

A *Cryphonectria parasitica* (Murill.) Barr gomba hipovirulens törzseinek morfológiai és virulencia változásai a hosszú idejű, laboratóriumi tárolás során

Kovács Gabriella*, Biró Györgyi, Tarcali Gábor és Radócz László

Debreceni Egyetem Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,

Növényvédelmi Intézet, 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

*e-mail: kovacs.gabriella@agr.unideb.hu

Összefoglalás

A szelídgesztenye fajok (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh. és *Castanea sativa* Mill.) kéregrákos megbetegedését okozó *Cryphonectria parasitica* gomba Amerikában és Európában is jelentős károsító. Eredményesen védekezni ellene csak a hipovirulens változat használatával lehet. A hipovirulens gombatörzsek citoplazmájában egy kettősszálú-RNS vírus található. Ez okozza a jelentős megbetegítő képesség (virulencia) csökkenést. Ezek a törzsek táptalajon morfológiailag is különböznek a virulens izolátumoktól. Tapasztalataink szerint, előfordulhat, hogy az RNS vírus fragmentálódik és gombaizolátum kezdetben még a hipovirulens változatra jellemző fehér, áttetsző telepmorfológiát mutat a BDA táptalajon, azonban már nem képes *in vivo* átadni a mikovírusát. De az is előfordulhat, hogy hosszabb tárolást követően annyira töredezik az RNS vírus, hogy a szabadföldi kezelésekre teljesen alkalmatlanná válik a tenyészet, holott a táptalajon még fehér a micélium. Ezért a molekuláris biológiai (alátámasztó) vizsgálatok nélkülözhetetlenek a szabadföldi kezelések megkezdése előtt.

Kulcsszavak: szelídgesztenye kéregrák betegség, *Cryphonectria parasitica*, hipovirulens törzs, RNS vírus

Abstract

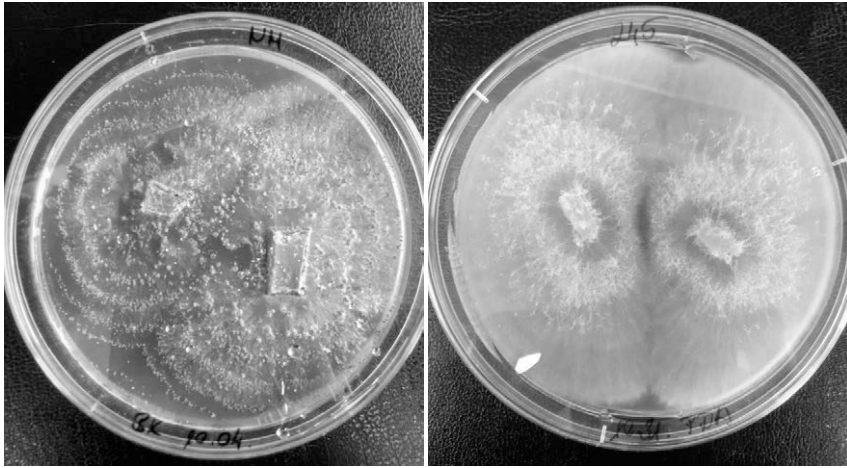
The fungus *Cryphonectria parasitica*, which causes the blight disease on the chestnut species of *Castanea dentata* and *Castanea sativa*, is also a major pest in America and Europe. The only way to control this fungus is to use hypovirulent isolates. A double-stranded RNA virus is

present in the cytoplasm of hypovirulent fungal strains. This causes a significant reduction in virulence. These strains also differ morphologically from the virulent isolates on the medium. In our experience, the RNA virus may be fragmented and the fungal isolate initially exhibits a white colon morphology characteristic of the hypovirulent variant on the BDA medium, but is no longer capable of transmitting mycovirus *in vivo*. Alternatively, after prolonged storage, the RNA virus is so fragmented that the culture becomes completely unsuitable for field treatment, although the mycelium is still white on the medium. Therefore, molecular biological (confirmatory) tests are essential before field treatments can be performed.

