

УДК 581.821:581.47:582.734.3

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСКУЛЬПТУРЫ И МИКОБИОТЫ ПОВЕРХНОСТИ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ПРИ СОЗРЕВАНИИ И ХРАНЕНИИ

Т.Х. КУМАХОВА¹, О.О. БЕЛОШАПКИНА¹, А.В. БАБОША², А.С. РЯБЧЕНКО²

¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева,

² Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН)

Методами сканирующей электронной и конфокальной флуоресцентной микроскопии изучены ультраструктура и микобиота поверхности плодов яблони на стадии созревания и в ходе хранения. Показано, что на поверхности зрелых плодов яблони формируются отложения кутикулярного покрова и эпикутикулярного воска, имеющие сортовую специфичность. На более ранних этапах развития плодов обнаруживаются устьица, а на более поздних — чечевички; в кутикуле плодов ряда сортов в ходе созревания, а у других и при хранении образуются микротрещины, иногда доходящие до наружных тангенциальных стенок эпидермы, со специфическим составом патогенной и сапротрофной микобиоты. Выявлены на поверхности плодов гифы грибов и споры разного диаметра, наличие которых слабо коррелирует с состоянием плодов и способностью к длительному хранению. В связи с этим в работе обсуждается возможная взаимосвязь особенностей ультраструктуры поверхности со степенью устойчивости плодов к фитопатогенным грибам.

Ключевые слова: плоды яблони, электронная микроскопия, ультраструктура, кутикула, микобиота, мицелий, парша.

Как известно, ухудшение качества и большие потери урожая плодовых культур могут быть вызваны как неинфекционными заболеваниями, причинами которых являются абиотические факторы, так и инфекционными, вызванными патогенными микроорганизмами. При этом некоторые инфекционные болезни начинают поражать плоды еще в период формирования, другие подключаются на стадии их созревания, при уборке, транспортировке или непосредственно в ходе хранения. Продукты метаболизма сапротрофных микроорганизмов могут оказывать повреждающее действие, усиливать физиологические расстройства, особенно при нарушении режима хранения. Впоследствии на их фоне очень часто начинают прогрессировать инфекционные болезни, в основном микозы и бактериозы. С другой стороны, выделения некоторых микромицетов-антагонистов оказывают ингибирующее действие на патогенов.

Как нам представляется, эффективность прогнозирования потерь плодов в ходе созревания и в период хранения, а также защитных мероприятий, направлен-

ных на их снижение, во многом определяется достоверной информацией о видовом составе микобиоты, ее изменениях с течением времени. Поэтому исследование поверхности репродуктивных органов плодовых культур в настоящее время относят к числу приоритетных направлений, как структурной ботаники, так и практической физиологии и фитопатологии, поскольку оно может служить источником информации о характере их устойчивости к различным неблагоприятным воздействиям внешней среды. Материалы подобных исследований представляют особый интерес при оценке физиологического состояния и выявлении биологических повреждений растений, определении темпов и стадий развития патогенов.

Знание особенностей строения таких поверхностных структур, как кутикулярный покров и эпикутикулярный воск, граничащих непосредственно с внешней средой, имеет немаловажное значение в практике сельского хозяйства [5]. Именно особенности строения этих структур в значительной мере определяют такие свойства плодов, как устойчивость к патогенным грибам и их лежкость.

Одним из первых исследователей строения «кожуры» семечковых культур был А. Zschokke (1897). Изучив ее роль в сопротивлении грибным заболеваниям, он выделил два типа устойчивости к развитию гнилостных грибов и естественному отмиранию клеток: 1) устойчивость, основанная на анатомическом строении «кожуры», против механических повреждений и грибной инфекции; 2) устойчивость, связанная с химическим составом клеточного сока. Описав строение кутикулы, кутикулярных слоев, глубину кутинизации, а также различия в их строении у разных сортов, он не обратил внимания на колленхимоподобные субэпидермальные клетки, называемые в современной ботанической литературе «гиподермой», являющейся важной защитной тканью [6, 12].

К настоящему времени в достаточной мере изучены вопросы селекции и химической защиты яблони от болезней [2, 4, 10, 11, 13], а также биохимии, анатомии и ультраструктуры плодов яблони [7-9 и др.]. Взаимосвязь особенностей тонкого строения поверхностных тканей и микобиоты плодов, в частности яблочек, остается малоизученной, и в литературе имеются лишь фрагментарные данные.

В последние годы в современных биологических исследованиях широко используются сканирующая электронная (СЭМ) и конфокальная микроскопия (КМ), преимуществами которых являются высокая разрешающая способность и небольшие препаративные затраты. Поскольку значительная часть жизненного цикла многих фитопатогенных и сапротрофных грибов: прорастание, дифференциация инфекционных структур, образование мицелия — проходит на поверхности покровных тканей, она доступна для наблюдения в сканирующем электронном микроскопе.

Целью данной работы было исследование с применением электронной и конфокальной микроскопии ультраскульптуры поверхности плодов разных сортов яблони и развития грибных микроорганизмов в период созревания и хранения.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были плоды пяти сортов яблони (Мелба, Ренет Симиренко, Алеся, Вербное, Память Сюбарова), произрастающих в Кабардино-Балкарии на разных высотах (300, 600 м над у.м.) и в Мичуринском саду РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Исследования проводили на базе лаборатории экологической физиологии и иммунитета растений ГБС имени Н.В. Цицина РАН.

Материал отбирали в конце июля и начале августа из средней части кроны трех модельных деревьев. Плоды изучали непосредственно в ходе созревания

и после хранения 2-6 мес. в холодильной камере при температуре +2°C. Пробы брали в области экватора и плодоножки плода, а также из пораженных паршой участков. Образцы помещали на столик замораживающей приставки «Deben CoolStage» (метод криоСЭМ), предварительно покрытый слоем терморасты, охлаждали до -30 С, а затем просматривали в режиме высокого вакуума с использованием сканирующего электронного микроскопа (LEO-1430 VP, Carl Zeiss, Германия). Для получения изображения использовали сигналы 4QBSD — 4-квadrантного полупроводникового детектора обратно рассеянных электронов с ускоряющим напряжением 20 kV и рабочим расстоянием 10 мм. Более детальное изучение ультраскульптуры поверхности плодов проводили на образцах, напыленных золотом в камере вакуумной ионно-распылительной установки. Автофлуоресценцию поверхностных структур плодов исследовали с использованием конфокального микроскопа *Olympus FV1000D* при возбуждении светом 405, 473 и 560 нм.

Микробиологический анализ фрагментов кожуры яблок проводили с использованием универсальной искусственной питательной среды КГА. Таксономическую принадлежность полученных грибов уточняли методом микроскопирования (МБС).

Диаметр гиф определяли на цифровых фотографиях при помощи программы Image J. Расчеты проводили в программе Excel.

Результаты и их обсуждение

Модельными объектами для описания особенностей ультраскульптуры и микобиоты были выбраны плоды двух сортов с разными сроками созревания, являющиеся неустойчивыми по отношению к парше: Мелба и Ренет Симиренко.

Сорт Мелба. Покровную тканью зрелых плодов является эпидерма, состоящая из собственно эпидермальных клеток и клеток устьиц (рис. 1, А, Б). При исследовании методом СЭМ на поверхности эпидермы наблюдали кутикулу, покрытую слоем воска в виде зернышек (рис. 1 А). На разных участках поверхности плода отмечены различия в деталях строения и характере отложений кутикулы и воска. Обнаружены участки, где кутикула довольно рыхлая и слоистая; обычно в этих местах воска было значительно меньше. Другая часть поверхности была покрыта отдельными крупными кутикулярными пластинами, на которых также неравномерно расположены восковые гранулы. Устьица немногочисленные, имеют строение, характер-

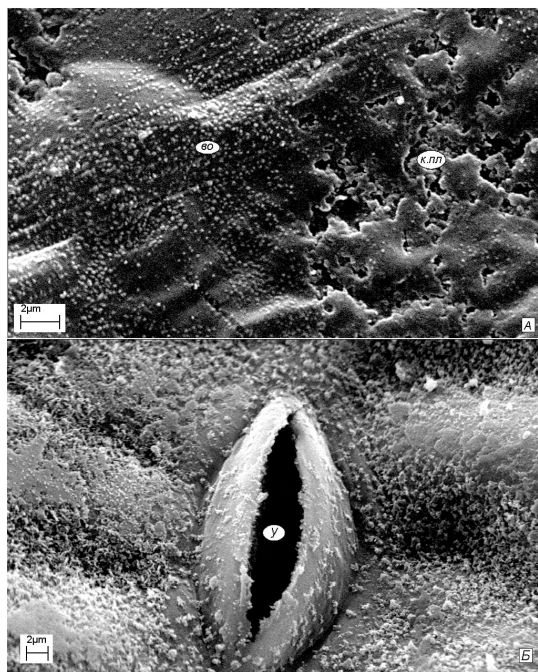


Рис. 1. Фрагменты поверхности плода яблони сорта Мелба: А — общий вид поверхности с восковыми гранулами и кутикулярными пластинами; Б — устьица (СЭМ-микрографии). Обозначения: во — восковые отложения; к.пл — кутикулярные пластины; у — устьица; ч — чечевичка

ное для большинства покрытосеменных растений (рис. 1 Б). Они состоят из двух замыкающих бобовидной формы клеток, связанных друг с другом на концах. Средние части замыкающих клеток отделены друг от друга щелью. Замыкающие клетки устьиц слегка приподняты над поверхностью и так же, как и другие участки поверхности, покрыты восковыми гранулами. По мере исчезновения волосков и устьиц в ходе созревания плодов происходит формирование чечевичек, которые, по-видимому, принимают на себя функцию газообмена.

