

УДК 579.26 + 632.4

Попов А.П., Белов А.А., Цветков И.Л., Кони́чев А.С.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА CRYPHONECTRIA PARASITICA
– ВОЗБУДИТЕЛЯ КРИФОНЕКРОЗА КАШТАНА ПОСЕВНОГО –
НА СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ КАВКАЗЕ***

Аннотация. Проведен микологический анализ образцов коры каштана посевного (*Castanea sativa*) из российской части его ареала. В чистую культуру выделено 97 штаммов фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica*, среди которых идентифицирован один гиповирулентный штамм, содержащий вирус CHV. Изучена вегетативная совместимость выделенных штаммов гриба. Продемонстрирована высокая степень угрозы российской популяции каштана посевного со стороны *C. parasitica*.

Ключевые слова: крифоне́кроз, *Cryphonectria parasitica*, вегетативная несовместимость, гиповирулентность, *Cryphonectria hypovirus* (CHV), каштан посевной.

A. Popov, A. Belov, I. Tsvetkov, A. Konichev

**STUDY OF CRYPHONECTRIA PARASITICA POLYMORPHISM – CAUSATIVE
AGENT OF CHESTNUT BLIGHT IN NORTHWESTERN CAUCASUS**

Abstract. In this study, we give mycological analysis of bark samples of *Castanea sativa* from Russian part of its habitat. We isolated 97 strains of phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* in pure cultures, among them one hypovirulent strain containing CHV virus was identified. We studied vegetative compatibility of those strains and showed the threat of *Cryphonectria parasitica* impact on Russian population of chestnut.

Key words: chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, vegetative compatibility, hypovirulence, *Cryphonectria hypovirus* (CHV), *Castanea sativa*, sweet chestnut.

Аскомицетный гриб *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E.Barr 1978 известен как возбудитель крифоне́кроза (рака коры) – опасного заболевания ряда древесных растений. *C. parasitica* – ранящий паразит, основными хозяевами которого являются представители рода *Castanea*, в первую очередь *Castanea dentata* (каштан зубчатый) и *Castanea sativa* (каштан посевной). Кроме каштанов, *C. parasitica* способна поражать также *Quercus* spp., *Castanopsis* spp., *Acer* spp., *Rhus typhina*, *Carya ovata*, *Ostrya carpinifolia*, *Alnus cordata* [10; 19]. Распространение патогена внутри растения-хозяина происходит очень быстро, гриб образует веерообразные желтовато-коричневые тяжи мицелия во внутренней коре и камбии, вызывая через несколько недель после инфицирования дерева образование характерных повреждений. В случае, если камбий погибает быстро, на месте инвазии образуется впалая область; образование каллуса временно ограничивает распространение гриба, при этом под пораженным участком могут образовываться новые слои коры и наблюдаться вспучивание и последующее растрескивание отмирающих наружных слоев коры. Из трещин пораженной коры выступают плодовые тела гриба в виде бугорков размером с булавочную головку, от желто-оранжевого до красно-коричневого цвета. Участки дерева выше точки инвазии погибают [10].

В 1950 году в Италии впервые были обнаружены гиповирулентные («белые») расы *C. parasitica*, морфологически отличающиеся от вирулентного типа рядом признаков, в первую очередь слабой пигментацией, которая не достигает красно-оранжевого цвета, оставаясь

* © Попов А.П., Белов А.А., Цветков И.Л., Кони́чев А.С.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (Государственный контракт № П624 от 07.08.2009 г.).

желто-оранжевой или даже белой. Кроме того, гиповирулентные штаммы гриба характеризуются слаборазвитым мицелием, более слабым уровнем бесполого и отсутствием полового спороношения. Отмечено, что они утратили способность препятствовать процессу опробкования перидермы раны, что способствует заживлению на деревьях повреждений, нанесенных грибом [10; 19].

