

УДК 632.4.01/.08 : 575.174.015.3 : 57.083.182
DOI: 10.25684/NBG.scbook.148.2019.11

ХАРАКТЕРИСТИКА И ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ КАЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ МОНОСПОРОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ ЯБЛОНИ

Андрей Иванович Насонов, Галина Валентиновна Якуба

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия
350901, Россия, г. Краснодар
e-mail: nasovan@mail.ru

Аннотация. Парша яблони является экономически значимым микозом основной семечковой садовой культуры региона. Изучение биологических и популяционных характеристик патогена является существенным условием для формирования обоснованной системы защиты яблоневого сада. Оценка популяционной структуры гриба может быть осуществлена с помощью фенотипического анализа его чистых культур. Преимуществом метода является его доступность и возможность исследования больших выборок. Эффективность такого подхода определяется использованием легко анализируемых и полиморфных качественных морфолого-культуральных признаков. **Цель.** Поиск и выделение признаков чистых культур патогена, пригодных для исследования его популяций. **Методы.** Исследования производили на моноспоровых изолятах *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, полученных из поражённых листьев прошлогодного опада (аскоспоровая стадия) с использованием оригинальной методики. На достигших месячного возраста чистых культурах оценивали различные качественные морфолого-культуральные признаки, среди которых находили такие, которые имели альтернативные варианты проявления. Присутствие одного варианта исключало наличие другого. **Результаты.** Были охарактеризованы показатели изолятов: форма, плотность воздушного мицелия, степень спороношения, окраска центра и его текстура. **Выводы.** В результате оценки 180 моноспоровых культур микромицета были выделены два перспективных для популяционных исследований патогена признака, относящиеся к характеристикам центра колоний.

Ключевые слова: *Venturia inaequalis*; морфолого-культуральные признаки; чистая культура; фенотипический анализ; альтернативные варианты признака, полиморфизм

Введение

Парша яблони является экономически значимым микозом основной семечковой садовой культуры региона. Возбудителем болезни является специализированный на одном растении-хозяине аскомицет *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, относящийся к классу *Dothideomycetes*. Поражение различных органов растения, в основном листьев и плодов, может достигать в периоды эпифитотий до 70-100 %. Вредоносность заболевания в последние годы возросла в связи изменениями климата [5].

Изучение биологических и популяционных характеристик патогена является одним из существенных условий для формирования обоснованной системы защиты яблоневого сада, заключающейся в эффективном регулировании численности агрессивных форм паразитического гриба. Многими исследователями отмечалось изменение популяционной структуры при различной степени развития болезни. С одной стороны, в периоды эпифитотий происходило увеличение внутривидового разнообразия патогена, а с другой возрастала доля его высокоагрессивных форм [1, 5]. Также отмечается изменение структуры популяции патогена в связи с появлением и распространением новых вирулентных рас [7, 8]. Оценка популяционной структуры микромицета может быть осуществлена с помощью фенотипического анализа его чистых культур. Преимуществом метода является его доступность и возможность исследования больших выборок. Эффективность такого подхода определяется использованием легко

анализируемых и полиморфных качественных морфолого-культуральных признаков, которые могут быть характеризованы термином «фен». Важным условием при поиске пригодных для популяционных исследований признаков (фенов), является их многовариантность и альтернативность проявления, когда присутствие одного варианта исключает наличие другого. Другим критическим моментом является отсутствие корреляции между используемыми в анализе признаками, т. е. их проявление должно быть независимым [4].

При морфологическом анализе чистых культур грибов часто используют макроскопические морфолого-культуральные характеристики: размер, форма, профиль, цвет воздушного мицелия и реверса, структура и цвет центра и края колонии, фактура мицелиальной дерновинки и другие особенности структуры. Среди микроскопических показателей можно отметить – степень спороношения. При фенотипическом анализе предпочтение отдаются неметрическим (качественным) либо имеющим дискретный характер признакам. К таким из выше перечисленных признаков можно отнести характеристики формы и профиля колонии, цвета, структуры и фактуры воздушного мицелия, а также степени спороношения. Спорношение изолята имеет как качественное проявление, когда признак может быть или отсутствовать, так количественный, отражающий степень его проявления [3]. Известно, что морфологические особенности спор и спороношения имеют важное таксономическое значение и характеризуется высокой консервативностью, однако колебания в пределах нормы реакции признака могут отражать и внутривидовое разнообразие, и микроэволюционные процессы. Так, группой французских учёных было показано увеличение размеров спор и степени спороношения в популяциях возбудителя парши яблони агроэкосистем в сравнении с дикими популяциями (на яблоне *Malus sieversii*) [6].