Известно, что при поражении паршой (телиоморфа возбудителя *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., анаморфа — *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fusk.) плоды яблоны значительно теряют товарные качества и лежкость при хранении [3]. При этом на плодах образуются округлые, резко очерченные черно-серые пятна, часто с оливково-черным налетом спороношения; вокруг пятна обычно заметен светлосерый ободок, возникший в результате разрыва ткани. Под пятном формируется буроватый пробковый слой, глубже которого гриб не проникает. Споры (конидии) возбудителя парши яблоны *F. dendriticum* обратнобулавовидные, реже яйцевидные, одно- и двухклеточные 13-30 x 6-12 мкм, образуются по одной на коротких конидиеносцах с 1-2 перегородками. Гифы пробуравливают «кожицу» яблока и проникают внутрь тканей, развиваясь между эпидермой и клетками субэпидермального слоя, редко используя устьица или механические повреждения.

В наших исследованиях в кутикуле зрелых плодов перед закладкой на хранение отмечали микротрещины с конидиями гриба — возбудителя парши (рис. 2, А-В).

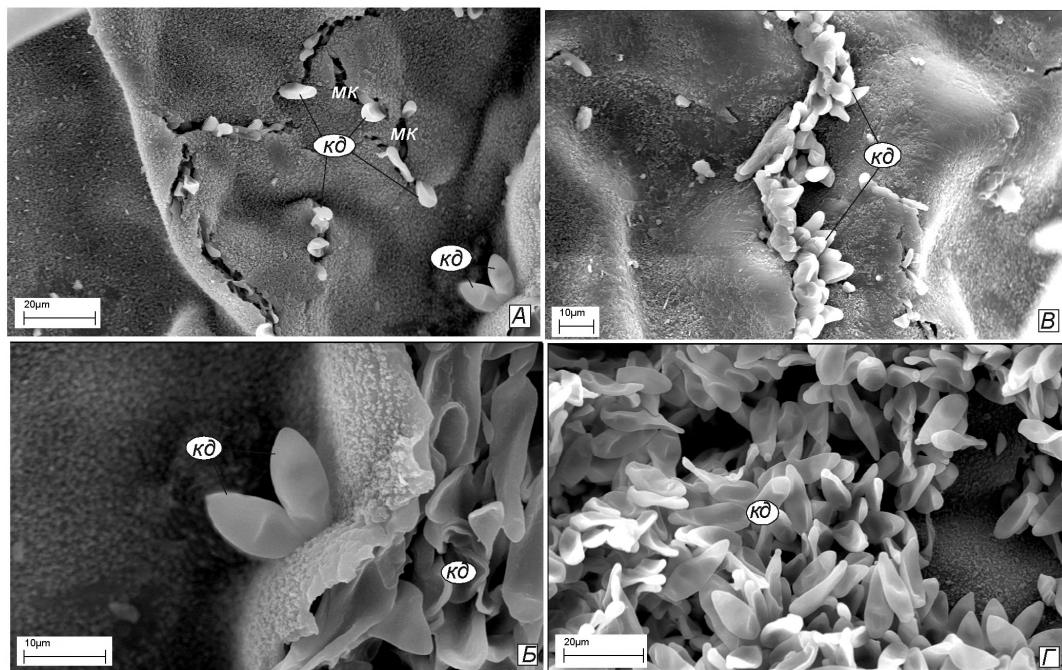


Рис. 2. Фрагменты поверхности плода с конидиями возбудителя парши *F. dendriticum* (СЭМ-микрографии): А-В — микротрещины в кутикуле с конидиями перед хранением; Г — участок с многочисленными конидиями в ходе хранения. *Обозначения:* кд — конидии; мк — микротрещины

На некоторых поврежденных участках поверхности плодов конидии встречались в большом количестве. Иногда микротрещины сливались друг с другом и образовывали сплошную сетку, полностью покрытую конидиями (рис. 2 Г).

В послелуборочный период и при хранении плодов в области плодоножек обнаруживали многочисленные гифы возбудителя парши (рис. 3, А, Б).

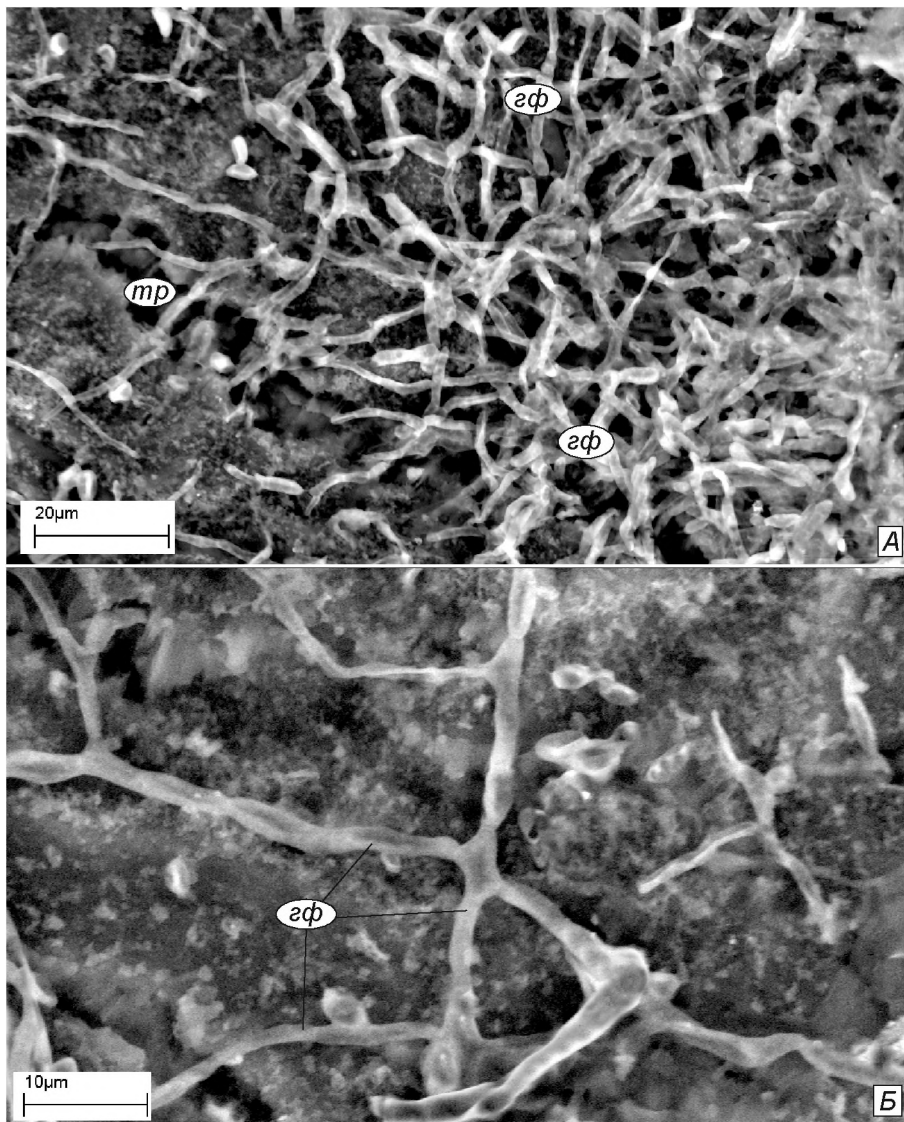


Рис. 3. Фрагменты поверхности плода в области плодоножки сорта Мелба после хранения: А — общий вид скоплений гиф (толщина 1,4-1,8 мкм) гриба (*V. inaequalis* (Cooke) Wint.) (СЭМ-микрорафии); Б — гифы (толщина 1,5-3 мкм) в кутикулярных трещинах (5 мкм). Обозначения: гф — гифы; тр — трещина

Кроме того, наблюдали большое количество грибных гиф различной толщины. Измерения показали, что трещины в кутикуле заселены преимущественно грибами с тонкими (1,1-1,3 мкм) гифами (рис. 4).

