

УДК 634.531:632.4 01/08:582.282.19

© 2014 Н. Н. Гринько

Адлерская опытная станция ВИР им. Н. И. Вавилова

## АГРЕССИВНОСТЬ ВНУТРИВИДОВЫХ СТРУКТУР ГРИБА *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) M. E. BARR ИЗ ТУРЦИИ

*Гринько Н. Н. Агрессивность внутривидовых структур гриба *Cryphonectria parasitica* (MURRILL) M. E. BARR из Турции. Впервые дана оценка агрессивных свойств природной популяции *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — возбудителя рака коры каштана съедобного (*Castanea sativa* Mill.) из Турции. Установлены различия морфотипов по признакам агрессивности, фитотоксической и ферментативной активности. 16 назв.*

**Ключевые слова:** каштан съедобный, гриб *Cryphonectria parasitica*, морфотипы, рак коры, возбудитель, паразитические свойства.

В естественных ареалах и искусственно созданных молодых насаждениях различных регионов мира кора каштана посевного или съедобного (*Castanea sativa* Mill.) массово поражается раком [1, 6, 12–14]. Возбудитель заболевания — гриб *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr, распространяясь по камбиальному слою и тканям заболони, вызывает некротизацию, гипертрофию, разрушение и отслаивание коры. Колонизация сосудов мицелием и токсические метаболиты гриба способствуют массовому отмиранию кроны, боковых побегов и, как следствие, гибели пораженных деревьев.

Мониторинг микрорезволюционных процессов в природных популяциях гриба в различных регионах мира выявил варьирование генотипической изменчивости *C. parasitica* по уровню вирулентности [2, 6]. Установленный нами ранее факт внутривидового полиморфизма культурально-морфологических признаков *C. parasitica* из Турции [4] обусловил необходимость анализа агрессивности природной популяции патогена.

В этой связи цель исследований — оценить патогенные свойства возбудителя рака коры каштана посевного *C. parasitica* в причерноморском ареале Турции, поскольку сообщения по данному вопросу практически отсутствуют [9, 10].

**Материалы и методы.** В 2008–2010 гг. анализировали паразитические признаки 21 изолята *C. parasitica*, любезно предоставленные сотрудниками Московского областного государственного университета [4]. Изоляты выделены из пораженной коры каштановых деревьев причерноморской части Севера Турции — Бартынской (Амасрынский, Бартынский, Хасанкадынский районы) и Зонгулдакской (Алапынский район) областей. Идентифицированные нами 3 морфотипа: оранжевый (*aur*), золотисто-желтый (*lut*) и беловатый (*alb*), обозначали согласно территориально — географическим границам, в пределах которых осуществлялся сбор инфекционного материала: *aur* – Ba1, Ba2, Bb3, Bb4, Bb5, Sa6, Sa7, Sa8, Sa9; *lut* — Ba10, Ba11, Bb 12, Sa13, Sa14, Sa15; *alb* – Bb16, Bb17, Sa18, Sa19, Sa20, Sa21 [4].

Для оценки паразитических признаков — агрессивность, фитотоксическая и ферментативная активность морфотипы *C. parasitica* культивировали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в течение 30 сут. Агрессивность (*Agr*) изолятов тестировали по

ускоренной методике на яблоках сорта Боровинка. Радиальный рост определяли на 7–10 сут. после инокуляции, измеряя длину и ширину образовавшихся некрозов [2]. Токсичность и ферментативную активность изолятов *C. parasitica* оценивали в фильтрате культуральной жидкости после инкубирования гриба в течение 30 сут. на жидкой картофельно-глюкозной среде [2]. Фитотоксическую активность (*Fit*) изолятов определяли на 3-х суточных проростках кукурузы по методике Берестецкого, а субстратную специфичность ферментов (*Fer*) оценивали визуально — по цветной реакции Бавендамма с использованием танина [3]. Значения показателей признаков ранжировали в баллах (*b*) по соответствующим шкалам [2–4]. Полученные данные суммировали и усредняли, преобразуя в индекс агрессивности (*Iagr*) изолятов по шкале: 0...1 — низкий; 1,1...2 — средний, 2,1...3 — высокий.

Частоту распределения изолятов по анализируемым признакам оценивали с помощью индекса разнообразия (H) Шеннона [1, 2, 4]. Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами статистического анализа с использованием пакета программ Excel и Statistica 7.0.

