

УДК 632.4.01/.08 : 57.083.182

## ОЦЕНКА МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ АСКОСПОРОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ ЯБЛОНИ

Насонов А.И., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» (Краснодар)

**Реферат.** Проведен анализ морфолого-культуральных характеристик 40 моноаскоспоровых изолятов *Venturia inaequalis* – возбудителя парши яблони, одного из основных грибковых заболеваний плодовой культуры. Была показана широкая морфологическая дифференциация, которая отражает внутривидовое разнообразие местной популяции патогена. В выборке изученных изолятов было выделено 10 основных морфотипов.

**Ключевые слова:** *Venturia inaequalis*, моноспоровые изоляты, морфотип, внутривидовое разнообразие, морфолого-культуральные характеристики, аскоспоры

**Summary.** The analysis of morphological and cultural characteristics of 40 monoascosporic isolates of *Venturia inaequalis* – the causal agent of apple scab, major fungal diseases of fruit crop. Wide morphological differentiation has been demonstrated that reflects the within-populative diversity of local populations of the pathogen. In the sample of studied isolates, 10 main morphological types have been selected.

**Key words:** *Venturia inaequalis*, monosporic isolates, morphotype, diversity of within-populative, morphological and cultural characteristics, ascospores

**Введение.** Парша яблони является основным микозом этой садовой культуры. Патогенез заболевания уникальный, при котором его возбудитель – микроскопический грибок *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter – развивается в субкутикулярном пространстве без проникновения в ткани хозяина и включает бессимптомный период, завершающийся появлением темно-оливковых и черных пятен на листьях и плодах яблони. Жизненный цикл патогена характеризуется двумя стадиями: половой и бесполой. Наличие ежегодной половой стадии в цикле развития гриба обуславливает присутствие широкой внутривидовой дифференциации возбудителя парши яблони, возникающей в результате рекомбинации признаков.

Изучение состава популяции патогена и динамики его изменчивости является фундаментом для создания как программ селекции на иммунитет, так и проведения защитных мероприятий в фитопатологической практике. В целом, при всё увеличивающемся пресинге фунгицидных обработок, когда ставится под сомнение рациональность природопользования, а также экологическая и пищевая безопасность, получение такой информации позволит сбалансировать применение искореняющих препаратов.

Как отмечают В.А.Чулкина и В.И.Усенко [2], в связи с узкой паразитической специализацией возбудителя, его тактика трофических связей достаточно уязвима, что говорит о возможности и эффективности использования селекции устойчивых сортов для контроля болезни. Для ускорения и увеличения эффективности селекционного процесса необходимо детальное изучение популяционной динамики патогена, а также использование искусственных инфекционных фонов.

Исследование генетического разнообразия микроорганизмов, в силу специфических особенностей объекта, связано с необходимостью разделения сложных по составу природных популяций с помощью метода чистых культур. Метод чистых культур позволяет про-

водить изучение отдельных признаков микроорганизма в стандартизированных условиях культивирования, в которых они проявляются четко, тогда как в условиях естественной среды на них могут влиять неконтролируемые параметры, в том числе взаимодействие с другими организмами, искажая их проявление [3].

При изучении генетического разнообразия стараются получить культуры, образованные от одной споры, так называемые моноспоровые изоляты, свойства которых в череде пересевов остаются неизменными. Фактически, из многокомпонентной популяции получают отдельные клоны, постоянство морфологических особенностей которых оценивают во времени.

Впервые чистая культура патогена была выделена Адерхольдом (1986) на экстрактах из яблоны, груши, вишни и др. культур, с добавлением желатина для получения твердой среды. В дальнейшем на моноспоровых культурах гриба *V. inaequalis* были проведены классические исследования его генетики и особенностей метаболизма [3, 4]. Культуру фитопатогена можно получить на любой из двух стадий развития, представленных половыми (аскоспорами) или бесполовыми (конидии) пропагулами.

Рядом исследователей было отмечено сходство культуральных признаков паразитного микромицета, полученного из различных типов спор [5]. Сумчатая стадия гриба развивается на опавших листьях и является сапрофитной (растет в отмерших тканях), в то время как конидиальная является паразитной (существует в живых тканях вегетирующих растений) [6]. Однако информация о внутривидовой изменчивости полученная на чистых культурах из аскоспор и конидий будет различаться, в первом случае можно говорить об ожидаемой изменчивости, тогда как во втором – о реальной, реализованной в конкретных условиях года.