Цель исследования заключалась в поиске и характеристике качественных признаков (фенов) чистых культур возбудителя заболевания *Venturia inaequalis*, пригодных для популяционных исследований гриба. Для выполнения цели был поставлен ряд задач: выделение моноспоровых изолятов патогена, изучение комплекса морфолого-культуральных признаков, выявление и характеристика их отдельных элементов, оценка качественности и вариативности проявления признаков, анализ их воспроизводимости и полиморфности на контрольной выборке гриба.

Объекты и методы исследования

Исследования проведены в лабораториях генетики и микробиологии, и защиты плодовых и ягодных культур в 2016-2017 гг. Объектами исследований являлись моноспоровые изоляты патогенного микромицета *V. inaequalis*. Чистые культуры гриба получали из листового опада яблони, содержащего его плодовые тела (перитеции) с использованием оригинальной методики [2]. Образцы перезимовавших поражённых листьев прошлого года собирали в весенний период в промышленных насаждениях яблони. Моноспоровые изоляты выращивали на картофельно-глюкозной агаризованной питательной среде на чашках Петри при 20°C в темноте в течение месяца. По окончании инкубации оценивали следующие морфолого-культуральные характеристики изолятов: размер, особенности структуры мицелиальной дерновинки, цвет, характер и степень спороношения [3]. Анализ спороношения проводили микроскопированием препаратов «раздавленная капля» воздушного и субстратного мицелиев в трехкратной повторности при увеличении 200х. Оценка чистых культур проводилась в одинаковых условиях на 30-й день инкубации и только на изолятах полученных от моноспорового посева. При соблюдении этих условий колонии характеризовались наибольшим разнообразием признаков, которые теряли свою

чёткость при более длительной инкубации (старые культуры) и при пересевах кусочком колонии. Подсчёт частоты проявления вариантов признака осуществляли с помощью статистического пакета программы Excel. Для оценки взаимозависимости между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, рассчитанный автоматически с помощью статистического калькулятора интернет-ресурса <https://www.psychol-ok.ru/statistics/spearman/>.

Результаты и обсуждения

В процессе работы были оценены морфолого-культуральные характеристики 180 моноспоровых изолятов *V. inaequalis*, многие из которых характеризовались высокой вариативностью.

Размер чистых культур варьировал от 5 до 26 мм и характеризовался непрерывным рядом величин, что типично для количественных признаков. Было выделено 23 фенотипа с шагом различий в размере изолятов в 1 мм. На рисунке 1 представлена частота встречаемости фенотипов, которая примерно имеет нормальное распределение.

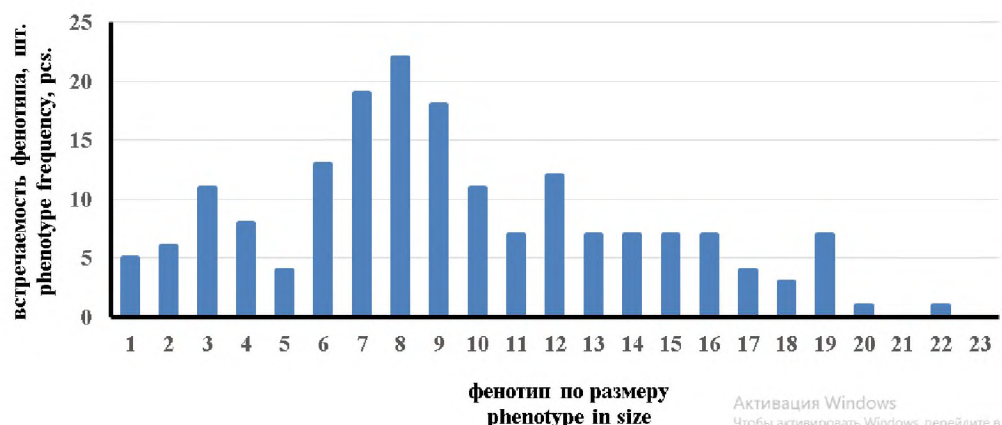


Рис. 1 – Встречаемость фенотипов изолятов *V. inaequalis*, различающихся размером
Fig. 1 – The frequency of phenotypes of *V. inaequalis* isolates with different sizes

