, ko smo tkivo trosišč nacepili na hranilno gojišče (preglednica 4). Pri nekaterih kulturah se je povečala, pri nekaterih zmanjšala, ponekod pa je ostala enaka. Ni nam znano, kateri dejavniki povzročajo te spremembe. Z gotovostjo pa lahko trdimo, da to niso genotip osebkov, temperatura okolja in sestava hranilnega gojišča, saj so bili pri vseh pregledanih kulturah *A. bisporus* ti parametri enaki. Pregledane kulture in trosnjaki *A. bisporus* so se razlikovali v načinu gojenja, gojitvenih prostorih ter lokaciji le-teh, kar nakazuje na to, da na prisotnost MV1 v njih lahko vpliva kraj rasti in preko tega vektorji prenosa virusov.

Znani vektorji prenosa virusov so spore (Schisler in sod., 1967), prenašalci pa bi lahko bili tudi insekti, pršice, bakterije, ljudje itd.

V trosnjakih, napadenih z larvami insektov, je velika prisotnost MV1, saj smo ugotovili, da je močno prisoten pri gobah vrst *Russula olivace* in *Russula albonigra*, katerih notranjost je najedena (preglednica 5). Rezultati nakazujejo na to, da bi lahko bile žuželke prenašalke virusov. Potrebno bi bilo pregledati več vrst larv in odraslih insektov, ki napadajo gobe in določiti prisotnost mikovirusov v njih ter opraviti nadaljne študije prenosa virusov.

MV1 je prisoten pri tretjini od desetih vzorcev *Agaricus campestris*. Pojavnost MV1 se pri vrsti *A. campestris* spreminja v različnih predelih trosnjaka. Pri nekaterih trosnjakih so bile opazne razlike med vzorci lističev trosišča in tkiva trosnjaka. Iz tega lahko sklepamo, da je v večjih količinah MV1 prisoten tudi v sporah (preglednica 5).

MV1 se je pogosteje pojavljal pri *Agaricus sp.*, zato sklepamo, da je specializiran za te vrste.

Ker se je prisotnost MV1 razlikovala tudi med gobami *A. campestris*, nabranimi na isti lokaciji (preglednica 5), lahko sklepamo, da na njegovo prisotnost vpliva okolje ter vektorji prenosa odvisni od okolja.

Pri vrsti *Polyporus tuberaster* je iz rezultatov razvidno, da je MV1 prisoten pri podgobjih starejših od dveh mesecev, pri podgobjih mlajših od dveh mesecev, pa ga nismo našli (preglednica 7). Ta podatek nakazuje na to, da diferenciacija oziroma starost podgobja vpliva na vsebnost MV1 in morda tudi na odpornost glive na virusne okužbe.

Pri vzorcih, ki so bili na gojišču okuženi z *Aspergillus sp.* nismo zasledili prisotnosti MV1. Potrebno bi bilo pregledati različne vrste gliv zaprtotrošnic in določiti prisotnost virusov v njih.

Na prisotnost virusov bi lahko vplival način izolacije kultur iz trošnjakov (slika 2), saj je na predelih trošnjaka, kjer se celice hitreje delijo, manjša možnost prisotnosti virusov, kot pa na mestih, kjer delitve potekajo počasneje. Na to nakazujejo tudi razlike v prisotnosti MV1 v različnih delih trošnjakov vrste *A. campestris* (preglednica 5).

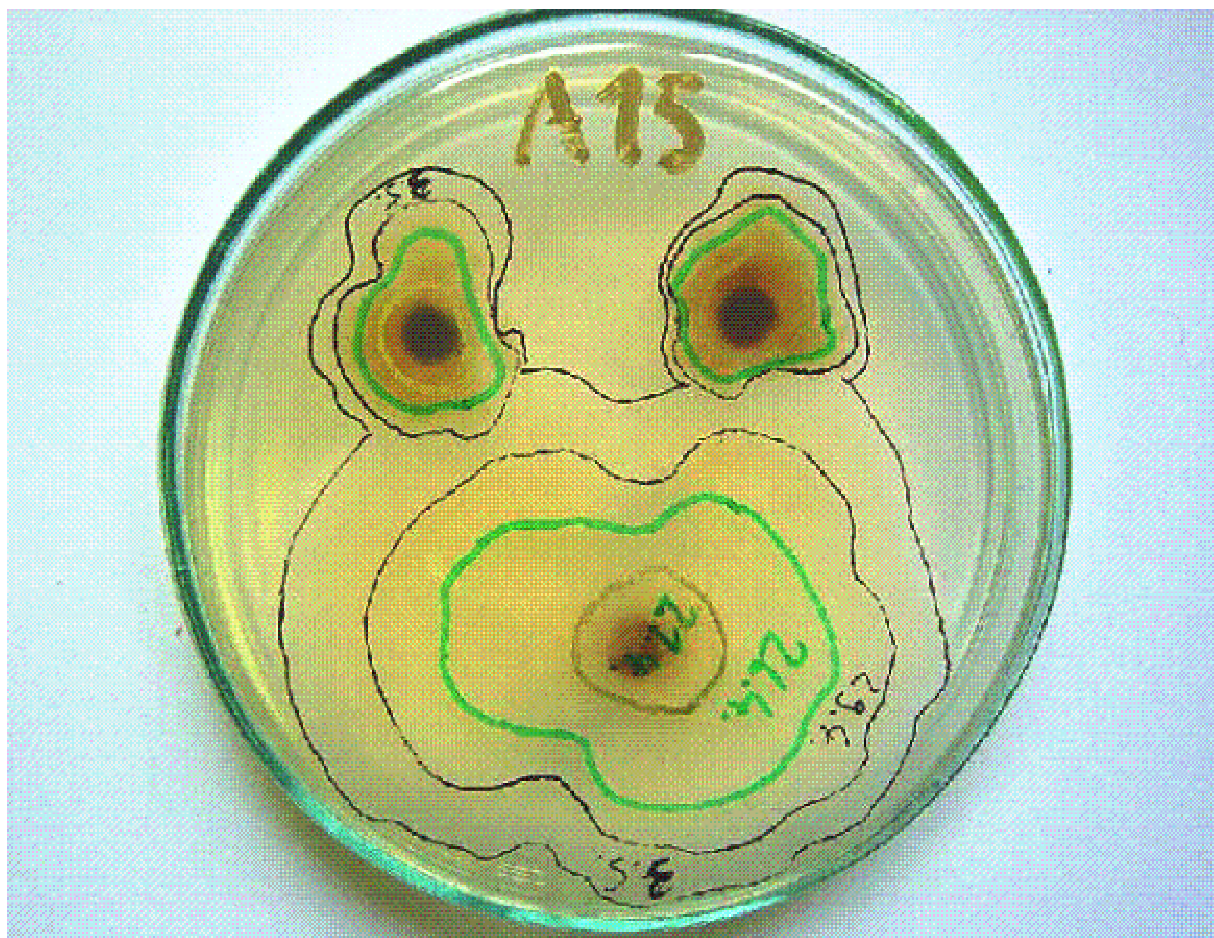
V nekaterih primerih je podgobje s hranilnega gojišča trdo (usnjato) in se izredno težko razdrobi. Večji delež celičnih sten lahko, zaradi tega ostane nepoškodovanih, kar lahko pripelje do manjše koncentracije virusov v vzorcu.