Гиповирулентность *S. parasitica* вызывается присутствием в цитоплазме клеток гриба вируса, названного *Cryphonectria hypovirus* (CHV), геном которого представляет собой двуцепочечную молекулу РНК (дцРНК). Установлено, что CHV распространяется исключительно в виде дцРНК через цитоплазматические анастомозы и бесполое споры гриба-хозяина [9], при этом известно, что транскрипция и репликация вирусного генома и формирование гиповирулентности у *S. parasitica* происходит без интеграции гиповируса в геном гриба. Феномен гиповирулентности у *S. parasitica* вызвал большой интерес у исследователей в качестве средства борьбы с крифонеброзом каштана. Серия проведенных в Европе экспериментов по инокуляции мицелием белых штаммов раневых поверхностей деревьев, зараженных вирулентным штаммом, показала, что в результате этой процедуры интенсивность развития последних резко снижается и они приобретают признаки гиповирулентности [18]. В результате методика искусственного заражения вирулентных штаммов *S. parasitica* стала рассматриваться в качестве перспективного способа борьбы с крифонеброзом и нашла применение во Франции и Италии, в отличие от США, где она имела небольшой успех [10; 11; 18]. Оказалось, что передача гиповируса между штаммами гриба происходит далеко не во всех случаях, что обусловлено явлением вегетативной несовместимости: штаммы *S. parasitica* формируют гифальные анастомозы только в том случае, если принадлежат к одной группе вегетативной совместимости (ВС). В Европе выявлена 31 группа вегетативной совместимости *S. parasitica*, при этом около 60% изученных «европейских» штаммов гриба относятся к одной ВС-группе [14], в то время как на территории США обнаружено более 70 ВС-групп, ни одна из которых существенно не преобладает над остальными, что препятствует распространению гиповирулентности в популяции гриба [8; 12]. Таким образом, возможность биологического контроля крифонеброза определяется двумя основными факторами – распространенностью CHV в конкретной популяции *S. parasitica* и степенью ее гетерогенности (как основного фактора, модулирующего распространение гиповирулентности).

Целью настоящей работы являлось изучение распространенности и внутривидового полиморфизма *S. parasitica* на территории РФ (Северо-Западный Кавказ), что позволило бы оценить состояние местной популяции каштана посевного (*Castanea sativa*) в связи с крифонеброзом.

Материалы и методы

Сбор биологического материала (образцов коры каштана посевного) производили в октябре 2009 г. на территории Сочинского национального парка. Выделение микроскопических грибов из собранных образцов проводили на твердой среде в чашках Петри, видовую идентификацию чистых культур осуществляли на основании культурально-морфологических признаков, а также с помощью разработанной нами ранее методики ПЦР-идентификации *S. parasitica* [5]. Выделенные штаммы *S. parasitica* использовались для проведения тестов на вегетативную совместимость, а также для получения препаратов нуклеиновых кислот для молекулярно-биологических исследований. Штаммы А2 и А9 были любезно предоставлены нам для исследований д.б.н., г.н.с. ГНУ «Адлерская опытная станция» ВИР им. Н.И. Вавилова Н.Н. Гринько.

Определение гиповирулентных штаммов *S. parasitica* осуществляли путем идентификации CHV в культуре гриба на основе специфических ПЦР-маркеров [4]. Тест на вегетативную совместимость проводили по модифицированной методике [16], в серии парных сращиваний

оценивая совместимость каждого из выделенных штаммов *S. parasitica* с гиповирулентными штаммами (73.2, А2 и А9). Для этого небольшие кусочки мицелия двух штаммов помещали на чашку Петри на расстоянии 1-2 мм друг от друга, культуры выращивали в течение семи дней при 26°C и отсутствии света, а затем в течении семи дней при комнатной температуре на свету. Несовместимость штаммов гриба определяли визуально – по образованию барража (линии из мертвых клеток в зоне контакта двух колоний с формирующимися пикнидами) или формированию зоны отгалкивания (не покрытой мицелием области на границе между срастиваемыми штаммами); совместимость определялась как слияние колоний и отсутствие разграничительных линий. Кроме этого, фиксировали факт передачи гиповируса от гиповирулентного (донорского) вирулентному (реципиентному) штамму *S. parasitica* – визуально [7] и с помощью ПЦР-идентификации СНV [4] в реципиентных штаммах гриба.

