

УДК 634.531:632.4 01/08:582.282.19

© 2012 Н. Н. Гринько

*Адлерская опытная станция ВИР им. Н. И. Вавилова*

## **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.*

*Ключевые слова: каштан съедобный, рак коры, агрессивность патогена, фитотоксическая и ферментативная активность.*

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 микроэволюционных 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 осуществляли сбор инфекционного материала: *aur* – Ba1, Ba2, Bb3, Bh4, Bh5, Sa6, Sa7, Sa8, Sa9; *lut* – Ba10, Ba11, Bb 12, Sa13, Sa14, Sa15; *alb* – Bh16, Bh17, Sa18, Sa19, Sa20, Sa21 [4].

Для оценки паразитических признаков — агрессивности, фитотоксической и ферментативной активности 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 трехсуточных 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 показателями агрессивности (количественный показатель патогенности), фитотоксической и ферментативной активности (рис. 1).

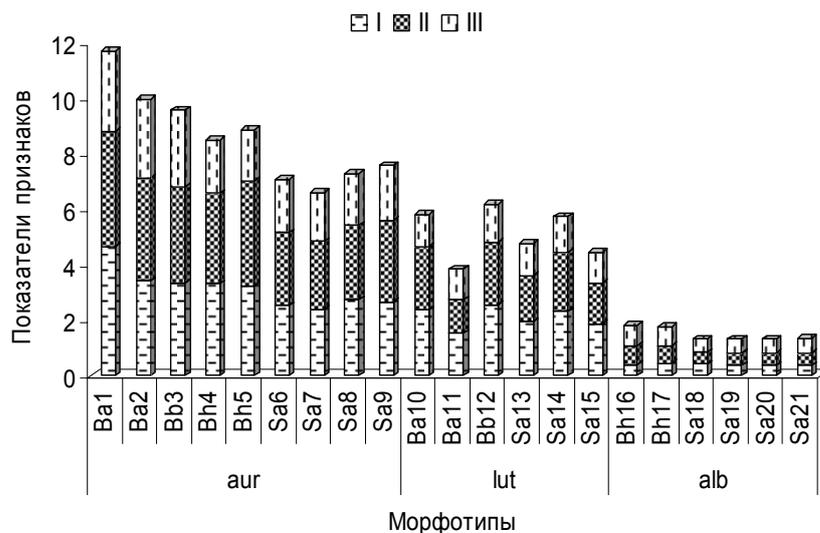


Рис. 1. Изменчивость морфотипов *C. parasitica* по изученным признакам (на рис. 1 – 3 описание морфотипов представлено в методике; I– агрессивность, II– фитотоксическая активность, III– ферментативная активность)

По признаку агрессивности (*Ag*) выявлены значительные ( $C_v = 59,7\%$ ) различия морфотипов, о чем свидетельствует высокая корреляционная зависимость ( $C_r = 0,99 \pm 0,03$ ;  $P < 0,001$ ) между средним показателем ( $Ag = 2,05 \pm 0,08$ ;  $Ag_{\min-\max} = 0,35 - 4,67 \pm 0,235$ ) и стандартным отклонением ( $\sigma = 1,23$ ). Максимальным значением характеризовались *aur*-морфотипы ( $Ag = 3,14 \pm 0,06$ ) с преобладанием доли высоко- и среднеагрессивных (рис. 1). Предельно высокий показатель ( $Ag = 3,59 \pm 0,09$ ) выявлен у *aur*-морфотипов Бартынской популяции, а наиболее низкий ( $Ag = 2,57 \pm 0,09$ ) — у Зонгулдакской. Средний показатель ( $Ag = 2,09 \pm 0,08$ ) типичен для *lut*-морфотипов, а минимальный ( $Ag = 0,39 \pm 0,04$ ) — для *alb*-. Менее пигментированные морфотипы из

разных популяций не отличались по средним значениям агрессивности. Показатели Agr 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 аур-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 –  $0,51 \pm 0,04$ ). Аур-морфотипам из Бартынской популяции свойственны более высокие значения 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 *S. 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 аур-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-. Значение Fer оказалось выше у аур-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 *S. parasitica* характеризовались более низким уровнем продуцирования внеклеточных ферментов [2, 3].

