

УДК [632.08:632.4] + 57.083.12

DOI 10.30679/2219-5335-2020-6-66-350-368

**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ
МЕТОДА ОЦЕНКИ
ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ПАРШИ ЯБЛОНИ
В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Насонов Андрей Иванович
канд. биол. наук
заведующий лабораторией
биотехнологического контроля
фитопатогенов и фитофагов
e-mail: nasoan@mail.ru

Якуба Галина Валентиновна
канд. биол. наук
старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов и фитофагов
e-mail: galyayaku@gmail.com

Астапчук Ирина Леонидовна
канд. биол. наук
научный сотрудник
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов и фитофагов
e-mail: irina_astapchuk@mail.ru

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

Барсукова Ольга Николаевна
д-р с.-х. наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории плодовых культур
e-mail: barsukova_37@mail.ru

*Филиал Майкопская опытная
Станция ФГБНУ «Федеральный
Исследовательский центр Всероссийский
институт генетических ресурсов
Растений имени Н.И. Вавилова»,
пос. Подгорный, Майкопский р-н,
Республика Адыгея, Россия*

В статье предложен метод оценки
вирулентности возбудителя парши яблони

UDC [632.08:632.4] + 57.083.12

DOI 10.30679/2219-5335-2020-6-66-350-368

**DEVELOPMENT AND TESTING
OF METHOD FOR ASSESSING
THE VIRULENCE
OF APPLE SCAB PATHOGEN
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

Nasonov Andrey Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Head of the Laboratory
of Biotechnological Control
of Phytopathogens and Phytophages
e-mail: nasoan@mail.ru

Yakuba Galina Valentinovna
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
Laboratories of Biotechnological Control
of Phytopathogens and Phytophages
e-mail: galyayaku@gmail.com

Astapchuk Irina Leonidovna
Cand. Biol. Sci.
Research Associate
of Laboratories of Biotechnological Control
of Phytopathogens and Phytophages
e-mail: irina_astapchuk@mail.ru

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia*

Barsukova Ol'ga Nikolaevna
Dr. Sci. Agr.
Leading Research Associate
of the Fruit Crops Laboratory
e-mail: barsukova_37@mail.ru

*Branch Maikop Experimental Station
of the Federal State Budget Scientific
Institution «Federal Research Center
of Russian Institute of Plant Genetic
Resources named after N.I. Vavilov»
v. Podgorny, Maikopsky district,
Republic Adygea, Russia*

A method for assessing the virulence
of the apple scab pathogen on unripe fruits

на незрелых плодах. Экспериментально определены необходимые условия его эффективного проведения. Показано, что незрелые плоды должны быть отобраны на генотипах яблонь, которые контролируются химическими препаратами от грибных болезней, в фазе развития «грецкий орех». Поверхностная дезинфекция плодов не эффективна в случае заражения их возбудителями гнилей в саду, что может мешать дальнейшему проведению анализа. Те же условия при подготовке и отборе незрелых плодов должны соблюдаться при их дальнейшем хранении для отложенных экспериментов. Метод был апробирован на 9 моноспоровых изолятах *Venturia inaequalis*, выделенных с сорта яблони Ренет Симиренко. Проявление симптомов поражения паршой характеризовалось развитием диффузных пятен темно-оливкового или темно-серого цвета с преимущественно поверхностным развитием мицелия патогена. Изученные изоляты *V. inaequalis* характеризовались различным уровнем вирулентности и агрессивности на различных генотипах растения-хозяина, что отражает высокую гетерогенность популяции патогена. Патогенность большинства изолятов оказалась выше для незрелых плодов сорта Ренет Симиренко, показывая их приспособленность к сорту, с которого они были выделены. Несколько более низкая вирулентность и агрессивность изолятов отмечена для сорта яблони Айдаред. К виду декоративной яблони *Malus x purpurea var pendula* был вирулентен только один из 9 изолятов возбудителя парши. Проведенное исследование показало эффективность предложенного метода, при соблюдении условий отбора плодов, в оценке показателей вирулентности и патогенности моноспоровых изолятов возбудителя парши яблони в лабораторных условиях.

Ключевые слова: VENTURIA INAEQUALIS, ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ, ИЗОЛЯТЫ, СОРТА, ВИДЫ, ЯБЛОНЯ, НЕЗРЕЛЫЕ ПЛОДЫ

is offered in the paper. The necessary conditions for its effective implementation were determined experimentally.

It is shown that unripe fruits should be selected from the genotypes of apple-trees, which are controlled by chemical preparations for fungal diseases, in the "walnut" development phase.

Surface disinfection of fruits is not effective if they are infected with rot agents in the garden, which may prevent of further analysis. The same conditions for the preparation and selection of unripe fruits should be observed when they are further stored for deferred experiments.

The method was tested on 9 monospore isolates of *Venturia inaequalis* isolated from the apple variety of Renet Simirenko.

The manifestation of symptoms of scab lesions was characterized by the development of diffuse spots of dark olive or dark gray color with mainly superficial development of pathogen mycelium. The studied isolates of *V. inaequalis* characterized by different levels of virulence and aggressiveness on different genotypes of the host plant, reflecting the high heterogeneity of the pathogen population. Pathogenicity of most isolates was higher for immature fruits from the variety Renet Simirenko, showing their adaptability to the variety from which they were isolated. Slightly lower virulence and aggressiveness of isolates was observed for the Idared apple variety. Only one of the 9 isolates of the scab pathogen was virulent to the species of *Malus x purpurea var pendula* ornamental apple. The study carried out showed the effectiveness of the proposed method, under the conditions of fruit selection, in assessing the virulence and pathogenicity of monospore isolates of the apple scab pathogen in laboratory conditions.