**Результаты и обсуждение.** К потенциальным компонентам агрессивности относят токсические метаболиты *C. parasitica*, нарушающие водный потенциал растительных тканей и функции мембран клеток, равно как и внеклеточные фенолоксиляющие ферменты, участвующие в детоксикации танинов в коре каштана [3]. Установлена существенная изменчивость паразитических свойств *aur*, *lut* и *alb* — морфотипов *C. parasitica*, оцениваемых по показателям агрессивности (количественный показатель патогенности), фитотоксической и ферментативной активности (рис. 1).

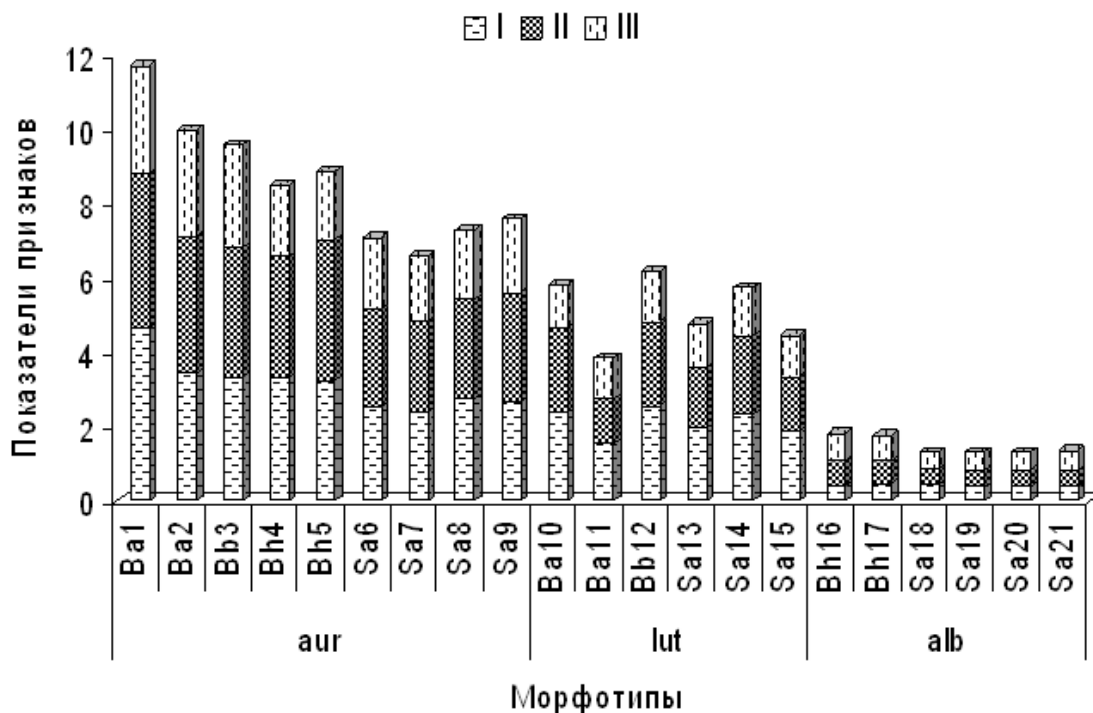


Рис. 1. Изменчивость морфотипов *C. parasitica* по изученным признакам.

*Примечание:* Здесь и на рис. 1–3 описание морфотипов представлено в методике; I– агрессивность, II– фитотоксическая активность, III– ферментативная активность.

По признаку агрессивности (*Agr*) выявлены значительные ( $Cv = 59,7\%$ ) различия морфотипов, о чем свидетельствует высокая корреляционная зависимость ( $Cr = 0,99 \pm 0,03$ ;

$P < 0,001$ ) между средним показателем ( $Ag_r = 2,05 \pm 0,08$ ;  $Ag_{r_{\min-\max}} = 0,35-4,67 \div 0,235$ ) и стандартным отклонением ( $\sigma = 1,23$ ). Максимальным значением характеризовались ауг-морфотипы ( $Ag_r = 3,14 \pm 0,06$ ) с преобладанием доли высоко- и среднеагрессивных (рис. 1). Предельно высокий показатель ( $Ag_r = 3,59 \pm 0,09$ ) выявлен у ауг-морфотипов Бартынской популяции, а более низкий ( $Ag_r = 2,57 \pm 0,09$ ) — Зонгулдакской. Средний показатель ( $Ag_r = 2,09 \pm 0,08$ ) типичен для lut-морфотипов, а минимальный ( $Ag_r = 0,39 \pm 0,04$ ) — для alb-морфотипов. Менее пигментированные морфотипы из разных популяций не отличались по средним значениям агрессивности. Показатели  $Ag_r$  и индекс разнообразия Шеннона находились в высокой отрицательной корреляционной связи ( $Cr = -0,82 \pm 0,12$ ;  $P < 0,001$ ).

