

УДК 634.531:632.4 01/08:582.282.19

© 2011 Н. Н. Гринько

Адлерская опытная станция ВИР им. Н. И. Вавилова

МОРФОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГРИБА *CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURRILL) M. E. BARR ИЗ ТУРЦИИ

*Впервые дана оценка внутривидового разнообразия природной популяции *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — возбудителя рака коры каштана съедобного из Турции. Выделены 3 морфотипа и установлены уровни сходства локальных популяций *C. parasitica*.*

Каштан съедобный, или посевной (*Castanea sativa* Mill.), благодаря многообразию полезных свойств — высококачественной древесине, плодам и дубильным веществам, нектару и пыльце, является ценной лесобразующей породой. Вместе с тем расширению площадей каштановых лесов препятствует массовое распространение гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr., вызывающего рак, или «ржавчину» коры древостоя. Патоген практически полностью уничтожил каштан зубчатый (*Castanea dentata* L.) в Северной Америке [15], а также способствовал повсеместной деградации каштановых лесов в странах Европы [9, 17, 21] и Северного Кавказа [7]. Прогрессирующее развитие заболевания способствовало планетарному мониторингу микроэволюционных процессов в природных популяциях гриба. Доказано варьирование генотипической изменчивости *C. parasitica* в различных эколого-географических регионах мира и наличие в структуре популяций двух морфотипов: вирулентного — оранжевой окраски и гиповирулентного — ослаблено пигментированного [10, 18, 19].

Ранее сообщалось, что в каштановых лесах Черноморского побережья «местная раса эндотии» менее агрессивна по сравнению с европейской и североамериканской популяциями патогена [5]. Вместе с тем наши исследования [2, 3] показали, что популяции *C. parasitica* на Северном Кавказе отличаются относительно высоким уровнем полиморфизма и включают от трех до шести морфотипов. Варьирование морфологических и паразитических признаков морфотипов свидетельствует в пользу прогрессирования процессов внутривидовой изменчивости гриба по уровню агрессивности.

В этой связи цель исследований — провести анализ популяции гриба в ближайшем природно-климатическом аналоге Северного Кавказа — причерноморском ареале каштана посевного Турции, учитывая фрагментарность сообщений по данному вопросу [12, 14].

Материалы и методы. В 2008–2010 гг. оценивали морфологические и паразитические признаки 21 изолята *C. parasitica*, полученных в процессе творческих контактов от сотрудников Московского областного государственного университета. Изоляты выделены в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина из пораженной коры каштановых деревьев причерноморской части Севера Турции — Бартынской (Амасрынский, Бартынский, Хасанкадынский районы) и Зонгулдакской (Алапынский район) областей и хранятся во Всероссийской коллекции микроорганизмов. Популяции, равно как и соответствующие им изоляты, обозначали произвольно согласно территориальным географическим границам, в пределах которых

осуществлялся сбор инфекционного материала (табл. 1). Изоляты *C. parasitica* оценивали по морфологическим — окраска колоний, и паразитическим признакам — радиальная скорость роста и образование пикнид. Гриб культивировали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в течение 9–30 сут. Морфологию колоний описывали по Неегарду [4], пигментацию — по шкале А. С. Бондарцева в модификации Н. П. Кутафьевой [2], радиальную скорость роста (*Kr*) и образование пикнид (*Pic*) учитывали общепринятыми методами [3].

1. Изоляты *Cryphonectria parasitica*, используемые в анализе

№ во Всероссийской коллекции микроорганизмов	Шифр изолятов/морфотипов	Место сбора
оранжевый морфотип (<i>aur</i>)		
3131	Va1	Бартынская обл., Амасынский район
3132	Va2	– " –
3135	Vb3	Бартынская обл., Бартынский район
3137	Vh4	Бартынская обл., Хасанкадынский район
3140	Vh5	– " –
3142	Sa6	Зонгулдакская обл., Алапынский район
3144	Sa7	– " –
3145	Sa8	– " –
3151	Sa9	– " –
золотисто-желтый морфотип (<i>lut</i>)		
3133	Va10	Бартынская обл., Амасынский район
3134	Va11	– " –
3136	Vb12	Бартынская обл., Бартынский район
3146	Sa13	Зонгулдакская обл., Алапынский район
3147	Sa14	– " –
3150	Sa15	– " –
беловатый морфотип (<i>alb</i>)		
3138	Vh16	Бартынская обл., Хасанкадынский район
3139	Vh17	– " –
3141	Sa18	Зонгулдакская обл., Алапынский район
3143	Sa19	– " –
3148	Sa20	– " –
3149	Sa21	– " –

Внутривидовое разнообразие и степень сходства популяций определяли по показателям среднего числа (μ) и доли редких морфотипов (h) по методике А. Л. Животовского [3]. Частоту распределения изолятов по анализируемым признакам оценивали с помощью индекса разнообразия (H) Шеннона [3]. Полученные

экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами статистического анализа с использованием пакета программ Excel и Statistica 7.0.

