

ПРИРОДНО РАСПРОСТРАНУВАЊЕ НА ХИПОВИРУЛЕНТНИ ИЗОЛАТИ НА *CRYPHONECTRIA PARASITICA* ВО КОСТЕНОВА СУБПОПУЛАЦИЈА НА ПЛАНИНАТА БЕЛАСИЦА

Кирил СОТИРОВСКИ, Михајло РИСТЕСКИ, Daniel RIGLING^{*)}

АПСТРАКТ

Распространувањето на хиповирулентност во популациите на *C.parasitica* е единствениот успешен метод за подобрување на лошата здравствена состојба на питомиот костен предизвикана од овој патоген вид габа. Во ова истражување, идентификувавме присуство на dsRNA во 8 изолати на *C.parasitica*, од локалитетот Смоларе, планина Беласица, колектирани во 2006г. Овој резултат ги потврди претпоставките дека големиот број т.н. „инволутивни рак-рани“ кои ги опсервиравме на овој локалитет во последните 8 години се резултат на присуство на хиповируси. Фактот што во 1998г., во претходни истражувања не откривме присуство на хиповируси во 100 изолати колектирани од Смоларе, Банско, Мокриево и Дражево, укажува дека во моментот на овој локалитет се случува природно распространување на хиповирулентност.

Клучни зборови: *Cryphonectria parasitica*, питом костен, *Castanea sativa*, хиповирулентност.

1. ВОВЕД

1.1. *Cryphonectria parasitica*, во светот и кај нас

Cryphonectria parasitica Murr. (Barr.) е растителна паразитна габа по видови од родовите *Castanea* и *Quercus*, но е најпозната како причинител за сушењето на питомиот костен, односно на болеста позната како рак по питомиот костен.

Ова заболување е за првпат регистрирано во 1904 година на само неколку стебла американски питом костен, *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh, во Зоолошката градина во Бронкс, во Њујорк. Во период од помалку од половина век после откривањето, патогената габа ги уништила без малку сите костенови популации во САД, на површина од 3,6 милиони хектари, со просечна стапка на ширење од 37km годишно^[4,5].

Габата, и заболувањето кое го предизвикува, се откриени во Европа во 1938г.^[7] во Италија, во близината на Џенова, на европскиот питом костен *C.sativa* Mill. Натаму се распространувала во речиси сите земји во кои постои питом костен, и тоа Франција во 1947, Шпанија во 1956^[11], од 1950 до 1975г. низ териториите на некогашна Југославија^[12], а од 1980-тите до 1990-тите во областите северно од Алпите^[13], Германија^[19] и во други земји со питом костен^[11].

На Балканот, *C.parasitica* за првпат била регистрирана во Грција во 1964 година^[26], додека на територијата на Република Македонија, за првпат е регистрирана во 1974 година, најпрво на мал број стебла во дебарскиот регион, а

^{*)} Д-р Кирил Сотировски, професор, Шумарски факултет - Скопје, Република Македонија, kirils@sf.ukim.edu.mk

Дипл. инж. Михајло Ристески, Скопје, постдипломски студент, Шумарски факултет - Скопје, Република Македонија, mihajlor_81@yahoo.com

D-r Daniel Rigling, Swiss Federal Institute Forest, Snow, Landscape Research, Birmensdorf, Switzerland, daniel.rigling@wsl.ch

набрзо потоа и на повеќе други локалитети^[18]. Од појавувањето на габата, за многу краток временски период биле зафатени скоро сите костенови субпопулации во Македонија, и нивната здравствена состојба е проценета како лоша, најповеќе како директна последица од влијанието на габата^[22, 23]. Во периодот од 1995 до 2002 година се направени поинтензивни истражувања, и габата била изолирана и вештачки одгледана од сите поголеми костенови локалитети во Македонија^[20, 21, 24]. Според поскорешни објавени истражувања, Република Македонија е меѓу последните региони во кои габата *C.parasitica* го етаблирала своето присуство^[25].

