

УДК 634.531:632.4 01/08:582.282.19

© 2013 Н. Н. Гринько

Адлерская опытная станция ВИР им. Н. И. Вавилова

ВЕГЕТАТИВНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ МОРФОТИПОВ *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) M. E. BARR ИЗ ТУРЦИИ И СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

*Впервые проведен сравнительный анализ вегетативного взаимодействия морфотипов *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — возбудителя рака коры каштана посевного (*Castanea sativa* Mill.) из локальных популяций Турции и Северного Кавказа. Выделены VC-группы, подтверждена возможность передачи гиповирулентности агрессивным изолятам паразита.*

Повсеместная деградация природной популяции и искусственных посадок каштана посевного обусловлена поражением древостоя грибом *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr. [1, 2, 7]. Прогрессирование рака коры каштана и образование новых очагов инфекции обусловлено вариабельностью паразитических свойств и накоплением агрессивных патотипов в популяции *C. parasitica* [13, 16, 21, 24]. Для оптимизации фитосанитарной ситуации в каштановых лесах апробируют метод снижения агрессивности паразита путем инвазирования генома dsRNA [10, 11, 12, 14]. Стабильная конверсия гиповируса возможна лишь при анастомозировании гиф и обмене цитоплазмой между вегетативно совместимыми изолятами в популяциях с преобладанием бесполого типа размножения *C. parasitica* [20]. Спорадическая встречаемость [6, 9, 11, 15] варьирующего по штаммовому составу *Cryphonectria hypovirus* [17, 25, 26] в каштановых лесах различных эколого-географических регионов мира, обуславливает необходимость инокуляции пораженных раком участков коры смесью тестеров. Однократная интродукция гиповируса не обеспечивает оптимальной результативности, поскольку dsRNA в естественных популяциях паразита распространяется слабо [19, 22], а продуцируемые гиповирулентными изолятами пикноспоры формируют типичные высокоагрессивные клоны [15].

В предыдущих исследованиях нами выявлена спорадическая встречаемость *alb* — гиповирулентных изолятов *C. parasitica* в каштановых лесах Северокавказского региона. В серии скрещиваний: *aur* — агрессивных изолятов с *alb* — гиповирулентными [2], инвазированными штаммом CHV1-EP713 [1], установлена несовместимая реакция барраж. На этом основании сделан вывод о незначительной трансмиссии гиповирулентности в северокавказской популяции *C. parasitica* [2].

В этой связи возникла необходимость поиска и компоновки вегетативно совместимых групп изолятов *C. parasitica* в ближайшем природно-климатическом аналоге Северного Кавказа — причерноморском ареале каштана посевного Турции. Актуальность исследований очевидна, учитывая фрагментарность исследований в данных регионах [9, 11].

Материалы и методы. В 2008–2010 гг. скрещивали морфотипы 21 изолята *C. parasitica*, выделенные из каштановых насаждений причерноморской части Севера Турции — Бартынской (Амасрынский, Бартынский, Хасанкадынский районы) и