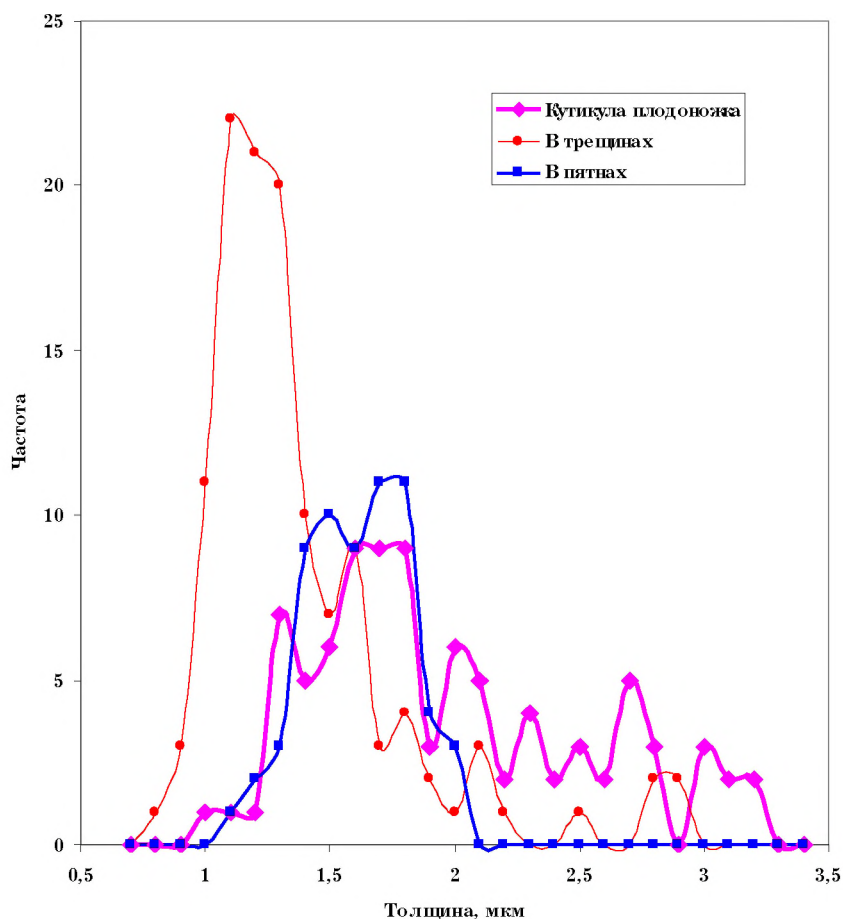


Рис. 4. Гистограмма распределения гиф по толщине в различных участках поверхности зрелых плодов яблоки сорта Мелба

Здесь же в области пятен расположены скопления мицелия, образуемые гифами средней толщины (1,4-1,8 мкм). Вне этих скоплений и мелких трещин, помимо упомянутых тонких и средних, наблюдали более толстые гифы толщиной 2-3 мкм. Такие гифы обнаружены и в широких (до 80 мкм) трещинах, причем здесь они были продолжением мицелия, расположенного преимущественно на неповрежденной кутикуле вне трещины. В экваториальной части плодов в местах без видимого поражения грибных гиф обнаружено не было. Иногда встречались пятна черного цвета диаметром около 2 мм с нарушенным внешним покровом и остатками отмерших гиф и конидий. Вблизи от этих пятен на неповрежденной кутикуле вне мелких тре-

ттин (7-10 мкм) наблюдали гифы тех же двух размерных групп: тонкие — 1-1,2 мкм и средней толщины — 1,5-2,7 мкм. В экваториальной части поверхности плодов отмечены также сходные с чечевичками структуры размером 300-600 мкм округло-треугольной формы, иногда возвышающиеся с разрывом кутикулы в двух перпендикулярных направлениях. На проглядывающих через разрыв тканях перикарпия заметны были гифы толщиной 1—1,2 мкм.

Сорт Ренет Симиреико. Поверхность эпидермы плодов сильно кутинизирована, покрыта мощным восковым покровом (рис. 5, А-Ж).

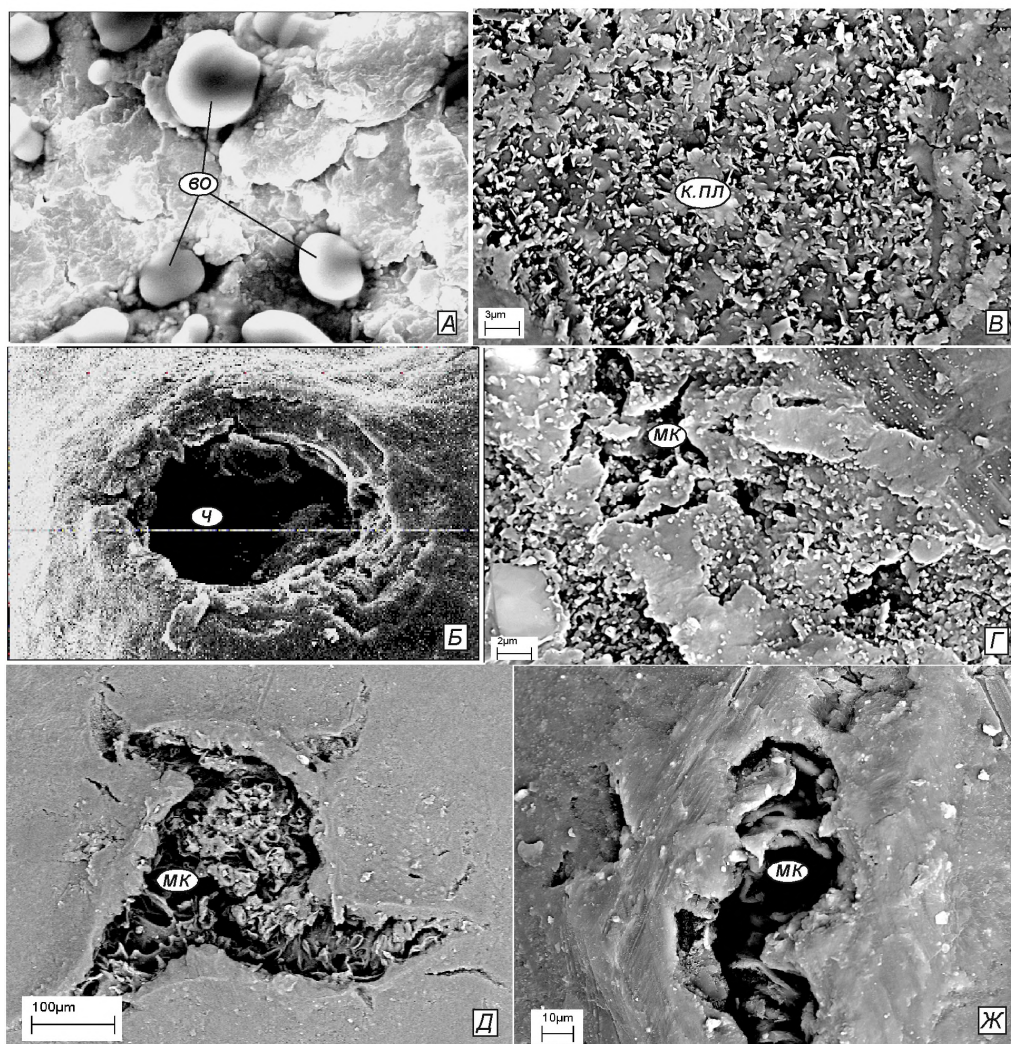


Рис. 5. Фрагменты поверхности плодов яблоки сорта Ренет Симиреико в ходе созревания и хранения (СЭМ-микрографии): А — восковые отложения; Б — чечевичка; В, Г — общий вид поверхности и участок с микротрещинами в кутикуле в ходе хранения; Д, Ж — микротрещины в кутикуле в середине хранения. *Обозначения:* во — восковые отложения; к.пл — кутикулярные пластины; МК — микротрещины; ч — чечевичка

Восковые отложения представлены либо пластинами, либо отдельными плотными образованиями округлой формы (рис. 5 А). Наличие мощного воскового покрова затрудняет обнаружение устьиц. Часто устьичные щели замыкающих клеток полностью забиты мощными наплывами воска и кутикулы. Наряду с этим особенностью плодов является интенсивное формирование чечевичек (рис. 5 Б). На СЭМ-микрографиях чечевички представляют собой слегка приподнятые над поверхностью структуры, «отверстия» которых проходят в глубжележащие ткани. В отличие от плодов сорта Мелба, на поверхности зрелых плодов сорта Ренет Симиренко перед закладкой на хранение конидии и мицелий грибов не были обнаружены. В ходе хранения плодов характер восковых отложений постепенно изменялся и в кутикуле появлялись микротрещины (рис. 5, В-Ж).