Velik delež primesi hranilnega gojišča ali vodnega kondenza v vzorcih lahko prav tako zmanjša koncentracijo virusov v končnem vzorcu.

Možno je tudi, da prisotnost drugih mikroorganizmov, zlasti bakterij in kvasovk, vpliva na rezultate, pridobljene s postopkom ELISA.

Pri centrifugiranju se podgobja različnih kultur različno hitro usedajo, nekatera pa celo plavajo ali lebdijo v raztopini. Nekatera podgobja so bila dalj časa shranjena (arhivirane) pri nizkih temperaturah (2 - 7 °C) in prelita z mineralnim oljem, kar bi prav tako lahko vplivalo na prisotnost virusov v njih.

Passmore in Frost (1979) sta ugotovila, da zmrzovanje plodišč pri -20 °C povzroča izgube virusnih delcev, daljše shranjevanje pri -20 °C pa močno zmanjša število virusnih delcev, ekstrahiranih iz plodišč. Mi pa smo ugotovili, da je MV1 pri nekaterih trošnjakih v primerjavi z negativno kontrolo prisoten tudi po petmesečnem shranjevanju pri -20 °C (preglednica 2, vzorec A14 v prilogi C).



Slika 8: Merjenje hitrosti rasti z MV1 okuženega micelija *Agaricus bisporus* na hranilnem gojišču.

Pri nekaterih vzorcih izsečki na hranilnem gojišču rastejo enako hitro (slika 5) medtem, ko se pri drugih vzorcih hitrost med posameznimi izsečki istega vzorca močno razlikuje (slika 8).

Razlike med posameznimi izsečki so lahko izredno velike, zato je otežkočena določitev hitrosti rasti. Odločili smo se, za izračun povprečne vrednosti hitrosti rasti pri več izsečkih istega vzorca, pri čemer pa so se zabrisale najnižje in najvišje vrednosti meritev.

Iz rezultatov meritev sklepamo, da prisotnost MV1 v kulturah *A. bisporus* verjetno vpliva na njihovo rast na hranilnem gojišču, saj so bile kulture istega genotipa in inkubirane pod enakimi pogoji.

Vendar pa metoda določanja prisotnosti MV1 v kulturah *A. bisporus* ni zanesljiva saj pri meritvah prihaja do velikih odstopanj.

Meritev hitrosti rasti je za določanje prisotnosti virusov v kulturah *Agaricus bisporus* nezanesljiva, kar so za nekatere viruse ugotovili že Last s sodelavci leta 1967 in 1974 ter Hollings s sodelavci leta 1970.

Z opazovanjem virusnih delcev z elektronskim mikroskopom težko določimo vrsto le-teh. Velikost delcev ni bila povsod enaka, iz česar lahko sklepamo, da gre za različne vrste virusov velikosti 25 - 30 nm ali pa se njihova velikost zaradi nestabilnosti spreminja. Velikost MV1 je 25nm, zato sklepamo, da so nekateri od teh delcev lahko virusi MV1.

Virusi so v vzorcih prisotni v izredno nizkih koncentracijah, kar je lahko posledica njihove nestabilnosti pri postopku izolacije, za optimizacijo metode bi bilo potrebno preveriti obstojnost virusov pri različnih postopkih izolacije.