1.2. Симптоматологија

Ракот на питомиот костен започнува како инфекција која се извршува преку рани на кората. После етаблирањето во растението, габата формира бледо обоени мицелиски лепези, кои брзо растат под кората и навлегуваат во васкуларниот камбиум и во надворешните ткива на ксилемот, а тоа доведува до формирање рак-рани на кората^[16]. Потоа доаѓа до потемнување на дрвото под кората, и тоа на површина која е секогаш поголема од онаа која ја има покриено мицелијата на габата^[3]. Формираните рак-рани, се зголемуваат и постепено го обиколуваат стеблото, а по навлегување на габата во васкуларниот камбиум стануваат смртоносни^[10]. Растението-домаќин на нападот на габата реагира со делумно лигнифицирање во коленимските клетки и клетките на тенкиот паренхим од примарниот кортекс, како и со целосна лигнификација на флоемот^[2].

1.3. Хиповирулентноста како можност за сузбивање на заболувањето

Првите објавени податоци за подобрена здравствена состојба на костеновите популации се појавиле околу 1950 година, кога Birraghi^[8], во северните делови на Италија забележал спонтано заздравување на рак-рани предизвикани од оваа габа. Нешто покасно, во Италија Grente^[9] од заздрави рак-рани изолирал атипични изолати на габата *C.parasitica*, со намалена пигментација (бели) и спорулација, и го воведува поимот хиповирулентност, (што означува намалена вирулентност). Во 60-тите години на 20-тиот век, во вакви бели изолати на габата биле откриени хиповируси. Се работи за двојноспирална РНК (double stranded RNA; dsRNA), од 1995 година официјално класифицирана како *Cryphonectria Hypovirus (CHV)*^[14].

Стеблата кои се заразени од хиповирулентни изолати на габата формираат површински рак-рани, без подлабоко распукнување на кората (слика 1). На местото на раната доаѓа до хипертрофија, што е различно од вдлабнувањето на кората кое се појавува во случај на инфекција со вирулентни изолати на габата, односно подлабокото распукнување на кората во подоцнежниот стадиум. Во случајот со вакви т.н. „инволутивни“ (заздравувачки) рак-рани, не доаѓа до изумирање на ткивото од ксилемот и кората, и стеблото продолжува нормално да живее.

Досега, во светот се идентификувани три типови dsRNA вируси и се означени како CHV1, CHV2 И CHV3^[14], а во Европа досега е регистриран единствено CHV1 типот^[1]. Хиповирусите изолирани во Македонија се од т.н. италијански подтип (CHV1-I) кој се одликува со голем хиповирулентен потенцијал кон *C.parasitica*^[24].

Пренесување (трансмисија) на хиповирусите е можно преку контакт на мицелиите од хиповирулентен и од вирулентен изолат. Тоа се случува сосема непречено меѓу изолати од ист вегетативно компатибилен (в-к) тип, додека вегетативната некомпатибилност меѓу донорскиот и реципиентниот изолат делумно ја ограничува или пак целосно ја оневозможува трансмисијата на хиповируси^[15]. Во голем број европски земји, природното распространување на хиповирулентноста придонесува за подобрување на здравствената состојба на костеновите популации^[11], што не е случај и во САД, каде што една од пречките е големиот диверзитет на в-к типови на габата *C.parasitica*^[10]. Имајќи предвид дека во Република Македонија има еден доминантен в-к тип, и многу низок севкупен диверзитет на в-к

типови^[25], што е карактеристика и за популацијата на габата во поширокиот регион на југоисточна Европа^[17], барем засега има одлични предуслови за успешно искористување на хиповирулентноста како биолошки метод за спречување на распространувањето на болеста, односно за подобрување на здравствената состојба во костеновите субпопулации.



Слика 1. Заздравувачка (инволутивна) рак-рана.
Figure 1. Healing (involutive) canker.

1.4. Цел на истражувањето

Основна цел на ова истражување е докажувањето на присуството на хиповируси во субпопулацијата на *S.parasitica* на локалитетот Смоларе, со молекуларно-биолошки методи, вообичаени за идентификација на dsRNA. Со тоа ќе се потврдат претпоставките за нивно природно распространување на овој локалитет, на кој не беа регистрирани во наши претходни обемни истражувања до 1998г.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА

2.1. Колекција на изолати

Во текот на 2006 година, во близина на село Смоларе (41°22'08г с.г.ш. и 22°54'08г и.г.д.), на планината Беласица, од секоја од 45 заздравувачки или калусирани рак-рани, беа колектирани по 4 примероци костенова кора, вкупно 180 примероци. Примероците беа со големина од сса 30x30mm, колектирани со нож, стерилизиран со 90% етил-алкохол пред секое ново засекување кора. Примероците се колектираа од рабовите на рак-раните, и тоа од во правците исток, запад, север и југ.