Спороношение имело несколько вариантов признака: 1 – отсутствие; 2 – слабое (редкие единичные конидии, одна-три, редко группа конидий в одном поле зрения); 3 – среднее (на субстратном мицелии не частые мутовки из 3-5 конидий, до 100 шт. в одном поле зрения); 4 – сильное (на субстратном мицелии частые мутовки из 4-7 конидий, свыше 100 шт. в одном поле зрения). На рисунке 2 (сплошная линия) представлена частота фенотипов, различающихся уровнем спороношения: наиболее распространённым был вариант со слабым проявлением признака, за ним следует сильноспороносящий фенотип. Стерильные и среднеспороносящие фенотипы имели близкую встречаемость и наиболее низкую среди всех вариантов проявления признака.

Изучение фактуры воздушного мицелия, характеризующейся с одной стороны разной степенью плотности/рыхлости его дерновинки, с другой – характером поверхности плотного варианта мицелия, позволило выделить шесть фенов: 1 – очень рыхлый, 2 – рыхлый, 3 – плотный войлочный, 4 – плотный бархатистый, 5 – плотный шерстистый, 6 – плотный пушистый. Этот признак оказался достаточно полиморфным. Наибольшая частота была характерна для фенов плотного войлочного и бархатистого воздушного мицелия, которая составила 0,33 (рис. 2, пункт). Реже встречался фен рыхлого мицелия. Уникальным оказался фен шерстистой фактуры воздушного

мицелия, который был найден только у одного изолята из 180. Необходимо отметить, что признак фактуры имеет и некоторые количественные переходы по характеру плотности мицелия, которые определяются особенностью структуры мицелиальной дерновинки, в свою очередь обусловленные механизмом радиального роста грибной колонии.

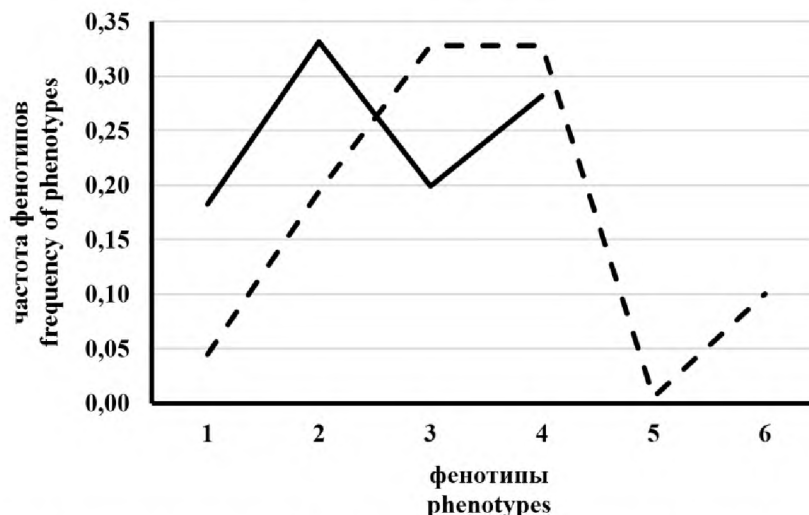


Рис. 2 – Частота фенотипов изолятов *V. inaequalis*, различающихся степенью спороношения и фактурой воздушного мицелия

Примечание: сплошная линия – фенотипы по степени спороношения; пунктирная – по фактуре воздушного мицелия

Fig. 2 - The frequency of phenotypes of isolates of *V. inaequalis* differing in the degree of sporulation and by the texture of aerial mycelium

Note: solid line - phenotypes according to the degree of sporulation; dashed line - according to the texture of aerial mycelium

Чаще всего в центре колония имела более плотную дерновинку, чем по краю колонии. Таким образом, признак часто представлен переходными формами с различной долей соотношения плотного мицелия в центре и рыхлого по краю. Крайними вариантами фактуры воздушного мицелия изолятов были полностью плотные или рыхлые культуры. В текущем исследовании плотный мицелий принимался имеющимся в наличии при любом его соотношении с рыхлым. Фен рыхлый мицелий выделялся только при полном проявлении этого признака в изолята и отсутствии плотного. Фены рыхлый и очень рыхлый различались степень развития воздушного мицелия.