Проведенный статистический анализ полученных данных подтвердил существенные различия тестируемых изолятов по паразитическим 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 изученных 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 агрессивности ( $I_{agr} = 1,90$ ) популяции *S. parasitica* из Турции (рис. 2).

Высокоагрессивными оказались аур-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 аур-морфотипы ( $I_{agr} = 3,31$ ) Бартынской популяции по сравнению с Зонгулдакской ( $I_{agr} = 2,53$ ). Подобная закономерность для lut- и alb-морфотипов не выявлена.

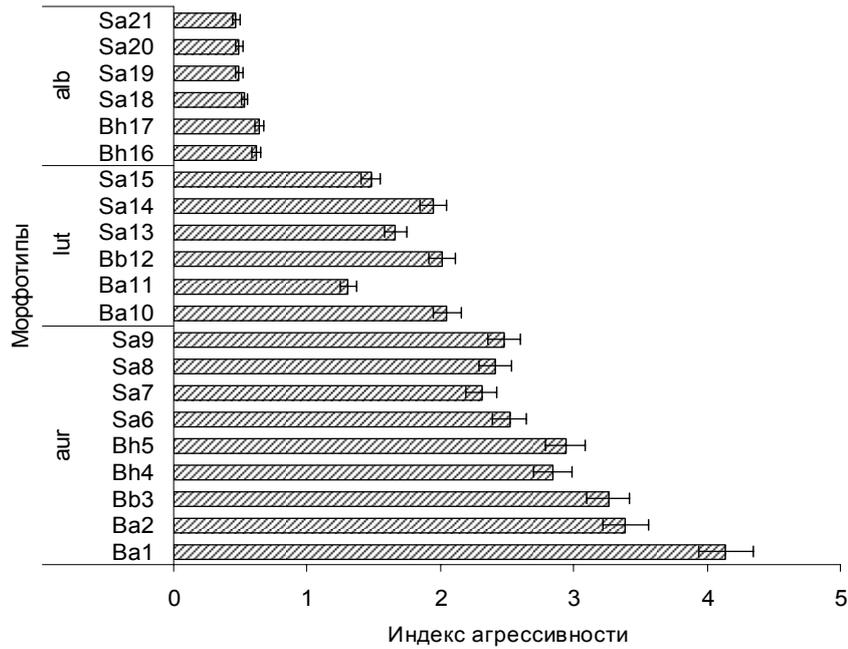


Рис. 2. Индекс агрессивности (*Iagr*) морфотипов *C. parasitica*

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

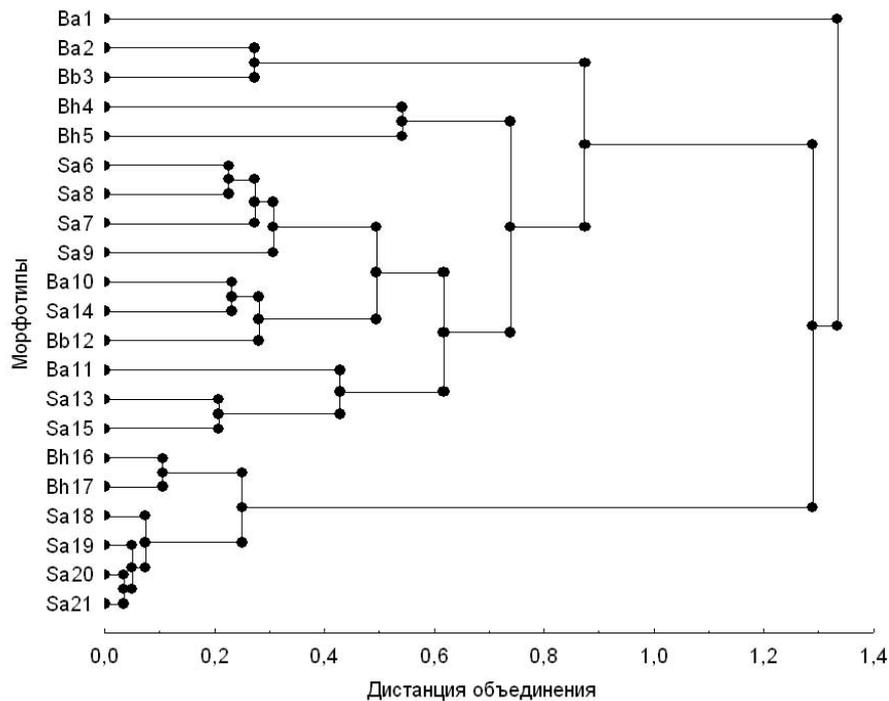


Рис. 3. Дендрограмма сходства морфотипов *C. parasitica* по изученным признакам

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 ауг-морфотипы 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. Второй кластер включал 10 изолятов из обеих популяций: aug- – высокоагрессивные морфотипы (Sa6 – Sa8) и lut- — среднеагрессивные (Ba10 – Sa14, Sa13 – Sa15). В третьем кластере представлены alb-морфотипы с минимальным уровнем агрессивности, сформировавшие внутривидовые пары изолятов: Bh16 – Bh17 и Sa20 – Sa21.

Полученные нами данные свидетельствуют о внутривидовой гетерогенности степени агрессивности *C. parasitica* из Турции, которая значимо ниже по сравнению с популяцией этого гриба 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 alb-морфотипы *C. parasitica* [1] инфицированы гиповирусом CHV1–EP713, а изоляты Bh16 и Sa20 из Турции — CHV1–EP721 и CHV1–Euro 7 соответственно [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 агрессивности ( $Iagr = 1,90$ ) популяции *C. parasitica* из Турции. Высокоагрессивными оказались *aur*-морфотипы ( $Iagr = 2,92$ ), средне- – *lut*- ( $Iagr = 1,74$ ) и слабо- – *alb*- ( $Iagr = 0,54$ ).