Зонгулдакской (Алапынский район) областей. Изоляты гриба любезно предоставили в процессе творческих контактов коллеги из Московского государственного областного университета. Культуры гриба хранили при 4°C на картофельно-глюкозном агаре (КГА) с ежегодным пересевом на свежеприготовленную среду. Ранее в соответствии с морфотипическими и паразитическими признаками изоляты дифференцировали на высокоагрессивные *aur* — оранжевые; среднеагрессивные *lut* — золотисто-желтые; гиповирулентные *alb* — беловатые [3, 4]. Группы изолятов, относящиеся к соответствующим морфотипам, обозначали согласно территориально-географическим границам, в пределах которых осуществлялся сбор инфекционного материала: *aur* — Ba1, Ba2, Bb3, Bh4, Bh5, Sa6, Sa7, Sa8, Sa9; *lut* — Ba10, Ba11, Bb12, Sa13, Sa14, Sa15; *alb* — Bh16, Bh17, Sa18, Sa19, Sa20, Sa21. С целью поиска вегетативно совместимых гиповирулентных групп скрещивали 21 изолят из Турции и 10 Северокавказских — выделенных нами и обозначенных начальными буквами локальных популяций (А — Адлерская, С — Сочинская, Кп — Краснополянская, Л — Лазаревская, Кр — Краснодарская) в соответствии с порядковыми коллекционными номерами: *aur* — А47, С32, Кп42, Л79, Кр61; *lut* — А12, С25, Кп14; *alb* — А2, А9 [2, 3]. В двух сериях опытов анализировали по 210 комбинаций, инкубируя чашки Петри в течение 30 сут. в термостате при температуре 24–26° С. Типы вегетативного взаимоотношения изолятов устанавливали по общепринятым реакциям — антагонизм (барраж и бордюр), совместимость [5]. Для дифференциации изолятов по типам вегетативного взаимодействия использовали показатель их частоты (p), рассчитанный от суммарного числа срачиваемых комбинаций, принятого за 1. Разнообразие реакций при вегетативной гибридизации изолятов *C. parasitica* анализировали с помощью индекса Шеннона [2, 6]. Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами статистического анализа с использованием пакета программ Excel и Statistica 7.0.

Результаты исследований. Сокультивирование изолятов *C. parasitica* из Турции выявило преобладание антагонистических реакций — барраж и бордюр. Барраж — разграничительная линия из мертвых клеток в зоне контакта двух колоний, фиксировался при срачивании изолятов независимо от их территориальной принадлежности. В зонах барража не формировались перитеции, что характерно в случае половой рекомбинации изолятов [23]. На этом основании, тестируемые изоляты *C. parasitica* отнесены к МАТ – 1 типу спаривания, превалирующему также в популяциях гриба в Греции и Македонии [21, 24]. Полученные нами данные согласуются с известными сведениями об отсутствии полового размножения в популяциях паразита в отдельных провинциях Турции [11]. Распределение частоты изолятов в соответствии с реакциями взаимодействия подтвердило высокую корреляционную связь с индексом разнообразия Шеннона ($Cr = 0,97 \pm 0,08$; $P < 0,001$). Доля морфотипов с реакцией барраж достигала максимального уровня ($p = 0,88 \pm 0,04$; $H = 1,44 \pm 0,06$), а частота их оказалась относительно выше в Зонгулдакской популяции по сравнению с Бартынской (рис. 1).

В комбинациях суммарных скрещиваний изолятов из обеих выборок выявлена предельно высокая ($p = 0,46 \pm 0,04$) частота индивидуумов с реакцией барраж, при среднем значении индекса Шеннона ($H = 0,52 \pm 0,06$).

Антагонистическое взаимодействие бордюр (отталкивание) проявилось замедленным ростом изолятов к центру чашки Петри и отсутствием мицелия на границе между колониями. Такой тип реакции установлен при сокультивировании изолятов из Бартынской популяции, а также в сочетаниях из обеих выборок.

Совместимость — срачивание колоний и отсутствие разграничительных линий отмечена в 14 комбинациях морфотипов ($p = 0,07 \pm 0,04$; $H = 0,37 \pm 0,06$). При парной конъюгации изолятов равнозначных и разнокачественных морфотипов во всех

испытанных комбинациях формировался барраж. При гибридизации однотипных индивидуумов частота и индекс разнообразия Шеннона достигали максимального уровня среди высокоагрессивных морфотипов *aur-aur* ($p = 0,11 \pm 0,02$; $H = 0,35 \pm 0,01$), а минимального — слабопатогенных *alb-alb* (рис. 2).