Key words: VENTURIA INAEQUALIS, VIRULENCE ASSESSMENT, ISOLATES, VARIETIES, SPECIES, APPLE-TREE, UNRIPE FRUITS

Введение. Парша яблони является экономически значимым заболеванием основной плодовой культуры умеренной климатической зоны. Её возбудитель – микроскопический гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter инфицирует в основном листья и плоды, развиваясь под их кутикулярным слоем. Наносимый паршой ущерб связан, прежде всего, с ухудшением товарных качеств поражённых плодов. Доля плодов с поражением у восприимчивых сортов яблони при эпифитотийном развитии болезни может достигать 80-90 % [1].

В контроле заболевания эффективно используют две основные стратегии: обработка фунгицидами и возделывание устойчивых к парше сортов яблони. Для реализации обеих стратегий требуется своевременная информация о количественном и качественном составе популяции патогена. Проведенные зарубежными и отечественными учеными исследования показывают широкую внутривидовую неоднородность гриба, которая обеспечивает его выживание. Так, в краснодарской популяции патогена на основе морфологического анализа моноспоровых изолятов патогена было выявлено 30 морфотипов [2]. В практическом плане значение этого факта выражается в эпизодическом снижении эффективности применяемых программ контроля, вызванных происходящими внутри популяции микромицета перестройками.

Одними из важнейших показателей, которые необходимо отслеживать в популяции гриба, являются её вирулентный или расовый состав, а также агрессивность. На важность мониторинга расового состава *V. inaequalis* указывает факт преодоления ранее эффективных генов устойчивости новыми вирулентными формами гриба, например появление рас 6 и 7, поражающих сорта яблони домашней и *Malus floribunda* 821, несущих ген Vf [3]. В данный момент новые расы активно распространяются в Европе и достигли Северной Америки [4, 5].

Наиболее значимым показателем вирулентности является при подборе устойчивого к заболеванию сортимента. Свойство вирулентности связано с качественной способностью патогена заражать растение-хозяина, тогда как агрессивность – количественная характеристика, определяющая степень инфицирования хозяина, то есть силу проявления болезни [6].

Для оценки вирулентности патогена используют специальный набор растений-дифференциаторов, несущих гены устойчивости к той или иной его расе [7]. Метод оценки этого качества гриба обычно требует наличия живых растений – либо деревьев в саду, либо саженцев, что накладывает определённые ограничения на его широкое применение. Так как для реализации оценки необходимо наличие насаждений сортов-дифференциаторов или, как минимум, вегетационного участка, что не всегда доступно для исследователя, то более распространённой практикой стала оценка вирулентности в теплицах или специальных комнатах на саженцах яблони, выращенных в горшках.

При такой организации процесса требуется значительно меньше места и ресурсов, связанных с уходными работами. Между тем классические методы оценки вирулентности остаются трудоёмкими и дорогостоящими. Кроме того, на процесс заражения и развития болезни может влиять окружающая среда, что затрудняет оценку реакции растения-хозяина на патоген в условиях тепличного или полевого скрининга [6].

Рядом исследователей были предложены методы оценки характеристик патогенности гриба в лабораторных условиях. Так, применение методов культивирования тканей яблони для скрининга *in vitro* генотипов хозяина на устойчивость к *V. inaequalis* обеспечивало больший контроль над условиями окружающей среды [8]. Кроме того, эти методы позволяют проводить эффективную и крупномасштабную оценку как сортов яблони, так и изолятов патогена в небольшом пространстве, при этом реакция растений *in vitro* коррелировала с данными, полученными в полевых условиях

[9, 10]. Для скрининга устойчивости сортов яблони к патогену использовали культуры апекса побега, мезофильные клетки и каллусную культуру различных сортов яблони [11-13].

Другими учёными был предложен вариант лабораторной оценки на основе метода листовых дисков. Суть метода заключалась в вырезании из предварительно дезинфицированных листьев дисков размером 1 см, нанесении на них суспензии спор возбудителя парши яблони с дальнейшим инкубированием в чашках Петри с питательной агаризованной средой до развития симптомов. Была проведена оценка на восприимчивость 16 генотипов-дифференциаторов яблони к трём изолятам возбудителя парши [14]. В другой работе метод листовых дисков был применён для генетического анализа взаимодействия в системе патоген-хозяин с использованием новых рас гриба [15].

Шведские учёные с помощью использования дисков листьев сортов-дифференциаторов показали наличие в садах Швеции рас парши 1-4, 6 и 7 [16]. Отмечалось, что предпочтительнее использовать более молодые листочки, так как эффекты взаимодействия *V. inaequalis* с яблоней на них происходили более чётко [14]. Известно, что с возрастом у листьев и плодов развивается некоторая возрастная или онтогенетическая устойчивость, обусловленная включением неспецифических механизмов защиты растения от патогена [17, 18].