**Библиографический 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) М. Е. Barr / Н. Н. Гринько // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — М., 2010. — № 1. — С. 98. **4. Гринько Н. Н.** Морфологическая изменчивость гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) М. Е. Barr. из Турции // Вісник ХНАУ. ім. В. В. Докучаєва: 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, No 6. — С. 391–402. **7. 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, No 3. — С. 288–296. **8. Bryner S. F.** Temperature-Dependent Genotype by Genotype Interaction between a Pathogenic Fungus and Its Hyperparasitic/ S. F. Bryner, D. Rigling // The American Naturalist. — 2011. — Vol. 177, No 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, No 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. — No 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. Açıköz, O. Erincik // Acta Horticult. — 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, No 10. — P. 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, No 6. — С. 413–421. **15. 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, No 1. — P. 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. Journal of Silviculture and Forest Ecology [online: 2010-12-02]. — 2010. — P. 252–258.

UDC 634.531:632.4 01/08:582.282.19

**Grinko N. N. Aggressiveness of intraspecific structure of fungus *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr from Turkey** // The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series «Phytopathology and Entomology». — 2012. — № 11. — P. 46–51.

For the first time, aggressive properties of natural population of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr — the causative agent of chestnut blight of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from Turkey were assessed. Differences of three morphotypes were evaluated by aggressiveness, phytotoxic and enzyme activity.

Key words: sweet chestnut, chestnut blight, aggressiveness of pathogen, phytotoxic and enzyme activity.

Fig. 3. Bibl. 16.