

## ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ВІРУЛЕНТНОСТІ

Гриби – одна з найпоширеніших груп живих організмів на Землі. Вони населяють ґрунти та водойми, організми рослин, тварин, комах. У ґрунті біомаса грибів може сягати понад 90 % від його загальної біомаси, яка охоплює дощові черви та інші безхребетні [3]. На сьогодні описано близько 100 000 видів грибів [20], що складає лише 7 % від їх прогнозованої кількості [15].

На відміну від тварин, збудниками хвороб яких є переважно бактерії і віруси, більшість фітопатогенів є грибами. Зв'язок грибів із рослинами склався ще на ранніх етапах їх еволюції. Найпримітивніші гриби – хітрідіоміцети і ооміцети паразитують на найпримітивніших рослинах – водоростях. Симбіотичні гриби забезпечили адаптацію зелених рослин до наземного існування. Майже немає грибів, що б жили у симбіозі з тваринами. Ферментативний апарат грибів налаштований на розкладання вуглеводів – будівельного матеріалу і запасних поживних речовин рослин. Тому не тільки паразитичні гриби вибрали як об'єкт свого нападу рослини, але і сапротрофні гриби живляться трупами рослин, залишивши трупи тварин бактеріям [4].

Гриби цікаві ще й тим, що є найпримітивнішими еукаріотами, тому характеризуються широким розмаїттям форм і способів розмноження, типами ядерного апарату, життєвого циклу. Гриби появились 1,5 млрд років тому, відділившись від бактерій і археїв, сформувавши добре оформлене ядро та набувши інших змін, притаманних еукаріотам. Це стосується в першу чергу розміру та організації генома. За своїм розміром геном грибів посідає проміжне місце між геномом прокаріотів та більшості еукаріотів і варіює від 13 до 40 (зрідка до 90) Мб [5].

### Встановлення видової належності грибів

Перші спроби класифікувати гриби були здійснені ще Плінієм Старшим (23–79 рр. н.е.). У 17 столітті після винайдення мікроскопа були описані перші мікроскопічні гриби. До появи молекулярно-біологічних методів ідентифікації для реєстру того чи іншого виду гриба користува-

лися результатами культурально-морфологічного аналізу окремих штамів [6]. Саме морфологічні структури лягли в основу поділу царства грибів на класи, порядки, роди і види [5]. Їх розмаїття надзвичайне. Майже кожен вид у природних умовах здатен формувати органи статевого і нестатевого спороношення (плодові тіла, сумки, сумкоспори, базидії, базидіоспори, конідії, спорангії і спорангіоспори), спочиваючі (склероції, хламідоспори) та інші характерні морфологічні структури (конідієносці, фіаліди). Проте в умовах штучного культивування більшість грибів таких структур не утворює, що ускладнює їх ідентифікацію і спонукає систематиків вдаватися до використання інших ознак (культуральних) та методів ідентифікації (серологічних, біохімічних). Важливою перепоною для використання морфологічних ознак є їх широка варіабельність на різних поживних середовищах, а також повільна швидкість росту грибів *in vitro*. І навіть розробка селективних поживних середовищ суттєво не вирішує проблеми.

На сьогодні рекомендовано використання молекулярних маркерів як для визначення видової належності патогенів, так і для встановлення їх патогенних властивостей. Завдяки розвитку методів аналізу ДНК наприкінці 20-го – на початку 21 століття система грибів почала змінюватися на очах, адже не тільки найбільші таксони, але й самі критерії їх опису стали зовсім іншими. Швидкими темпами поповнюються генетичні банки даних щодо грибів. Якщо на 2004 рік було секвеновано 16 421 грибних геномів, що становило 16 % від загальної кількості описаних видів [15], то на 2016 рік таких геномів уже налічувалося понад 77 тисяч [14].

Зі збільшенням числа секвенованих генотипів, систематика грибів стає все більш еволюційнообґрунтованою і стабільною. Змінюється сама концепція «виду»: від таксономічної та біологічної – до філогенетичної. І, нарешті, збільшується чисельність відомих видів грибів – появились так звані екологічні види (*environmental species*) [16].

