

ВЫДЕЛЕНИЕ ДИСКРЕТНЫХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ *VENTURIA INAEQUALIS*, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ ВАРИАТИВНОСТЬЮ

Насонов А.И., канд. биол. наук, Якуба Г.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)

Реферат. Один из рисков получения некачественных плодов яблони – развитие парши, возбудителем которой является гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Знание закономерностей формирования популяционной структуры патогена важно для его эффективного контроля. Оценка уровня внутривидовой изменчивости парши может проводиться на основе изучения вариативности признаков ее моноспоровых изолятов. Актуальность работы обусловлена отсутствием информации о культуральных признаках патогена, пригодных для популяционных исследований и характеризующихся качественным альтернативным проявлением. В работе проведен поиск дискретных культуральных признаков, характеризующихся вариативностью. На 250 изолятах *V. inaequalis* проанализировано 4 признака: цвет и фактура у основного воздушного мицелия и у центрального бугорка. Комплекс признаков, связанных с центральным бугорком чистой культуры, позволил четко дифференцировать популяцию патогена на несколько морфотипов, и может быть рекомендован для оценки его внутривидовой неоднородности.

Ключевые слова: парша яблони, изолят, морфотип, культуральные признаки, воздушный мицелий, изменчивость

Summary. One of the risks of obtaining the low-quality apple fruits is the development of scab, the causative agent of which is the fungus *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Knowledge of conformity to natural laws of the population structure of the pathogen formation is important for its effective control. Assessment of the level of scab intra-population variability can be carried out on the basis of studying the variability of signs of its monosporous isolates. The relevance of the work is due to the lack of information about the cultural characteristics of the pathogen that are suitable for population studies and are characterized by a qualitative alternative manifestation. In the paper the search is carried out for discrete cultural features characterized by variability. 4 characteristics were analyzed on 250 *V. inaequalis* isolates: color and texture of the main air mycelium and the central tubercle. The complex of features associated with the central tubercle of a pure culture made it possible to clearly differentiate the pathogen population into several morphotypes and can be recommended for evaluating its intraspecific heterogeneity.

Key words: apple scab, isolate, morphotype, cultural characteristics, aerial mycelium, variability

Введение. Среди плодовых культур в умеренной климатической зоне яблоня имеет преобладающее значение как по площади возделывания, так и по производству продукции. Существенную проблему для получения качественных плодов представляют грибные заболевания. Парша яблони, вызываемая специализированным паразитом этой культуры, *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, является наиболее значимой из них.

Понимание закономерностей формирования популяционной структуры патогена и её динамики является важным информационным блоком при составлении программ регуляции численности вредного организма на уровне, не превышающем его экономической значимости. Исследования, проведенные ранее, показывают изменение структуры популяции парши яблони как в зависимости от интенсивности развития инфекции и погодных

условий, так и от генетических особенностей растения хозяина [1-3]. В периоды эпифитотийного развития заболевания отмечалось возрастание популяционного разнообразия, а также доли агрессивных генотипов патогена.

Популяционные исследования возбудителя парши яблони проводятся с использованием различных методических подходов, таких как морфологический, иммунологический и молекулярно-генетический [3-6]. При этом молекулярно-генетический метод требует специального оборудования и синтеза специфических праймерных последовательностей, иммунологический – исчерпывающего набора актуальных растений-дифференциаторов рас патогена и проведения искусственного заражения, в то время как морфологический позволяет изучать изменчивость в популяциях, имея только чистые культуры патогена.

Последний метод позволяет проводить исследования на больших выборках изолятов и может использоваться в качестве как основного, так и вспомогательного. Однако успешность применения такого подхода определяется подбором легко читаемых морфолого-культуральных признаков изолятов, характеризующихся несколькими вариантами проявления. Варианты признака должны быть хорошо отличимыми друг от друга, то есть дискретными или качественными, без постепенных переходов между ними. Наличие одного варианта исключает присутствие другого [7].

Часто при морфолого-культуральном анализе микроорганизмов оцениваются такие показатели, как диаметр культуры, её высота, количество спор или спорулирующих структур. Однако эти признаки имеют количественный характер проявления, поэтому для популяционных исследований неудобны. Среди качественных характеристик можно отметить: форму колонии, её профиль, плотность и цвет воздушного и субстратного мицелия, различные особенности края культуры или её центра. Морфолого-культуральные признаки при оценке внутривидовой неоднородности популяции *V. inaequalis* были использованы в работах ряда исследователей [8-11].