Результаты и обсуждение

Обследованию с одновременным сбором образцов биологического материала были подвергнуты территории Лазаревского, Головинского, Марьинского, Макопсинского, Адлерского и Кепшинского лесничеств Сочинского национального парка. Полученные нами результаты и опубликованные данные [1] свидетельствуют, что *S. parasitica* присутствует по всему ареалу обитания каштана посевного на Северо-Западном Кавказе. В частности, в местах основного скопления каштана посевного на территории РФ (Лазаревское лесничество) нами отмечена близкая к 100%-ной пораженность деревьев крифонеброзом. *S. parasitica* также обнаружена нами практически во всех обследованных локальных популяциях каштана, единственное исключение составляла небольшая каштановая роща около Красной Поляны (СШ 43 39.866 ВД 40 10.421), где фитопатоген не был встречен.

Микологическому анализу было подвергнуто около 100 образцов, собранных нами на обследованных территориях, в чистую культуру выделено 97 штаммов *S. parasitica* (табл. 1), обнаруживших определенные различия по макроморфологическим признакам и скорости роста. Проведенный ПЦР-анализ показал, что только один из них содержит СНV, т.е. является гиповирулентным. Это соотносится с полученными ранее данными Н.Н. Гринько [1], которая, проанализировав материал из 385 географических точек Кавказа РФ, выделила только единичные гиповирулентные («alb») морфотипы патогена, предположив наличие в них СНV. Это предположение было подтверждено нами в ходе выполнения данной работы: с помощью ПЦР-анализа ряда предоставленных Н.Н. Гринько штаммов *S. parasitica* гиповирус был идентифицирован именно (и исключительно) в alb-морфотипах (штаммы А2 и А9). Заметим, что столь низкая распространенность гиповирулентности в северокавказской популяции *S. parasitica* коренным образом отличается от ситуации в Европе, для которой характерно доминирование гиповирулентных штаммов патогена, результатом чего, несмотря на большой процент пораженных крифонеброзом каштанов, является низкий уровень смертности деревьев от этого заболевания [13; 17; 19].

Проведенные нами тесты на вегетативную совместимость выделенных изолятов *S. parasitica* показали, что гиповирулентные штаммы А2 и А9 совместимы лишь с двумя вирулентными штаммами, а гиповирулентный штамм 73.2 – с пятью (табл. 1).