Изучение структуры изолята позволило выделить такой важный диагностический признак, бугорок, расположенный в центре колонии. Наличие этого структурного элемента обусловлено в основном методическими особенностями получения моноспоровых изолятов патогенного гриба, когда перенос единичной проросшей споры на свежую питательную среду производится на агаровом блоке. Характер обрастания агарового блока, который оказывается в центре растущей колонии, формирует особенности и варианты этого признака. Так, были отмечены вариации в его окраске, в сравнении с окраской основного мицелия, и гетерогенность в степени плотности воздушного мицелия. Как видно на таблице 1, по признаку цвета центрального бугорка (ЦЦБ) было выделено 6 легко идентифицируемых вариантов (фенов), по признаку рыхлости центрального бугорка (РЦБ) – 5.

Анализ встречаемости фенов цвета центрального бугорка, показал, что преобладающим был вариант ЦЦБ1, при котором цвет бугорка не отличался от цвета

основного мицелия (рис. 3, сплошная линия). Остальные фены были на уровне редких или уникальных.

Таблица 1

Характеристика вариантов признака центрального бугорка по окраске и фактуре

Table 1

Characteristic options for the feature of the central tubercle in color and texture

Обозначение варианта Option designation	Характеристика Characteristic
Цвет центрального бугорка (ЦЦБ)/ Color central tubercle (CCB)	
ЦЦБ1/ CCB1	цвет как у основного мицелия/ color is like the main mycelium
ЦЦБ2/ CCB2	отличается: спелая антоновка/ CB different color: ripe antonovka
ЦЦБ3/ CCB3	белый или светлее ЦЦБ2/ white or lighter than CCB2
ЦЦБ4/ CCB4	более темный/ darker
ЦЦБ5/ CCB5	серо-жёлтый, ЦЦБ2+серый/ gray-yellow, CCB2 + gray
ЦЦБ6/ CCB6	бледно-лиловый/ pale lilac
Рыхлость центрального бугорка (РЦБ)/ Looseness of the central tubercle (RCB)	
РЦБ1/ RCB1	плотный бархатистый; форма округлая/ dense velvety; the shape rounded
РЦБ2/ RCB2	плотный войлочный; мицелий повторяет форму посевного блока/ thick felt; mycelium repeats the shape of the sowing unit
РЦБ3/ RCB3	плотный с редкими пустотами/ tight with rare voids
РЦБ4/ RCB4	рыхлый субаэральный с крупными пустотами/ loose subaerial with large voids
РЦБ5/ RCB5	рыхлый пушистый/ loose fluffy

Частота фенотипов по признаку фактуры (рыхлости) центрального бугорка была представлена в выборке более выровнено. Наиболее встречаемым был фен РЦБ2, характеризующийся плотной войлочной структурой, образованной субаэральным мицелием, повторяющим форму посевного блока агара (рис. 3, пунктирная линия).

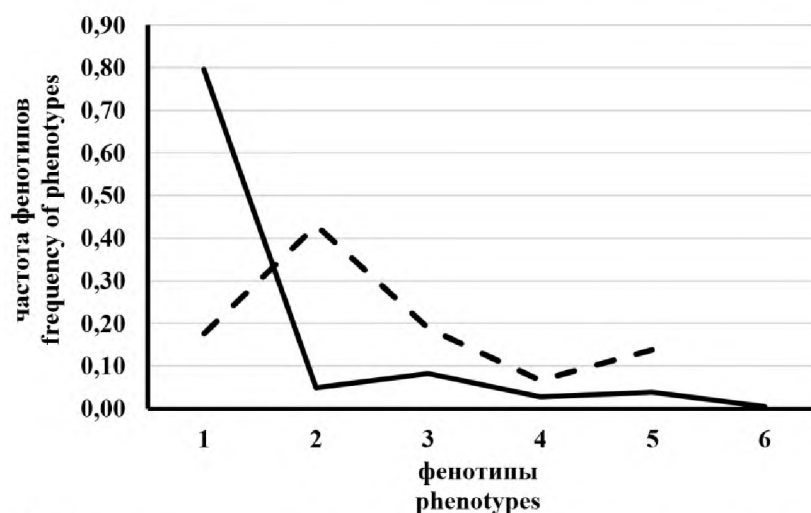


Рис. 3 – Частота фенотипов изолятов *V. inaequalis*, различающихся цветом и фактурой центрального бугорка