Фитотоксическая активность (Fit) тестируемых морфотипов варьировала в значительных пределах ( $Cv = 60,5\%$ ), о чем свидетельствует высокая корреляционная взаимосвязь ( $Cr = 0,96 \pm 0,06$ ;  $P < 0,001$ ) между средним показателем ( $Fit = 2,05 \pm 0,08$ ;  $Fit_{\min-\max} = 0,42-4,15 \div 0,23$ ) и стандартным отклонением ( $\sigma = 1,24$ ). Максимальным показателем отличались ауг-морфотипы ( $Fit = 3,23 \pm 0,07$ ) с доминированием доли высоко- и среднетоксичных (рис. 1). Морфотипы lut характеризовались средним значением признака ( $Fit = 1,83 \pm 0,08$ ), а alb-минимальным ( $Fit = 0,51 \pm 0,04$ ). Следует отметить, что ауг-морфотипам из Бартынской популяции свойственны более высокие показатели признака ( $Fit = 3,67 \pm 0,07$ ) по сравнению с Зонгулдакской ( $Fit = 2,68 \pm 0,07$ ). Подобной закономерности относительно слабопигментированных морфотипов не выявлено. Показатели Fit находились в отрицательной корреляционной связи ( $Cr = -0,77 \pm 0,14$ ;  $P < 0,001$ ) с индексом разнообразия Шеннона.

Полученные данные согласуются с обнаруженной нами ранее взаимосвязью признаков интенсивности продуцирования внеклеточных метаболитов и фитотоксической активности изолятов *C. parasitica* из Северного Кавказа с их агрессивностью [2].

Ферментативная активность (Fer) морфотипов отличалась существенной вариабельностью ( $Cv = 53,7\%$ ), подтвержденной значимой корреляционной связью ( $Cr = 0,91 \pm 0,09$ ;  $P < 0,001$ ) между средним показателем ( $Fer = 1,45 \pm 0,05$ ;  $Fer_{\min-\max} = 0,46-2,91 \div 0,14$ ) и стандартным отклонением ( $\sigma = 0,78$ ). Максимальное значение признака отмечено у ауг-морфотипов ( $Fer = 2,21 \pm 0,05$ ) с превалированием доли высоко- и среднеактивных изолятов (рис. 1). Средним показателем характеризовались lut-морфотипы ( $Fer = 1,20 \pm 0,03$ ), а минимальным ( $Fer = 0,57 \pm 0,03$ ) — alb. Следует отметить, что значение Fer оказалось выше у ауг-морфотипов из Бартынской популяции ( $Fer = 2,47 \pm 0,05$ ), по сравнению с Зонгулдакской ( $Fer = 1,89 \pm 0,05$ ). По данному признаку морфотипы lut и alb существенно не различались в популяциях. Показатели Fer находились в высокой отрицательной корреляционной связи с индексом разнообразия Шеннона ( $Cr = -0,83 \pm 0,12$ ;  $P < 0,001$ ). Подобная закономерность установлена нами ранее при оценке ферментативной активности изолятов гриба из Северокавказского региона. Так, менее агрессивные изоляты *C. parasitica* характеризовались более низким уровнем продуцирования внеклеточных ферментов [2, 3].

Проведенный статистический анализ полученных данных подтвердил существенные различия тестируемых изолятов по паразитическим признакам — «агрессивность» ( $Ag_r$ ), «фитотоксическая активность» (Fit), «ферментативная активность» (Fer) ( $P < 0,001$ ;  $Ag_r - Fit - Fer: F_{\phi} = 47,97 - 65,54 - 31,35 > F_{01} = 8,02$ ). На высоком уровне значимости ( $P < 0,001$ ) доказана тесная положительная корреляционная связь изученных признаков:  $Ag_r - Fit$  ( $Cr = 0,98 \pm 0,04$ );  $Ag_r - Fer$  ( $Cr = 0,93 \pm 0,08$ );  $Fit - Fer$  ( $Cr = 0,95 \pm 0,07$ ) и определен средний уровень агрессивности ( $I_{agr} = 1,90$ ) популяции *C. parasitica* из Турции (рис. 2). Высокоагрессивными оказались ауг-морфотипы ( $I_{agr} = 2,92$ ), средне — lut ( $I_{agr} = 1,74$ ) и слабо — alb ( $I_{agr} = 0,54$ ). Более значимым внутривидовым полиморфизмом по уровню агрессивности характеризовались ауг-морфотипы ( $I_{agr} = 3,31$ ) Бартынской популяции по