5.2 SKLEPI

- MV1 je prisoten v vzorcih *Agaricus bisporus* ter v nekaterih drugih gojenih in samoniklih gobah.
- Za sklepanje o vplivu opreme gobarn, pokrivke ter izdelovalca izhodiščnih kultur na prisotnost MV1 smo imeli premalo podatkov.
- Vsebnost MV1 pri *A. bisporus* se spremeni, ko tkivo trosišča nacepimo na hranilno gojišče.
- Micelij *A. bisporus*, v katerem smo določili MV1, je rasel z drugačno dinamiko, kot micelij, v katerem MV1 nismo našli. Micelij *A. bisporus*, okužen z MV1, v povprečju raste hitreje.
- Merjenje hitrosti rasti ni zanesljiva metoda za določitev prisotnosti MV1 pri *A. bisporus*.
- Z elektronsko mikroskopijo smo opazili 25 – 30 nm velike delce v ekstraktih trosnjakov in micelija *A. bisporus*, pri katerih smo določili prisotnost MV1 z ELISA.
- Potrebno je optimiranje priprave preparatov za elektronsko mikroskopijo s ciljem pridobitve večjega števila virusnih delcev v le-teh.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je uvedba različnih metod določanja virusov v gojenih in samoniklih glivah ter določitev prisotnosti virusa MV1 (Mushroom Virus 1), ki ga povezujejo z La France boleznijo pri *Agaricus bisporus*.

V svetu se pojavlja virusna bolezen (La France bolezen), ki povzroča velike izpade pridelkov gob *A. bisporus* (šampinjon ali gojitveni kukmak). V Sloveniji ni potrjenih izpadov pridelka pri gojenih gobah zaradi virusnih okužb. MV1 (mushroom virus 1) je značilen po tem, da se njegova koncentracija v tkivih gob *A. bisporus* poveča, ko je velika možnost prisotnosti La France bolezni.

Predpostavljali smo, da bi ELISA lahko pripomogla pri diagnosticiranju La France bolezni. S pomočjo ELISA smo določali prisotnost MV1 v gojenih in samoniklih gobah.

Ugotovili smo prisotnost MV1 pri nekaterih kulturah vrst *A. bisporus*, *Polyporus tuberaster*, *Agaricus campestris*, *Agrocybe aegerita* ter pri gobah vrst *Agaricus bisporus*, *Russula olivacea*, *Russula albonigra*, *Lactarius vellereus* in *Collybia maculata*.

Množina MV1 se je pri nekaterih izolatih vrste *A. bisporus* med inkubacijo na hranilnem gojišču pri 24 °C spremenila.

Primerjali smo hitrost rasti podgobja *A. bisporus* pri kulturah z različnimi vsebnostmi MV1. Kulture *A. bisporus*, v katerih smo določili MV1, so rastle z drugačno dinamiko, kot kulture v katerih MV1 nismo našli. MV1 smo lahko določili v trosnjakih *A. bisporus* kljub petmesečnem shranjevanju pri -20 °C.

S pomočjo elektronske mikroskopije smo opazovali 25 – 30 nm velike delce v podgobju in trosnjakih *A. bisporus*.

Raziskave nakazujejo, da so v slovenskih gobarnah prisotni virusi MV1, ki jih povezujejo z La France boleznijo. Prisotni so predvsem na Štajerskem, kjer smo jih v vzorcih *A. bisporus* našli največ.

7 VIRI

- Barton R.J., Hollings M. 1979. Purification and some properties of two viruses infecting the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Virology* . 42: 231-240.
- Bishop J.M., Koch G. 1969. Infectious replicative intermediate of polivirus: purification and characterization. *Virology*, 37:52.
- Buck K.W. 1986. Fungal virology- An overview. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 84 str.
- Dieleman-van Zaayen A., Igesz O. 1969. Intracellular appearance of mushroom virus. *Virology*, 39: 147-152.
- Dieleman-van Zaayen A. 1970. Means by which virus disease in cultivated mushrooms is spread and methods to prevent and control it. *Mushroom Growers Association. Bulletin*, 244: 158-178.
- Dieleman-van Zaayen A., 1972. Intracellular appearance of mushroom virus in fruiting bodies and basidiospores of *Agaricus bisporus*. *Virology*, 47: 94-104.
- Franklin R.M. 1966. Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52: 401.
- Gandy D.G. 1962. Studies on die-back of mushrooms. *Mushroom Science*, 5:468-479.
- Ghabrial S.A. 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16: 119.
- Goodin M.M., Schlagnhauer B., Romaine P.C. 1992. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36-nm isometric viruslike particles. *Phytopathology*, 82: 285-290.
- Grogan H.M., Tomprefa N., Mulcahy J., Holcroft S., Gaze R.H. 2003. Transmission of mushroom virus x disease in crops. Wellesbourne, Warwick, U.K. Horticulture Research International (neobjavljen vir).
- Harju V., Danks C., Preston S., Banks J., Henry C. Production of monoclonal antibodies to mushroom virus 1. Sand Hutton, York, U.K., Central Science Laboratory (interni vir, neobjavljeno).