Изученные штаммы *Stryphonectria parasitica*

№	Место сбора (геогр. координ. / высота над уровнем моря, м)	A9, A2	73.2	№	Место сбора (геогр. координ. / высота над уровнем моря, м)	A9, A2	73.2
1	СП43 54.528 ВД39 25.229 /183			47	СП43 51.618 ВД39 31.936 /657		
2.1	СП43 54.528 ВД39 25.229 /183	+п		48	СП43 51.718 ВД39 32.241 /594		
2.2	СП43 54.528 ВД39 25.229 /183			49	СП43 51.718 ВД39 32.241 /594		+п
3	СП43 55.172 ВД39 26.648 /422		+п	51	СП43 51.692 ВД39 32.758 /524		
4	СП43 55.172 ВД39 26.648 /422			53	СП43 51.744 ВД39 32.951 /491		
5	СП43 55.172 ВД39 26.648 /422			54	СП43 51.984 ВД39 32.760 /436		
7	СП43 55.080 ВД39 26.856 /439			55	СП43 51.984 ВД39 32.760 /436		п
8	СП43 55.080 ВД39 26.856 /439			57	СП43 51.835 ВД39 31.994 /683		
9	СП43 55.080 ВД39 26.856 /439			58	СП43 52.038 ВД39 32.029 /696		+п
10	СП43 54.689 ВД39 27.552 /532			60	СП43 52.038 ВД39 32.029 /696		
11	СП43 54.689 ВД39 27.552 /532			61	СП44 00.332 ВД39 18.850 /69		
12	СП43 54.689 ВД39 27.552 /532			62.1	СП44 00.332 ВД39 18.850 /69		+п
13	СП43 54.689 ВД39 27.552 /532			63	СП43 59.576 ВД39 25.031 /649		
14	СП43 54.537 ВД39 27.915 /564			64	СП43 59.560 ВД39 25.244 /624		
15	СП43 54.537 ВД39 27.915 /564			65	СП43 59.560 ВД39 25.244 /624		
17	СП43 54.498 ВД39 28.206 /651			66	СП43 59.560 ВД39 25.244 /624	н/о	н/о
18	СП43 54.782 ВД39 28.514 /733			67	СП43 59.560 ВД39 25.244 /624		
19.1	СП43 54.782 ВД39 28.514 /733			71.1	СП43 57.829 ВД39 27.176 /263		
19.2	СП43 54.782 ВД39 28.514 /733			71.2	СП43 57.829 ВД39 27.176 /263		
19.3	СП43 54.782 ВД39 28.514 /733	+п		72	СП43 57.858 ВД39 27.624 /376		
20	СП43 55.204 ВД39 27.864 /727			73.2	СП43 57.858 ВД39 27.624 /376		
21	СП43 55.204 ВД39 27.864 /727			75	СП43 57.606 ВД39 27.901 /358		
22	СП43 55.594 ВД39 27.658 /722			76	СП43 57.379 ВД39 27.981 /346		
23.2	СП43 56.415 ВД39 26.709 /716			77	СП43 56.958 ВД39 27.575 /173		
26	СП43 56.652 ВД39 26.478 /700			78	СП43 57.828 ВД39 26.821 /196		
28	СП43 57.179 ВД39 26.359 /554	п		79	СП43 57.828 ВД39 26.821 /196		
29	СП43 57.179 ВД39 26.359 /554			80.1	СП43 57.814 ВД39 25.926 /314		п
30	СП43 57.737 ВД39 26.164 /362			81	СП43 56.487 ВД39 22.934 /95		
31	СП43 57.737 ВД39 26.164 /362	п		82	СП43 55.610 ВД39 21.651 /48		
32	СП43 57.317 ВД39 24.885 /182			83	СП43 28.910 ВД39 58.602 /175		
33	СП43 57.317 ВД39 24.885 /182			84	СП43 30.406 ВД39 58.110 /341		
34	СП43 57.123 ВД39 24.782 /158			85	СП43 30.406 ВД39 58.110 /341		
35	СП43 57.123 ВД39 24.782 /158			86	СП43 30.406 ВД39 58.110 /341		
36	СП43 49.030 ВД39 28.638 /32	п		91	СП43 39.425 ВД40 09.508 /333		
38	СП43 51.450 ВД39 31.209 /579	н/о		93	СП43 38.136 ВД40 06.105 /289		
39	СП43 51.450 ВД39 31.209 /579			94	СП43 38.136 ВД40 06.105 /289		
40	СП43 51.551 ВД39 31.346 /641			95	СП43 38.136 ВД40 06.105 /289		
41	СП43 51.845 ВД39 31.202 /658			96	СП43 39.132 ВД40 04.029 /264		
42	СП43 51.845 ВД39 31.202 /658		п	97	СП43 39.312 ВД40 03.925 /290		
43	СП43 51.415 ВД39 31.628 /599		+п	98	СП43 39.922 ВД40 03.270 /291		
44	СП43 51.404 ВД39 31.840 /625			99	СП43 39.922 ВД40 03.270 /291		
45	СП43 51.404 ВД39 31.840 /625			100	СП43 40.265 ВД40 02.998 /304		п
46	СП43 51.618 ВД39 31.936 /657						

Примечание: А2, А9 и 73.2 – вегетативная совместимость с соответствующими штаммами (+ – штаммы совместимы, п – происходит передача СНV, н/о – не определено).