2.2. Изолација на габата

За изолација и одгледување на изолатите од габата користевме подлога од компир декстроза агар (PDA-Liofilchem), во концентрација препорачана од производителот, по 20ml во Петриеви садови со дијаметар 9cm.

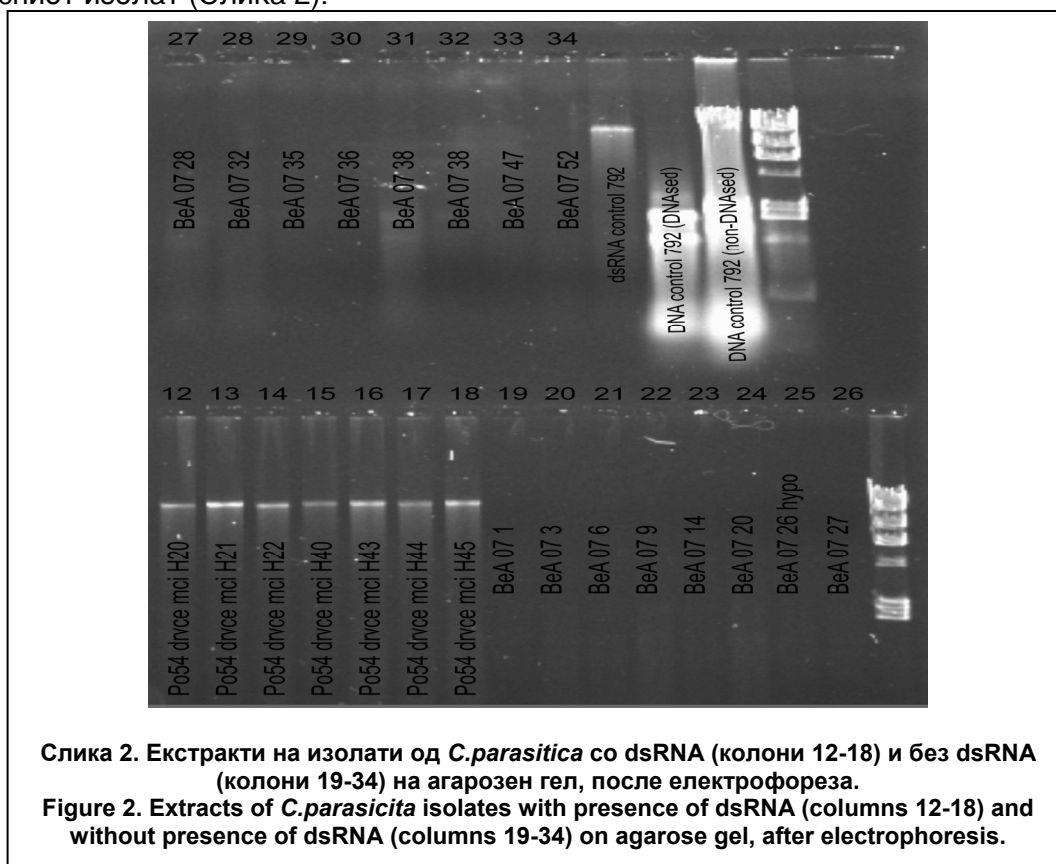
На подлогата беа ставани фрагменти од колектираните примероци на костенова кора со големина 4-5mm². Петри сатовите беа инкубирани на собна температура на дневна светлина. Порастот на мицелијата се набљудуваше секојдневно, а во моментот кога бевме сигурни дека има пораст на мицелија од *S.parasitica* изведувавме реизолација, повторно на PDA подлога.

Сите изолати се зачувани на филтер хартија на -20°C во фитопатолошката лабораторија на Шумарски факултет во Скопје.