Результати молекулярних досліджень стали основою не лише виявлення нових видів, але і перегляду систематичного положення того чи іншого виду, роду чи навіть порядку. Це спонукало дослідників по-іншому глянути на визначення виду гриба, зважаючи на відсутність у деяких видів статевого розмноження. Неабиякий інтерес викликають виявлені за допомогою молекулярних маркерів нові генотипи грибів (екологічні види), що, у свою чергу, дало підстави спрогнозувати чисельність царства грибів до 5,1 і більше млн. видів [10]. Питання, поставлене 1997 року Хоксвортом і Росманом: «Де всі неописані види?» [17], підхопили й інші дослідники [8, 9, 25]. Все, що нас оточує, може стати джерелом виявлення нових видів грибів: ґрунт, вода, рослинні рештки, а також живі рослини, тварини та інші організми. Оскільки багато видів грибів у природних умовах знаходяться в асоціативних взаємовідносинах з іншими організмами, культивування таких грибів проблематичне. Лише аналіз ДНК дає можливість виявити ступінь подібності з іншими грибами і таким чином ідентифікувати новий вид. Але залишається відкритим питання, чи може вважатися видом взятий із навколишнього середовища зразок грибною ДНК? Чи потрібний матеріальний носій (талом гриба) як типовий зразок [25]? Зважаючи на те, що більшість мікроміцетів (як і бактерій) некультивуєбельні (тобто не культуються в штучних умовах), уже можна перебачити результат цієї дискусії.

### Визначення патогенних властивостей

На сьогодні описано близько 10 тисяч видів фітопатогенних грибів [7]. Грибні фітопатогени мають важливе господарське значення, оскільки, за даними ФАО, щорічні втрати урожаю сільськогосподарських культур від грибних хвороб складають 16 млрд. доларів США [1].

Дослідження патогенності грибів базується на застосуванні постулатів Коха, що охоплює: 1) виділення ізоляту і вирощування в чистій культурі, 2) зараження здорової рослини (створення штучних інфекційних фонів), 3) повторну ізоляцію з ураженої тканини рослини. Тривалий час (до появи молекулярних методів досліджень) вірулентність/авірулентність штамів фітопатогенних грибів визначали шляхом зараження моноспоровими культурами стійких та сприйнятливих сортів (видів), що дозволяло ідентифікувати гени, які б визначали сортову (чи, відповідно, видову) специфічність. При цьому взаємодія рослина – патоген вивчалася на культурних рослинах

із відповідними генами стійкості. Було встановлено, що стійкість рослин до грибних фітопатогенів забезпечується так званими R-генами, більшість із яких кодує нуклеотид-зв'язуючі багаті на лейцинові повтори (NB-LRR) білки, які можуть прямо розпізнавати продукти відповідних авт-генів патогена і запускати різні захисні реакції [21]. Отже, гени авірулентності (авт-гени) забезпечували стійкість рослини до хвороби, а гени вірулентності відігравали, відповідно, протилежну роль – вони сприяли ураженню рослини хворобою. Таким чином, вірулентність розглядалася як здатність гриба спричинити хворобу на тому чи іншому сорті, що відповідало терміну «специфічність», а патогенність трактувалася більш широко як здатність спричинити хворобу взагалі. З розширенням кола грибів, фітопатогенні властивості яких досліджувалися, включаючи і ті, яким не властива ні сортова, ні видова специфічність, в науковій літературі з'явилося неоднозначне трактування термінів «патогенність» і «вірулентність». Так, поняття «вірулентності» часто звужувалося до значення якісної складової патогенності, а кількісною складовою вважалася «агресивність» [4]. Часто термін «вірулентність» вживався як синонім терміна «патогенність».

І лише в результаті досліджень генома фітопатогенних мікроміцетів було доведено, що взаємодію рослина – патоген визначає три групи генів (Pathogen-Host Interaction genes (PHI genes) – генів «взаємодії»): гени патогенності, гени вірулентності/агресивності та ефекторні гени [30]. Якщо продуктом гена визначається, чи буде рослина хворіти, чи ні, такий ген відноситься до генів патогенності. Гени вірулентності/агресивності визначають рівень розвитку хвороби, отже, вірулентність, яку раніше пов'язували лише зі стійкістю рослини, на сьогодні розглядається як наслідок поєднання властивостей патогена і хазяїна. Останнє визначення є аналогічним прийнятому у медицині, що може розглядатися як ще один крок на шляху до «спільної теорії імунітету» [2].