При этом штамм 73.2 характеризуется несовместимостью со штаммами А2 и А9, которые относятся к одной ВС-группе (совместимы между собой и обнаруживают одинаковые реакции совместимости с остальными штаммами). Случаев передачи СНV от гиповирулентных штаммов гриба вирулентным зафиксировано несколько больше, чем определено вегетативно совместимых изолятов – 9 и 5 при сращивании со штаммами 73.2 и А2, А9, соответственно (табл. 1). Подобное явление описано в литературе: установлено, что принадлежность штамма *S. parasitica* к определенной ВС-группе обусловлена семью

генами вегетативной совместимости *vic*, каждый из которых имеет по два аллеля, при этом передача СНV от штамма к штамму гриба в пределах одной ВС-группы происходит с успешностью 100%, но возможна и между гетероаллельными по генам *vic* штаммами. Вероятность передачи гиповируса определяется степенью гетероаллелизма по генам *vic* (в случае больших генетических отличий между штаммами она крайне мала) и тем, по каким из генов ВС гетероаллельны сращиваемые штаммы *S. parasitica* [7; 8].

Результаты нашей и ранее опубликованных работ [1; 2] убедительно демонстрируют высокий уровень генетической гетерогенности *S. parasitica* на Северном Кавказе, что является серьезной преградой для распространения гиповирулентности в популяции патогена и, наряду с эпизодической встречаемостью гиповирулентных рас гриба, определяет невозможность естественного биологического контроля крифонекроза. Математические модели «каштан-*S. parasitica*-СНV» («дерево-паразит-гиперпаразит») показывают, что успешность распространения СНV среди *S. parasitica* при внедрении последней в локальные популяции каштана во многом определяется начальными параметрами инвазии [15]. Согласно разработанным моделям, доминирование гиповирулентной формы паразита (ситуация, в целом характерная для Европы) возможно только в том случае, если на начальных этапах вспышки крифонекроза штаммы, пораженные СНV, преобладали над вирулентными штаммами гриба. В противном случае СНV имеет мало шансов закрепиться в популяции *S. parasitica*, и высокая агрессивность патогена приводит к деградации насаждений каштана [15]. Этот сценарий реализовался в Северной Америке, где популяция каштана зубчатого сократилась более чем на 85%, а гиповирулентные расы *S. parasitica* обнаруживаются в единичных случаях [11].

