
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 632.08:632.4 + 57.083.12

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *VENTURIA INAEQUALIS* ИЗ АСКОСПОР

© 2019 г. А. И. Насонов*

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, 350901 Краснодар, Россия

* E-mail: nasoan@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2018 г.

После доработки 10.05.2018 г.

Принята к публикации 29.05.2018 г.

Аскомицет *Venturia inaequalis* является возбудителем одной из самых экономически значимых болезней яблони. Выделение патогена в чистую культуру является важным этапом его популяционных исследований. Предложена модификация метода получения изолятов гриба из аскоспор, отличающаяся простотой и эффективностью. В качестве ловушки спор использовалась перевернутая вверх дном полистирольная чашка Петри с предварительно залитым 3–6-миллиметровым слоем 2%-го водного агара. Перезимовавший лист яблони закладывался в крышку чашки Петри выводными отверстиями псевдотеций вверх. Ловушка инкубировалась при комнатной температуре в течение 15 ч. Попадание аскоспор *V. inaequalis* на поверхность агара происходило за счет специфического механизма разгрузки аска, называемого водяной пушкой. Одиночные проросшие аскоспоры изолировали в новые чашки Петри. Используемая ловушка позволяла получать чистый инокулюм проросших аскоспор для дальнейшего моноспорового посева.

Ключевые слова: аскоспора, ловушка, парша яблони, псевдотеций, чистая культура, *Venturia inaequalis*

DOI: 10.1134/S0026364819010094

Выделение возбудителя парши яблони в чистую культуру является важным этапом популяционно-генетических исследований патогена. Достаточно сложный метод получения аскоспоровой культуры был описан американскими учеными в начале прошлого столетия. Он заключался в препарировании перитециев парши яблони с извлечением отдельных сумок, с последующим захватом аскоспор выделенного аска микрокапилляром (Keitt, Palmiter 1938; Keitt, Langford, 1941). Такой подход отвечал научным задачам того времени по изучению механизмов наследования отдельных признаков *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. В современных популяционных исследованиях требуется получение как можно большего количества изолятов вида. Оценка популяции патогенного гриба сразу после прохождения полового процесса (на аскоспоровой стадии) позволяет максимально оценить его разнообразие (Nasonov, Suprun, 2016). В этом случае необходим простой и хорошо воспроизводимый метод получения изолятов микромицета из аскоспор.

Относительно несложный подход для получения чистого инокулюма аскоспор в целом для сумоспоровых аскомицетов был описан в справочнике “Методы экспериментальной микологии” (Bilay, 1982). Внутри чашки Петри вкладывалась культуральная чашка меньшего размера или стек-

лянные палочки, на которую/которые помещался лист отверстиями плодовых тел вниз. После инкубирования ловушки в течении 3 ч и более дно большой чашки микроскопировали под стереомикроскопом для поиска и переноса спор на питательный агар. Существенным недостатком данной методики является расположение собирающей поверхности под листом, что приводит к случайному заносу нецелевых спор других микроорганизмов путем осыпания. В недавно предложенном методе получения аскоспоровой культуры парши яблони (Nasonov et al., 2016) данный недостаток был преодолен помещением листа прошлогоднего опада отверстиями перитециев вверх в чашке Петри в условиях влажной камеры. Ловчей поверхностью выступала нижняя сторона предметного стекла, помещенного над дезинфицированным листовым опадом на стеклянные палочки. Метод включал этапы посева вазелина с поверхности предметного стекла в чашку Петри с водным агаром и перенесение единичных проросших аскоспор на питательный агар. Предложенный авторами метод основан на баллистическом механизме эмиссии аскоспор псевдотециями *V. inaequalis*. Он позволяет получать чистый инокулюм аскоспор для моноспорового посева, но требует более чем двое суток.

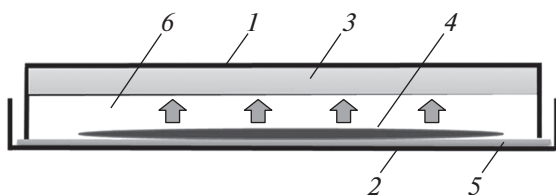


Рис. 1. Схема спороловушки: 1 — дно чашки Петри; 2 — верхняя створка чашки Петри; 3 — 2%-й водный агар; 4 — лист опада яблони; 5 — фильтровальная бумага; 6 — внутреннее пространство чашки Петри. Широкие стрелками показано направление движения аскоспор внутри спороловушки.