Результаты исследований. Тестируемые изоляты *C. parasitica* из каштановых лесов Бартынской и Зонгулдакской областей Турции характеризовались изменчивостью анализируемых признаков. Исходя из дискретности признаков окраски, идентифицировали 3 морфотипа: оранжевый (aur), золотисто-желтый (lut) и беловатый (alb) (табл. 1). Пигментацию морфотипов, сохраняющую стабильность при многократных пересевах, можно считать наследуемым маркерным признаком. Исходя из среднего числа оцениваемых морфотипов, большим разнообразием отличалась Бартынская популяция, а долей редких — Зонгулдакская (рис. 1а). Согласно индексу разнообразия Шеннона соотношение морфотипов варьировало в зависимости от популяций, при этом в структуре каждой из них доминировали aur — оранжевые, типичные для *C. parasitica*. Следует отметить, что морфотипы с редуцированной пигментацией lut преобладали в Бартынской, а alb — в Зонгулдакской популяциях (рис. 1б).

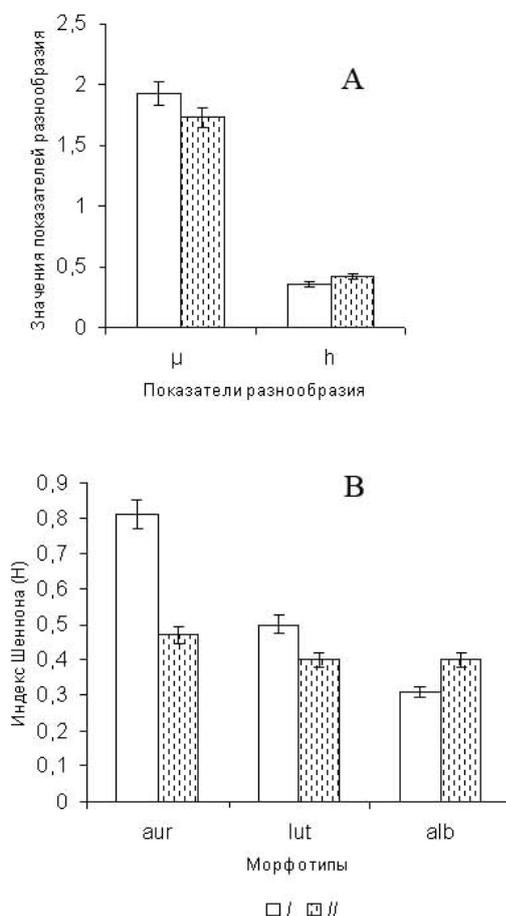


Рис. 1. Показатели разнообразия (а), состав и соотношение морфотипов (б) *Cryphonectria parasitica* в Бартынской (I) и Зонгулдакской (II) популяциях

Итак, по числу и доле редких морфотипов популяции *C. parasitica* из Турции оказались тождественны европейским [17, 22]. Сравнительный анализ полученных данных с уже известными сведениями показал, что, несмотря на равнозначное число морфотипов, обнаруженных в популяциях Турции (табл. 1) и пространственно отдаленной равнинной Краснодарской из Северокавказского региона, в последней не встречались беловатые alb – изоляты [2].

Известно, что слабопигментированные морфотипы гриба малочисленны в каштановых насаждениях Швейцарии [8], Италии [22], Португалии [9], Северного Кавказа [3] и не обнаружены в провинции Айдын Турции [14].