За да се спречи можноста од распространување на фитопатогената габа во природа, сите материјали кои на било каков начин дошле во контакт со габата (Петри садови, епрувети, најлони, гранчиња, и сл.), беа стерилизирани со автоклавирање пред да се исфрлат.

2.3. Идентификација на хиповирулентни изолати

Сите изолати од габата беа подложени на метод на детекција на хиповируси, според протоколот на Bissegger^[6] со модификација според Rigling (необјавено). Израснатата мицелија од секој изолат, механички се мацерира со челична кугла во Mikro-Dismembrator. Нуклеинските киселини се екстрахираат во пуфер 2xSTE, кој содржи висока концентрација на соли, и затоа ја штити dsRNA од разградување од DN-аза. Протеините се преципитираат со 10% SDS (sodium dodecyl sulphate = натриум додецил сулфат), фенол-хлороформ и хлороформ. Водениот раствор во кој се содржат DNA, ssRNA и dsRNA, се доведува до крајна концентрација на 15% етил алкохол. При таа концентрација, dsRNA, но не и другите нуклеински киселини, се врзува за целулозата CF-11. Целулозата CF-11 се измива со 1xSTE/15% етил алкохол и dsRNA се измива со 1xSTE. DsRNA се наталожуваат во 0,3 M NaAcetate и 66% етил алкохол, и се собираат преку центрифугирање. Пробите со dsRNA се растворуваат во вода без RNаза и се чуваат на -20°C . Потоа, секој примерок се става на агарозен гел и се подложува на електрофореза. Евентуалниот сигнал со приближна големина од 12kb означува присуство на хиповируси (dsRNA) во односниот изолат (Слика 2).

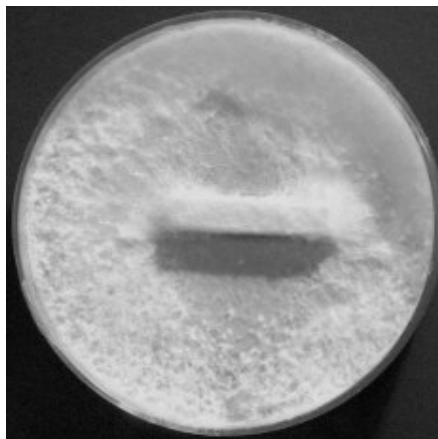


Слика 2. Екстракти на изолати од *C.parasitica* со dsRNA (колони 12-18) и без dsRNA (колони 19-34) на агарозен гел, после електрофореза.

Figure 2. Extracts of *C.parasitica* isolates with presence of dsRNA (columns 12-18) and without presence of dsRNA (columns 19-34) on agarose gel, after electrophoresis.

3. РЕЗУЛТАТИ

Од 180 примероци кора подложени на постапка за изолација на габата *C.parasitica*, беа добиени 33 чисти култури. Од нив, во 8 изолати ($Smo_{\varnothing_6}1ha$, $Smo_{\varnothing_6}4ha$ (Слика 4), $Smo_{\varnothing_6}18ha$, $Smo_{\varnothing_6}18b$, $Smo_{\varnothing_6}29hb$, $Smo_{\varnothing_6}32hb$, $Smo_{\varnothing_6}33hb$ и $Smo_{\varnothing_6}34hc$, беше докажано присуство на хиповируси (12kb dsRNA).



Слика 4. Чиста култура на хиповирулентниот изолат $Smo_{\varnothing_6}4ha$.
Figure 4. Pure culture of hypovirulent isolate $Smo_{\varnothing_6}4ha$.

4. ДИСКУСИЈА

Во наши претходни истражувања за откривање на хиповируси^[20, 24], 43 изолати на *C.parasitica* од локалитетот Смоларе, анализирани во 1998г., како и други 57 изолати од блиски локалитети (Банско, Мокриево и Дражево), беа подложени на екстракција на dsRNA, но во ниту еден од тие 100 изолати не регистриравме присуство на хиповируси. Од тој период, па до 2006г., костеновиот локалитетот над селото Смоларе беше посетуван најмалку еднаш годишно, при што забележавме сè побројно присуство на заздравувачки рак-рани. Ова беше основниот повод за да се ангажираме во уште една екстензивна колекција на изолати, но овојпат насочена единствено кон докажување на присуство на хиповируси, односно хиповирулентност на оваа локација. Самиот факт што од 180 примероци кора изолиравме само 33 чисти култури на габата е во согласност со претходни истражувања (Rigling, необјавено), според кои хиповирулентни изолати потешко се изолираат од заздравувачките рак-рани. Токму заради овие констатации и се решивме за собирање на по 4 примероци кора од секоја рак-рана во 2006г.