Рис. 6. Фото колоний грибов, выделенных с поверхности яблок сорта Ренет Симиренко на питательной среде (КГА) после 6 мес. хранения

круглых спорангиях — спорангиоспоры 6-15 мкм, округлые и угловатые с толстой складчатой сероватой оболочкой) фактически не повлияли на товарные и вкусовые свойства, а также лежкость плодов. В незначительных количествах были выявлены грибы *Rhizoctonia* sp.; при использовании СЭМ их присутствие, с большой долей вероятности, было выявлено по характерному ветвлению, толщине гиф и отсутствию спороношения.

Грибы рода *Fusarium* sp. могут вызывать фузариозную гниль плодов. Однако среди представителей этого рода достаточно много сапротрофных видов, есть и антагонисты патогенов. В наших исследованиях, вероятно, мы обнаружили именно их, так как, несмотря на наличие мицелия и спороношения, подтвержденного микробиологическим методом, поражения плодов не отмечено.

С большой долей вероятности это также справедливо и к выявленным грибам рода *Penicillium* sp. Заражение этим грибом происходит через механические повреждения и чечевички обычно в период транспортировки и хранения плодов. Сорт Ренет Симиренко восприимчив к нему. Гриб способен образовывать конидии

К концу хранения (через 6 мес.) наблюдали значительное снижение тургора плодов; на кожуре отмечали локальные, разной формы потемневшие участки бурого и светло-коричневого цвета; мелкие, до 1 мм, сухие черные некрозы; кольцевые, слегка вдавленные, более темного цвета, чем кожура, пятна; присутствовал запах выделяющегося этилена.

На искусственной питательной среде были выделены колонии различных грибов и бактерий (рис. 6, таблица).

Выделенные на питательной среде грибы родов *Alternaria* (в основном с коричнево-оливковыми крупными — 30-50 и 14-18 мкм — конидиями с 3-6 поперечными и 1-3 продольными перегородками, перетяжками и заостренным одним концом конидиями) и *Rhizopus* (в черных мелких

**Видовой состав микроорганизмов, обнаруженных
на поверхности яблок сортов Мелба и Ренет Симиренко**

Микроорганизмы, их систематическое положение	Частота встречаемости, %		Описание колоний
	Мелба	Ренет Симиренко	
<i>Fusicladium dendriticum</i> (грибы отдела Аскомицеты)	48	—	Светло-серые
<i>Alternaria</i> sp.(грибы отдела Дейтеромицеты)	17	30	Серо-бурые, оливково-черные
<i>Fusarium</i> sp. (грибы отдела Дейтеромицеты)	20	19	Розово-красноватые, белые, желтоватые
<i>Penicillium</i> sp. (грибы отдела Дейтеромицеты)	4	19	Голубовато-зеленоватые
<i>Rhizoctonia</i> sp.(грибы отдела Дейтеромицеты)	—	8	Буро-серо-коричневые
<i>Rhizopus</i> sp.(грибы отдела Зигомицеты)	7	12	Белые с черными головками (спорангиями)
Истинные бактерии	14	12	Слизистые белые

при +2°C, они одноклеточные, бесцветные, округлые, реже шаровидные, мелкие — 2-5 мкм.

Исследуя поверхность плодов в середине и конце хранения с помощью конфокального микроскопа, мы обнаружили картины проникновения и прорастания мицелия грибов в ткани перикарпия через чечевички (рис. 7, А, Б). В некоторых участках поверхности полости чечевички были полностью забиты многочисленными гифами мицелия (рис. 7 Б).

На конфокальных микрографиях хорошо видно, что клеточные стенки гиф интенсивно флуоресцировали в синей части спектра, благодаря чему они хорошо выделяются на фоне остальных клеток, флуоресцирующих преимущественно в желто-коричневой и красной области.

С помощью СЭМ на заключительном этапе хранения в области плодоножки отмечали трещины разных размеров с многочисленными гифами и спорами разных грибов (рис. 8, А, Б; 9, А, Б).

Результаты количественных измерений гиф на различных участках поверхности плодов в конце хранения представлены на рисунке 10. Согласно этим данным, подавляющее большинство гиф — тонкие (0,8-1,2 мкм); присутствуют гифы средней величины (1,5-2,5) и крупные (толщиной 3-3,2); также обнаруживаются и более толстые гифы (3,6-4 мкм). Следует отметить, что выявленные в конце хранения гифы — тех же достаточно хорошо разграниченных диапазонов толщины, что были отмечены на плоде сорта Мелба до хранения. При этом распределение гиф различалось у разных плодов и в зависимости от места отбора пробы.

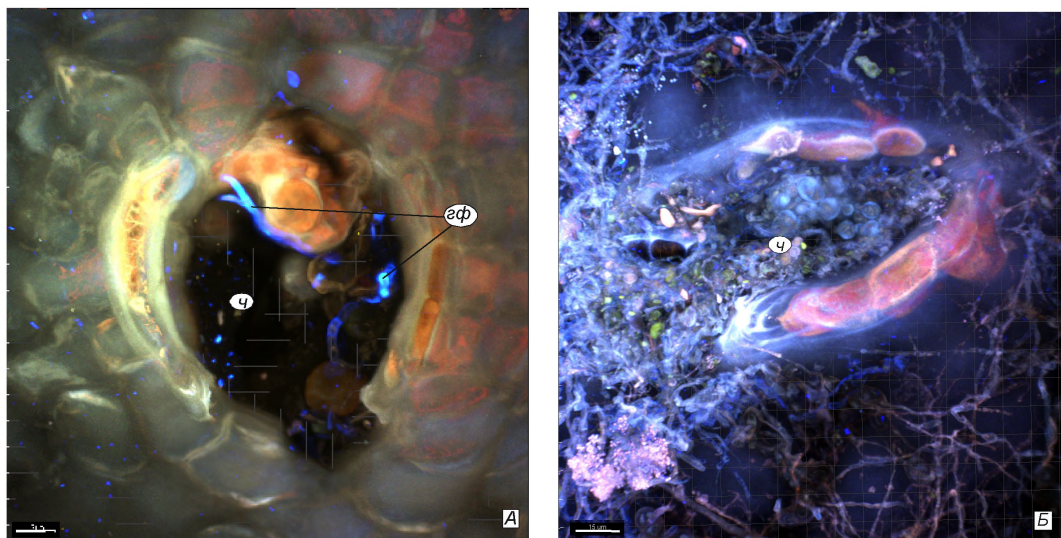


Рис. 7. Поверхность плода сорта Ренет Симиренко в области чечевички при хранении (КМ-микрографии): А — картина прорастания гиф мицелия грибов в середине хранения; Б — полость чечевички, забитая многочисленными гифами мицелия в конце хранения. *Обозначения:* *gf* — гифы мицелия; *ч* — чечевичка

Полученные данные не позволяют выявить закономерность соотношения долей гиф разных размеров в разных локализациях, поскольку распространение их на поверхности плодов крайне неравномерное. Однако присутствие разных размерных диапазонов достаточно очевидно, что свидетельствует об ограниченном составе микобиоты, представленном главным образом тремя или четырьмя разновидностями.