Зачастую изучение популяционной динамики начинают с оценки морфолого-культуральных признаков патогена, которая и была основным методом до появления ДНК-маркерных систем, позволяющих оценивать эволюционно нейтральные характеристики [7]. Тем не менее, этот способ не потерял своей актуальности и в настоящее время в рамках предварительной оценки генетического разнообразия, а также как дополнительный к молекулярному маркированию метод [8, 9].

Изменчивость морфологических и физиологических признаков наглядно проявляется как в естественных условиях, так и при культивировании *in vitro* (на питательных средах). Чаще всего отмечают варьирование размеров и форм спор, но она может проявиться и рядом других признаков, таких как скорость роста и окраска колоний, интенсивность спороношения, форма и толщина гиф, продуктивность конидий, а также агрессивность и вирулентность патогена [3]. В некоторых случаях из всего количества оцениваемых признаков выбирают несколько наиболее вариативных или один признак, но коррелирующий с рядом других особенностей.

О.Н.Барсуковой, оценивавшей большую выборку из 541 изолята *V. inaequalis* европейской части СССР, за основу группировки была взята степень плотности мицелия, которая коррелировала с уровнем их спороношения и патогенностью [10]. В целом этот подход сходен с группировкой изолятов парши яблоны, предложенной D. S. Kirkham [11]. В результате О.Н.Барсуковой было выделено 4 основные группы возбудителя заболевания, которые характеризовались некоторой зависимостью от экологического фактора.

Изоляты из третьей и четвертой группы, характеризующиеся более плотным мицелием и низкой продукцией спор, были типичны для степных районов Краснодарского края, а также Ставропольского края и Ростовской области. Вероятно, засушливый климат этих регионов сдерживал развитие парши, поэтому её изоляты обладали меньшей жизнеспособностью и при изоляции давали малоспороносную или стерильную культуру [10].

В других случаях изоляты разделяют по всей совокупности морфолого-культуральных признаков на морфотипы. При этом в морфотип объединяют изоляты с

максимально сходным набором характеристик, и в этом случае можно говорить об их генетической идентичности или родстве. Этот способ в наибольшей степени подходит для изучения популяционной изменчивости и динамики, так как позволяет наиболее полно оценить фенотипическое и генотипическое разнообразие. В исследованиях советских учёных было описано для белорусской популяции патогена на выборке из 620 моноспоровых изолятов 18 морфотипов [12] и позже ещё 14 дополнительных [13].

Целью работы была оценка морфолого-культуральных признаков аскоспоровых изолятов, выделенных из различных по сортовому составу и расположению садовых насаждений Краснодарского края и Республики Адыгея, а также определение морфотипного состава, с подробной характеристикой каждого морфотипа данной выборки штаммов.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводились в лаборатории генетики и микробиологии Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства. Объектами исследований служили моноаскоспоровые изоляты *V. inaequalis*, выделенные в 2015 году в трёх промышленных насаждениях яблони, два из которых располагались в Краснодарском крае – ОПХ «Центральное» (Краснодар), ОАО «Агроном» (Динской р-он) и в республике Адыгея – КХ «Мускат» (ст. Абадзехская).

Выделение возбудителя в чистую культуру осуществляли из его аскоспоровой стадии по оригинальной методике [14]. Согласно методике, отбор аскоспор осуществляли с листового опада с созревшими перитециями с помощью «ловчих» стекол, представляющих собой предметные стекла, смазанные с одной из сторон вазелином. «Ловчие» стекла в стерильных условиях помещали на стеклянных палочках над продезинфицированным листом опада в условиях влажной камеры (чашка Петри с увлажнённой фильтровальной бумагой) на сутки или двое. После с «вазелиновой» поверхности предметных стекол препаративной иглой, под контролем стереомикроскопа, отбирали отдельные аскоспоры, или микробиологической петлей – вазелин с инокулюмом спор и делали посев на яблочную или картофельно-глюкозную агаровую среду.