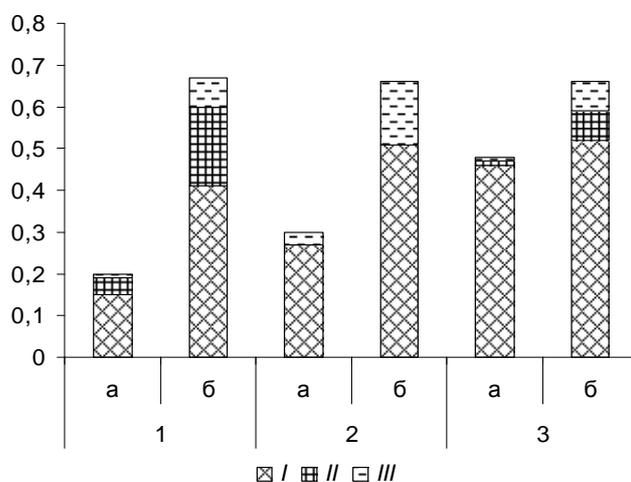


Рис. 1. Распределение изолятов *Cryphonectria parasitica* из Турции по типам вегетативного взаимоотношения (*a* — частота (*p*) морфотипа, *b* — индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: *I* — барраж, *II* — бордюр, *III* — совместимость; комбинации скрещивания морфотипов по популяциям: 1 — Бартынская, 2 — Зонгулдакская, 3 — Бартынская + Зонгулдакская)

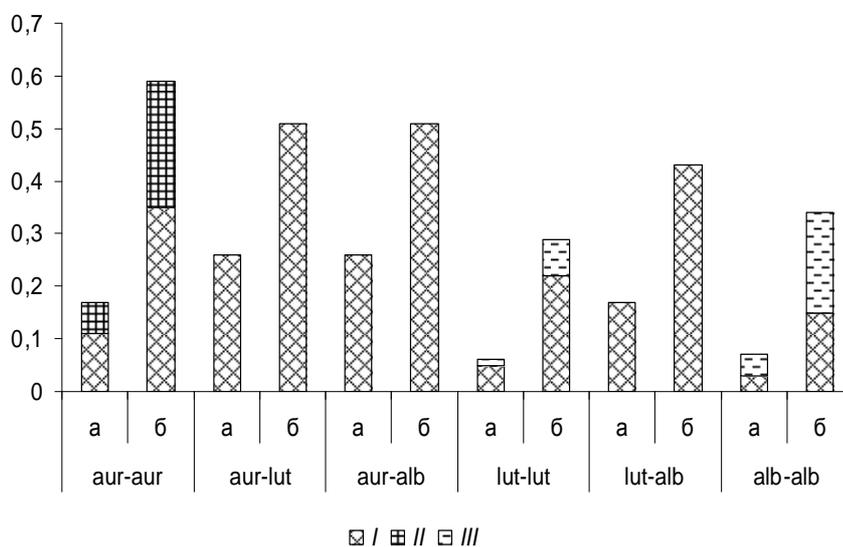


Рис. 2. Типы реакций при вегетативной гибридизации равнозначных и разнокачественных морфотипов *Cryphonectria parasitica* из Турции (*a* — доля морфотипа, *b* — индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: *I* — барраж, *II* — бордюр, *III* — совместимость)

В разнящихся группах морфотипов доминировали комбинации *aur-lut* и *aur-alb* ($p = 0,26 \pm 0,02$; $H = 0,51 \pm 0,01$). Бордюр отмечен при скрещивании пар морфотипов *aur-*

aur из обеих выборок. Данный тип реакции характерен при гибридизации изолятов Ba1 + Ba2 + Ba 3, а также каждого из них с Bh4, Bh5 и Sa6. Совместимыми оказались изоляты в сочетаниях морфотипов: lut–lut ($H = 0,07 \pm 0,01$) и alb–alb ($H = 0,22 \pm 0,01$). Характерно, что при гибридизации комбинаций alb–alb наблюдалось сращивание изолятов: Bh16 + Bh17 и каждого из них с Sa18; Sa18 + Sa19 с Sa20 и Sa21; Sa19 + Sa20 и Sa21; Sa20 + Sa21. Надо полагать, что отсутствие совместимых комбинаций и формирование барража при гибридизации отдельных изолятов alb морфотипов из Турции, свидетельствует в пользу их интерстерильности. Вероятно, барраж предотвращает миграцию гиповирусов CHV1-EP721 и CHV1-euro7 из alb — морфотипов Bh16 и Sa19 соответственно [1, 3] в aur — агрессивные изоляты *C. parasitica*.