Чаще всего на плодах встречались гифы больших и средних размеров, которые располагались плотно друг к другу, образуя крупные скопления или пятна неправильной формы. Наблюдали также крупные и мелкие округлые пятна. Еще более плотные переплетения гиф со сходными параметрами наблюдали в области мелких (до 1-2 мм) темных пятен на поверхности кутикулы вне трещин в районе плодоножки. Подавляющее большинство гиф в районе трещин имели толщину от 1,8 до 2,2 мкм. В зависимости от ширины трещин толщина преобладающих гиф изменялась, что, вероятно, отражает различие видового состава микобиоты. Широкие трещины от 30 до 100 мкм в области плодоножки в основном зарастали гифами с толщиной от 1,3 до 3,4 мкм (рис. 9). В узких трещинах шириной до 10-20 мкм, которые встречались реже, преобладали более крупные гифы толщиной 2,4-4,7 мкм и конидии 5,1-6,2 мкм. Возможно, это свидетельствует о разных временных рамках и разной природе возникновения трещин на поверхности кутикулы плодов.

Аналогичные картины ультраскульптуры поверхности плодов в ходе созревания и хранения были получены при исследовании других сортов (Алеся, Вербное, Память Сюбарова), относительно устойчивых к парше. На поверхности плодов этих сортов перед закладкой на хранение также обнаружены трещины разных размеров (20-200 мкм), но без грибной составляющей (рис. 11, А, Г).

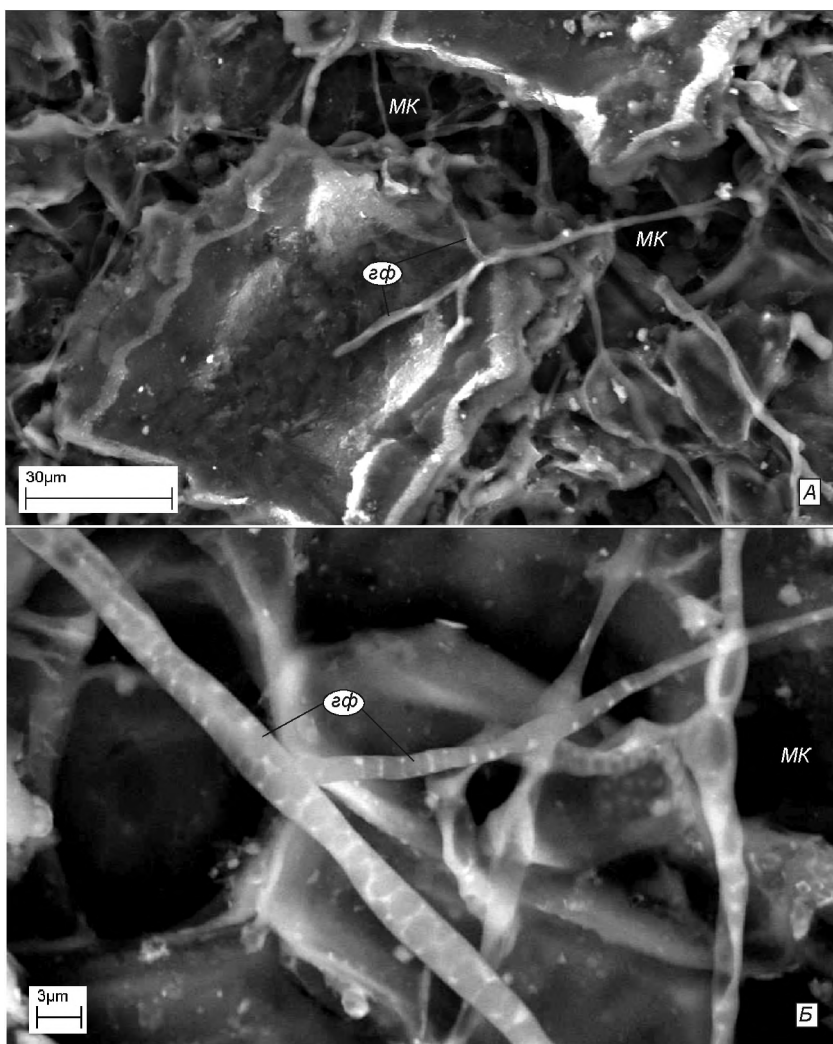


Рис. 8. Фрагменты поверхности в области плодоножки плода сорта Ренет Симиренко через 6 мес. хранения (СЭМ-микрографии): А -микротрещины с многочисленными гифами грибов; Б — гифы, предположительно гриба *Rhizoctonia* sp. Обозначения: гф — гифы; МК— микротрещины

После 6 мес. хранения восковые отложения на поверхности плодов тоже рыхлые, представлены отдельными пластинами в виде чешуй (рис. 11 Б). В этот период в зоне микротрещин обнаруживалась многочисленная микобиота (рис. 11В). Основная масса гиф имела толщину 2,7-3,1 мкм (рис. 12).

В некоторых трещинах наблюдали конидии (3,5-6,0 мкм) и хорошо сформированный мицелий грибов из довольно плотных многочисленных сплетений гиф.

Характер ультраскульптуры поверхности зрелых плодов сорта Память Сударова и в ходе хранения отражен на рисунках 13, А-Г; 14, А-Б. На поверхности

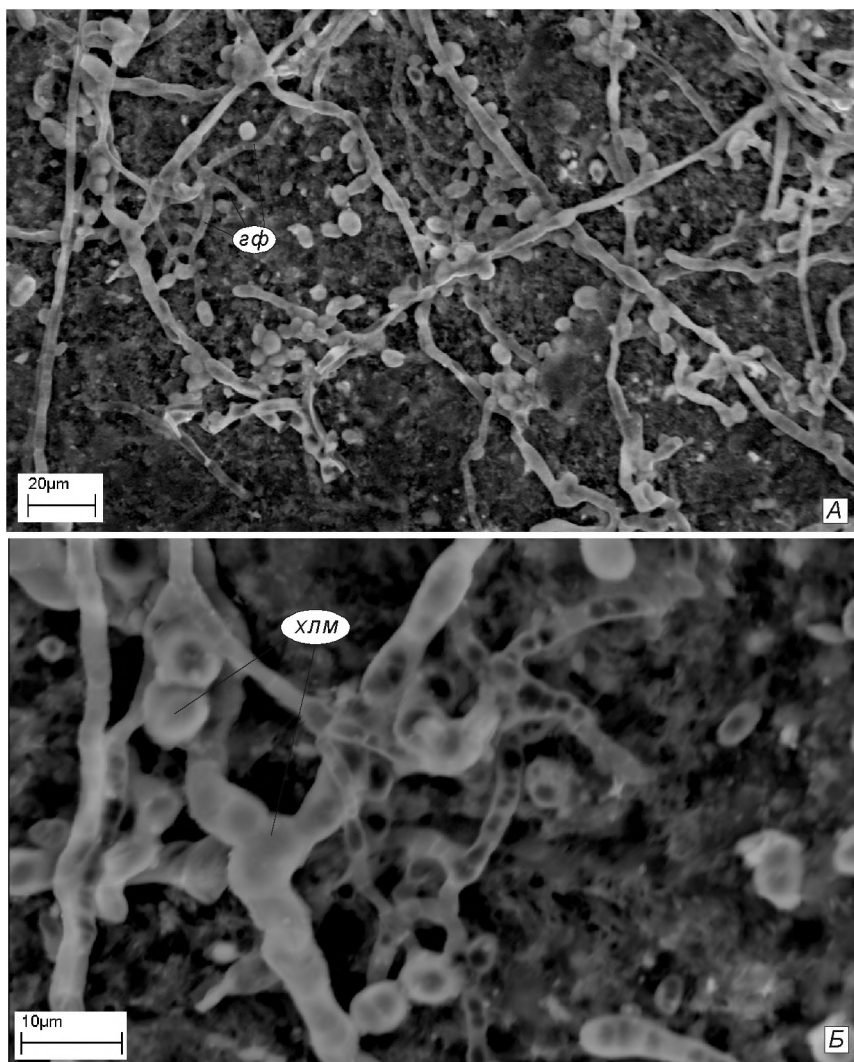


Рис. 9. Фрагменты поверхности плода яблони сорта Ренет Симиренко в конце хранения (СЭМ-микрографии): А — общий вид поверхности с конидиями и хламидоспорами; Б — участок в увеличенном виде. Обозначения: гф — гифы; хлм — хламидоспора

плодов перед закладкой на хранение отмечены трещины 2-100 мкм без присутствия каких-либо грибов (рис. 13 А).