В случае посева инокулюмом спор, для выделения моноспоровых штаммов, после появления видимых признаков чистой культуры производили отсев отдельно стоящих колоний на свежую питательную среду. Полученные культуры парши яблони хранили в пробирках с косым яблочным агаром (косяках) в течение 1-2 месяцев, с последующим пересевом на новую среду.

Анализируемые чистые культуры получали на картофельно-глюкозном агаре следующего состава: 100 г картофеля (отвар), 20 г глюкозы, 15-20 г агар-агара на 1 л воды [15]. Оценку морфолого-культуральных характеристик осуществляли на 30 сутки инкубации при 20°C. Оценивали следующие характеристики изолятов: размер, особенности края колонии (рисунок, рыхлость), её форма, профиль и цвет, характер и плотность мицелия, наличие/отсутствие центрального бугорка, соотношение воздушного и субстратного мицелия по краю колонии, относительную степень спороношения.

В основном признаки оценивали визуально, при определении спороношения осуществляли микроскопирование препарата мицелия из края колонии в раздавленной капле воды при 200 и 400-кратном увеличении.

**Обсуждение результатов.** Морфологическое разнообразие изолятов выражалось более вертикальным или горизонтальным ростом колонии (профилем), воздушным или войлочным типом мицелия, наличием или отсутствием центрального бугорка, характером края и др. Одним из самых переменных признаков был размер (диаметр) колоний, который изменялся в широком диапазоне – от 5 до 30 мм. Известно, что размер колонии чистой культуры микроскопических грибов, кроме свойств самого изолята, зависит от состава используемой питательной среды и условий его выращивания.

На картофельно-глюкозном агаре при температуре выращивания 18°C нами были получены изоляты серо-зелёного цвета и размером около 30 мм (на 30 сутки роста), что соответствует характеристикам полученных штаммов по результатам исследований В.С. Комардиной [8] на среде того же состава. Ею было изучено влияние некоторых питательных сред (яблочного, картофельного, картофельно-глюкозного агара и среды Чапека) на основные морфолого-культуральные свойства (цвет, размер, спороношение колонии и характер её края) чистой культуры *V. inaequalis*. Другие исследователи сообщают о получении на картофельно-глюкозном агаре колоний парши яблони размером от 8 до 40 мм [10].

Всего было выделено 40 различных моноаскоспоровых изолятов (название каждого из них начинается с первой буквы названия сорта и порядкового номера выделения), которые по совокупности морфолого-культуральных признаков были сгруппированы в 10 морфотипов (рис.).

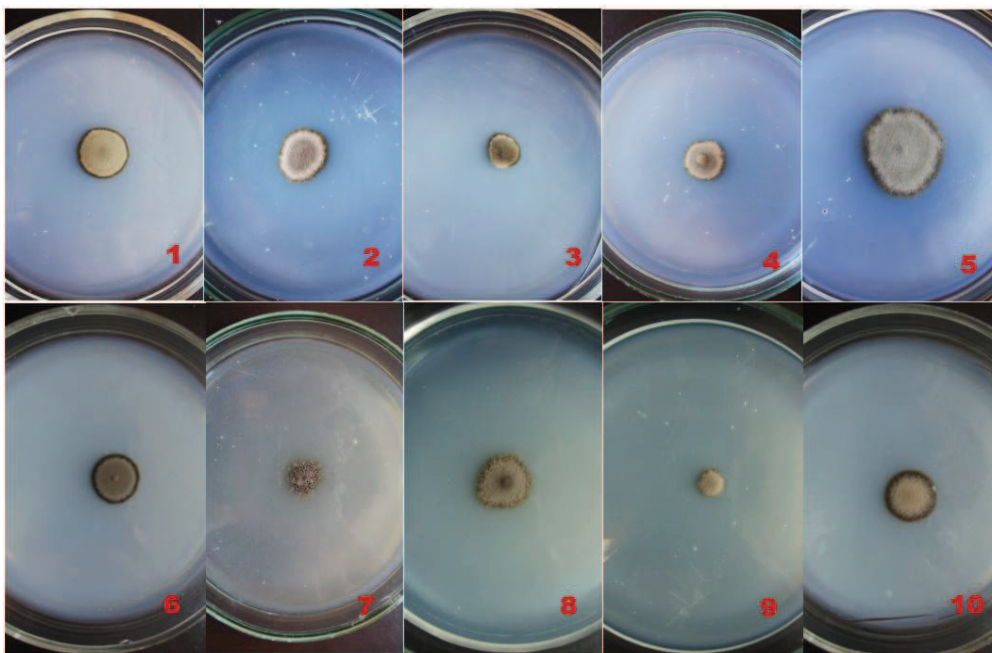


Рис. Типичные моноаскоспоровые изоляты для 10 полученных морфотипов *Venturia inaequalis*

Ниже представлено описание характеристик каждого из морфотипов.