Примечание: сплошная линия – признак цвета; пунктирная – фактуры центрального бугорка

Fig. 3 - The frequency of phenotypes of isolates of *V. inaequalis*, differing in color and texture of the central tubercle

Note: the solid line is a sign of the color of the central tubercle; dotted line - textures

Оценка корреляции между изученными признаками, показала высокую взаимозависимость многих из них (табл. 2). Так, чем больше был размер изолята, тем выше была плотность мицелия и окрашенность центрального бугорка. При этом

уровень спороношения и фактура центрального бугорка имели обратную зависимость с размером чистых культур патогена.

Таблица 1

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между парами изученных фенотипических признаков

Table 1

Spearman's rank correlation coefficient between pairs of studied phenotypic traits

	Размер изолята/ isolate size	Плотность мицелия/ mycelium density	Цвет центрального бугорка/ color of the central tubercle	Фактура центрального бугорка/ texture of the central tubercle
Плотность мицелия/ mycelium density	0.444**			
Цвет центрального бугорка/ color of the central tubercle	0.365**	0.241*		
Фактура центрального бугорка/ texture of the central tubercle	-0.254*	0.244*	0.131	
Уровень спороношения/ sporulation level	-0.242*	-0.352**	0.231**	0.082

Примечание: * - корреляция значима на уровне $p \leq 0,05$; ** - корреляция значима на уровне $p \leq 0,01$.

Наиболее независимым признаком оказалась фактура (рыхлость) центрального бугорка. Для пар признаков фактура центрального бугорка / цвет центрального бугорка, а также фактура центрального бугорка / уровень спороношения изолятов гипотеза о существовании коррелятивной связи отвергается.

Выводы

Анализ 5 морфолого-культуральных признаков моноспоровых изолятов возбудителя парши яблони позволил оценить их дискретность и качественность, а также уровень вариативности. За исключением размера чистых культур, все признаки были альтернативными и легко выделяемыми. Полиморфность изученных фенетических комплексов колебалась от 4 фенотипов (для уровня спороношения) до 5-6 для вариантов центрального бугорка колоний и плотности основного мицелия. Оценка на независимость признаков показала высокую коррелятивную связь между большинством признаков. Только признак фактуры центрального бугорка был независим для характеристик уровня спороношения и цвета центрального бугорка. Таким образом, для фенотипического анализа популяционной структуры *Venturia inaequalis* можно рекомендовать использование признаков центрального бугорка, характеризующихся альтернативностью, вариативностью и независимым проявлением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дорожкин Н.А., Бондарь Л.В., Коновалова Н.А. Вирулентность штаммов возбудителя парши яблони // Микология и фитопатология. 1979. Т. 13. Вып. 5. С. 401–404.
2. Насонов А.И., Якуба Г.В., Супрун И.И. Получение аскоспоровой культуры гриба *Venturia inaequalis* в лабораторных условиях // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50, №. 2. С. 130–131.
3. Пантелеймонова Т.И. Опыт фенетического изучения мицелиальных грибов (на примере *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) // Фенетика природных популяций. М.: Наука, 1988. С. 100–111.