Предлагается модификация вышеописанной методики, которая позволяет значительно ее упростить и снизить времязатратность. Принцип новой ловушки очень прост и исключает установку ловчего предметного стекла, сочетая сразу все этапы предыдущего подхода в одном. Чашку Петри 90 мм диам. с предварительно залитым 2%-м водным агаром переворачивают вверх дном. Толщина агара составляет 3–6 мм — так, чтобы расстояние между листом с псевдотециями и поверхностью агара в полистирольной чашке Петри оказывалось 7–10 мм. В крышку перевернутой чашки Петри 90 мм диам. закладывают стерильный смоченный дистиллированной водой лист фильтровальной бумаги, например марки “Белая” или “Желтая лента”. На фильтровальную бумагу помещают хорошо промытый в проточной водопроводной воде и дезинфицированный лист опада яблони с созревшими псевдотециями гриба (рис. 1). Листья дезинфицируют 10 с в 70%-м растворе спирта, затем 10 с в 3%-м растворе перекиси водорода и промывают в стерильной дистиллированной воде. Выводные отверстия плодовых тел должны быть ориентированы вверх. Определение их положения относительно нижней или верхней стороны листа может осуществляться микроскопированием при малом увеличении стереомикроскопа, либо закладкой двух частей одного листа разными сторонами вверх.

Ловушку инкубируют при комнатной температуре в течение ночи (около 15 ч), после чего снимают нижнюю часть чашки Петри, переворачивают и микроскопируют поверхность водного агара при малом увеличении стереомикроскопа (40×). Проросшие одиночные аскоспоры вырезают вместе с агаровым блоком и переносят на питательный агар.

Данная методика была апробирована при получении 50 моноспоровых изолятов *V. inaequalis* и показала свою высокую эффективность. Методика практически исключает контаминацию спорового материала пропагулами других грибов, а также бак-

терий или их пассивный занос под действием сил гравитации. Попадание аскоспор *V. inaequalis* на поверхность агара происходит за счет специфического механизма разгрузки аска, называемого водяной пушкой, позволяющего выбрасывать споры под давлением на высоту 5–13 мм (Aylor, Anagnostakis, 1991), а по некоторым данным — до 50 мм (Fedorova, 1977). Разгрузка асков может происходить в течение суток (Fedorova, 1977). Попадание аскоспор на поверхность агара запускает процесс их прорастания. Оптимальной для прорастания аскоспор является температура 15–25°C. При этих значениях прорастание начинается через 2–3 часа (Louw, 1948; Boric, 1985).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aylor D.E., Anagnostakis S.L. Active discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. 1991. V. 81. P. 548–551.
- Bilay V.I. (ed.). *Methods of experimental mycology*. Naukova Dumka, Kyev, 1982 (in Russ.).
- Boric B. Influence of temperature on germability of spores of *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, and their viability as affected by age. *Zast Bilja*. 1985. V. 36. P. 295–302.
- Fedorova R.N. Apple scab. *Kolos*, Leningrad, 1977 (in Russ.).
- Keitt G.W., Langford M.H. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies. *Amer. J. Bot.* 1941. V. 28 (9). P. 805–820.
- Keitt G.W., Palmiter D.H. Heterothallism and variability in *Venturia inaequalis*. *Amer. J. Bot.* 1938. V. 25 (5). P. 338–345.
- Louw A.J. The germination and longevity of spores of the apple-scab fungus, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Union S. Afric. Sci. Bull.* 1948. V. 285. P. 19.
- Nasonov A.I., Suprun I.I. Use monoascosporic isolates in population studies *Venturia inaequalis*. In: *Modern solutions in the development of agricultural science and production*. Krasnodar, 2016. P. 124–128 (in Russ.).
- Nasonov A.I., Yakuba G.V., Suprun I.I. Obtaining of *Venturia inaequalis* ascospore culture under laboratory conditions. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2016. V. 50 (2). P. 130–131 (in Russ.).
- Билай В.И. (ред.) (Bilay) *Методы экспериментальной микологии*. Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.
- Насонов А.И., Сунрун И.И. (Nasonov, Suprun) Использование моноаскоспоровых изолятов в популяционных исследованиях *Venturia inaequalis*. *Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства: Международный саммит молодых ученых: материалы конф.* Краснодар, 2016. С. 124–128.
- Насонов А.И., Якуба Г.В., Сунрун И.И. (Nasonov et al.) Получение аскоспоровой культуры гриба *Venturia inaequalis* в лабораторных условиях // *Микология и фитопатология*. 2016. Т. 5. Вып. 2. С. 131–132.
- Федорова Р.Н. (Fedorova) Парша яблони. Л.: Колос, 1977. 64 с.

New Method of Producing of *Venturia inaequalis* Culture from Ascospores

A. I. Nasonov[#]

North-Caucasian Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia

[#] *E-mail: nasoan@mail.ru*

Ascomycete *Venturia inaequalis* is a causal agent of one of the most economically significant apple diseases. The isolation of the pathogen into a pure culture is an important stage in its population studies. A modification of a method for obtaining fungal isolates from ascospores is proposed, which is distinguished by its simplicity and efficiency. A polystyrene Petri dish turned upside down with pre-cast layer of 3–6 mm 2% water agar was used as a spore trap. An overwintered apple leaf was placed in the lid of the Petri dish with the opening holes of pseudothecia upwards. The trap was incubated at room temperature for 15 hours. *V. inaequalis* ascospores appeared on the agar surface due to a specific mechanism of ascus discharge, called the water cannon. The trap used made it possible to obtain pure inoculum of germinated ascospores for further monosporous sowing.

Key words: apple scab, ascospores, pseudothecia, pure culture, trap, *Venturia inaequalis*