Этот метод, как и описанные выше лабораторные методы, позволял проводить одновременный анализ большого количества, как генотипов хозяина, так и патогена в контролируемых условиях, но без предварительного получения культуры тканей, так как эксперименты проводились на листьях, отобранных непосредственно с деревьев яблони в поле или с саженцев в теплице. Между тем, при применении этой методики турецкими учёными отмечалось возникновение проблем, связанных с гибелью отобранных листьев в процессе их дезинфекции в лаборатории [19]. Также в ряде

исследований вирулентности для получения листовых дисков использовали растения, выращенные *in vitro*, совмещая два этих подхода [20, 21].

Таким образом, предложенные разными учёными лабораторные методы скрининга вирулентности и патогенности изолятов парши яблони были применены с различной степенью успеха в нескольких исследованиях, показав свои сильные и слабые стороны. Так, существенным недостатком в первом варианте лабораторных подходов является освоение достаточно трудоёмких методов культивирования растительных тканей и органов, а во втором варианте требуется наличие молодых свежих листьев и правильная их дезинфекция. Кроме того, в научной литературе остался неосвещённым вопрос использования других органов яблони, например плодов, в том числе незрелых, для лабораторных исследований вирулентности патогена.

Анализ научной литературы показал, что создание действительно доступного эффективного и простого экспресс-метода оценки вирулентности в лабораторных условиях продолжает оставаться достаточно актуальным.

Целью нашего исследования являлась разработка и апробация простого и эффективного метода оценки патогенных свойств *V. inaequalis* в лабораторных условиях с использованием незрелых плодов яблони.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов СКФНЦСВВ в рамках госзадания № 0498-2019-0002.3 «Выделить штаммы возбудителя парши яблони из современных садовых агроценозов Западного Предкавказья, изучить их морфолого-культуральные характеристики, выявить основные морфологические типы и внутрипопуляционную структуру патогена, а также создать коллекцию изолятов для усовершенствования методов мониторинга парши яблони». Объекты исследований: плоды различных видов рода *Malus* Mill., а также сортов *Malus x domestica* Borkh; моноспорные изоляты возбудителя парши яблони *V. inaequalis* и их споровые суспензии.

Моноспоровые изоляты парши получали из перезимовавшего листового опада сорта Ренет Симиренко, имевшего зрелые плодовые тела патогена, по оригинальной методике, предложенной А.И. Насоновым [23]. Листовой опад яблони отбирали в промышленном моносортовом насаждении в пос. Агроном Динского района Краснодарского края весной в период активного вылета аскоспор патогена.

Полученную моноспоровую культуру выращивали на картофельно-глюкозном агаре в темноте при 20⁰С в течение месяца. Было выделено 18, а для работы отобрано 10 моноспоровых изолятов, различающихся морфолого-культуральными свойствами. Для получения спорowego материала изоляты высевали на сусло-агар следующего состава: неохмеленное пивное сусло, плотность которого доводили до 7⁰, агар-агар – 15 г на 1 литр среды [6].

Посев на сусло-агар проводился кусочком агара с чистой культурой патогена. Через 15-30 дней с выросшей культуры проводили смыв конидий в минимальном объеме стерильной дистиллированной воды [6]. Получение инокулюма осуществляли в стерильных условиях. Концентрацию спор в суспензии подсчитывали с помощью камеры Горяева. Для заражения брали суспензию спор в диапазоне концентраций 0,04-2,5*10⁵ / мл. Полученную суспензию использовали сразу.

Предлагаемый метод предусматривает использование незрелых плодов яблони. Использование именно незрелых плодов основано на предположении, что зрелые плоды могут, по аналогии с листьями, иметь онтогенетическую неспецифическую устойчивость, которая искажает реальную картину восприимчивости генотипа хозяина [17, 18]. Незрелые плоды отбирали в стадии развития яблони «плод - лещина» или «плод - грецкий орех» в коллекции генетических ресурсов Майкопской опытной станции ВИР (МОС ВИР) – Республика Адыгея, Майкопский район, пос. Шунтук, а также в промышленных садах – Краснодарский край, пос. Водники г. Краснодар и пос. Агроном, Динской район (табл. 1). Выборка плодов по каждому образцу должна составлять от 50 до 100 шт.

Таблица 1 – Характеристика образцов генотипов растения-хозяина

Вид/сорт яблони	Поражаемость расой	Ген устойчивости*	Место отбора	Контроль парши яблони***
Мекинтош	1	P-1+	МОС ВИР	нет
Уэлси	1	P-2+	МОС ВИР	нет
Голден Граймс	1	P-6+	МОС ВИР	нет
Долго	2	P-8+	МОС ВИР	нет
R-12-740-7 (Russian seedlings)	2 и 4	P-9+	МОС ВИР	нет
<i>M. niedzwetzkyana</i> Dieck.	1	_**	МОС ВИР	нет
<i>M. orientalis</i> Uglitzh.	1	-	МОС ВИР	нет
<i>M. x purpurea</i> (Barbier.) Rehd. var. <i>pendula</i>	1	-	СКФНЦСВ В	нет
Ренет Симиренко	1	-	п. Агроном	да
Айдаред	1	-	п. Водники	да

* по Boone D.M., 1971 [22];

** - ген устойчивости не известен;

*** - программа обработок фунгицидами, принятая в хозяйстве.

Перед экспериментом плоды дезинфицировали по следующей схеме: 1) мыли в растворе ПАВ; 2) ополаскивали водопроводной водой до исчезновения следов пены; 3) инкубировали в свежеприготовленном водном растворе хлорсодержащего средства (содержание гипохлорида 1-5 %), например «Доместос», разбавленного в соотношении 1/10 в течение 20 мин; 4) отмывали дважды дистиллированной водой; 5) замачивали на 1-1,5 минуты в 70 %-м этиловом спирте; 6) отмывали дважды дистиллированной водой; 7) просушивали на чистых бумажных салфетках. До использования хранили в холодильнике при +4 °С в чистых полиэтиленовых пакетах.