- Harmsen M.C., van Griensven L.J.L.D., Wessels J.G.H. 1989. Molecular analysis of *Agaricus bisporus* double-stranded RNA. *Journal of General Virology*, 70: 1613-1616.
- Hollings M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 1962: 962-965.
- Hollings M., Stone O.M., Norrish M.E., Last F.T., Gandy D.G. 1963. Mushroom viruses. Report of the Glasshouse Crops Research Institute, 1962: 86-87.
- Hollings M., Stone O.M., Atkey P.T. 1970. Mushroom viruses. Report of the Glasshouse Crops Research Institute, 1969: 132-133.
- Hollings M., Stone O.M. 1971. Viruses that infect fungi. *Annual. Review of Phytopathology*, 9: 93-118.
- Koons K.C., Schlaghauser B., Romaine P.C. 1989. Double-stranded RNAs in mycelial cultures of *Agaricus bisporus* affected by La France disease. *Phytopathology*, 79: 1272-1275.
- Last F.T., Hollings M., Stone O.M. 1967. Some effects of cultural treatments on virus diseases of cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Annual Applied Biology*, 59: 451-462.
- Last F.T., Hollings M., Stone O.M. 1974. Effects of cultural conditions on the mycelial growth of healthy and virus-infected cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Annual Applied Biology*, 76: 99-111.
- Marino R., Sakseena K.N., Schuler M., Mayfield J.E., Lemke P.A. 1976. Double stranded RNA in *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*, 31: 433 str..
- Moffit E.M., Lister R.M. 1973. Detection of mycoviruses using antiserum specific for dsRNA. *Virology*, 52: 301-304.
- Molin G., Lapierre H. 1973. L'acid nucleique des virus de champignon; cos de virus de *Agaricus bisporus*. *Annual Phytopathology*, 5: 233-240.
- Morris T. J., Dodds J.A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69: 854-858.
- Passmore E.L., Frost R.R. 1979. The detection and occurrence of virus-like particles in extracts of mushroom sporophores *Agaricus hortensis* (Cooke) Pilát. *Phytopathologische Zeitschriften*, 80: 85-87.

- Revell P.A., Davidson A.D., Wright P.J. 1994. The nucleotide sequence and genome organisation of mushroom bacilliform virus: A single stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Virology*, 202: 904-911.
- Romaine C.P. 1987. A review of virus disease with reference to hybrid mushrooms. *Mushroom News*, 2: 14.
- Romaine C.P., Schlaghauser B. 1989. Prevalence of double-stranded RNAs in healthy and La France disease-affected basidiocarps of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 81: 822-825.
- Romaine C.P., Schlaghauser B. 1991. Hybridization analysis of the single-stranded RNA bacilliform virus associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Phytopathology*, 81: 1336-1340.
- Romaine C.P., Uhlich P., Schlaghauser B. 1993. Transmission of La France isometric virus during basidiosporogenesis in *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 85: 175-179.
- Romaine C.P., Schlaghauser B., Goodin M.M. 1994. Vesicle-associated double stranded ribonucleic acid genetic elements in *Agaricus bisporus*. *Current Genetics*, 25:128.
- Romaine C.P., Schlaghauser B. 1995. PCR Analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 2322-2325.
- Ross R.C., Brown G.A., Romaine C.P. 1986. Recent experience in detecting viral double-stranded RNA in commercial mushroom crops and its effect on yield. *Development in Crop Science*, 10: 321-329.
- Schisler L.C., Sinden J.W., Sigel E.M. 1967. Etiology, symptomology and epidemiology of a virus disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology*, 57: 519-526.
- Schmidt H.B., Zimmerman E. 1985. Elektronmikroskopische Darstellung von Champignonviren und virusähnlichen Partikeln in Ultradünnschnitten von Fruchtkörper des Kulturchampignons (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 21, 1: 13-19.
- Sinden J.W., Hauser E. 1950. Report of two new mushroom diseases. *Mushroom science*, 1: 96-100.
- Stamets P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Berkeley, California, USA, Ten Speed Press: 80 str.

Tavantzis S.M., Romaine C.P., Smith S.H. 1980. Purification and partial characterization of a baciliform virus from *Agaricus bisporus*: A single-stranded mycovirus. *Virology*, 105: 94-102.

Wach M.P., Sriskantha A., Romaine C.P. 1987. Double-stranded RNAs associated with La France disease of commercial mushroom. *Phytopathology*, 77: 1321-1325.

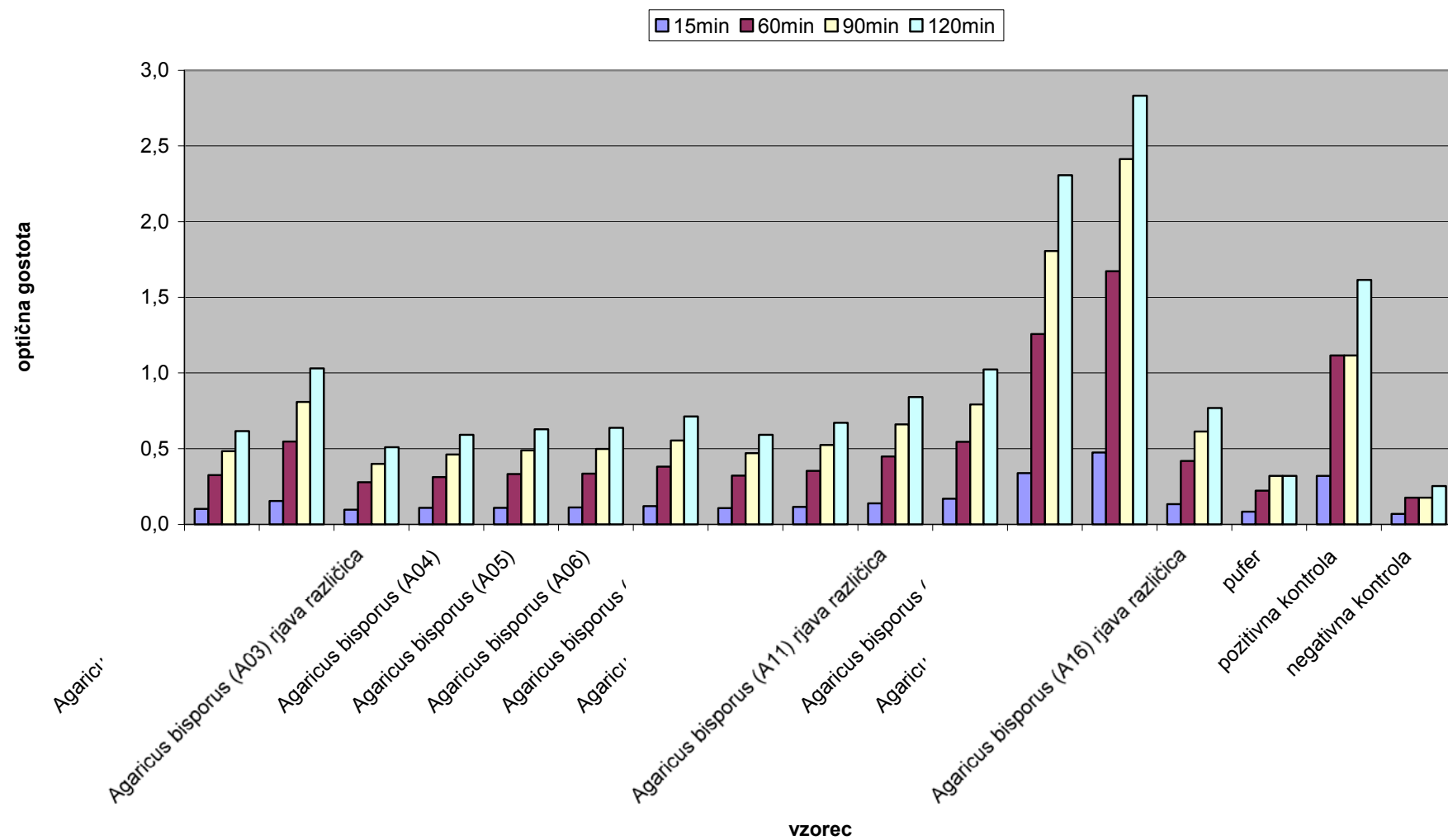
ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici dr. Maji Ravnikar, mentorju dr. Francu Pohlevnu, dipl. biol. Nataši Mehle in mag. Magdi Tušek za pomoč, strpnost in razumevanje, vsem gojiteljem gob, kolegici Mariji Ličen ter staršem za pomoč pri pisanju in oblikovanju diplome.