Найбільш повно у грибних фітопатогенів вивчена група генів, які на сьогодні носять назву «ефекторні» (effector genes), а раніше називалися генами авірулентності (авт-гени). Першою роботою, в якій вдалося клонувати авірулентні гени (авт-гени), було дослідження бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* [29]. Цьому сприяло те, що геном бактерій маленького розміру і легко піддається аналізу. Із бібліотеки генів раси 6 було ізольовано фрагмент (pPg6L3), який

за перевірки 600–700 трансформованих клонів спричиняв зміну реакції листків сої на зараження. Введення цього фрагменту в інші раси бактерії змінювало їх вірулентність, проте фрагмент pPg6L3 у жодному разі не змінював реакцію на зараження з несумісності на сумісність. Отже, цей ген спричиняє індукцію не сприйнятливості, а стійкості.

Вслід за бактеріальним геном у 90-х роках було клоновано гени фітопатогенних грибів *Cladosporium fulvum* [13], *Rhynchosporium secalis* [27], *Magnaporthe grisea* [31], *Gibberella zeae* (anamorpha *F.graminearum*) [26], *Cochliobolus carbonum* [21, 23]. Із листків томату, ураженого *C. fulvum*, було виділено два расо-специфічні еліситори, AVR4 і AVR9, які викликали реакцію надчутливості у сортах томатів із генами стійкості Cf4 і Cf9. Досліджуючи клоновані гени Avr4 і Avr9, встановили, що вони відповідають за синтез багатих на цистеїн протеїнів (cysteine-rich), які під впливом грибних або рослинних протеаз перетворюються на активні протеїни AVR4 і AVR9, що складаються, відповідно, із 105 та 28 амінокислот [13, 21].

Інший расо-специфічний еліситор, NIP1, був ізольований із культурального фільтрату *R. secalis*. Під його впливом у рослинах ячменю з геном стійкості Rrs1 запускалося кілька каскадів захисних реакцій, проте реакції надчутливості не спостерігалося. Раси *R. secalis*, авірулентні до ячменю з генами Rrs1, містять два класи *nip1* алелей, кожен із яких кодує активний еліситор. У більшості вірулентних рас *nip1* ген, ймовірно, знаходиться в неактивному стані. Крім того, було встановлено, що не лише вірулентні раси, але і авірулентні щодо Rrs1-сортів раси виділяють продукти *nip1* генів, які не активні як еліситори [21, 27]. У аскоміцета *M. grisea* одним із перших було виявлено ген AVR2-YAMO, який забезпечував сорт-специфічну стійкість рису сорту Yashiro-mochi. Доведено його посередницьку роль в утворенні еліситора [31].

Один із перших генів патогенності – *HTS1* – було виявлено 1992 року у гриба *Cochliobolus carbonum* – збудника гельмінтоспоріозу кукурудзи [23]. Продуктом цього гена є специфічний токсин, необхідний для патогенності гриба. У *F. graminearum* 1995 року виявлено ген Tri5, який кодує ензим триходієнсінтазу, необхідний на першому етапі синтезу трихотеценових мікотоксинів, які, у свою чергу, забезпечують патогенність гриба [26].

На сьогодні гени «взаємодії» секвеновано у 67 аскоміцетів, 4 базидіоміцетів та 8 ооміцетів [30]. Створення бази даних таких генів продиктовано зростаючою небезпекою появи нових, раніше невідомих фітопатогенів та необхідністю пошуку альтернативних шляхів захисту рослин від хвороб, основаних на знаннях молекулярних механізмів їхньої взаємодії з рослиною. Найповніше вивчено і представлено генетичні бази даних грибів *F. graminearum* (1191 ген), *M. grisea* (765), *Botrytis cinerea* (233), *F. oxysporum* (149) [24]. Ці гриби не лише є зручними об'єктами для генетичних досліджень, але й мають важливе народногосподарське значення.