Перекрестная гибридизация равноценных и разнящихся морфотипов из Турции и Северного Кавказа выявила преобладание реакции барраж ($p = 0,90 \pm 0,03$; $H = 2,17 \pm 0,04$). Вегетативная несовместимость типа бордюра наблюдалась в сочетаниях морфотипов lut–lut и alb–alb (рис. 3).

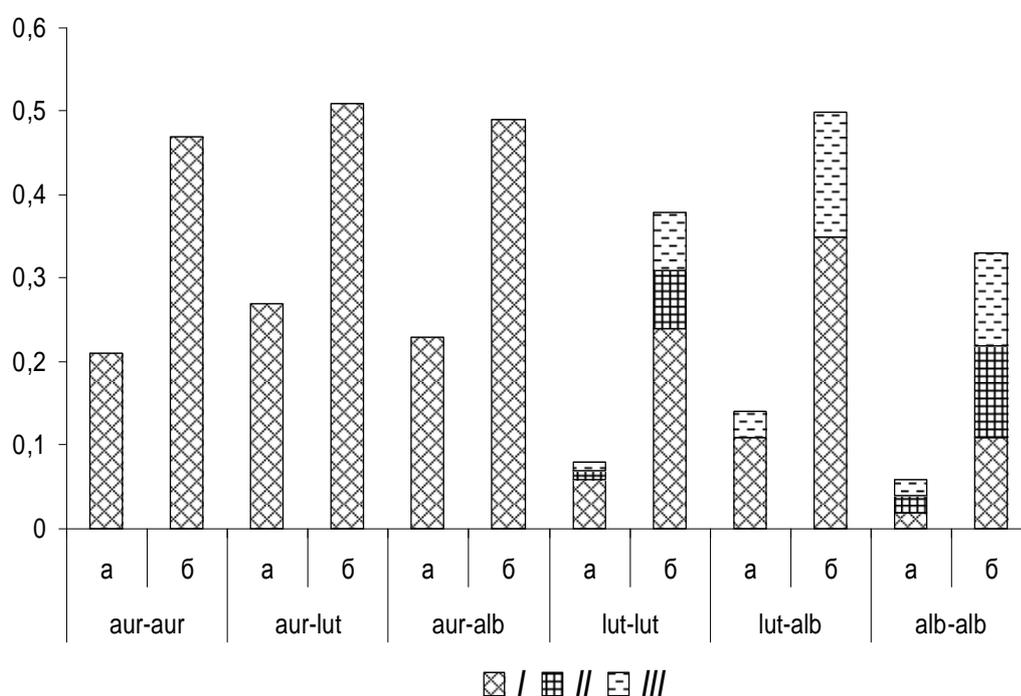


Рис. 3. Типы взаимодействия при гибридизации равнозначных и разнокачественных морфотипов *Cryphonectria parasitica* из Турции и Северного Кавказа (а – доля морфотипа, б – индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: I – барраж, II – бордюра, III – совместимость).

Характерно, что в комбинациях скрещиваний морфотипов lut–lut антагонизм проявили изоляты Ba10 + A12, Ba10 + C25 и Bb12 + C25. Сращивание выявлено у изолятов Ba11, Sa13 и Sa15 с Kп14 из Краснополянской выборки. Ранее нами установлена реакция вегетативной совместимости при сокультивировании lut–lut морфотипов из северокавказской популяции [2]. Следовательно, lut — морфотипы из Турции и Северного Кавказа относятся к генетически различным индивидуумам. Также не исключено, что lut-изоляты инфицированы штаммами гиповируса, не относящимися к подтипу CHV1 и ранее не обнаруженными в Европе [1].