Резултатите од екстракцијата на dsRNA од изолатите колектирани од локалитетот Смоларе во ова истражување, докажаа присуство на хиповируси во 8 изолати од вкупно 33 изолати кои беа подложени на екстракција. Нискиот процент на изолати во кои е регистрирано присуство на хиповируси (24,2%) е уште еден доказ дека хиповирусите не секогаш може да се откријат, дури иако се работи за типични хиповирулентни рак-рани. Постојат претпоставки според кои ова се должи на својството на хиповирусите да ја инхибираат мицелијата на габата *C.parasitica*, до таа мера што станува непогодна за репликација односно опстанок на самите хиповируси (Rigling, необјавени податоци). Оттаму и објаснувањето зашто од примероците кора собрани од самите рабови на калусираните или заздравувачки рак-рани изолиравме само околу 15% чисти култури на габата, и што во нив детектиравме dsRNA (хиповируси) во само 8 изолати (24,2%).

Со овие резултати за прв пат, недвосмислено, со стандардни молекуларни методи, ги потврдивме нашите претпоставки за постоење на хиповируси во оваа

субпопулација на габата *C.parasitica*, откако во изминатите години забележавме појава на инволутивни, односно заздравувачки рак-рани на овој локалитет.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Со резултатите од екстракцијата на dsRNA од изолати на *C.parasitica* колектирани во 2006г. од костеновиот локалитет во близина на село Смоларе на планината Беласица, докажавме присуство на хиповируси во оваа субпопулација на габата. Со ова се потврдија нашите претпоставки базирани на повеќегодишни набљудувања на здравствената состојба на костените на овој локалитет дека е дојдено до природно распространување на хиповирулентност. Во претходни обемни истражувања, со изолати колектирани во 1996г. и анализирани во 1998г. од истиот овој и од блиски локалитети, не детектиравме dsRNA, односно хиповируси, во ниту еден од 100 изолати подложени на екстракција и анализа.

6. РЕФЕРЕНЦИ

- [1] Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., & Rigling, D. (1999). Genetic variation of Cryphonectria hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Mol. Ecol.*, **8**, 843-854.
- [2] Anagnostakis, S.L. (1992). Search for novel peroxidases in chestnut blight fungus. *Proc. of the International Chestnut Conf. Morgantown, West Virginia, USA*.
- [3] Anagnostakis, S. L. (1982). Biological control of chestnut blight. *Science*, **215**, 466-471.
- [4] Anagnostakis, S. (1987). Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* **79**, 23-27.
- [5] Anagnostakis, S, L., & Waggoner, P.E. (1981). Hypovirulence, vegetative incompatibility and the growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology*, **71**, 1198-1202.
- [6] Bissegger, M., Rigling, D., & Heiniger, (U. 1997). Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* **87**: 50-59.
- [7] Biraghi A. (1946). Il cancro del castagno causato da *Endothia parasitica*. *Ital. Agric.* **7**:1-9.
- [8] Biraghi A. (1953). Possible active resistance to *Endothia parasitica* in *Castanea sativa*. *Rep. Congr. Int. Union For. Res. Org., 11th. Rome*.
- [9] Grente, J. (1965). Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. *C. R. Acad. Agric. France* **51**, 1033-1037.
- [10] Griffin, G. J. (1986). Chestnut blight and its control. *Horticultural review*, **8**, 291-336.
- [11] Heiniger, U. & Rigling, D. (1994). Biological control of chestnut blight in Europe. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **32**, 581-599.
- [12] Halambek, (1986). Hipovirulentni sojevi *Cryphonectria parasitica-nova* mogućnost za oporavak pitomog kestena. *Radovi* **26**:223-40.
- [13] Heiniger U, Stadler B. (1990). Kastanienrindenkrebs auf der Alpennordseite. *Schweiz. Z. Forstwes.* **141**:383-88.
- [14] Hillman, B. I.; Suzuki, N. 2004: Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Adv. Virus Res.* **63**, 423-472.
- [15] Liu, Y.-C. & Milgroom, M.G. (1996) Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, **86**, 79-86.
- [16] McManus, P.S., Ewers, F.W. & Fulbright, D.W. (1989). Characterization of the chestnut blight canker and the localization and isolation of the pathogen *Cryphonectria parasitica*. *Can. J. Bot.* **67**:3600-3607.
- [17] Milgroom, M.G., Sotirovski, K., Spica, D., Davis, J.E., Brewer, M.T., Milev, M. & Cortesi, P. (2008). Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, **17**, 4446–4458.