В работах некоторых исследователей изучалась внутривидовая гетерогенность возбудителя парши яблони на основе оценки полиморфизма его морфолого-культуральных характеристик. Так, Кирхем выделил четыре основных морфотипа патогена в зависимости от варьирования характера воздушного мицелия, который мог быть прижатым к субстрату и растущим над ним или вертикально ему, а также уровня спороношения культуры [10].

Сходной была классификация изолятов и у О.Н. Барсуковой, которая на выборке из 541 моноспоровой культуры также выделила 4 группы изолятов, различавшихся по комплексу таких морфолого-культуральных характеристик, как размер, форма, характер воздушного мицелия, цвет и уровень спороношения. При описании второй группы она отмечает как диагностический признак особенности центрального бугорка культуры. Также эта работа отличается тем, что большая часть изученной выборки относилась к Северо-Кавказской популяции патогена, и была отмечена взаимосвязь его морфолого-культуральных характеристик с экологическими особенностями места отбора [11].

В исследованиях В.С. Комардиной изоляты *V. inaequalis* были разделены по фактуре воздушного мицелия на 4 типа: со слабо-пушистым, шерстистым, войлочным и войлочным с концентрическими кругами мицелиями [8]. В ранее выполненных нами работах по оценке неоднородности популяций патогена по комплексу культуральных признаков было выделено 30 морфотипов [4].

Таким образом, анализ научной литературы показал, что для изучения изолятов парши не были предложены культуральные признаки, характеризующиеся качественным альтернативным проявлением, пригодные для популяционных исследований патогена. Целью нашего исследования было выявление дискретных структурных элементов чистой культуры *V. inaequalis*, проявляющих качественную изменчивость.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов СКФНЦСВВ согласно государственному заданию № 0498-2019-0002.3. Объектами исследования служили изоляты *V. inaequalis*, полученные посевом одной спорой по оригинальной методике [12].

Источниками спор патогена для посева служили прошлогодний опад листьев яблони с созревшими плодовыми телами возбудителя и свежие листья с характерными для парши симптомами поражения. Листовой материал собирали в производственных насаждениях различных восприимчивых сортов яблони в 2017-2019 гг. от начала разлёта аскоспор парши и в течение всего вегетационного периода растения-хозяина. Отбор образцов осуществляли рендомизированно.

Изоляты получали и выращивали на картофельно-глюкозном агаре при 20 °С в темноте в течение тридцати дней. По окончании этого периода производили оценку культуральных характеристик. Предварительно каждый изолят фотографировали при дневном свете на цифровую камеру Canon Ixus 175. Важным условием эксперимента являлась оценка культуры, полученной только посевом одной спорой, даже если производился пересев моноспоровой культуры с хранения, так как свойства изолятов, посеянных спорами или кусочком мицелиальной массы, могли различаться.

При анализе изолятов учитывались следующие структурные элементы культуры: центр и край, воздушный и субстратный мицелии – их плотность, зональность, цвет и соотношение друг с другом. Оценивались только макроскопические характеристики колоний как непосредственно культур, так и их качественных фотографий, полученных при одинаковых условиях освещённости. При оценке цвета мицелия или структурных элементов изолята использовали специальные и общедоступные цветовые шкалы [13-14]. Анализ цифровых изображений чистых культур микромицета проводили с использованием программного пакета Microsoft Office.

Обсуждение результатов. В результате работы были изучены культуральные характеристики 250 моноспоровых изолятов *V. inaequalis*. Была выявлена широкая вариативность некоторых признаков. Оценка культуральных характеристик воздушного мицелия показала его изменчивость по цвету и фактуре. Цвет изолятов изменялся от светло- до тёмно-серого с теплыми или холодными оттенками. Варианты окраски чистой культуры патогена были многочисленными. В некоторых случаях отмечалось наличие нескольких цветов и цветовая зональность. В большинстве гетерогенных по цвету культур ближайшая к краю часть мицелия была светлее, чем центральная. В результате анализа было выделено до 38 морфотипов по цвету.

Известно, что основным фактором, определяющим цвет культуры гриба, является уровень синтеза пигмента меланина, играющего важную роль в его жизнедеятельности и патогенных свойствах [16, 17]. В результате наших исследований отмечено, что на оттенки окраса колоний может влиять также характер структуры мицелия, его плотность. Таким образом, показано, что высокая степень субъективизма при оценке цветовых различий, определяемая индивидуальными способностями восприятия исследователем цветовых нюансов, не позволяет, как нам представляется, получать воспроизводимые результаты с использованием признака «цвет воздушного мицелия». Кроме этого, при оценке цвета по цифровым снимкам необходимо учитывать, что его характер зависит от условий фотографирования.