После хранения в течение 6 мес. в трещинах кутикулы обнаруживается мицелий грибов, подчиняющийся закономерностям, описанным выше. Чаше встречаются гифы толщиной 3,1-3,3 мкм. Кроме мицелия, диаметр гиф которого в пределах 2-3

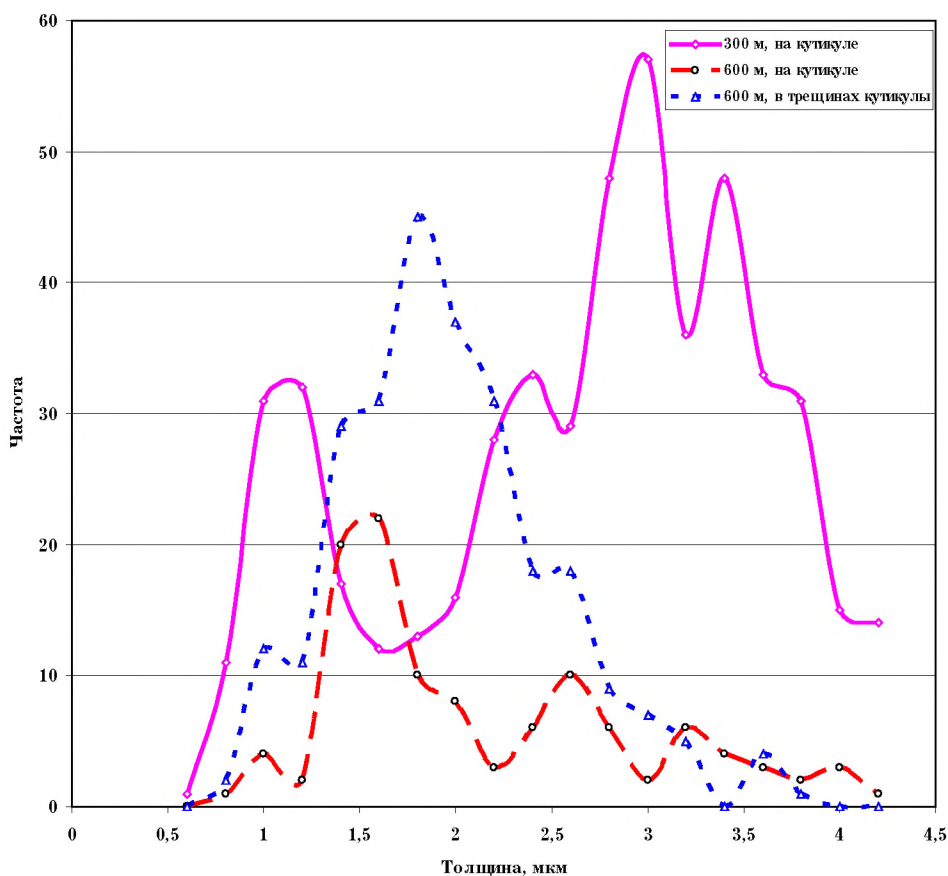


Рис. 10. Гистограмма распределения гиф по толщине в различных местах поверхности плодов яблоки сорта Ренет Симиренко после 6 мес. хранения

мкм, в кутикулярных трещинах отмечали наличие многочисленных одноклеточных округлых конидий размером 3,5-6,0 мкм.

Методом конфокальной микроскопии гифы грибов также обнаруживали и в полости чечевичек плодов сорта Память Сюбарова (рис. 14, А-В). При этом гифальные клеточные стенки обладали интенсивной флуоресценцией в синей части спектра, благодаря чему они хорошо выделялись на фоне составляющих чечевички клеток, флуоресцирующих преимущественно в желтой и красной области.

Согласно полученным данным, можно предположить, что устьица, чечевички и микротрещины представляют собой наиболее уязвимые места поверхности плода, через которые грибная инфекция прорастает в ткани перикарпия. Следует отметить, что грибные гифы на поверхности и в полости чечевичек наблюдали у плодов, сохранивших хороший товарный вид (рис. 14, А, Б). По-видимому, наблюдаемый нами мицелий относится к видам грибов, не обладающих патогенными свойствами [14].

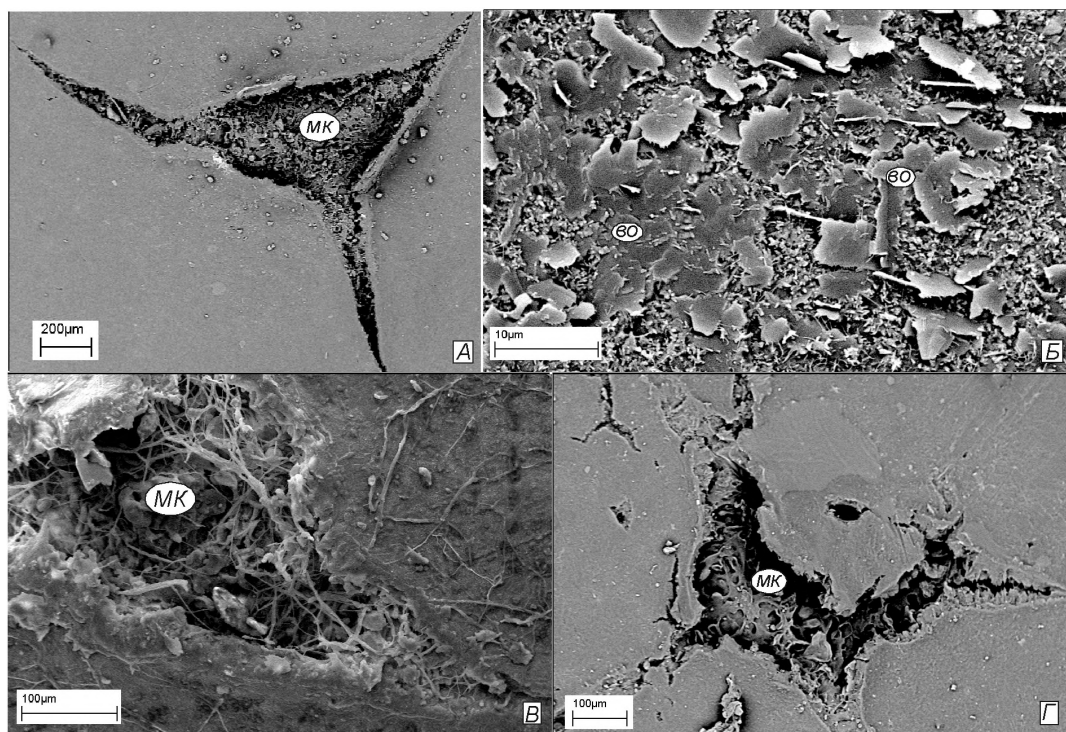


Рис. 11. Фрагменты поверхности плодов яблони сортов (А-В) Алеся и (Г) Вербное (СЭМ-микрографии): А — общий вид микротрещины в кутикуле зрелых яблок; Б — восковые отложения на поверхности плодов в ходе хранения; В — общий вид микротрещины в кутикуле с многочисленными гифами сапротрофов в конце хранения плодов; Г — общий вид микротрещины в кутикуле плодов перед закладкой на хранение. *Обозначения:* во — восковые отложения; мк — микротрещина

Вместе с тем наличие сапрофитной микробиоты может служить индикатором состояния плодов, их способности к длительному хранению. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимы более детальные дополнительные исследования.

Кроме того, метаболиты ряда грибов-антагонистов обладают способностью индуцировать устойчивость к патогенам, ингибируя прорастание и развитие их спор, а также могут запускать каскад неспецифических защитных механизмов. Как известно, фенольные соединения составляют основу фитонцидов и фитоалексинов — важнейших факторов пассивного и активного иммунитета растений. Эти же соединения являются компонентом продуктов метаболизма, определяющих отношения в системе микроорганизмов «патоген-антагонист» [15]. Продукты окисления фенолов могут локализовать очаг инфекции, защитить от вторичного заражения и распространения. Некоторые фенольные соединения способны помимо химических барьеров образовывать и механические — путем увеличения синтеза суберина и лигнина. Отдельные сорта яблони даже в период хранения могут синтезировать суберин, что приводит к опробковению раневых поверхностей и защите тканей [1, 7].