Итак, барражные зоны блокируют инвазию гиповируса CHV1-EP713 из alb-морфотипов северокавказской популяции в aur — агрессивные турецкие изоляты гриба. Трансмиссия гиповирусности возможна при гибридизации alb — морфотипов A2 и A9

из Северного Кавказа со среднеагрессивными lut-Ba11, Sa13 и Sa15 и слабопатогенными alb- a 20 и Sa 21 из Турции.

Гетерогенность взаимодействия изолятов выявила в структурах локальных популяций *C. parasitica* Турции 9 VC-групп (H = 2,37), среди которых вегетативно совместимыми оказались лишь 2 (рис. 4). Полученные данные соотносятся с известным фактом отсутствия половой рекомбинации в турецкой популяции *C. parasitica* [11]. Ранее сообщалось о наличии 2 VC-групп при сокультивировании турецких изолятов с европейскими тестерами EU-1 и EU-2 [9]. Перекрестное скрещивание изолятов из Турции и Северного Кавказа выявило 15VC-групп (H = 2,68), а совместимыми оказались 3 (рис. 4). Сравнительный анализ полученных данных обнаружил сходство вегетативных реакций в популяциях патогена Турции и Европы, а также существенные отличия от Северокавказских выборок. В локальных популяциях Северного Кавказа обнаружено 38 мелких VC-групп, агрегированных в 6 VC-групп более высокого ранга, различающихся числом взаимодействующих изолятов и типом вегетативной несовместимости [2].

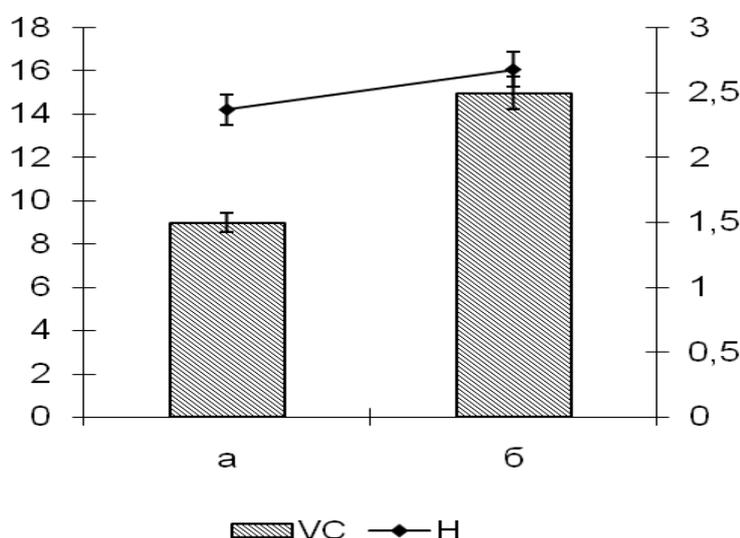


Рис. 4. Состав и разнообразие VC — групп при гибридизации изолятов *Cryphonectria parasitica*: (а) — Турция; (б) — Турция + Северный Кавказ (VC — группы, H — индекс Шеннона)

Результаты исследований объяснимы с точки зрения высокого уровня полиморфизма *C. parasitica* по генам вегетативной несовместимости [8]. Функция вегетативной несовместимости у природных изолятов гриба контролируется шестью несцепленными vis-локусами, генетика которых сложна и недостаточно изучена [5]. Определенное сочетание аллелей специфических локусов двух взаимодействующих изолятов обуславливает вегетативную несовместимость [23]. Опытами in vitro доказано, что конверсия агрессивных штаммов в гиповирулентные обусловлена числом VC-локусов, по которым отличаются тестируемые изоляты. Различия изолятов по одной паре аллелей снижают, но не препятствуют миграции dsRNA, а по многим локусам — полностью предотвращают трансмиссию гиповирулентности. Показано, что не только географически удаленные популяции *C. parasitica*, но и формирующиеся на одной раковой опухоли, распадаются на значительное число вегетативно несовместимых VC-групп. Изолированность соседних колоний друг от друга обеспечивает внутривидовую дивергенцию, а накопление в геноме гиповируса [11], препятствует половому скрещиванию изолятов паразита [5, 14]. Так, в популяциях *C. parasitica* различных