Паразитические свойства морфотипов *C. parasitica* оценивали по скорости роста (Кг) и продуктивности пикнид (Рс). По признаку радиальной скорости роста (Кг) отмечена существенная вариабельность анализируемых морфотипов ($C_v = 56,8\%$), о чем свидетельствует высокая корреляционная связь ($C_r = 0,95 \pm 0,07$; $P < 0,001$) между средним баллом ($b_s = 2,23 \pm 0,09$; $b_{\min-\max} = 0,65-4,98 \div 0,511$) и стандартным отклонением ($\sigma = 1,19$). Максимальным показателем Кг отличались aug-морфотипы ($b_s = 3,32 \pm 0,05$) с преобладанием изолятов с высокой и средней скоростью развития (рис. 2). При этом более высокие значения Кг ($b_s = 3,71 \pm 0,09$) обнаружены у изолятов Бартынской популяции, а относительно низкие ($b_s = 2,84 \pm 0,09$) — Зонгулдакской. Средние показатели Кг характерны для lut-морфотипов ($b_s = 2,04 \pm 0,07$), а alb — предельно низкие ($b_s = 0,79 \pm 0,03$). Значения признака Кг у lut- и alb-морфотипов существенно не различались между популяциями. Индекс разнообразия Шеннона и показатели Кг коррелировали отрицательно ($C_r = -0,76 \pm 0,15$; $P < 0,001$).

В географически разобщенных популяциях Северной Америки и Европы изоляты, продуцирующие оранжевый пигмент, относятся к быстрорастущим, а беловатые — к слабо развивающимся [8]. Аналогичная взаимосвязь признаков пигментации и скорости роста характерна для морфотипов северокавказской популяции *C. parasitica*: aug — быстро-, lut — средне- и alb — медленно растущие [3].

По продуктивности пикнид (Рс) морфотипы отличались высоким уровнем варьирования ($C_v = 60,9\%$), что подтверждается существенной корреляционной связью ($C_r = 0,97 \pm 0,05$; $P < 0,001$) между средним баллом ($b_s = 1,71 \pm 0,07$; $b_{\min-\max} = 0,41-3,99 \div 0,204$) и стандартным отклонением ($\sigma = 1,06$).

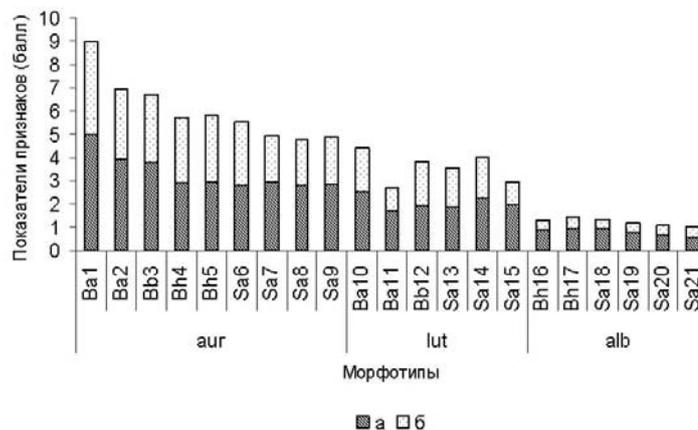


Рис. 2. Вариабельность морфотипов *Cryphonectria parasitica* по изученным признакам. (Здесь и на рис. 3 описание морфотипов приведено в табл.: а — радиальная скорость роста; б — продуктивность пикнид).

Для aug-морфотипов характерен максимальный уровень продуктивности пикнид ($b_s = 2,69 \pm 0,04$) с преобладанием доли высоко- и среднеспорულიрующих изолятов (рис. 2). При этом более высокие значения Рс показали aug-морфотипы из Бартынской популяции ($b_s = 3,11 \pm 0,07$) по сравнению Зонгулдакской ($b_s = 2,34 \pm 0,07$). Морфотипы со сниженной пигментацией — lut и alb, существенно не различаясь по популяциям, характеризовались соответственно средними ($b_s = 1,45 \pm 0,06$) и наименьшими ($b_s = 0,44 \pm 0,03$) значениями Рс. Показатели Рс и индекс разнообразия Шеннона находились в отрицательной корреляционной зависимости ($C_r = -0,62 \pm 0,17$; $P < 0,01$). Низкая способность образования

пикнид свойственна также слабопигментированным изолятам из северокавказских популяций гриба [2].

Проведенный статистический анализ полученных данных подтвердил существенные различия тестируемых изолятов по признакам — «радиальная скорость роста» (K_r) и «продуктивность пикнид» (P_{ic}) ($P < 0,001$; K_r – P_{ic}: $F_{\phi} = 35,86 - 48,16 > F_{01} = 8,02$). На высоком уровне значимости ($P < 0,001$) доказана тесная положительная корреляционная связь изученных признаков ($C_r = 0,96 \pm 0,06$).