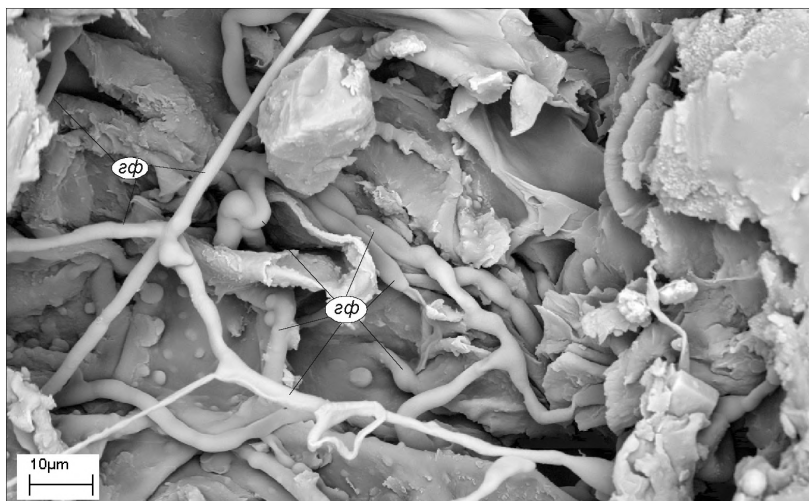


Рис. 12. Мицелии гриба в полости микротрещины в кутикуле плода яблони сорта Алеся после 6 мес. хранения (СЭМ-микрографии).
Обозначения: гф — гифы

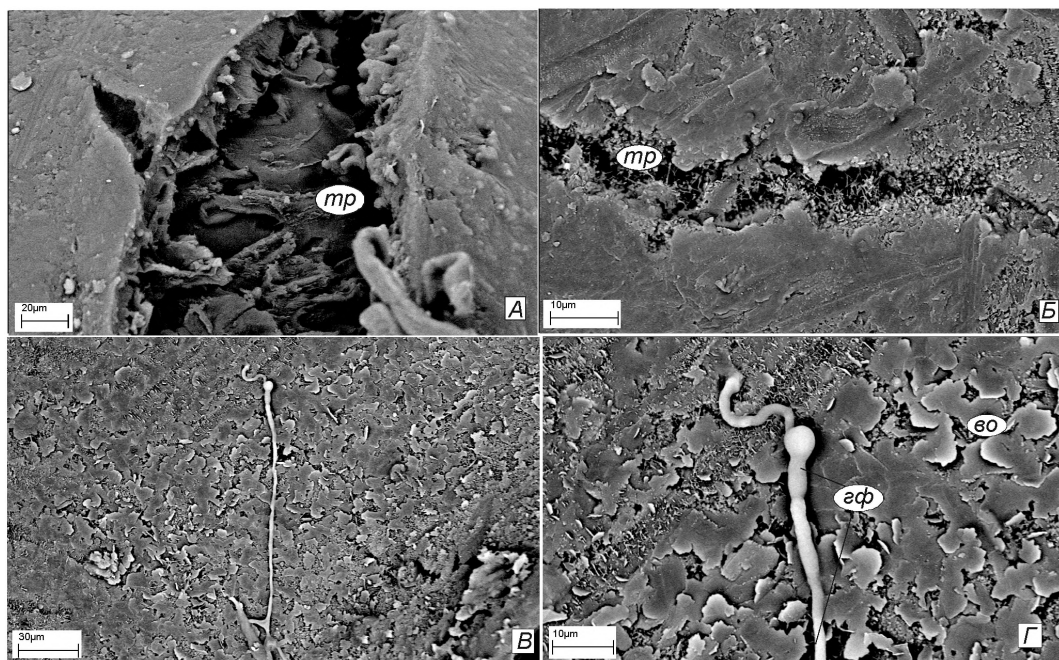


Рис. 13. Фрагменты поверхности плода яблони сорта Память Сюбарова в динамике (СЭМ-микрографии): А — микротрещины в кутикуле зрелого плода; Б — микротрещины в кутикуле после 6 мес. хранения; В, Г — общий вид и увеличенный участок поверхности плода с чешуйчатыми восковыми отложениями и гифой гриба в ходе хранения. Обозначения: во — восковые отложения; гф — гифы; мк — микротрещина

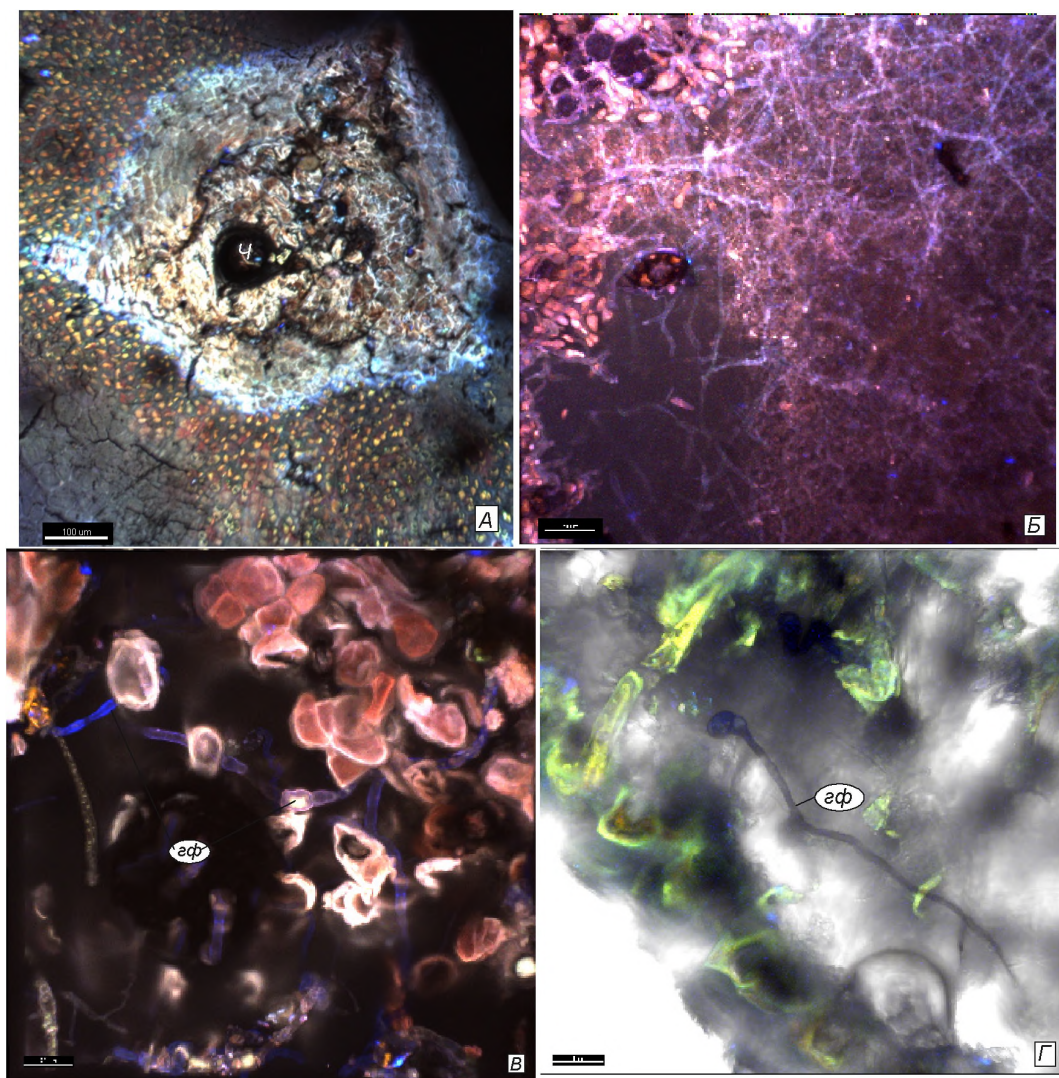


Рис. 14. Фрагменты поверхности и полости чечевички плода яблони сорта Память Скубарова в конце хранения (КМ-микрографии): *А* — общий вид чечевички; *Б* — общий вид поверхности с гифами мицелия; *В* — полость чечевички с гифами мицелия (3-5,8 мкм); *Г* — участок полости чечевички с гифой гриба в увеличенном виде. *Обозначения:* *гф* — гифы; *ч* — чечевичка

Заключение

1. Сканирующая электронная и конфокальная микроскопия позволяют детально исследовать ультраскульптуру поверхности плодов и морфологию эктофитных грибов, в том числе патогенных, вести их оперативный мониторинг с использованием количественных и качественных методов. Метод криоСЭМ, благодаря заморажи-

ванию, позволяет в условиях высокого вакуума изучать практически нативные биологические ткани, фактически является экспресс-методом, значительно ускоряющим исследовательский процесс.