Predvsem pa bi se rad zahvalil Njemu, ker mi je poslal na pot vse te dobre ljudi in mi pomagal v težkih trenutkih.

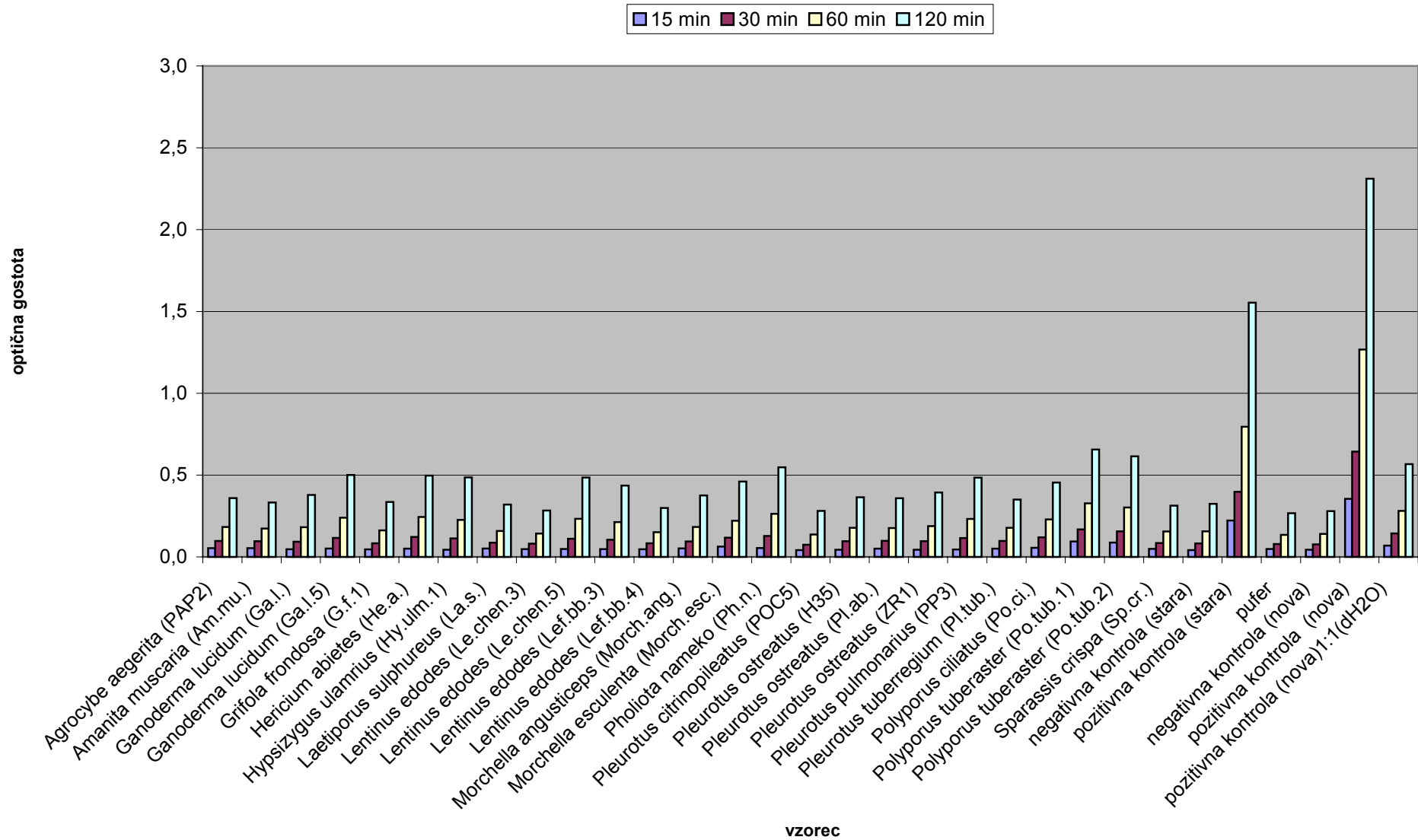
Priloga A

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v zmrznjenih trosiščih *A. bisporus*.