Структура или фактура воздушного мицелия определяется характером и степенью его развития и особенностями роста и ветвления составляющих его гиф. По плотности воздушного мицелия выделили три основных варианта: со слабо развитым (рис. 1.1), рыхлым (рис. 1.2) и плотным мицелием (рис. 1.3-1.6). При этом плотный мицелий в зависимости от характера ветвления и длины гиф отличался различной фактурой, которая могла быть войлочной (рис. 1.3), бархатистой (рис. 1.4), шерстистой (рис. 1.5) и пушистой (рис. 1.6).



Рис. 1. Морфотипы изолятов возбудителя парши яблони по фактуре воздушного мицелия
Условные обозначения: 1 – слаборазвитый; 2 – рыхлый; 3 – плотный войлочный;
4 – плотный бархатистый; 5 – плотный шерстистый; 6 – плотный пушистый.

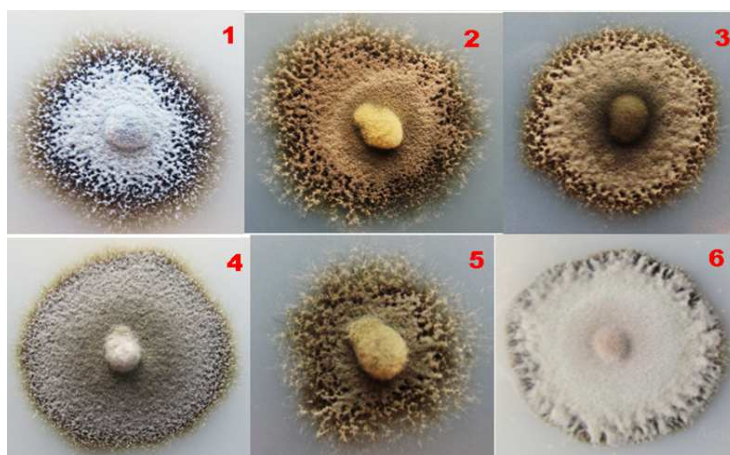


Рис. 2. Морфотипы изолятов возбудителя парши яблони по цвету центрального бугорка
Условные обозначения: цвет центрального бугорка относительно основного мицелия:
1 – такой же, как у основного мицелия; 2 – «спелая антоновка»; 3 – темнее;
4 – белый или светлее; 5 – серо-желтый; 6 – бледно-лиловый.

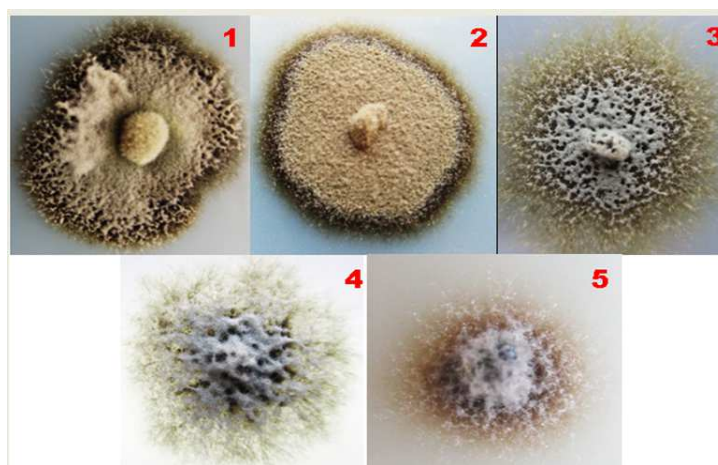


Рис. 3. Морфотипы изолятов возбудителя парши яблони по рыхлости центрального бугорка
Условные обозначения: рыхлость центрального бугорка: 1 – плотный бархатистый;
2 – плотный войлочный; 3 – плотный с редкими пустотами; 4 – крупные или частые пустоты;
5 – рыхлый пушистый.

Войлочный мицелий характеризовался средними показателями длины и ветвления гиф. Бархатистый мицелий имел короткие и частоветвящиеся гифы, формирующие тонкую и ровную структуру мицелия. Шерстистый мицелий имел длинные и слабоветвящиеся гифы, образуя мицелий с практически вертикально растущими нитями. Пушистый мицелий формировал длинные гифы со средним уровнем ветвления.

Необходимо отметить, что если по фактуре плотного мицелия различия между морфотипами были чёткими, то по степени его рыхлости возникали переходные формы. Часто культура имела оба варианта мицелия, при этом по краю мицелий был более рыхлым, чем в центре. Такая структура обусловлена радиальным характером роста любой грибницы, при которой периферическая часть является более молодой, а поэтому ещё не набравшей массу мицелия. Доля рыхлого мицелия могла составлять четверть, половину или даже треть чистой культуры.