**Морфотип 1.** Колония плоская или приподнятая, круглая с четким краем, мицелий плотный – войлочный, светло-зеленовато-серого цвета, центральный бугорок не выражен, размер 16-20 мм, спороношение отсутствует. Представлен 7 изолятами: Г3, Г4, Г6, Г8, Г9, Де1 (с сортов Гала и Делишес).

**Морфотип 2.** Колония приподнятая, круглая или неправильной формы, мицелий плотный – войлочный, по краю слабо пушистый, цвет неоднородный: темно-серый в центре, по краю светло-серый; размер 7-16 мм, спороношение не выявлено. Представлен 8 изолятами: Г10, ГД6, Гло4, Де2, Ч1, Ч2, Ч3, Ч8 (с сортов Гала, Голден Делишес, Глостер и Чемпион).

**Морфотип 3.** Колония выпуклая (бугорчатая), неправильной формы, край четкий, мицелий плотный – шерстистый (типичный вид – «мех мыши»), гифы толстые игловидные, вертикально торчащие, светло-зеленовато-серого цвета, размер 5-8 мм (маленькие),

спор нет. Морфотип 3 представлен двумя очень сходными изолятами: РС3, Ч5 (с сортов яблони Ренет Симиренко и Чемпион).

**Морфотип 4.** Колония приподнятая, конусовидная, круглая, мицелий плотный – шерстистый, гифы толстые горизонтальные, край темный рыхлый, центральный бугорок хорошо выражен, крупный (40% от размера колонии), размер около 12 мм, спороношение отсутствует. Представлен 2 изолятами: Ж2 и РС4 (с сортов Женева Эрли и Ренет Симиренко).

**Морфотип 5.** Колония плоская, круглая или неправильной формы, мицелий плотный – войлочный, край темный рыхлый, центральный бугорок выражен, маленький (5% от размера колонии), цвет однородный светло-зеленовато-серый, размер 22-25 мм (крупные). Представлен 2 изолятами: Ж3 и Ж4 (с сорта Женева Эрли).

**Морфотип 6.** Колония плоская, круглая, мицелий плотный – бархатистый, край темный рыхлый, центральный бугорок выражен (до 10% размера колонии), размер 15-22 мм, спороношение слабое. Представлен 2 штаммами: Г5и Ч6 (с сортов Гала и Чемпион).

**Морфотип 7.** Колония плоская, неправильной формы, мицелий рыхлый – ноздреватый, по краю – ризоидный, край рыхлый, субстратный мицелий превалирует над воздушным, центральный бугорок выражен (до 10 % от размера колонии), размер 12 мм, спороношения нет. Представлен штаммом – ГД8 (с сорта Голден Делишес).

**Морфотип 8.** Колония приподнятая, круглая, мицелий плотный – войлочный, край четкий рыхлый слабо пушистый, цвет неоднородный: центральный бугорок или середина темная, основная часть – тепло-серая, центральный бугорок есть или отсутствует, размер около 13 мм, спороношение отсутствует или слабое. Представлен 2 изолятами: ГД5 и РС1 (с сортов Голден Делишес и Ренет Симиренко).

**Морфотип 9.** Колония бугорчатая, круглая, мицелий плотный – пушистый, край плотный с развитым воздушным мицелием, воздушный мицелий преобладает над субстратным, гифы толстые средневетвящиеся, цвет светло-зеленовато-серый, размер 6 мм (маленькая), спороношение отсутствует. Представлен изолятом – РС1 (с сорта Ренет Симиренко).