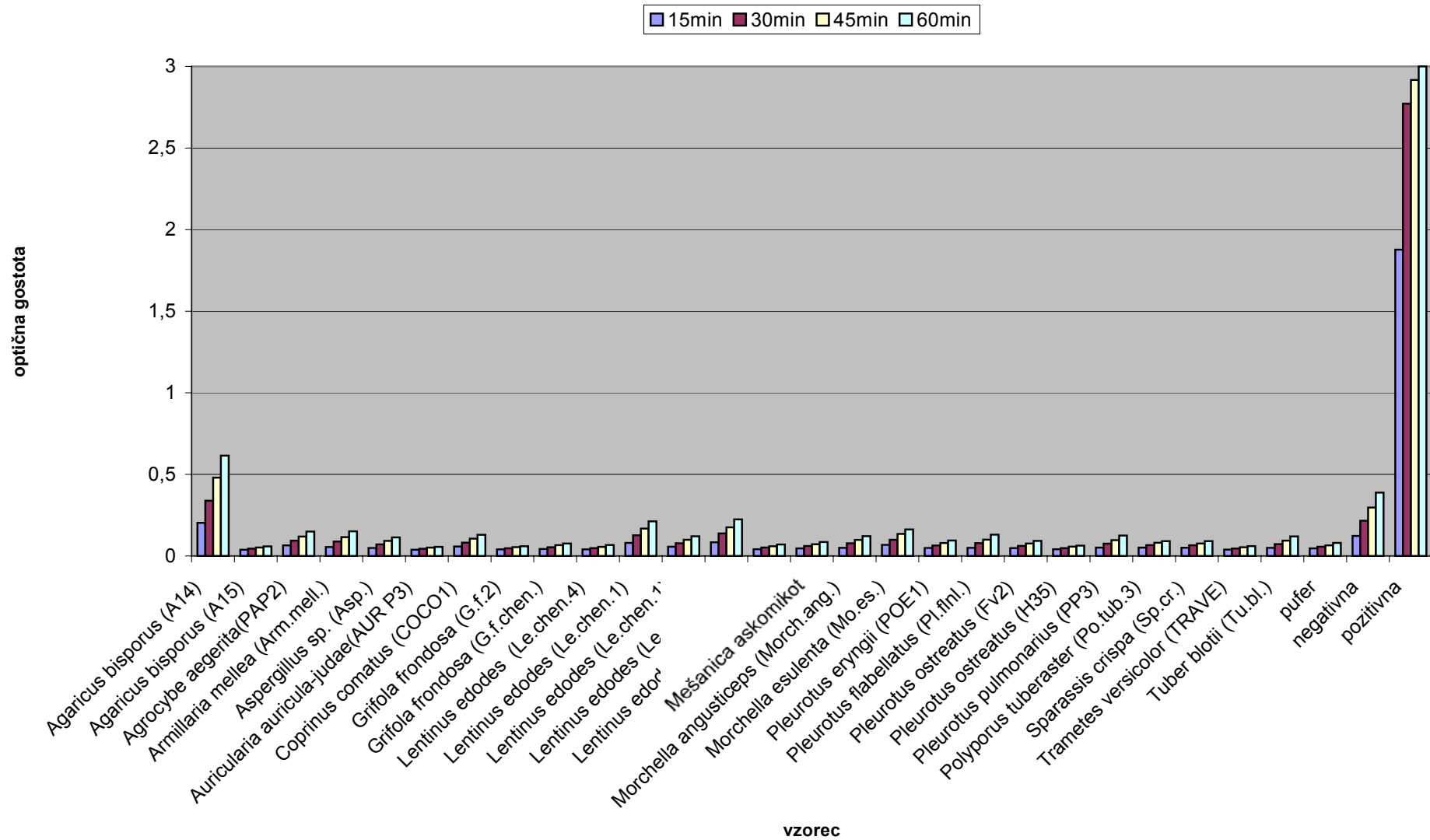
Priloga B

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih kultur gojenih in samoniklih gob na hranilnem gojišču