Таким образом, этот признак имел полуколичественное проявление. Для того чтобы такие варианты признака имели качественную характеристику, их ранжировали: колонию считали рыхлой, если доля рыхлого воздушного мицелия составляла более половины культуры, и, напротив, колонию считали плотной, если доля рыхлого воздушного мицелия была менее половины культуры. Визуально рыхлость мицелия проявлялась также по-разному. Так, рыхлый мицелий мог быть ноздреватым, когда он рос пучками гиф, разделёнными пустотами, и паутинистым, представленным отдельными редкими длинными гифами, растущими по субстрату или над ним.

Другим интересным структурным элементом культуры оказался центральный бугорок (ЦБ), который представляет собой обросший мицелием посевной блок. Посевной блок является кусочком водного агара (2 %), на котором переносится одна проросшая спора при моноспоровом посеве. Нами была выявлена вариабельность двух признаков центрального бугорка: цвета и рыхлости мицелия.

При оценке изменчивости цвета ЦБ учитывался не сам по себе цвет, а его отличие от цвета основного мицелия, что позволяет исключить дублирование признаков. Эти отличия могут быть обусловлены рядом факторов: во-первых, посевной агаровый блок не идентичен по составу питательному агару, он не содержит картофельной вытяжки и глюкозы; во-вторых, центральная часть культуры является наиболее старой.

Было найдено шесть вариантов проявления признака, при которых цвет мицелия центрального бугорка (ЦЦБ) либо не отличался от основного цвета изолята – один вариант (ЦЦБ1, рис. 2.1), либо отличался – пять вариантов: ЦЦБ2 – цвет «спелая антоновка» по цветовой классификации RAL (рис. 2.2), ЦЦБ3 – белый или светлее основного мицелия культуры (рис. 2.3), темнее чего основного мицелия культуры (ЦЦБ4, рис. 2.4), ЦЦБ5 – серо-жёлтый (рис. 2.5) и ЦЦБ6 – бледно-лиловый, обычно присутствовал у изолятов со светло-серым основным мицелием (рис. 2.6).

Как показал анализ выборки изолятов по этому признаку, наиболее распространённым его вариантом был ЦЦБ1, составлявший до 80 % всех изолятов. Остальные варианты были редкими или уникальными.

Другой качественной вариабельной характеристикой центрального бугорка чистой культуры *V. inaequalis* была степень плотности/рыхлости его мицелия. Мицелий ЦБ мог быть таким же по структуре и фактуре, как мицелий основной части культуры, так и отличаться от нее. Всего было выделено 5 вариантов признака.

Для удобства его описания ему была присвоена аббревиатура, как и в случае с цветом центрального бугорка: РЦБ – рыхлость центрального бугорка, а каждый вариант обозначался цифрой. Наглядно варианты проявления признака представлены на рисунке 3.

Вариант первый (РЦБ1) имел плотный бархатистый мицелий (рис. 3.1). При обработке посевного блока в этом варианте чаще получался центральный бугорок округлой формы за счёт вертикально растущих слабоветвящихся гифов, как бы сглаживающих неровности кусочка агара.

Второй вариант (РЦБ2, рис. 3.2) также имел плотный мицелий, но короткие и частоветвящиеся гифы тесно прилегали к субстрату или росли параллельно ему и при обрастании посевного блока повторяли его форму.

Проявление этого варианта признака было наиболее частым в изученной выборке, при этом фактура мицелия ЦБ и основного мицелия в большинстве случаев совпадала. РЦБ3 формировал условно плотный субаэральный мицелий с небольшим количеством пустот, чаще всего 1-3, и мог иметь как бархатистую, так и войлочную фактуру (рис. 3.3).

РЦБ4 имел рыхлый мицелий с крупными и частыми пустотами, сформированный пучками гиф (рис. 3.4).

Развитие рыхлого пушистого мицелия, образованного вертикально растущими хорошо ветвящимися гифами, было характерно для РЦБ5 (рис. 3.5).

Таким образом, в сравнении с литературными данными, было установлено, что при оценке гетерогенности популяции парши яблони часть используемых ранее культуральных признаков, например цвет и фактура основного мицелия, имели полуколичественное или неоднозначное проявление, что приводило к выделению промежуточных вариантов.

Рассмотренные в этой работе впервые признаки цвета и фактуры центрального бугорка колонии позволили выделить хорошо отличимые друг от друга качественные варианты его проявления, отвечающие критериям понятия «фен», предложенного А.В. Яблоковым [7]. При этом наличие одного варианта исключает присутствие другого. Такие признаки возможно четко описать и каталогизировать для использования в подобных работах другими исследователями.