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

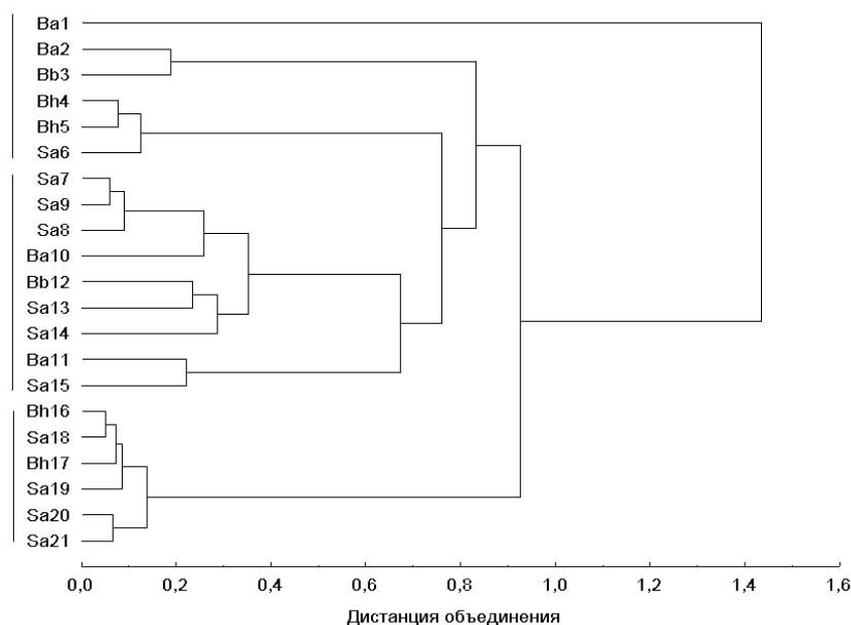


Рис. 3. Дендрограмма сходства морфотипов *Cryphonectria parasitica* по изученным признакам

Группировка изолятов внутри кластеров независимо от их географического положения (см. табл. 1), указывает на пространственную внутривидовую гетерогенность *C. parasitica* в ареале каштановых лесов Турции. Так, в первом кластере, состоящем из aug-морфотипов Бартынской популяции, близкое сходство проявили изоляты из одного района выборки (Bh4–Bh5), отличающиеся высокими показателями паразитических свойств, и более отдаленные территориально (Ba2–Bb3). Предельно высоким уровнем патогенности отличался изолят Ba1, представляющий фактически отдельный кластер. Второй кластер объединил 9 изолятов из обеих популяций: aug-морфотипы (Sa7–Sa9) с высокими — и lut (Bb12–Sa13 и Ba11–Sa15) — со средними показателями паразитических признаков. В третьем кластере представлены alb-морфотипы с низкими значениями патогенности, сформировавшие внутривидовые пары изолятов: Bh16–Bh18 и Sa20–Sa21. Полученные нами данные свидетельствуют о внутривидовой гетерогенности турецкой популяции *C. parasitica*. По изученным признакам она значительно отличается от северокавказской популяции гриба [3].

Различия между изолятами из Турции и Северокавказского региона объясняются действующим в природе стабилизирующим отбором, обеспечивающим наличие в популяциях фитопатогенных грибов морфотипов с варьирующим уровнем агрессивности [4, 6]. Существенное влияние на внутривидовую изменчивость фитопатогенных грибов оказывают также внеядерные элементы — плазмиды dsDNA [16] и dsRNA [20]. Полагают, что полиморфизм популяций *C. parasitica* в большей степени обусловлен рекомбинацией

в цитоплазме dsRNA [9, 12]. На фенотип и паразитические свойства *C. parasitica* значительное воздействие оказывают преобладающие в геноме гиповирус и микореовирус [13], варьирующие в зависимости от эколого-географического региона. Фенотипическая изменчивость гриба — морфология, жизнеспособность и патогенность, наряду с видовой определяется также штаммовой принадлежностью гиповируса. Для европейской популяции гриба типичен вирус *Cryphonectria hypovirus* 1 — CHV1 [11, 19, 21]. Выделенные нами на Северном Кавказе A2 и A9 alb-морфотипы *C. parasitica* [2] инфицированы гиповирусом CHV1-EP713, а турецкие изоляты Bn16 и Sa20 соответственно CHV1-EP721 и CHV1-Euro 7. Полученные данные указывают на идентичность турецких и европейских гиповирулентных изолятов, существенно отличающихся от северокавказских морфотипов [1]. Подтверждается это сведениями о незначительных изменениях морфологии и паразитической активности изолятов гриба, инвазированных штаммами гиповируса CHV1-Euro 7 [13] и существенными преобразованиями генома *C. parasitica* под воздействием CHV1-EP713 [19].