Keywords: chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, hypovirulent strain, dsRNA virus

Bevezetés

A szelídgesztenye (*Castanea sativa* Mill.) legjelentősebb kórokozója a kéregrákot okozó *Cryphonectria parasitica* (Murill.) Barr gomba. Elsőként 1906-ban írták le Amerikában (Merkel). Közel ötven évvel később Európában is megjelent, 1946-ban Olaszországban találta meg Biraghi. Az ellene való védekezés egyetlen hatékony lehetősége a hipovirulens törzsekkel való biológiai növényvédelem. Ezek a törzsek a legtöbb esetben spontán megjelennek a fertőzött területeken. Svájcban 1948-ban észlelték először a kéregrák tüneteit, a hipovirulens törzset viszont csak 1975-ben izolálták (Bazzingher et al., 1981). Hasonlóképp Olaszországban Biraghi feldezt fel egy olyan szelídgesztenye állományt, mely erősen fertőzött volt, de nem mutatta az elhalás jeleit. Majd Grente (1965) izolálta vissza a kórokozót a természetes módon gyógyult, rákos sebekből, mely telepmorfológiailag is eltért a virulens gombatörzstől. A hipovirulenciát előidéző (kettősszálú RNS-t tartalmazó), köpenyfehérjével nem rendelkező mikovírusokat Hillmann és munkatársai (1994) rendszertanilag a Hypoviridae genuszba sorolták. Az általunk vizsgált gomba a *Cryphonectria hypovirus* CHV-1 mikovírust hordozta. A hipovirulens törzs táptalajon fehér színű (Grente, 1965), míg a virulens törzsek jellemzően erősen pigmentált, narancssárga színűek (1. ábra).



1. ábra. Balra NM jelzésű virulens törzs, jobbra a gyógyult kéregből visszaizolált hipovirulens NM változat

Ez a mikovírus hifaanasztomózissal könnyen átadódik (Grente, Sauret, 1969), azonban a gombafonalak összenövése abban az esetben lehetséges, ha köztük vegetatív kompatibilitás áll fenn (Anagnostakis, Waggoner, 1981). Ha a hipovirulens törzsek elveszítik a citoplazmájukban lévő kettősszálú RNS-t, akkor fertőzőképességük újra megnő (Fulbright, 1984).

Anyag és módszer

A szabadföldi izoláció során a fertőzött és egészséges kéregész határáról mintát veszünk, majd ezt laboratóriumi körülmények közt, 70%-os etanollal fertőtlenítjük 2 percig, ezt követően pedig steril vízzel öblítjük. A kéregdarabokat BDA táptalajra helyezzük. Később többször átoltjuk, hogy tiszta tenyészetet kapjunk. Két-három hét elteltével a virulens törzsek jellemzően narancssárga pigmentációt mutatnak, míg a hipovirulens törzsek gyengébben fejlődnek, a micélium színe fehér, szinte áttetsző, kevés légmicéliumot növeszt. A biológiai védekezéshez a hipovirulens törzseket párosítjuk a virulens törzsekkel. Ha köztük vegetatív kompatibilitás áll fenn, akkor a két gomba közt létre jön a hifa anasztomózis és a hipovirulens törzsből a dsRNS vírus átjut a virulensbe, így egy konvertált törzset kapunk. A szabadföldi kezeléseket pedig ezzel hajtjuk végre, elkerülve ezzel esetlegesen új kórokozó gomba genotípusok behurcolását a kezelt területekre.

Ahhoz, hogy biztosak legyünk a kettős szálú RNS meglétében, molekuláris biológiai vizsgálatokra van szükség. Ezt a Nyitrai Erdészeti Kutató Intézet munkatársai, Katarína Adamčíková és Emília Ondrušková segítségével hajtottuk végre NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany) dsRNS izoláló KIT segítségével. Tizenhárom mintát vizsgáltunk, melyből négy minta Reziből (R), öt minta Nagymarosról (NM) származik, további négy pedig külföldi izolátum volt. Az izolálás során DNÁzzal történő emésztést végeztek (20 perc inkubáció, 37 ° C-on), mivel a *Cryphonectria parasitica* DNS fragmentumai és a CHV-1 dsRNS nagyon hasonlóan vándorolnak agaróz gélen (Rigling et al, 1989). Ezen felül ugyanazokat a *C. parastica* izolátumokat, mint amelyeket a teljes RNS kivonásánál alkalmaztak, egyidejűleg használták a DNS kivonáshoz és a párosodási típus azonosításához is (Milgroom et al. 2008., Rigling, 1995). A DNS koncentráció meghatározása NanoDrop (Thermo Scientific) spektrofotométerrel történt. 13 izolátum vizsgálatát multiplex polimeráz láncreakcióval végezték és az alábbi specifikus primerpárt használták a MAT típusok azonosítására: M1-GS1n és M1-GS3rev a MAT-1 típus esetén és a M2GS3 és gs1-d-1primereket a MAT-2 típusnál (Marra és Milgroom, 1999).