Выводы. В проведенного анализа результате анализа 250 моноспоровых изолятов *V. inaequalis*, выделенных из различных промышленных насаждений яблони, было выявлено 4 дискретных культуральных признака, проявивших различную вариативность: цвет и фактура основного воздушного мицелия и центрального бугорка.

Наиболее полиморфным был признак цвета основного воздушного мицелия, позволившего выделить до 38 морфотипов. Изменчивость остальных признаков была на уровне 5-6 вариантов проявления.

Высокая степень субъективизма при оценке цветовых различий возбудителя парши яблони, определяемая индивидуальными способностями восприятия исследователем цветовых нюансов, не позволяет, как нам представляется, получать воспроизводимые результаты с использованием этого признака.

Некоторые варианты признака фактуры основного мицелия имели полуколичественные характеристики проявления, что также усложняет его применение в анализе.

На основании выполненных нами исследований выделены дискретные культуральные признаки *Venturia inaequalis*, характеризующиеся вариативностью: цвет и фактура центрального бугорка колонии.

Комплекс признаков, связанных со структурным элементом колонии – центральным бугорком – позволял чётко дифференцировать популяцию патогена на несколько морфотипов и в связи с этим указанный комплекс может быть рекомендован для популяционных исследований *V. inaequalis*.

Литература

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. Якуба, Г.В. Адаптивные изменения возбудителя парши яблони в условиях погодных стрессов // Защита и карантин растений. 2014. № 4. С. 26–29.
3. Michalecka, M. Population structure of *Venturia inaequalis*, a causal agent of apple scab, in response to heterogeneous apple tree cultivation / M. Michalecka, S. Masny, T. Leroy, J. Puławska // BMC evolutionary biology. – 2018. – Vol. 18. – №. 5. – P. 1–15. DOI 10.1186/s12862-018-1122-4
4. Насонов А.И., Якуба Г.В., Лободина Е.В. Особенности морфотипного состава популяции *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter на восприимчивых к парше сортах яблони // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 58. С. 151-157.
5. Пикунова А.В., Седов Е.Н. Расовый состав *Venturia inaequalis* в условиях Орловской области // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. №. 5. С. 293-300.
6. Mansoor, S. Elucidating genetic variability and population structure in *Venturia inaequalis* associated with apple scab disease using SSR markers / S. Mansoor, N. Ahmed, V. Sharma [et al.] // PloS one. – 2019. – Vol. 14. – №. 11. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224300>
7. Яблоков А.В., Ларина Н.И. Введение в фенетику популяций. Новый подход к изучению природных популяций. М.: Высшая школа, 1985. 159 с.
8. Комардина, В.С. Особенности культурально-морфологических признаков возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint (конидиальная стадия *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck.), выделенных из садов различных типов // 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. Насонов А.И., Якуба Г.В. Особенности генетического разнообразия *Venturia inaequalis* в садовых насаждениях Краснодарского края и республики Адыгея // Научные труды СКЗНИИСиВ. Т. 9. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2016. С. 180-186.
10. Kirkham, D.S. Relationships between cultural characters and pathogenicity in *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina* / D.S. Kirkham // Microbiology. – 1957. – Vol. 16. – №. 2. – P. 360 – 373.
11. Барсукова О.Н. Парша яблони в европейской части СССР // Микология и фитопатология. 1983. Т. 17. Вып. 5. С. 395-403.
12. Насонов, А.И. Новый способ получения культуры *Venturia inaequalis* из аскоспор // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 1. С. 46-48. DOI: 10.1134/S0026364819010094.
13. RAL – мировой язык цвета. Режим доступа: https://ral.ru/classic_russian
14. Бондарцев, А.С. Шкала цветов (пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях). М.-Л.: изд-во АН СССР, 1954. 28 с.
15. Коллекция цветов Тиккурила Симфония. Режим доступа: https://www.tikkurila.ru/dlya_professionalov/tsveta/katalog_tsvetov_simfoniya
16. Steiner, U. Localized melanization of appressoria is required for pathogenicity of *Venturia inaequalis* / U. Steiner, E.C. Oerke // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97. – №. 10. – P. 1222–1230.
17. Hignett, R.C. Melanoprotein and virulence determinants of *Venturia inaequalis* / R.C. Hignett, A.L. Roberts, J.H. Larder // Physiological plant pathology. – 1984. – Vol. 24. – №. 3. – P. 321–330.