Ревизию состояния хранящихся плодов проводили в конце каждого месяца. При этом оценивали долю загнивших плодов, которые отбраковывали. Так как часть плодов была собрана в садах с обработками фунгицидами, перед использованием в лабораторном анализе на вирулентность для инактивации действующих веществ препаратов, которые могли находиться в эпидермальной части кожицы, плоды выдерживали в холодильнике в течение 2-3-х недель.

Суспензию спор наносили на каждый плод с помощью микродиспенсера с объемом резервуара 20 мл таким образом, чтобы образовывалась плёнка из капель на образце; старались избегать формирования крупных капель и стекания их по поверхности. Между каждым образцом споровой суспензии микродиспенсер пульверизатора обрабатывали 70 %-м этиловым спиртом и промывали три раза стерильной дистиллированной водой, далее замещая воду в диспенсере воздухом.

Заражение дезинфицированных незрелых плодов яблони споровой суспензией проводили в полипропиленовых контейнерах для пищевых продуктов с крышками объёмом 500 мл, которые предварительно стерилизовали УФ излучением в течение получаса в ламинарном боксе. В контейнер свободно помещалось 6-7 плодов размера лещины или 4-5 плодов размера грецкого ореха (рис. 1А). Плоды разных образцов в одном контейнере заражали одним штаммом патогена. Повторность трёхкратная.

Плоды предварительно этикетировали: к черешку плода приклеивали изоленту размером 1x2 см, на которую наносили номер или буквенное обозначение образца (рис. 1Б).

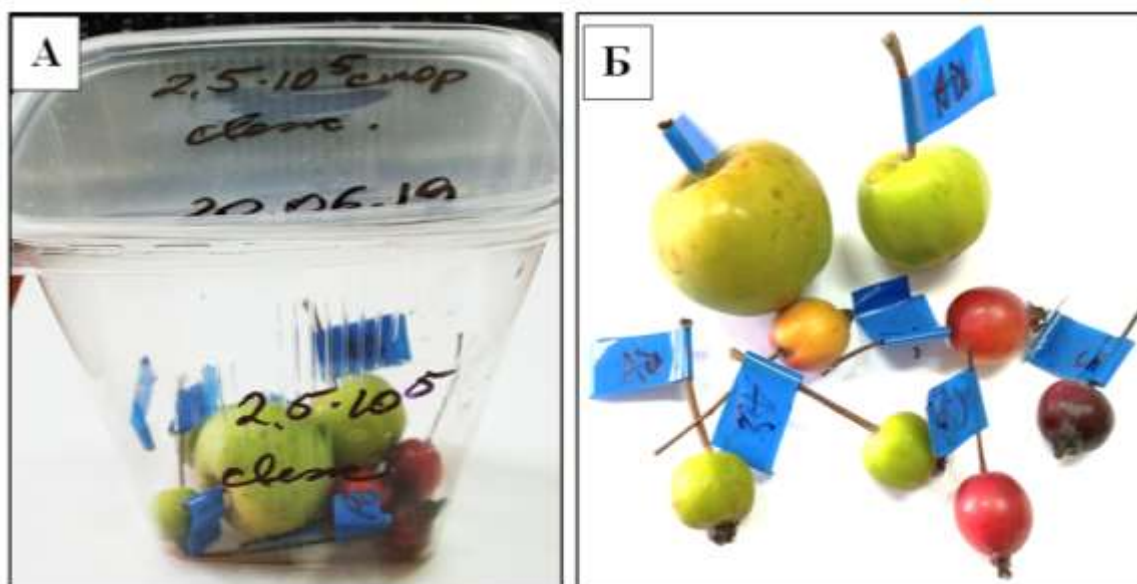


Рис. 1. Контейнер с подготовленными для заражения паршой плодами яблони (А); этикетированные изолентой незрелые плоды яблони (Б)

Изоленту также облучали УФ светом. Влажность в закрытых крышками контейнерах была на уровне 100 %, что отслеживали по наличию конденсата на их внутренних стенках. Такую влажность поддерживали в течение 2-х суток, как рекомендовали В.В. Жданов и Е.Н. Седов [6], после чего в крышке контейнера делали несколько отверстий шилом или иглой от медицинского шприца на 10 мл, что позволяло снизить влажность до 70 %.

Инокулированные плоды инкубировали полтора месяца в темноте при температуре 20⁰С. Оценку симптомов проводили на 5-е, 10-е, 30-е и 45-е сутки. Оценивали количество пятен парши и степень покрытия ими поверхности плода по общепринятой шкале учета в баллах; высший балл шкалы – 5. При наличии признаков гниения плоды отбраковывали на любом из этапов эксперимента.