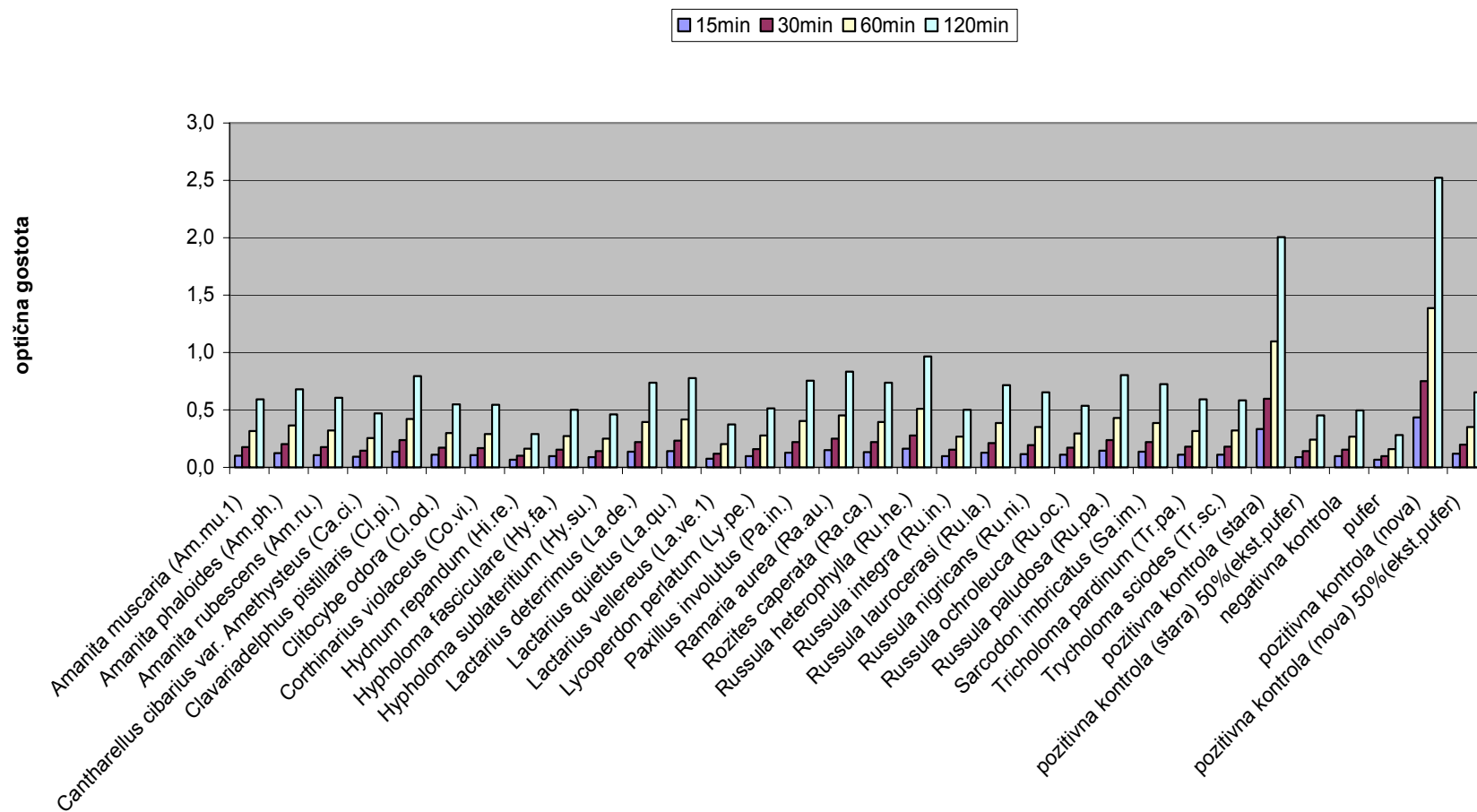
Priloga C

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih kultur gojenih in samoniklih gob na hranilnem gojišču