Так, завдяки молекулярно-біологічним дослідженням встановлено, що назва *F. graminearum* відноситься щонайменше до 13 філогенетично відмінних видів, охоплюючи нові: *F. ussurianum*, *F. asiaticum*, *F. vorisii*. При цьому жоден із цих видів не відрізняється морфологічно від *F. graminearum* [32]. Молекулярну подібність до *F. graminearum* виявлено і у видів *F. culmorum* і *F. cerealis*, однак ці види можна розрізнити за морфологічними ознаками. Цей приклад наочно свідчить про важливість молекулярних аналізів для ідентифікації видової належності мікроскопічних грибів.

У *F. graminearum* досить повно досліджено і гени «взаємодії» (PHI genes). Ще раніше було встановлено, що колонізація тканин колоса пшениці цим патогеном залежить від синтезу штамом мікотоксинів. Завдяки молекулярним методам доведено, що у *F. graminearum* основою синтезу мікотоксинів групи ДОН (деоксинівланон) є гени групи TRI [12], причому одні штами є продуцентами 3А ДОН, інші – 5А ДОН, ще інша група є продуцентами ніваленона [32]. Розроблено специфічні праймери для ПЛР-аналізу таких штамів [19, 28].

Результати молекулярно-генетичних аналізів підтвердили і гіпотезу про ступінчастість процесу зараження *F. graminearum* колоса пшениці [11], висловлену низкою вчених ще в 90-і роки у прив'язці до трьох категорій стійкості сортів пшениці до фузаріозу колоса: стійкістю до колонізації колоса, стійкістю до проникнення збудника в зерно і стійкістю до синтезованих ним мікотоксинів [22]. На сьогодні доведено, що ефективність колонізації визначає група генів TRI, яка також контролює синтез мікотоксинів, а проникнення гриба в тканини колоса залежить від інших 160 генів [12, 18].

## Висновки

Наведені вище приклади свідчать, як завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів аналізу змінюється і поповнюється інформація про мікроскопічні гриби, у тому числі про уже достатньо вивчені фітопатогени. А, зважаючи на те, що період від ізоляції гриба до отримання результатів про його патогенність у кілька разів ко-

ротший, ніж за класичних аналізів, використання молекулярно-генетичних методів у фітопатології є якісно новим кроком до розуміння процесів, що відбуваються в рослині під час ураження фітопатогенами. Використання молекулярних методів неодмінно сприятиме розробці сучасних більш ефективних та екологічно безпечних методів захисту рослин від грибних хвороб.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Блинов В.А. Лечение болезней растений эффективными микроорганизмами // Достижения ЭМ-технологии в России. – М., 2004. – С. 50–53.
2. Дьяков Ю.Т. На пути к общей теории иммунитета // Журнал общей биологии. – 2005. – 66, N 6. – С. 451–458.
3. Дьяков Ю.Т. Занимательная микология. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 240 с.
4. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Т., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология: Учебное пособие. – М.: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. – 302 с.
5. Леонтьев Д.В., Акулов О.Ю. Загальна мікологія: Підручник для вищих наукових закладів. – Х.: Вид. група «Основа», 2007. – 228 с.
6. Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. – Л.: Наука, 1969. – 124 с.
7. Agrios G. Plant Pathology (5th ed.). – Elsevier Academic Press, 2005. – 922 p.
8. Aime M.C., Brearley F.Q. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery // Biodivers. Conserv. - Springer Science + Business Media B.V. 2012. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-012-0338-7>.
9. Bass T., Richards T.A. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean” // Fungal Biology Review. – 2011. – 25. – P. 159–164.
10. Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 ...5.1 million species? // American Journal of Botany. – 2011. – 98, N 3. – P. 426–438.
11. Brown N.A., Urban M., Van de Meene A.M.L., Hammond-Kosack K.E. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears // Fungal Biol. – 2010. – 114. – P. 535–571.
12. Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. – 2012. – 13, N 4. – P. 414–430.
13. De Witt P.J., Joosten M.H., Honee G., Wubben J.P., Van den Ackerveken G.F., Van den Broek H.W. Molecular communication between host plant and the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* // Antonie van Leeuwenhoek. – 1994. – 65, N 3. – P. 257–262.
14. Fungi DB 27. The Eu Path DB Project. – 2016. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://fungidb.org>.
15. Hawksworth D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections // Studies in Micology. – 2004. – 50. – P. 9–18.
16. Hawksworth D.L. Integrating morphological and molecular data in fungal systematics // Systematic and Evolution of Fungi / Ed. Misra J.K., Tewari J.P., Deshmukh S.K. Ch.10. – Jersey, British Isles, Enfield, New Hampshire: Science Publisher, 2012. – P. 1–14.
17. Hawksworth D.L., Rossman A.Y. Where are all undescribed fungi? // Phytopathology. – 1997. – 87. – P. 888–891.
18. Jansen C., von Wettstein D., Schafer W., Kogel K.H., Felk A., Maier F.J. Infection pattern in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – 102. – P. 16892–16897.
19. Jenning P., Coates M.E., Walsh K., Turner J.A., Nicholson P. Determination of deoxynivalenol- and nivalenil-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from wheat crops in England and Wales // Plant Pathology. – 2004. – 53. – P. 643–652.
20. Kirk P.M., Cannon P., Minter D.W., Stalpers J.A. Dictionary of the fungi. – Wallingford (UK): CABI Publishing, 2008.
21. Knogge W. Fungal infection of plants // The Plant Cell. – 1996. – 8. – P. 1711–1722.
22. Mesterhazy A. Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat // J. Appl. Genet. – 2002. – 43 (A). – P. 289–302.
23. Panaccione D.G., Scott-Craig J.S., Pocard J.A., Walton J.D. A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – 89, N 14. – P. 6590–6594.
24. PHI-base. Pathogen -Host Interaction. – 2016. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.phi-base.org>.
25. Perry B. MycoDigest: Evaluating fungal diversity with environmental sampling // Mycena News. – 2008. – 59. – P. 1–8.
26. Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of trichotecene toxin biosynthetic gene // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1995. – 8. – P. 593–601.
27. Rohe M., Gierlich A., Hermann H., Hahn N., Schmidt B., Rosahl S., Knogge W. The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs 1 resistance genotype // EMBO J. – 1995. – 14, N 17. – P. 4168–4177.
28. Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Toth B., Varga J., O'Donnel K. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichotecene toxin diversity // Fungal Genetics and Biology. – 2007. – 44. – P. 1191–1204.