сравнению с Зонгулдакской ( $I_{agr} = 2,53$ ). Подобная закономерность для lut- и alb-морфотипов не выявлена.

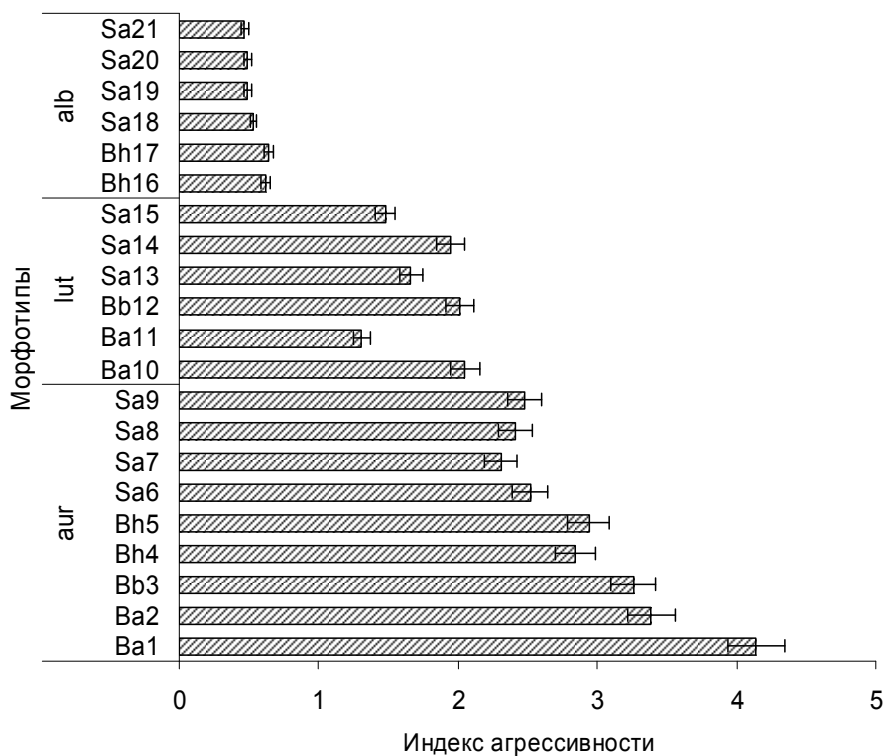


Рис. 2. Индекс агрессивности ( $I_{agr}$ ) морфотипов *C. parasitica*

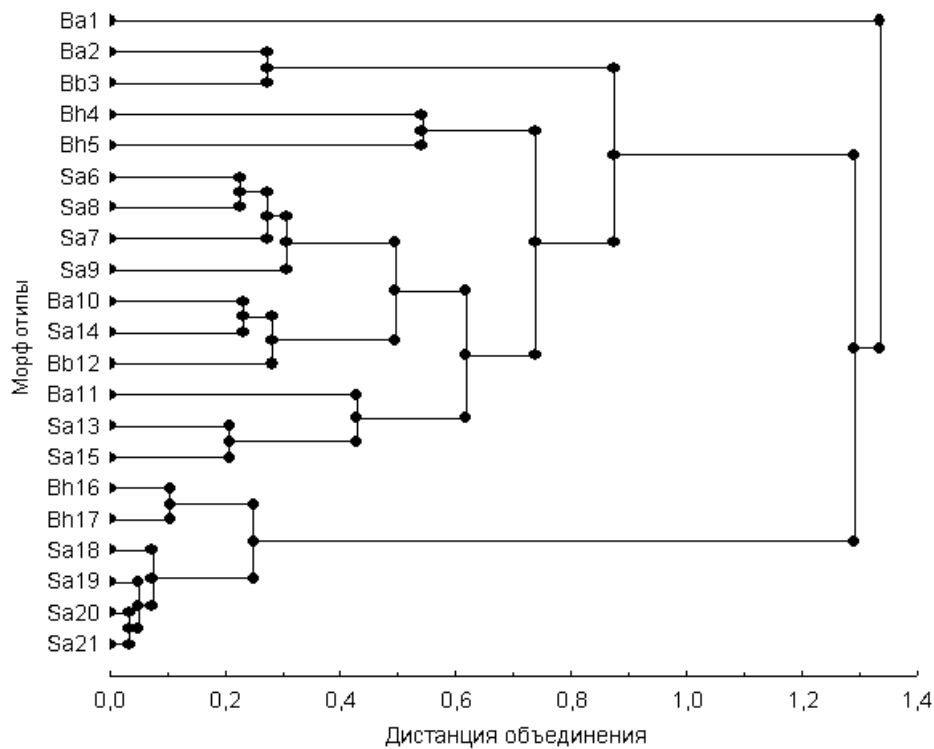


Рис. 3. Дендрограмма сходства морфотипов *C. parasitica* по изученным признакам

Методом попарно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением показателей изученных признаков тестируемые изоляты распределены по 3 основным кластерам (рис. 3).

Группировка изолятов внутри кластеров независимо от их географического положения [4], указывает на пространственную внутривидовую гетерогенность *C. parasitica* в ареале каштановых лесов Турции. Так, в первом кластере, содержащем аутоморфотипы Бартынской популяции, близкое сходство наряду с высокоагрессивными изолятами из одного района выборки (Bh4–Bh5) проявили и более отдаленные территориально (Ba2–Bb3). Предельно высоким уровнем агрессивности отличался изолят Ba1, представляющий фактически отдельный кластер. Вторым кластером включал 10 изолятов из обеих популяций: аутоморфотипы (Sa6–Sa8) и лутиморфотипы (Ba10–Sa14, Sa13–Sa 15). В третьем кластере представлены алломорфотипы с минимальным уровнем агрессивности, сформировавшие внутривидовые пары изолятов: Bh16 – Bh17 и Sa20–Sa21.

Полученные нами данные свидетельствуют о внутривидовой гетерогенности степени агрессивности гриба из Турции, которая значимо ниже по сравнению с популяцией *C. parasitica* из Северокавказского региона [1, 4]. К числу факторов, обеспечивающих существование в популяциях фитопатогенных грибов морфотипов, с варьирующим уровнем агрессивности