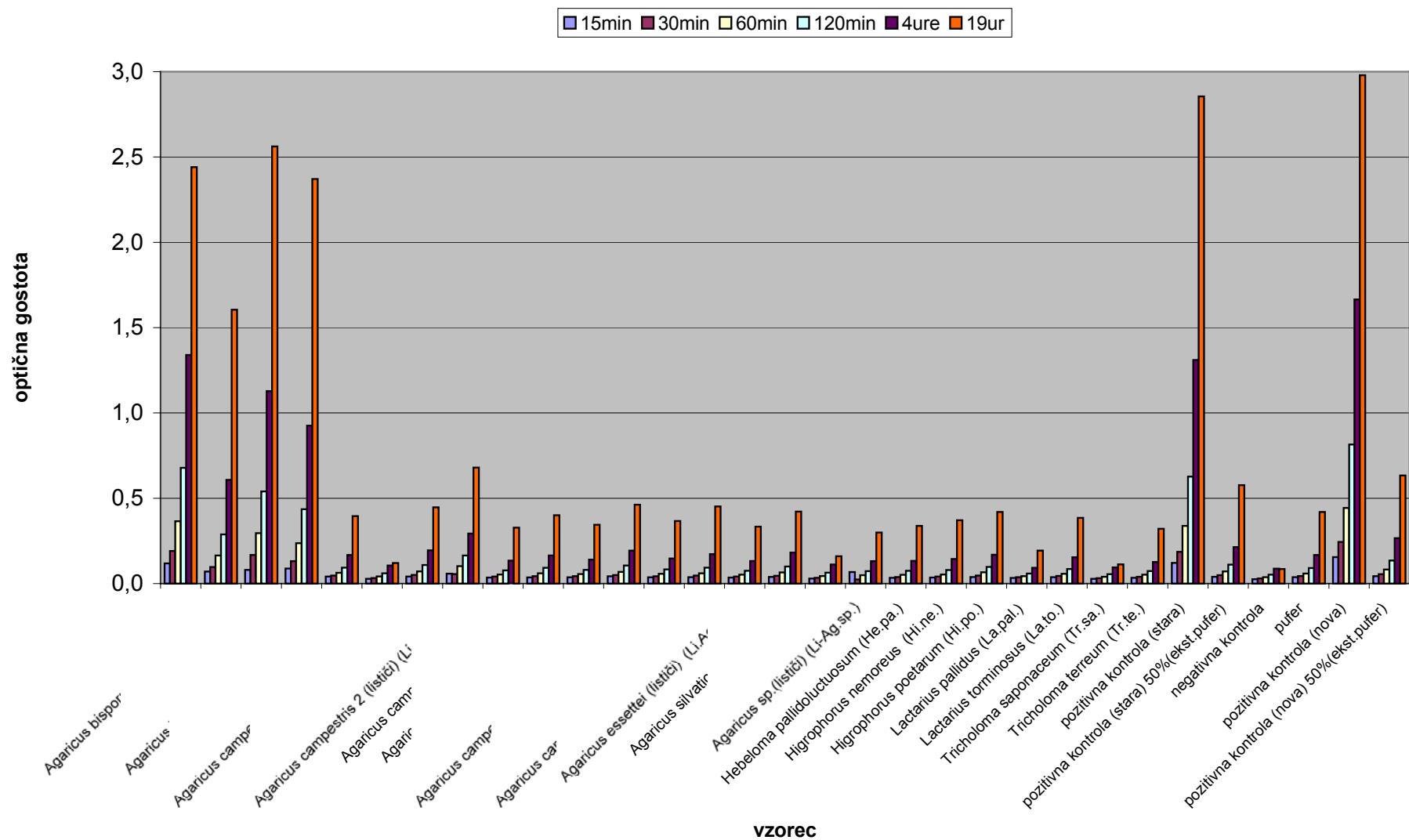
Priloga D

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih zmrznjenih trosišč samoniklih gob



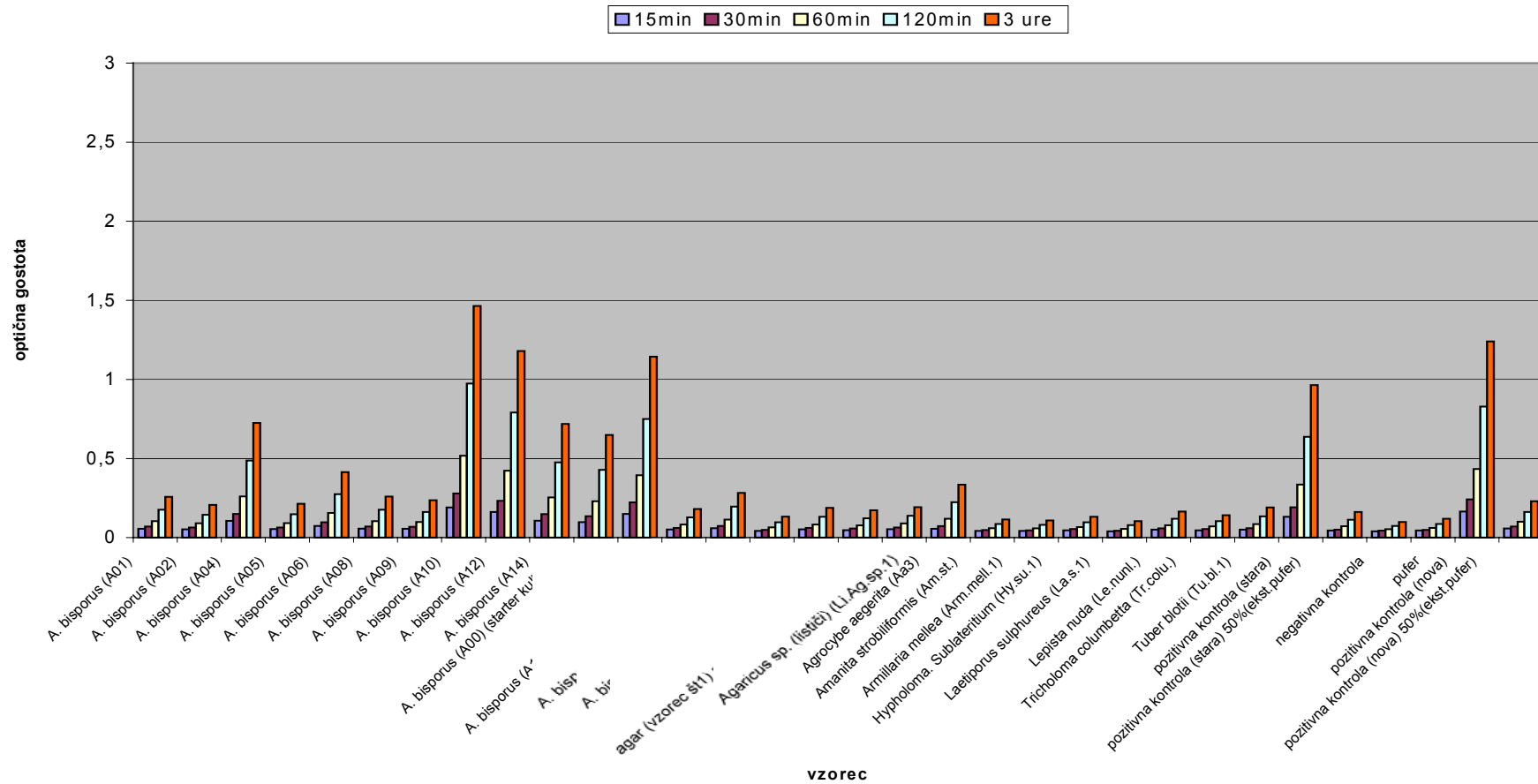
Priloga E

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč (lističih plodišč) samoniklih gob ter kultur *A. bisporus* na hranilnem gojišču



Priloga F

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč samoniklih gob, kultur *A. bisporus* na hranilnem gojišču ter hranilnega gojišča brez kulture



Priloga G

Dokazovanje prisotnosti MV1 z ELISA v vzorcih svežih trosišč samoniklih gob