Обсуждение результатов. В результате проведенной работы было заражено 10 различных образцов яблони 10 моноспоровыми изолятами *V. Inaequalis*. Необходимо отметить, что не по всем образцам был получен результат в силу того, что они сгнили. Как видно из таблицы 2, количество гниющих плодов на 10-е сутки было относительно невелико, составив от 3 до 20 %, на 20-е сутки оно достигало у некоторых образцов 100 %. При этом количество загнивающих плодов в стадии «лещина» было на 20-40 % больше, чем у плодов в стадии «грецкий орех». Среди плодов сортов Ренет Симиренко и Айдаред количество сгнивших в стадии «грецкий орех» было на 90 % меньше, чем у всех остальных образцов.

Сравнивая характеристики отобранных образцов (см. табл. 1), можно видеть, что эти плоды собраны в промышленном саду с использованием фунгицидов, в отличие от остальных, отобранных в МОС ВИР и имеющих высокий естественный фон различных возбудителей микозов. Промежуточное положение занимают плоды *M. x purpurea*, произрастающей на территории ФГБНУ СКФНЦСВВ в единичном экземпляре как декоративное расте-

ние, где обработки фунгицидами не проводят, но в силу отсутствия большого количества генотипов растения-хозяина естественный фон снижен.

Таблица 2 – Доля сгнивших плодов в процессе искусственного заражения моноспоровыми изолятами возбудителя парши яблони

Образец	Стадия плода	Доля гнилых плодов, %	
		10-е сутки	30-е сутки
Мекинтош	Лещина	12	85
Уэлси	Лещина	9	90
	Грецкий орех	5	80
Голден Граймс	Лещина	16	95
Долго	Лещина	10	90
R-12-740-7	Лещина	10	100
<i>M. niedzwetzkyana</i>	Лещина	15	90
<i>M. orientalis</i>	Лещина	20	100
<i>M. x purpurea</i>	-	3	40
Ренет Симиренко	Лещина	3	50
	Грецкий орех	0	10
Айдаред	Лещина	5	35
	грецкий орех	0	5
Всего	Лещина	10,3	77,5
	Грецкий орех	2	31,7

Следует отметить, что гниль развивалась, несмотря на тщательную поверхностную дезинфекцию плодов. Симптомы гнили отмечались вокруг чашечки или плодоножки в виде бурого пятна, которое по мере разрастания покрывалось белым налетом мицелия. Микроскопический анализ показал, что гниль плодов имела различную этиологию и была вызвана *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers., а также грибами рода *Fusarium* Link. Возбудителями гнили плоды яблони заражаются не только в саду, но и в период хранения, в том числе от тары, через механические повреждения кожицы плодов.

В данном эксперименте заражение произошло до начала проведения исследований в насаждениях, в которых не проводился химический контроль. В пользу этого утверждения говорит абсолютное преобладание числа сгнивших плодов из коллекции МОС ВИР. Источником инфекции также не могли быть контейнеры, так как, во-первых, они были стерилизованы, а во-вторых, в каждой ёмкости были представлены плоды разных образцов, однако загнивали не все, а только определенные. Следовательно, важным методическим аспектом лабораторной оценки вирулентности на незрелых плодах является как предварительный химический контроль грибных заболеваний на генотипах-растениях, с которых производится отбор образцов, так и дезинфекция контейнеров и этикеток, чтобы исключить развитие гнилей в процессе выдерживания плодов во влажной камере.

Выявлено, что наиболее сохранившимися оказались плоды на стадии развития «грецкий орех». Незрелые плоды сортов Ренет Симиренко и Айдаред и вида яблони *Malus x purpurea var pendula*, не показавшие признаков гнили на протяжении всего эксперимента, позволили оценить на них вирулентность и патогенность 9 изолятов возбудителя парши яблони, выделенных с сорта Ренет Симиренко (табл. 3).

Все изученные изоляты *V. inaequalis* показали различную вирулентность как в пределах одного генотипа, так и на разных генотипах плодов хозяина. Наибольшее количество пораженных плодов среди всех генотипов было на сорте Ренет Симиренко, составив 80-90 %, при этом тяжесть развития симптомов была также сильнее у образцов этого сорта, на 10 % выше, чем у сорта Айдаред. Полученные результаты согласуются с данными Сиротски с соавторами, которые установили, что изоляты возбудителя парши яблони чаще и сильнее поражают те же генотипы растения-хозяина, с которых они были выделены, чем другие, даже в пределах сорта-хозяина восприимчивых сортов. Их результаты показали, что в восприимчивых сортах присутствуют различные дополнительные факторы устойчи-

ности, которые обуславливают отбор в природных популяциях, различающихся по вирулентности [24]. Ранее было также показано, что внутри первой расы *V. inaequalis* присутствует неоднородность по вирулентности, определяемая семью генами [22].