относится стабилизирующий отбор [5], равно как и наличие в цитоплазме гриба внеядерных элементов — плазмид, вирусов и вирусоподобных частиц. В большей степени фенотипическая изменчивость — морфология, жизнеспособность и патогенность гриба обусловлена штаммовой принадлежностью гиповируса dsRNA [6, 9, 10]. В Европе преобладает вирус *Cryphonectria hypovirus* 1 — CHV1 [8, 15]. На Северном Кавказе, выделенные нами A2 и A9 алломорфотипы *C. parasitica* [1] инфицированы гиповирусом CHV1–EP713, а изоляты Bh16 и Sa20 из Турции соответственно CHV1–EP721 и CHV1–Euro 7 [4]. Турецкие гиповирулентные изоляты идентичны европейским, но существенно отличаются от северокавказских морфотипов. Известно, что инвазирование изолятов *C. parasitica* штаммами гиповируса CHV1–Euro 7 лишь незначительно влияет на их паразитические и морфологические признаки [10], в то время как CHV1–EP713 значительно преобразует геном гриба [15].

Таким образом, средний уровень агрессивности морфотипов и факты отсутствия [9] либо спорадической встречаемости гиповирулентных изолятов [11] свидетельствуют в пользу относительно низкой конкурентоспособности турецкой популяции по сравнению с северокавказской [1–3]. Нами не исключается усиление вредоносности рака коры в каштановых лесах Турции в результате насыщения популяции высокоагрессивными морфотипами из Северокавказского региона. Обмен генетическими клонами гриба возможен аэрогенно, а также посредством птиц и насекомых. Об этом свидетельствует факт активной миграции диаспор гриба между географическими популяциями Италии, Франции, Словении, Швейцарии и других стран Европы с помощью желтой осы (*Dryocotus kuniphilus*) [16].