Eredmények

A Nagymarosról származó hipovirulens törzset használtuk fel kezeléseink során nem csak Nagymaros térségében, hanem Pécsbánya és Szalárd (RO) településeken is.

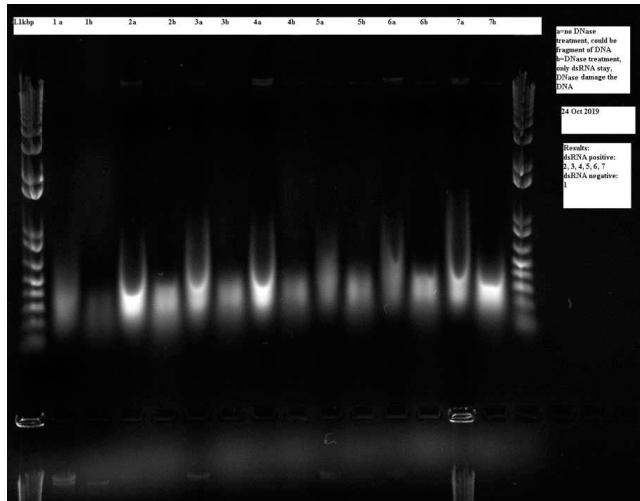
Az NM jelzésű mintával 2017 őszén kezeléseket végeztünk Nagymaros területén, valamint mesterséges fertőzést hajtottunk végre kispárcellás kísérletben. Utóbbi esetén több mérést végeztünk, illetve visszaizoláltuk a gombát. Visszaizolálást követően azonban meglepő eredményt kaptunk, az általunk hipovirulensnek hitt NM jelzésű gomba a táptalajon egyértelműen virulens morfológiát mutatott. Az a gomba, melyet hűtőben tároltunk, amiből az izolátum eredetileg származott, még mindig hipovirulensnek tűnt. Tavasszal Nagymarosról is azt a visszajelzést kaptuk, hogy a kezelt fák nem gyógyulnak. A meglévő mintákat felszaporítottuk és azt tapasztaltuk, hogy a táptalajon néhol kisebb pigmentáció jelenik meg az egyébként fehér micélium közt (2. ábra). Az RNS fragmentációja feltételezéseink szerint azért is következhetett be, mert a mintákat sokáig tároltuk. A korábbi években sikeresen kezelt fákból is vettünk mintát, ezek esetében sikerült kimutatni a teljes hosszúságú (kb. 13.000 bázispár) ds RNS-t.



2. ábra. Nagymarosi gyógyult sebből visszaizolált hipovirulens törzs

Az R8 jelzésű Reziből származó törzsünket Érden és Szalárdon is felhasználtuk. A szalárdi ültetvényben hatékonyan bizonyult az oltóanyag, míg Érdről negatív visszajelzést kaptunk. A meglévő mintát felszaporítottuk és a pigmentációt elősegítő fény alatt tárolva, néhány Petri-csésze esetében valóban jelentkezett a narancssárgás szín. További érdekességet volt az, hogy Érdről viszont sikerült visszaizolálni a hipovirulens törzset és táptalajon fehér micéliumot növesztett. Ebben az esetben valószínűleg a ott lévő virulens törzs olyannyira gyors növekedésű lehetett, hogy az átadott RNS vírus még nem tudta kifejteni hatását.