Отметим, что картина распространения крифонекроза на Кавказе с момента первого обнаружения болезни (1939 год [3], практически одновременно с остальной Европой) отличалась крайним своеобразием. В работе [3], обобщающей имевшиеся к рубежу 1970-х г. сведения, отмечалось, что, несмотря на широкое диффузное распространение крифонекроза по всему Кавказскому ареалу каштана, активные его очаги занимали сравнительно небольшие площади. При этом увеличение площади отдельных очагов и отмирание древостоя происходило крайне медленно, что в корне отличалось от стремительного пандемического распространения *S. parasitica* в Европе и тем более в США. В качестве возможных причин подобного феномена предполагались более высокая устойчивость к крифонекрозу кавказского каштана или пониженная вирулентность местной расы патогена. К сожалению, как констатируется в работе [6], в бывшем СССР и нынешней РФ исследования различных аспектов взаимодействия *S. parasitica*–каштан не получили развития (в отличие от Европы и США), вследствие чего был упущен из вида огромный пласт информации в этой области. В связи с этим на данный момент трудно определить причину столь, как кажется, внезапного «взрыва» крифонекроза на территории РФ (так, еще в 2004 г. [6] шла речь об «относительно благополучном стабильном состоянии популяции посевного каштана на Северо-Западном Кавказе в течение последних 50-60 лет») и стратегию борьбы с ним. Учитывая практическую невозможность контроля крифонекроза в данном регионе с использованием явления гиповирулентности, не исключено, что единственно возможным вариантом является интродукция азиатских видов каштана и гибридизация их с местными формами каштана посевного. Подобные работы, проводимые в США на протяжении нескольких десятилетий, дали положительные результаты – в результате селекционной работы и естественной гибридизации (в смешанных насаждениях разных видов и гибридов каштанов) были получены устойчивые к крифонекрозу гибридные формы, обладающие холодостойкостью американского каштана и показавшие свою конкурентоспособность в лесных сообществах [6].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гринько Н.Н. Внутривидовой полиморфизм возбудителя рака коры каштана (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Wagn.) на Северном Кавказе // Современная микология в России. М.: Национальная академия микологии, 2008. Т.2. С.174-176.
2. Гринько Н.Н. Внутривидовое разнообразие возбудителя рака каштана съедобного на Северном Кавказе // Вестник РАСХН. 2009, №4. С.29-33.
3. Иссинский П.А. Каштановые леса Кавказа и основы ведения хозяйства в них // Сб. тр. СочНИЛОС. М.: «Лесная промышленность», 1968. Вып. 4. С. 1-240.
4. Коничев А.С., Белов А.А., Попов А.П. Молекулярно-биологическая идентификация СНV-вируса в штаммах *Cryphonectria parasitica* // Труды Института микробиологии НАН Азербайджана. 2009, Т. VII. С. 235-238.
5. Попов А.П., Цветков И.Л., Белов А.А., Коничев А.С., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Озерская С.М. Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 246-251.
6. Рекомендации по сохранению и восстановлению каштановых лесов /Чернышев М.П., Придня М.В. Сочи: ФГУ «НИИгорлесэкол», 2004. 46 с.
7. Cortesi P., McCulloch E. C., Song H., Lin H. & Milgroom M. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* // Genetics. 2001, Vol. 159. P.107-118.
8. Cortesi P., Milgroom M.G. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica* // Appl. Envir. Microbiol. 1998, V. 64. P. 2988-2994.
9. Dawe A.L., Nuss D.L. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis // Annu. Rev. Genet. 2001, V. 35. P. 1-29.
10. HV 7/45 (1) *Cryphonectria parasitica* // Bulletin OEPP/Bulletin EPPO. 2005. V. 35. P. 295-298.
11. Macdonald W. L., Double M.L. Hypovirulence: use and limitations as a chestnut blight biological control // Restoration of American chestnut to forest lands – Proceedings of a Conference and Workshop. May 4-6, 2004. National Park Service, Washington, DC., 2006. P. 87-95.
12. Milgroom M.G., Cortesi P. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, V. 96. P.10518-10523.
13. Milgroom M.G., Cortesi P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis // Annu. Rev. Phytopathol. 2004, V. 42. P. 311-338.
14. Milgroom MG, Sotirovski K, Spica D, Davis J.E, Brewer M.T, Milev M, Cortesi P. Clonal population structure in expanding ranges of the chestnut blight fungus in southeastern Europe // Mol. Ecol. 2008, V. 17, № 20. P. 4446-4458.
15. Morozov A., Robin C., Franc A. A simple model for the dynamics of a host–parasite–hyperparasite interaction // J. Theor. Biol. 2007, V. 249. P. 246-253.
16. Robin C., Anziani C., Cortesi P. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France // Phytopathology. 2000. Vol. 90. P. 730-737.
17. Robin C., Heiniger U. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol // For. Snow Landsc. Res. 2001. V. 76. P. 361-367.
18. Turchetti T., Ferretti F., Maresi G. Natural spread of *Cryphonectria parasitica* and persistence of hypovirulence in three Italian coppiced chestnut stands // Forest Pathol. 2008, V. 38. № 4. P. 227-243.
19. Turchetti T., Maresi G. Biological control and management of chestnut diseases // Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria / A. Ciancio et K.G. Mukerji (eds.). Springer Science+Business Media B.V., 2008. P. 85-118.