4. Яблоков А.В., Ларина Н.И. Введение в фенетику популяций. Новый подход к изучению природных популяций. М.: Высшая школа, 1985. 159 с.
5. Якуба Г.В. Основные способы антропогенного управления микопатосистемами яблони в условиях фитосанитарной дестабилизации // Научные труды СКЗНИИСиВ, Т. 7. Краснодар: ФГБНУ СКЗНИИСиВ, 2015. С. 178-184.
6. De Gracia M., Cascales M., Expert P., Bellanger M. N., Le Cam B., Lemaire C. How did host domestication modify life history traits of its pathogens? // PloS one. 2015. Vol. 10 (6). P. e0122909. DOI: 10.1371/journal.pone.0122909.
7. Lemaire C., De Gracia M., Leroy T., Michalecka M., Lindhard-Pedersen H., Guérin F., Gladieux P., Le Cam B. Emergence of new virulent populations of apple scab from nonagricultural disease reservoirs. *New Phytol.* 2016. 209(3). P. 1220–1229. DOI: 10.1111/nph.13658.
8. Michalecka M., Masny S., Leroy T., Pulawska J. Population structure of *Venturia inaequalis*, a causal agent of apple scab, in response to heterogeneous apple tree cultivation // *BMC evolutionary biology*. 2018. Vol. 18 (1). P. 5. DOI: 10.1186/s12862-018-1122-4.

REFERENCES

1. Dorozhkin N.A., Bondar L.V, Kononova N.A. The virulence of the strains of the causative agent of apple scab. *Mycology and Phytopathology*. 1979. 13 (5): 401-404 [In Russian].
2. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Suprun I.I. Obtaining ascospore culture of the fungus *Venturia inaequalis* under laboratory conditions. *Mycology and Phytopathology*. 2016. 50 (2): 130–131 [In Russian].
3. Panteleymonova T.I. The experience of the phenetic study of mycelial fungi (by the example of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.). *Phenetics of natural populations*. Moscow: Nauka, 1988: 100–111 [In Russian].
4. Yablokov A.V., Larina N.I. Introduction to the phenetics of populations. A new approach to the study of natural populations. М.: Vysshaya shkola, 1985. 159 p. [In Russian].
5. Yakuba G.V. The main methods of anthropogenic management of apple mycopathic systems in terms of phytosanitary destabilization. *Nauchnye trudy SKZNIISiV, Vol. 7*. Krasnodar: FSN SKZNIIS, 2015: 178-184 [In Russian].
6. De Gracia M., Cascales M., Expert P., Bellanger M. N., Le Cam B., Lemaire C. How did host domestication modify life history traits of its pathogens? *PloS one*. 2015. Vol. 10 (6). e0122909. DOI: 10.1371/journal.pone.0122909.
7. Lemaire C., De Gracia M., Leroy T., Michalecka M., Lindhard-Pedersen H., Guérin F., Gladieux P., Le Cam B. Emergence of new virulent populations of apple scab from nonagricultural disease reservoirs. *New Phytol.* 2016. 209 (3): 1220–1229. DOI: 10.1111/nph.13658.
8. Michalecka M., Masny S., Leroy T., Pulawska J. Population structure of *Venturia inaequalis*, a causal agent of apple scab, in response to heterogeneous apple tree cultivation. *BMC evolutionary biology*. 2018. 18 (1). P. 5. DOI: 10.1186/s12862-018-1122-4.

Nasonov A.I., Yakuba G.V. Characteristics and polymorphism of certain qualitative signs of monosporius isolates of the apple scab pathogen // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2019. – Vol.148. – P. 109-116

Abstract. Apple scab is an economically significant mycosis of the main seed garden crop of the region. The study of the biological and population characteristics of the pathogen is an essential condition for the formation of reasonable protection system for apple orchards. Assessment of the fungus population structure can be carried out using phenotypic analysis of its pure cultures. The advantage of the method is its availability and the ability to study large samples. The effectiveness of this approach is determined by the use of easily analyzed and polymorphic qualitative morphological and cultural signs. **Aim.** Search and selection of signs of pure

cultures of the pathogen, suitable for the study of its populations. **Methods.** The studies were performed on *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter monosporic isolates obtained from the diseased leaves of last year's litter (ascospore stage) using the original technique. At the pure cultures reached one month of age, various qualitative morphological and cultural characteristics were evaluated, among which were found those that had alternative variant of appearance. The presence of one variant excluded the presence of another. **Results.** Characteristics of the isolates were characterized: the form, the density of the aerial mycelium, the degree of sporulation, the center color and its texture. **Main conclusions.** As a result of the evaluation of 180 monosporic micromycete cultures, two perspective variant for population research of the pathogen, related to the characteristics of the colonies' center, were identified.

Key words: *Venturia inaequalis*; morphological and cultural signs; pure culture; phenotypic analysis; alternative variants of sign, polymorphism