29. Staskawicz B.J., Dahlbeck D., Keen N.T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1984. – 81, N 19. – P. 6024–6028.
30. Urban M., Part R., Raghunath A., Irvine A.G., Pedro H., Hammond-Kosack K.E. The Pathogen-Host Interaction database (PHI-base): additions and future development // Nucleic Acid Research. – 2015. – 43. – P. D645–D655.
31. Valent B., Farrall L., Chumley F.G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses // Genetic. – 1991. – 127, N 1. – P. 876–101.
32. Yli-Mattila T. Morphological and molecular taxonomy of highly toxigenic *Fusarium* species from small cereal grains in Northern Europa and Asia // Systematic and Evolution of Fungi / Ed. Misra J.K., Tewari J.P., Deshmukh S.K. Ch.10. – Jersey, British Isles, Enfield, New Hampshire: Science Publisher, 2012. – P. 275–302.

**KRIUCHKOVA L.O.**

National University of Life and Environmental Science of Ukraine,  
Ukraine, 03041, Kyiv, Heroyiv Oborony str., 15, e-mail: k\_larysa@ukr.net

**THE HYSTORY OF STUDIES ON PLANT PATHOGENIC FUNGI AND THEIR VIRULENCY INTERPRETATION**

**Aim.** Fungi as members of a separate life kingdom require original methods of investigation. Among them plant pathogenic micromycete drew considerable attention because of threat crop yield. To combat infection more knowledge is required on the pathogenic process. However, over a long research period even the definitions of “pathogenicity” and “virulence” as their main characteristics are often changed. **Results.** The review presents and summarizes the literature data, reflecting the development of understanding of host-pathogen interactions for the last century. **Conclusions.** Only due to molecular biology techniques the information on genes proven to affect the outcome of pathogen-host interaction has been catalogued as pathogenicity genes, virulence/aggressiveness and effector genes. Molecular methods used in fungal taxonomy also extend our knowledge of plant pathogen diversity.

**Keywords:** fungi, molecular methods, pathogen-host interaction genes, fungal systematic.