провинций Италии выявлено от 20 до 8 ВС-групп [6]. В большинстве случаев изоляты паразита из Греции и Италии совместимы с европейскими тестерами EU-1 и EU-2. Характерно, что с EU-12 скрещивается лишь незначительное число изолятов *C. parasitica* из Греции, Италии, Португалии [6, 7, 21]. Азиатские популяции гриба по сравнению с европейскими и североамериканскими генетически более полиморфны [16], что подтверждает наличие выделенных в Японии и Китае нескольких десятков ВС-групп. При этом ВС-группы из Японии проявили совместимость с 64 ВС-группами из Европы [18].

Выводы. Впервые выявлена существенная внутривидовая гетерогенность типов вегетативного взаимоотношения *C. parasitica* причерноморского ареала каштана посевного Турции. Несмотря на наличие в естественной популяции паразита alb-морфотипов, инвазированных штаммами гиповируса CHV1-EP721 и CHV1-euro7 [1, 3, 4], трансмиссия гиповирулентности ингибируется фактором вегетативной несовместимости — барраж или бордюр. Доказана потенциальная возможность конверсии гиповируса CHV1-EP713 из alb-морфотипов A2 и A9 Северного Кавказа в среднеагрессивные lut-изоляты паразита Турции. Выводы подтверждают фотоальбомы [«Полиморфизм *Cryphonectria parasitica* (Северный Кавказ)»; «Взаимоотношение морфотипов *C. parasitica* (Северный Кавказ)»; «Полиморфизм гриба *Cryphonectria parasitica* (Турция)»; «Гибридизация изолятов *C. parasitica* (Северный Кавказ#Турция)»], размещенные на <https://www.facebook.com/nina.grinko/photos>.

Библиографический список: 1. Белов А. А. Внутривидовой полиморфизм фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica* в причерноморской части ареала каштана посевного (*Castanea sativa*) / А. А. Белов. — Автореф. дис ... канд. биол. наук. М., 2010. — 19 с. 2. Гринько Н. Н. Внутривидовое разнообразие возбудителя рака каштана съедобного на Северном Кавказе / Н. Н. Гринько // Вестник РАСХН. — 2009. — № 4. — С. 29–33. 3. Гринько Н. Н. Морфологическая изменчивость гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr. из Турции / Н. Н. Гринько // Вісник ХНАУ ім. В. В. Докучаєва: сер. «Фітопатологія та ентомологія». — 2011. — № 9. — С. 44–50. 4. Гринько Н. Н. Агрессивность внутривидовых структур гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr. из Турции / Н. Н. Гринько // Вісник ХНАУ ім. В. В. Докучаєва: сер. «Фітопатологія та ентомологія». — 2012. — № 11. — С. 46–51. 5. Дьяков Ю. Т. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов / Ю. Т. Дьяков, А. В. Долгова. — М.: МГУ, 1995. — 161 с. 6. Aguin P. Distribution y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetative de *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. en castanos de Castilla y Leon / P. Aguin [et al.] // Bol. sanid. veg. Plagas. — 2005. — Vol. 31. — № 2. — P. 287–297. 7. Bragança H. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compability types mating types, and occurrence of hypovirulence/ H. Bragança [et al.] // Forest Pathology. — 2008. — Vol. 37. — № 6. — P. 391–402. 8. Breuillin F. Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers / F. Breuillin, C. Dutech // Mycological Research. — 2006. — Vol. 110. — № 3. — P. 288–296. 9. Çeliker N. M. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight in Turkey / N. M. Çeliker, E. Onoğur // Forest Snow and Landscape Res. — 2001. — Vol. 76. — № 3. — P. 378–382. 10. Deng F. Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections in the chestnut blight fungus/ F. Deng [et al.] // Eukaryotic Cell. — 2007. — № 6. — С. 1286–1298. 11. Döken M. T. Chestnut blight and evaluation of the feasibility of its biological control in the Aydin province, Turkey by using hypovirulence: I European Congress on chestnut castanea/ M.T. Döken, S. Açıkgöz, O. Erincik // Acta Hortical. — 2009. — P. 866. 12. Feducci M. Distribution of hypovirulent strains of *Cryphonectria*