**Выводы.** Впервые дана оценка паразитических свойств возбудителя рака коры каштана посевного (*Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr) из Бартынской и Зонгулдакской областей Турции. Подтверждены существенные различия тестируемых морфотипов по изученным признакам — «агрессивность» (Agr), «фитотоксическая активность» (Fit), «ферментативная активность» (Fer) ( $P < 0,001$ ; Agr – Fit – Fer:  $F_{\phi} = 47,97-65,54-31,35 > F_{01} = 8,02$ ). На высоком уровне значимости ( $P < 0,001$ ) доказана тесная положительная корреляционная связь оцениваемых признаков: Agr–Fit ( $Cr = 0,98 \pm 0,04$ ); Agr–Fer ( $Cr = 0,93 \pm 0,08$ ); Fit–Fer ( $Cr = 0,95 \pm 0,07$ ) и определен средний

уровень агресивності (Iagr = 1,90) популяції *C. parasitica* из Турції. Высокоагресивними оказались aug-морфотипы (Iagr = 2,92), средне — lut (Iagr = 1,74) и слабо — alb (Iagr = 0,54).

**Бібліографічний список:** 1. **Гринько Н. Н.** Внутривидовое разнообразие возбудителя рака каштана съедобного на Северном Кавказе / Н. Н. Гринько // Вестник РАСХН. — 2009. — № 4. — С. 29–33. 2. **Гринько Н. Н.** Изменчивость *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr. по признаку агрессивности / Н. Н. Гринько // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — М., 2009. — № 2. — С. 22. 3. **Гринько Н. Н.** Чувствительность к танину внутривидовых структур *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr / Н. Н. Гринько // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — М., 2010. — № 1. — С. 98. 4. **Гринько Н. Н.** Морфологическая изменчивость гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr. из Турции / Н. Н. Гринько // Вісник ХНАУ: сер. «Фітопатологія та ентомологія». — Х., 2011. — № 9. — С. 44–50. 5. **Левитин М. М.** Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов / М. М. Левитин/. — Л.: Агропромиздат, 1986. — 208 с. 6. **Bragança H.** *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types mating types, and occurrence of hypovirulence / H. Bragança [et al.] // Forest Pathology. — 2008. — Vol. 37, № 6. — С. 391–402. 7. **Breuellin F.** Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French — populations assessed by microsatellite markers / F. Breuellin, C. Dutech // Mycological Research. — 2006. — Vol. 110, № 3. — С. 288–296. 8. **Bryner S. F.** Temperature – Dependet Genotype by – Genotype Interaction between a Pathogenic Fungus and Its Hyperparasitic/ S. F. Bryner, D. Rigling // The American Naturalist. — 2011. — Vol. 177, № 10. — С. 65–74. 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. — С. 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. **Griffin G. J.** American chestnut survival in understory mesic sites following the chestnut pandemic / G. J. Griffin // Can. J. Bot. — 1992. — Vol. 70, № 10. — С. 1950–1956. 13. **Hoegger P.** Differential Transfer and Dissemination of Hypovirus and Nuclear and Mitochondrial Genomes of a Hypovirus – Infected *Cryphonectria parasitica* Strain after Introduction into a Natural Population/ P. Hoegger [et al] // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69. — P. 3767–3771. 14. **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. — С. 413–421. 15. **Robin C.** Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south – castern France is associated with fitness – related traits/ C. Robin [et al] // Biol. Control. — 2010. — Vol. 53, № 1. — С. 55–61. 16. **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.

Поступила в редакцію 10.09.2014 г.

**Гринько Н. Н. Агрессивность внутривидовых структур гриба *Cryphonectria parasitica* (MURRILL) M. E. BARR из Турции.** Впервые дана оценка агрессивных свойств природной популяции *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — возбудителя рака коры каштана съедобного (*Castanea sativa* Mill.) из Турции. Установлены различия морфотипов по признакам агрессивности, фитотоксической и ферментативной активности. 16 назв.

**Ключевые слова:** каштан съедобный, гриб *Cryphonectria parasitica*, морфотипы, рак коры, возбудитель, паразитические свойства.

**Grinko N. N. Aggressiveness intraspecies structure of the fungus *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr from Turkey.** For the first time the aggressive properties of the natural population of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — the causative agent of cancer of cortex of edible chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from Turkey were assessed. The differences between three morphotypes by aggressiveness, phytotoxic and enzyme activity are determined.....16 refs.

**Key words:** fungus, *Cryphonectria parasitica*, *Castanea sativa*, morphotypes, cancer of cortex