Таблица 3 – Наличие и степень развития инфекции на сортах и видах яблони, заражённых моноспоровыми изолятами *V. inaequalis*, на 45-е сутки, балл

Изолят патогена	Инфекционная нагрузка, *10 ⁵ спор/мл	Ренет Симиренко	Айдаред	<i>Malus x purpurea</i>
PCarp19a25-1	0,30	abs*	abs	abs
PCarp19a17-1	0,51	3-4	3	abs
PCarp19a4-5	0,59	3	1	-
PCarp19a10-5	0,04	1	1	-
PCarp19a16-1	0,99	5	4	abs
PCarp19a27-2	0,80	3-4	-	abs
PCarp19a8-2	0,55	1-2	1	2
PCarp19a5-1	0,58	1	abs	abs
PCarp19a24-1	2,55	3	4	abs

*- симптомы поражения отсутствуют

Наименьшее количество поражённых плодов в нашем эксперименте было у другого вида яблони – *Malus x purpurea*. Только один из 9 изолятов патогена – PCarp19a8-2 – вызвал симптомы поражения паршой на этом хозяине, причём тяжесть их проявления была сильнее, чем на сортах. Как известно, культурные сорта яблони относятся к виду *Malus x domestica*. *Malus x purpurea* является межвидовым гибридом *M. niedzwetzkyana* x *M. atrosanguinea*, встречается только в культуре. И хотя *Malus x purpurea* так же, как и вид *Malus x domestica*, поражается расой 1 патогена, мы видим влияние межвидовых различий растения-хозяина на вирулентность изученных изолятов.

Кроме этого, отмечены различия в вирулентности изученных изолятов возбудителя парши. Наиболее вирулентным оказался штамм РСagr19a8-2, наименее – штаммы РСagr19a25-1 и РСagr19a5-1 (см. табл. 3). Изолят РСagr19a25-1 не порастил ни одного плода. Необходимо учитывать, что споры патогена, полученные из его чистых культур, могут характеризоваться сниженной жизнеспособностью, вирулентностью и патогенностью [6]. Большинство изолятов, заразивших сорт Ренет Симиренко, поражало также плоды сорта Айдаред. Отличались изоляты и тяжестью развития симптомов.

Наибольшей агрессивностью характеризовалась моноспоровая культура РСagr19a16-1, поразившая плоды сорта Ренет Симиренко на 5 баллов, а сорта Айдаред – на 4 балла. Достаточно агрессивными для обоих сортов были изоляты РСagr19a17-1 и РСagr19a24 -1, а для сорта Ренет Симиренко, кроме того, изоляты РСagr19a27-2 и РСagr19a4-5, давшие поражение в степени 3-4 балла. Широкая вариабельность изолятов патогена по свойствам вирулентности и патогенности определяется, в целом, высокой внутривидовой гетерогенностью возбудителя парши яблони [25].

Отдельного внимания требует рассмотрение характера проявления симптомов парши яблони при искусственном заражении незрелых плодов в лабораторных условиях. Развивающиеся пятна поражений были тёмно-оливкового или темно-серого цвета. При этом поражение носило диффузный характер с преимущественно поверхностным развитием мицелия патогена. Образование зон опробковения эпидермиса или его разрывов не происходило (рис. 2). Поверхностный характер развития гриба при искусственном заражении в лабораторных условиях отмечали многие исследователи. При этом на резистентных генотипах хозяина мицелий гриба не развивался вообще [14-16].



Рис. 2. Незрелые плоды яблонь с симптомами развития парши яблони

Примечание: плоды сортов Ренет Симиренко и Айдаред показали восприимчивую реакцию для моноспоровых изолятов *V. inaequalis* PCagr19a16-1 и PCagr19a27-2; плод *Malus x purpurea* (маленький красно-жёлтого цвета) – без симптомов.

Также в рамках данной работы была оценена способность незрелых плодов к длительному хранению для возможного проведения лабораторных экспериментов по оценке вирулентности патогена в период покоя растения-хозяина, когда отсутствуют поражаемые патогеном органы. В целом, данные эксперимента по хранению плодов совпали с данными о степени загнивания образцов плодов в условиях влажной камеры при искусственном заражении изолятами. Так, все плоды, собранные с деревьев яблони, не обрабатывавшихся фунгицидами, сгнили на 50-90 % в течение

двух месяцев хранения в холодильнике, а через четыре месяца хранения – на 100 %. Плоды из промышленных садов с ежегодным химическим контролем болезней в течение четырех месяцев хранения имели только 10 % сгнивших плодов.

Через шесть месяцев хранения количество сгнивших плодов не увеличилось, однако происходило их пожелтение, то есть дозревание. Плоды более поздней стадии развития – «грецкий орех» – хранились лучше. Плоды на стадии развития «лещина» сильнее теряли воду и быстрее дозревали. Также важно отметить, что плоды на этапе хранения не подвергались этикетированию и контакту с контейнерами, в которых в дальнейшем проводится этап заражения. В связи с вышесказанным можно рекомендовать для длительного хранения незрелых плодов сортов-дифференциаторов отбирать их на стадии развития «грецкий орех» с обязательной предварительной обработкой маточных растений фунгицидами.

Заключение. В результате исследований был предложен метод оценки вирулентности возбудителя парши яблони в лабораторных условиях с использованием незрелых плодов. Экспериментально определены необходимые условия эффективности метода. Было показано, что незрелые плоды должны быть отобраны на генотипах, которые контролируются химическими препаратами от грибных болезней; срок отбора – фаза развития яблони «грецкий орех». Те же условия при подготовке и отборе незрелых плодов должны соблюдаться при их дальнейшем хранении для отложенных экспериментов.