parasitica in Tuscany (Italy) as influenced by dimatic – environmental factors/ M. Feducci [et al.] // Forest. — 2008. — Vol. 5. — № 1. — P. 131–135. **13. Ghezi E.** Distribution and severity of damage by *Cryphonectria parasitica* in the chestnut stands in Guilan province. Iran/ E. Ghezi, S.A. Khodaparast, R. Zare // Forest Pathology. — 2010. — Vol. 40. — P. 450–457. **14. Joshua C.M.** Vegetative incompatibility diversity in Michigan populations of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*/ C. M. Joshua [et al.] // Biol. Contr. See more of the 95th ESA Annual Meeting (August 1–6, 2010). — 2010. — P. 123–175. **15. Juhásová G.** Results of biological control of chestnut blight in Slovakia / G. Juhásová, K. Adamcikova, C. Robin // Phytoprotection. — 2005. — T. 86. — № 1. — P. 19–23. **16. Kubisiak T. L.** Fifty– three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* / T. L. Kubisiak, C. Dutech, M. G. Milgroom // Mol. Ecol. Notes. — 2007. — Vol. 7. — № 3. — P. 428–432. **17. Linder-Basso D.** Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America / D. Linder-Basso, J. N. Dynek, B. I. Hillman // Virology. — 2005. — Vol. 1. — № 337. — P. 192–203. **18. Liu Y. C.** High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China / Y. C. Liu, M. G. Milgroom // Mycologia. — 2007. — Vol. 99. — № 2. — P. 279–284. **19. Milgroom M. G.** Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis/ M. G. Milgroom, P. Cortesi // Ann. Review of Phytopathol.: Palo Alto (Calif.), 2004. — Vol. 42. — P. 311–338. **20. Papasova – Anakieva I.** Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia / I. Papasova – Anakieva [et al.] // European J. of Plant Pathol. — 2008. — Vol. 120. — № 1. — P. 35–42. **21. Perlerous C.** Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece/ C. Perlerous, S. Diamandis // Forest Pathol. — 2006. — Vol. 36. — № 6. — P. 413–421. **22. Robin C.** 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 / C. Robin [et al.] // Biol. Control. — 2010. — Vol. 53. — № 1. — P. 55–61. **23. Smith M. L.** Heterokarion incompatibility function of barrage – associated vegetative incompatibility gene (*vic*) in *Cryphonectria parasitica* / M. L. Smith, C. C. Gibbs, M. G. Milgroom // Mycologia. — 2006. — Vol. 98. — № 1. — P. 43–50. **24. Sotirovski K.** Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia/ K. Sotirovski [et al.] // Forest Pathol. — 2006. — Vol. 36. — № 2. — P. 136–143. **25. Spica D.** Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* in Sicily: Tes. [13th National Meeting of the Italian Society for Plant Pathol. (SIPAV), Foggia, 12–16 Sept., 2006.] / D. Spica [et al.] // J. Plant Pathol. — 2006. — Vol. 88. — № 3. — P. 59–60. **26. Turchetti T.** Interazioni tra cinipide galligeno e cancro della cortecia: una nuova criticità per il castagno/ T. Turchetti, E. Addario, G. Maresi // Forest @ 7. — 2010. — P. 252–258.

UDC 634.531:632.4 01/08:582.282.19

Grinko N. N. Vegetative hybridization of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr morphotypes from Turkey and the North Caucasus // The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series «Phytopathology and Entomology». — 2013. — № 10. — P. 68–74.

Interaction of vegetative morphotypes of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr - cancer agent of bark chestnut (*Castanea sativa* Mill.) seeds was first analyzed for local populations from Turkey and North Caucasus. Vegetative incompatibility of morphotypes and allocated VC-group was proved.

Fig. 4. Bibl. 26.

Одержано редколлегією 26.11.2013 р.