2. Плоды изученных сортов яблони различаются по строению и характеру отложений кутикулярного и воскового покровов, а также по степени заселения грибными микроорганизмами. Микротрещины в кутикуле плодов были обильно заполнены гифами грибов, особенно в конце хранения. Микобиоту в микротрещинах по толщине гиф можно разделить на три категории: 0,8-1,4 мкм, 1,4-2,5 и 2,5-3 мкм. Как нам представляется, микротрещины могут возникать в результате механических повреждений, опережающего увеличения объема плода или являются результатом расщепления кутикулярного покрова ферментом грибов — кутиназой.

3. Степень инфицирования яблоч патогенными грибами, включая возбудителя парши яблони, вероятно, в значительной степени зависит от строения и толщины кутикулярного и воскового покровов. Можно предположить, что устойчивость к грибным патогенам контролируется присутствием сапротрофных грибов-антагонистов, своими выделениями (в т.ч. фенольной природы) препятствующих заселению и размножению возбудителей болезней.

4. Высокое содержание в клеточных стенках растений и грибов фенольных веществ, обладающих флуоресцирующими свойствами, делает возможным выявление мест локализации мицелия грибов в поверхностных структурах и глубжележащих тканях методом конфокальной микроскопии.

Библиографический список

1. Баширова Р.М. Вторичные метаболиты растений. Уфа: РИО БашГУ, 2003. 187 с.
2. Белошапкина О.О., Вахшех И.Н.Н., Плюсинов Е.Т. Результаты испытаний новых препаратов и агрохимикатов против парши груши (*Venturia pinna*) // Плодоводство и ягодоводство России. 2013. Т. XXXVI. Ч. 1. С. 44-49.
3. Деметьева М.П., Выгонский М.И. Болезни плодов, овощей и картофеля при хранении. М.: Агропромиздат. 1988. 231 с.
4. Климова Е.В. Особенности экологизированной защиты от фитопатогенов в горных садах КБР (Защита яблони от парши и других болезней) // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. 2006. № 1. 150 с.
5. Кумахова Т.Х., Меликян А.П. Ультраструктура кутикулы плодов разных сортов *Malus domestica* (Rosaceae) // Бот. журн. 1989. Т. 74. № 3. С. 328-332.
6. Кумахова Т.Х. Некоторые особенности анатомии плодов *Malus domestica* (Rosaceae) в зависимости от высоты культивирования в горах // Бот. журнал. 2003. Т. 88. № 6. С. 75-84.
7. Кумахова Т.Х. Некоторые особенности гистогенеза плодов *Malus domestica* (Rosaceae) в зависимости от высоты ее культивирования в горах // Известия ТСХА. 2011. № 2. С. 75-92.
8. Кушнарева М.С., Кушнарев М.А. Селекция яблони на устойчивость к парше // Достижения науки и техники АПК. 2013. № 7. С. 11-13.
9. Матиенко Б.Т. и др. Динамика изменений наружных тканей в процессе развития плодов яблони в условиях интенсивного сада // Эколого-анатомические особенности изменчивости культурных растений. Кишинев, 1984. С. 105-112.
10. Пишхачев Т.Х. Хозяйственно-биологическая характеристика иммунных к парше сортов яблони и некоторые приемы их возделывания в лесогорной плодовой зоне Кабардино-Балкарии: Автореф. канд. дисс. Нальчик, 2000. 23 с.
11. Рахимова Е.В., Абиев С.А. Мучнистая роса и парша яблони: ультраструктурные аспекты. Алматы: ТОО (Изд. LEM), 2005. 202 с.

12. Самсель Н.В. Зависимость лежкости плодов некоторых сортов яблони от анатомического строения их кожуры // Вестн. МГУ Сер. биол. и почвовед. 1964. Т. 1. С. 50-60.
13. Седое Е.Н. и др. Новые иммунные к парше сорта яблони // Садоводство и виноградарство. 2004. № 2. С. 19-20.
14. Семина Ю.В., Кремер Р., Щербакова Л.А. и др. Изучение возможности использования фильтрата культуральной жидкости непатогенного изолята FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* для защиты растений моркови от *Alternaria radicina* // Вестн. защиты растений. 2012. №2. С. 34-41.
15. Упадышев М.Т. Роль фенольных соединений в процессах жизнедеятельности садовых растений. М.: Изд. дом МСП, 2008. 320 с.
16. Zschokke A. Ueber den Bau der Haut und die Ursachen der verschiedenen Haltbarkeit unserer Kemobstrfrachte // Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz. Berlin. Bd. 11. 1897.

ULTRA SCULPTURE AND MYCOBIOTA OF APPLE FRUIT SURFACE AT RIPENING AND STORAGE

T.KH. KUMAKHOVA¹, O.O. BELOSHAPKINA¹, A.V. BABOSHA², A.S. RYABCHENKO²

¹ 0 RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev,
² Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences)

Scanning electron and confocal fluorescence microscopy was used to study ultrasculpture and mycobiota of apple fruit surface at ripening and storage stages. Scanning electron microscopy of frozen samples (cryoSEAI) is an express method that allows studying nearly native biological tissues. High content of phenols with fluorescent properties in the cell walls of plants and fungi makes it possible to observe plant surface structures and to identify fungal mycelium on the surface and in deeper tissues by means of confocal microscopy. The surface of mature apple fruit was shown to deposit cuticular cover and epicuticular wax that have specific features in different varieties. Wax depositions were represented by separate plates or rounded thick formations and by wax granules. Stomata were found in the earlier stages of fruit development, later followed by the development of lenticels. The lenticels on SEAI micrographs were observed as structures slightly raised above the surface and with the «holes» opening to deeper underlying tissue. Intense blue fluorescence sharply differed lenticels from the background surrounding epidermis on confocal microscopy images. Cuticle microcracks were formed on the surface of fruit at ripening in several varieties and after storage in others. They may reach the outer tangential walls of the epidermis and may have a specific composition of pathogenic and saprotrophic mycobiota. Confocal microscopy allowed detecting of fungal hyphae in the cavity of fruit lenticels. Fungal hyphae and spores of various diameters were also detected on the surface of fruits. By the thickness of hyphae mycobiota can be divided into 3 categories: 0,8-1,4 micron, 1,4—2,5 mm and 2,5-3 microns. The representatives of 5 genera of fungi (Alternaria, Fusarium, Penicillium, Rhizoctonia, Rhizopus) were identified on artificial medium. Characteristic branching of hyphae and their thickness allowed us to determine Rhizoctonia sp. by cryoSEAI. The presence of the fungi did not correlate with the state of fruits and with the capacity for long-term storage. Possible relationship of ultrasculpture and a degree of fruits resistance to phytopathogenic fungi was discussed.

Key words: apple fruit, electron microscopy, ultrasculpture, cuticle, mycobiota.

Кумахова Тамара Хабаловна — к. б. н., доц. кафедры ботаники РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; тел./факс 8 (499) 976-04-20; e-mail: tkumachova@gmail.com).

Белошаркина Ольга Олеговна — д. с.-х. н., проф. кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; тел./факс 8 (499) 976-04-20; e-mail: beloshapkina@timacad.ru).

Бабоса Александр Валентинович — к. б. н., ст. науч. сотр., зав. лаб. экологической физиологии и иммунитета растений ГБС имени Н.В. Цицина РАН. (127276, Ботаническая ул., 4; тел./факс 8 (499)977-91-72; e-mail: phimmunitet@yandex.ru).

Рябченко Андрей Сергеевич — к. б. н., науч. сотр. лаборатории экологической физиологии и иммунитета растений ГБС имени Н.В. Цицина РАН (127276, Ботаническая ул., 4; тел./факс 8 (499) 977-91-72; e-mail: marchellos@yandex.ru).

Kumakhova Tamara Khabalovna — PhD in Biology, associate professor of the botany department, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. 8 (499) 976-04-20; e-mail: tkumachova@gmail.com).

Beloshapkina Olga Olegovna—Doctor of Agricultural Sciences, professor of the department of plant protection, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. 8 (499) 976-04-20; e-mail: beloshapkina@timacad.ru).

Babosha Aleksandr Valentinovich — PhD in Biology, senior research scientist, head of the laboratory of plant ecological physiology and immunology. Main botanical garden named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences (127276, Botanicheskaya street, 4; tel. 8 (499) 977-91-72; e-mail: phimmunitet@yandex.ru).

Ryabchenko Andrey Sergeevich — PhD in Biology, research scientist of the laboratory of plant ecological physiology and immunology. Main botanical garden named after N.V Tsitsin of the Russian Academy of Sciences (127276, Botanicheskaya street, 4; tel. 8 (499) 977-91-72; e-mail: marchellos@yandex.ru).