Метод был апробирован на 9 моноспоровых изолятах *Venturia inaequalis*, выделенных с сорта Ренет Симиренко. Проведенное исследование показало эффективность предложенного метода в оценке показателей вирулентности и патогенности моноспоровых изолятов возбудителя парши яблони в лабораторных условиях.

Изученные изоляты *V. inaequalis* характеризовались различным уровнем вирулентности и агрессивности на различных генотипах растения-хозяина, что отражает высокую гетерогенность популяции патогена. Однако данные по этим характеристикам патогена получены на небольшом количестве сортов и видов яблони, что требует дальнейшего исследования.

Литература

1. Смольякова В.М. Болезни плодовых пород Юга России. Краснодар: Весть, 2000. 190 с.
2. 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.
3. Roberts T., Crute I. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda* // Norwegian Journal of Agricultural Science. 1994. Vol. 17. P. 403-406.
4. Parisi L., Laurens F., Didelot F., Evans K., Fischer C., Fouillet V., Tsiouridis C. Geographical distribution of *Venturia inaequalis* strains virulent to the Vf gene in Europe // IOBC WPRS BULLETIN. 2006. Vol. 29. №. 1. P. 49.
5. Papp D., Singh J., Gadoury, D. Khan, A. New North American isolates of *Venturia inaequalis* can overcome apple scab resistance of *Malus floribunda* 821 // Plant Disease. 2020. Vol. 104 (3). P. 649-655.
6. Жданов В.В., Седов Е.Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приок. кн. изд-во, 1991. 208 с.
7. Пикунова А.В., Седов Е.Н. Расовый состав *Venturia inaequalis* в условиях Орловской области // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. №. 5. С. 293-300.
8. Daub M.E. Tissue culture and selection of resistance to pathogens // Annual Review of Phytopathology 1986. Vol. 24. P. 159-186.
9. Yepes L.S., Aldwinckle H.S. Selection of resistance to *Venturia inaequalis* using detached leaves from a in vitro grown apple shoots // Plant Science 1993. Vol. 93. P. 211-216.
10. Yepes L.S., Aldwinckle H.S. Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot tip cultures and on glasshouse-grown apple cultivars // Phytopathology 1993. Vol. 83. P. 1155-1162.
11. Rosati P., Predieri S., Mezzetti B., Ancherani M., Fasolo F., Foscolo S. *In vitro* selection of apple rootstock somaclones with *Phytophthora cactorum* culture filtrate // Acta Horticulturae 1990. Vol. 280. P. 409-416.
12. Mezzetti B.R., Zimmerman H., Mischke C., Rosati P., Hammerschlag F.A. Mero-cyanine 540 as an optical probe to monitor the effects of culture filtrates of *Phytophthora cactorum* on apple cell membranes // Plant Science 1992. Vol. 83. P. 163-167.
13. Beech I., Gessler C. Interaction between *Venturia inaequalis* and apple callus tissue cultures: an electron microscopic study // Journal of Phytopathology. 1986. Vol. 116. P. 315-322.
14. Benaouf G., Parisi L. Characterization of *Venturia inaequalis* pathogenicity on leaf discs of apple trees // European journal of plant pathology. 1998. Vol. 104. №. 8. P. 785-793.
15. Benaouf G., Parisi L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species // Phytopathology. 2000. Vol. 90. №. 3. P. 236-242.

16. Raman H., Goodwin P. B. *In vitro* screening of apple germplasm for resistance against black spot caused by *Venturia inaequalis* // Journal of New Seeds. 2001. Vol. 2. №. 2. P. 37-46.
17. Valsangiacomo C., Gessler C. Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis* // Phytopathology. 1988. Vol. 78. №. 8. P. 1066-1069.
18. Li B., Xu X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves // Journal of Phytopathology. 2002. Vol. 150. №. 11- 12. P. 687-691.
19. Kaymak S., Boyraz N. Farklı Alanlardan Toplanan *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. (Elma Karalekesi) İzolatlarının Patojenisiteleri // Bitki Koruma Bülteni. 2015. Vol. 55. №. 1. P. 1-13.
20. Guillaumès J., Chevalier M., Parisi L. Etude des relations *Venturia inaequalis* – *Malus* × *domestica* sur vitroplantes // Can. J. Plant. Pathol. 1995. Vol.17. P. 305-311.
21. Ivanicka J., Kellerhals M., Theiler R. Evaluation of scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) on shoots and detached leaves from in vitro and greenhouse grown plants of apple *Malus domestica* Mill.) cultivars Golden Delicious and Florina // Gartenbauwissenschaft 1996. Vol. 5. P. 242–248.
22. Boone D. M. Genetics of *Venturia inaequalis* // Annual Review of Phytopathology. 1971. Vol. 9. №. 1. P. 297-318.
23. Насонов А.И. Новый способ получения культуры *Venturia inaequalis* из аско-спор // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 1. С. 46-48.
24. Sierotzki H., Eggenschwiler M., Boilatt O., McDermott J. M., Gessler C. Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis* // Phytopathology. 1994. Vol. 84. P. 1005-1009.
25. Насонов А.И., Якуба Г.В. Особенности генетического разнообразия *Venturia inaequalis* в садовых насаждениях Краснодарского края и республики Адыгея // Научные труды ФГБНУ СКЗНИИСиВ. Т. 9. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2016. С. 180-186.