**Морфотип 10.** Колония приподнятая, круглая, мицелий плотный – пушистый, воздушный мицелий развит, край темный рыхлый, слабопушистый, гифы воздушного мицелия по краю толстые, субстратный мицелий шире воздушного, цвет однородный темно-серый, центральный бугорок не выражен, размер 15 мм (средний), спороношение отсутствует. Представлен изолятом ГД2 (с сорта Голден Делишес).

**Выводы.** Проведенный анализ морфолого-культуральных признаков 40 моноаскоспорных изолятов, выделенных из трех садовых насаждений яблони, показал наличие широкой морфологической дифференциации, отражающей уровень внутривидовой разнообразия местной популяции *Venturiainaequalis*, возбудителя парши. В результате оценки многообразия полученных изолятов было сгруппировано в 10 морфотипов.

В заключение следует подчеркнуть, что изучение состава популяции патогена и динамики его изменчивости является основой селекции на иммунитет. При увеличивающемся прессинге фунгицидных обработок получение такой информации позволит сбалансировать применение искореняющих препаратов в фитосанитарной практике.

### Литература

1. Насонов, А.И. Парша яблони: особенности возбудителя и патогенеза / А.И. Насонов, И.И. Супрун // Микология и фитопатология. – 2015. – Т. 49. – Вып. 5. – С. 275–285.
2. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем плодовых и ягодных культур/ Под ред. В.А. Чулкиной и В.И. Усенко. – М.: Колос, 2006. – 240 с.
3. Федорова, Р.Н. Парша яблони / Р.Н. Федорова. – Л.: Колос, Ленингр. отд-ние, 1977. – 64 с.
4. Keitt, G.W. Heterothallism and variability in *Venturia Inaequalis* / G.W. Keitt, D.H. Palmer // *American Journal of Botany*. – 1938. – Vol. 25. – №. 5. – P. 338–345.
5. Keitt, G.W. *Venturia Inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies / G.W. Keitt, M. H. Langford // *American Journal of Botany*. – 1941. – Vol. 28. – №. 9. – P. 805–820.
6. Якуба, Г.В. Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений: Монография / Г.В. Якуба. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2013. – 213 с.
7. Tenzer, I. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe / I. Tenzer, C. Gessler // *European Journal of Plant Pathology*. – 1999. – Vol. 105. – №. 6. – С. 545-552.
8. Комардина, В.С. Особенности культурально-морфологических признаков возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Coock.) Wint. (конициальная стадия *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck.), выделенных из садов различных типов / В.С. Комардина // *Защита растений: сборник научных трудов / РУП "Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию", Республиканское научное дочернее унитарное предприятие "Институт защиты растений". – Минск, 2006. – Вып. 30, Ч. 2. – С. 121-129.*
9. Козловская, З.А. Внутривидовая неоднородность *Ventruia inaequalis* – возбудителя парши яблони / З.А. Козловская, Т.А. Гашенко // *Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2009. – № 4. – С. 97-100.
10. Барсукова, О. Н. Парша яблони в европейской части СССР / О. Н. Барсукова // *Микология и фитопатология*. – 1983. – Т. 17. – Вып. 5. – С. 395-403.
11. Kirkham, D.S. Relationships between cultural characters and pathogenicity in *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina* / D.S. Kirkham // *Microbiology*. – 1957. – V. 16. – №. 2. – P. 360 – 373.
12. Дорожкин, Н.А. Вирулентность штаммов возбудителя парши яблони / Н.А. Дорожкин, Л.В. Бондарь, Н.А. Коновалова // *Микология и фитопатология*. – 1979. – Т. 13. – Вып. 5. – С. 401-404.
13. Бондарь, Л.В. Сравнительное изучение популяций возбудителя парши яблони по морфологическим признакам / Л. В. Бондарь // *Защита растений (сборник науч. трудов)*. – Минск: Ураджай, 1988. – Вып. XIII. – С. 21–25.
14. Насонов, А.И. Получение аскоспоровой культуры гриба *Venturia inaequalis* в лабораторных условиях / А.И. Насонов, Г.В. Якуба, И.И. Супрун // *Микология и фитопатология*. – 2016. – Т. 50. – № 2. – С. 131-132.
15. Жданов, В.В. Селекция яблони на устойчивость к парше /В.В.Жданов, Е.Н.Седов. – Тула: Приок. кн. изд-во, 1991. – 208 с.