A sorozatos ellentmondásokat észelve végeztük el a molekuláris biológiai vizsgálatokat. A teljes hosszúságú kettőszálú-RNS-t az eredeti R8-as törzsünk már nem tartalmazta, azonban a visszaizolált törzsben még jelen volt (3. ábra). A Nagymaroson kezelt gyógyult sebekből visszaizolált törzsek mindegyike tartalmazta a teljes dsRNS-t (2. ábra).



3. ábra. Gélkép: 1. minta R8, 2. minta R8 gyógyult sebből visszaizolált törzs, 5., 6., és 7. minta Nagymarosi gyógyult sebből visszaizolált törzsek

(Forrás: Katarína Adamčíková és Emília Ondrušková SZTA Erdészeti Kutató Intézet, Nyitra)

Következtetések

A szabadföldön tapasztalt kéregnekroízis típus és a táptalajon mutatott külső morfológiai tenyészbélyegek, illetve a molekuláris vizsgálatok eredményei nincsenek mindig teljes szinkronban. A hipovirulens gombatörzsek hosszú idejű, laboratóriumi tárolása során bekövetkezhet a teljes hosszúságú dsRNA hypovírus (13 kBp) töredezése, deléciója. Ezek a töredezett, kettősszálú-RNS fragmentumok már nem tartalmazzák a teljes mikovírus genomot. Egyes fragmentumok azonban még képesek kialakítani a tenyésztett gombában a hipovirulens morfológiai bélyegeket, de a nagymértékű virulencia csökkenést (hipovirulenciát) már nem tudják előidézni az adott kórokozó gombaizolátumnál. Fokozott figyelemmel kell lennünk tehát ezek használata során. A sikeres *in vitro* konverziót (amely az eredményes szabadföldi kezelések előfeltétele) minden esetben igazolnunk szükséges molekuláris biológiai vizsgálatokkal is, amelyekben a teljes hosszúságú kettősszálú-RNS citoplazmatikus jelenléte kimutatható.

Hivatkozások

- Anagnostakis S. L. and Waggoner P.E. 1981. Hypovirulence, vegetative compatibility and the growth of canker of chestnut blight. *Phytopathology*. 1198-1202.
- Bazzigher G., Kanzler E. and Kuhler T. 1981. Irreversible Pathogenitätsverminderung bei *Endothia parasitica* durch übertragbare Hypovirulenz. *Eur. J. for Pathol.* 358-369.
- Biraghi A. 1946. Il cranco del castagno causato da *Endothia parasitica*. *Agric. Ital.* 7. 1-9.
- Biraghi A. 1951. Caratteri di resistenza in "Castanea sativa" nei confronti di "*Endothia parasitica*." *Boll. Staz. Patol. Veget.* 8.
- Fulbright D.W. 1984. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica* *Phytopathology* 722-724.
- Grente J. 1965. Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoir de lutte contre le chancre du châtaignier. *Acad. Agric. France*, 51. 1033-1036.
- Grente J. and Berthelay-Sauret S. 1969. Le hypovirulence exclusive, est-elle controlée par des determinants cytoplasmiques. *C.R. Seances Acad. Sci Fr.* 3173-3176.
- Hillman B.I., Fulbright G. W., Nuss, D.L. and Van Alfen N. 1994. Hypoviridae. In: Sixth report of the International Comm. for the Tax of Viruses. Ed: Murphy F.A., Springer-Verlag, New York, USA. 30-65.
- Marra R. E. and Milgroom M. G. 1999. PCR amplification of the mating-type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology*, 8. 1947-1950.
- Merkel H. W. 1906. A deadly fungus in the American chestnut. *NY. Zool. Soc. Am. Rep.* 10. 204-210.
- Milgroom M. G., Sotirovski K., Spica D., Davis J. E., Brewer M. T., Milev M. and Cortesi P. 2008. Clonal population structure of the chestnut blight fungus expanding range in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, 17. 4446-4458.
- Morris T. J. and Dodds J.A. 1979. Isolation and analyses of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 87. 1026-1033.
- Rigling D., Heiniger U. and Hohl H. R. 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology* 79. 219-223.
- Rigling D. 1995. Isolation and characterization of *Cryphonectria parasitica* mutants that mimic a specific effect of hypovirulence-associated dsRNA on laccase activity. *Canadian Journal of Botany*, 73. 1655-1661.