Следовательно, средние показатели паразитизма морфотипов и факты отсутствия [14] либо спорадической встречаемости [12] инфицированных вирусом CHV1 [1] гиповирулентных изолятов, указывают на относительно низкую конкурентоспособность внутривидовых структур турецкой популяции по сравнению с северокавказской [3]. В этой связи возрастает вероятность усиления вредоносности рака коры в каштановом древостое Турции, в результате элиминации слабопатогенных изолятов и насыщения популяции высокоагрессивными морфотипами из Северокавказского региона. Широкомасштабный обмен генетическими клонами гриба возможен общеизвестным способом — аэрогенно, с деловой древесиной, птицами и насекомыми.

Выводы. Впервые дана оценка внутривидового разнообразия *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — возбудителя рака коры каштана съедобного из Турции. Выделены 3 морфотипа патогена — оранжевый (aug), золотисто-желтый (lut) и беловатый (alb). Подтверждены существенные различия тестируемых изолятов по признакам — «радиальная скорость роста» (K_r) и «продуктивность пикнид» (P_{ic}) ($P < 0,001$; K_r – P_{ic}: $F_{\phi} = 35,86 - 48,16 > F_{01} = 8,02$). На высоком уровне значимости ($P < 0,001$) доказана тесная положительная корреляционная связь изученных признаков ($C_r = 0,96 \pm 0,06$).

Автор выражает глубокую благодарность заведующему кафедрой микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова д. б. н. Ю. Т. Дьякову за помощь в проведении исследований и обсуждении полученных результатов, а также сотрудникам Московского государственного областного университета д. б. н. А. С. Коничеву и к. б. н. А. А. Белову за любезно предоставленные изоляты гриба *C. parasitica* из Турции.

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. Внутривидовой полиморфизм возбудителя рака коры каштана (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) M. E. Barr) на Северном Кавказе / Н. Н. Гринько // Современная микология в России: Тез. докл. 2-го Съезда микологов России. — М.: Национальная академия микологии, 2008. — Т. 2. — С. 174–176. 3. Гринько Н. Н. Внутривидовое разнообразие возбудителя рака каштана съедобного на Северном Кавказе / Н. Н. Гринько // Вестник РАСХН. — 2009. — № 4. — С. 29–33. 4. Дьяков Ю. Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов / Ю. Т. Дьяков. — М.: ИД «Муравей», 1998. — 384 с. 5. Иссинский П. А. Каштановые леса Кавказа и основы ведения хозяйства в них / П. А. Иссинский // Сб. тр. СочНИЛОС. — Вып. 4. М.: Лесная промышленность, 1968. — 240 с. 6. Левитин М. М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов / М. М. Левитин. — Л.: Агропромиздат, 1986. — 208 с. 7. Придня М. В.

Эволюционные проблемы лесообразовательного процесса / М. В. Придня. — Сочи: СГУТиКД, 2005. — 330 с. **8. Bisseger M.** Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in presence of natural hypovirulence/ M. Bisseger, D. Rigling, U. Heiniger // *Phytopathol.* — 1997. — Vol. 87, № 1. — С. 50–59. **9. 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. **10. 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. — С. 288–296. **11. 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. **12. 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. **13. 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. **14. 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. **15. Griffin G. J.** American chestnut survival in understory mesic sites following the chestnut pandemic/ G. J. Griffin // *Can. J. Bot.* — 1992. — Vol. 70, № 10. — P. 1950–1956. **16. Heiniger U.** Hypovirus and mitochondria transfer between *Cryphonectria parasitica* strains/ U. Heiniger, S. Schmid, D. Rigling // *Forest Snow and Landscape Res.* — 2001. — Vol. 76, № 3. — P. 397–401. **17. 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. **18. 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. **19. 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. **20. Schapira R.** Molecular analysis of a double-stranded RNA virus associated with the chestnut fungus: [Pap.] 13th Congr. Israeli Phytopathol. Soc., Bet Dagan, Febr. 3–4, 1992/ R. Schapira, D. L. Nuss // *Phytoparasitica.* — 1992. — Vol. 20, № 3. — P. 259–260. **21. 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. **22. 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.

UDC 634.531:632.4 01/08:582.282.19

Grynko N. N. Morphotypical variability of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) m. e. barr from Turkey // The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series «Phytopathology and Entomology». — 2011. — № 9 — P. 44–50.

For the first time intraspecific diversity of natural population of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr, which causes chestnut blight of *Castanea sativa* in Turkey was evaluated. Three morphotypes were distinguished, levels of similarity for local populations of *C. parasitica* are determined.

Tab. 1. Fig. 3. Bibl. 22.