References

1. Smol'yakova V.M. Bolezni plodovyyh porod Yuga Rossii. Krasnodar: Vest', 2000. 190 s.
2. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Lobodina E.V. Osobennosti morfotipnogo sostava populyatsii *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter na vospriimchivyyh k parshe sortah yabloni // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. 2019. Т. 58. S. 151-157.
3. Roberts T., Crute I. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda* // Norwegian Journal of Agricultural Science. 1994. Vol. 17. P. 403-406.
4. Parisi L., Laurens F., Didelot F., Evans K., Fischer C., Fouillet V., Tsipouridis C. Geographical distribution of *Venturia inaequalis* strains virulent to the Vf gene in Europe // IOBC WPRS BULLETIN. 2006. Vol. 29. №. 1. P. 49.
5. Papp D., Singh J., Gadoury, D. Khan, A. New North American isolates of *Venturia inaequalis* can overcome apple scab resistance of *Malus floribunda* 821 // Plant Disease. 2020. Vol. 104 (3). P. 649-655.
6. Zhdanov V.V., Sedov E.N. Selekcija yabloni na ustojchivost' k parshe. Tula: Priok. kn. izd-vo, 1991. 208 s.
7. Pikunova A.V., Sedov E.N. Rasovyyj sostav *Venturia inaequalis* v usloviyah Orlovskoj oblasti // Mikologiya i fitopatologiya. 2019. Т. 53. №. 5. S. 293-300.
8. Daub M.E. Tissue culture and selection of resistance to pathogens // Annual Review of Phytopathology 1986. Vol. 24. P. 159-186.

9. Yepes L.S., Aldwinckle H.S. Selection of resistance to *Venturia inaequalis* using de-tached leaves from a *in vitro* grown apple shoots // Plant Science 1993. Vol. 93. P. 211-216.
10. Yepes L.S., Aldwinckle H.S. Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot tip cultures and on glasshouse-grown apple cultivars // Phytopathology 1993. Vol. 83. P. 1155-1162.
11. Rosati P., Predieri S., Mezzetti B., Ancherani M., Fasolo F., Foscolo S. *In vitro* selection of apple rootstock somaclones with *Phytophthora cactorum* culture filtrate // Acta Horticulturae 1990. Vol. 280. P. 409-416.
12. Mezzetti B.R., Zimmerman H., Mischke C., Rosati P., Hammerschlag F.A. Mero-cyanine 540 as an optical probe to monitor the effects of culture filtrates of *Phytophthora cactorum* on apple cell membranes // Plant Science 1992. Vol. 83. P. 163-167.
13. Beech I., Gessler C. Interaction between *Venturia inaequalis* and apple callus tissue cultures: an electron microscopic study // Journal of Phytopathology. 1986. Vol. 116. P. 315-322.
14. Bénaouf G., Parisi L. Characterization of *Venturia inaequalis* pathogenicity on leaf discs of apple trees // European journal of plant pathology. 1998. Vol. 104. №. 8. P. 785-793.
15. Bénaouf G., Parisi L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species // Phytopathology. 2000. Vol. 90. №. 3. P. 236-242.
16. Raman H., Goodwin P. B. *In vitro* screening of apple germplasm for resistance against black spot caused by *Venturia inaequalis* // Journal of New Seeds. 2001. Vol. 2. № 2. P. 37-46.
17. Valsangiacomo C., Gessler C. Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis* // Phytopathology. 1988. Vol. 78. №. 8. P. 1066-1069.
18. Li B., Xu X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves // Journal of Phytopathology. 2002. Vol. 150. №. 11- 12. P. 687-691.
19. Kaymak S., Boyraz N. Farklı Alanlardan Toplanan *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. (Elma Karalekesi) İzolatlarının Patojenisiteleri // Bitki Koruma Bülteni. 2015. Vol. 55. №. 1. P. 1-13.
20. Guillaumès J., Chevalier M., Parisi L. Etude des relations *Venturia inaequalis* – *Malus × domestica* sur vitroplantes // Can. J. Plant. Pathol. 1995. Vol.17. P. 305-311.
21. Ivanicka J., Kellerhals M., Theiler R. Evaluation of scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) on shoots and detached leaves from *in vitro* and greenhouse grown plants of apple *Malus domestica* Mill.) cultivars Golden Delicious and Florina // Gartenbauwissenschaft 1996. Vol. 5. P. 242–248.
22. Boone D. M. Genetics of *Venturia inaequalis* // Annual Review of Phytopathology. 1971. Vol. 9. №. 1. P. 297-318.
23. Nasonov A.I. Novyj sposob polucheniya kul'tury *Venturia inaequalis* iz askospor // Mikologiya i fitopatologiya. 2019. T. 53. № 1. S. 46-48.
24. Sierotzki H., Eggenschwiler M., Boilatt O., McDermott J. M., Gessler C. Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis* // Phytopathology. 1994. Vol. 84. P. 1005-1009.
25. Nasonov A.I., Yakuba G.V. Osobennosti geneticheskogo raznoobraziya *Venturia inaequalis* v sadovyh nasazhdeniyah Krasnodarskogo kraya i respubliki Adygeya // Nauchnye trudy FGBNU SKZNIISiV. T. 9. Krasnodar: SKZNIISiV, 2016. S. 180-186.