- [18] Папазов, В., Серафимовски, А., Грујовска, М., & Камиловски, М. (1986). Биеколошки проучувања на габата *Endothia parasitica*, (Murr.), причинител за сушењето на костенот во Македонија. Извештај, Шумарски факултет, Скопје.
- [19] Seemann D, Unger J-G. (1993). Rindenkrebs der Esskastanie in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtensbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst* **45**: 120—22.
- [20] Сотировски, К. (2000). Хиповирулентност, вегетативно компатибилни групи и размножувачки типови на *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Вагг. во Република Македонија. Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Република Македонија.
- [21] Сотировски, К., Милгроом, М.Г., & Папазов, В. (1997). *Cryphonectria parasitica* во Република Македонија: вегетативно компатибилни типови и хиповирулентни изолати. Симпозиум: 50 години Шумарски факултет, Скопје, Македонија.
- [22] Sotirovski K. & Milgroom (1998). Lack of diversity of vegetative compatibility and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Republic of Macedonia. Second International Symposium on Chestnut, 19-23 Oct. Bordeaux, France.
- [23] Сотировски К. & Папазов В. (1996). Хиповирулентност на *Cryphonectria (Endothia) parasitica*: можности за биолошки мерки за санација на питомиот костен во Република Македонија. XX Советување за Заштита на растенијата, Охрид, 1995.
- [24] Сотировски, К., Милгроом, М.Г., Риглинг, Д., & Хеинигер, У. (2006). Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia. *Forest Pathology*, **36**, 136-143.
- [25] Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N.J., & Milgroom, M.G. (2004). Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology*. **53**, 325–333.
- [26] Xenopolous S. (1982). Severity of chestnut blight disease and the pathogenicity of the causal fungus *Endothia parasitica* in Greece. *Eur. J. For. Pathol.* **12**:316-26.

SUMMARY

NATURAL SPREAD OF HYPOVIRULENT ISOLATES OF *CRYPHONECTRIA PARASITICA* IN CHESTNUT POPULATION ON MOUNTAIN BELASICA

Kiril SOTIROVSKI, Mihajlo RISTESKI, Daniel RIGLING^{*)}

The spread of hypovirulence in populations of *C.parasitica* is the only successful means for improvement of the bad state of health of sweet chestnut caused by this pathogen. In this research, we have identified presence of dsRNA in 8 isolates of *C.parasitica*, in the vicinity of Smolare, on mountain Belasica, collected in 2006. This result confirms our assumptions that the large number of binvolutive cankers which we have observed at this site in the last 8 years, are a result of presence of hypoviruses. The fact that in 1998, in previous research, we did not detect presence of hypoviruses in 100 isolates collected from Smolare, Bansko, Mokriovo and Drazovo, points out that natural spread of is happening at present at this site.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, sweet chestnut, *Castanea sativa*, hypovirulence.

^{*)} D-r Kiril Sotirovski, professor, Faculty of Forestry, Skopje, Republic of Macedonia, kirils@sf.ukim.edu.mk

Dipl.eng. Mihajlo Risteski, postgraduate student, Faculty of Forestry, Skopje, Republic of Macedonia, mihajlor_81@yahoo.com

Daniel Rigling, Ph. D, Swiss Federal Institute Forest, Snow, Landscape Research, Birmensdorf, Switzerland, daniel.rigling@wsl.ch