

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*

Lauksaimniecības un pārtikas tehnoloģijas fakultāte  
*Faculty of Agriculture and Food technology*

*Mg. agr.* **OLGA SOKOLOVA**

***VENTURIA INAEQUALIS UN VENTURIA  
PYRINA POPULĀCIJAS DAUDZVEIDĪBAS  
RAKSTUROJUMS LATVIJĀ***

***CHARACTERIZATION OF POPULATION  
DIVERSITY OF VENTURIA INAEQUALIS  
AND VENTURIA PYRINA IN LATVIA***

Promocijas darba **KOPSAVILKUMS**  
zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai  
lauksaimniecības, meža un veterinārās zinātnēs

***SUMMARY***

*of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science (Ph.D.)  
in Agriculture, Forestry and Veterinary Sciences*

Jelgava, 2024

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*

Lauksaimniecības un pārtikas tehnoloģijas fakultāte  
*Faculty of Agriculture and Food technology*



*Mg. agr.* **OLGA SOKOLOVA** <sup>id</sup>

***VENTURIA INAEQUALIS UN VENTURIA  
PYRINA POPULĀCIJAS DAUDZVEIDĪBAS  
RAKSTUROJUMS LATVIJĀ***

***CHARACTERIZATION OF POPULATION  
DIVERSITY OF VENTURIA INAEQUALIS AND  
VENTURIA PYRINA IN LATVIA***

Promocijas darba **KOPSAVILKUMS**  
zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai  
lauksaimniecības, meža un veterinārās zinātnēs

***SUMMARY***

*of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science (Ph.D.)  
in Agriculture, Forestry and Veterinary Sciences*

Paraksts / *signature*

Jelgava, 2024

**Darba zinātniskā vadītājs / Scientific supervisors:** prof. Dr.biolo. **B. Bankina**  
Ph. D. **I. Moročko-Bičevska**

**Darba recenzenti / Reviewers:**

Dr.biolo. Ina Alsiņa  
Dr. biolo. Laila Ikase  
Dr. Vidmantas Bendokas

**Promocijas darba aizstāvēšana paredzēta** Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes “Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātne” ar specializāciju “Lauksaimniecība” Promocijas padomes atklātajā sēdē 2024. gada 14. martā, plkst. 10:00, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātē, Bioekonomikas un ilgtspējīgo resursu vadības centrs (293 telpa.), Lielā ielā 2, Jelgavā.

***The defence of Thesis will held in open session of the Promotion Board in “Field of Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science” with specialization “Agriculture” on 14 Mart 2024 at 10:00 in room 293, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā iela 2, Jelgava, Latvia.***

**Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu** var iepazīties Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā iela 2, Jelgava.

***The thesis and summary are available at the Fundamental Library of Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā iela 2, Jelgava, Latvia.***

**Atsauksmes lūdzu sūtīt** “Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes” ar specializāciju “Lauksaimniecība” promocijas padomes sekretārei Dr. sc. ing. Ingrīdai Augšpolei, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001.

***References are welcome to be sent to Dr. sc. ing. Ingrīda Augšpole, the Secretary of the Promotion Board in “Field of Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science” with specialization “Agriculture”, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001, Latvia.***

**Darba pabeigšanu atbalstīja** ESF projekts Nr. 8.2.2.0/20/I/001 “LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli”

***The completion of the work was supported by the ESF project No. 8.2.2.0/20/I/001 “Transition of LLU to the new doctoral funding model”***

## SATURS / CONTENTS

IEVADS .....	4
PĒTĪJUMA APSTĀKĻI UN METODIKA .....	5
Pētījuma vieta un laiks .....	5
<i>Venturia inaequalis</i> un <i>V. pyrina</i> Latvijas populācijas daudzveidības raksturošana .....	6
<i>Venturia inaequalis</i> un <i>V. pyrina</i> izolātu morfoloģisko paziņņu raksturošana .....	6
<i>Venturia inaequalis</i> populācijas ģenētiskās daudzveidības raksturošana ar SSR marķieriem .....	7
<i>Venturia inaequalis</i> un <i>V. pyrina</i> virulences un ābeļu un bumbieru šķirņu izturības noteikšana <i>in vitro</i> apstākļos .....	8
<i>Venturia inaequalis</i> rasu sastāva noteikšana Latvijā, izmantojot rases diferencējošos <i>Malus</i> genotipus .....	10
Datu matemātiskā apstrāde .....	13
REZULTĀTI .....	14
<i>Venturia inaequalis</i> un <i>V. pyrina</i> izolātu morfoloģisko paziņņu raksturojums .....	14
Ābeļu kraupja ierosinātāja <i>V. inaequalis</i> Latvijas populācijas daudzveidības raksturojums, izmantojot SSR marķierus .....	17
<i>Venturia inaequalis</i> izolātu virulences un ābeļu šķirņu izturības noteikšana <i>in vitro</i> apstākļos .....	24
<i>Venturia pyrina</i> izolātu virulences un bumbieru šķirņu izturības noteikšana <i>in vitro</i> apstākļos .....	26
<i>Venturia inaequalis</i> rasu sastāva noteikšana no 2017. līdz 2022. gadam rases diferencējošo <i>Malus</i> genotipu stādījumā .....	29
SECINĀJUMI .....	32
PATEICĪBAS .....	33
INTRODUCTION .....	34
CONDITIONS AND METHODOLOGY OF THE STUDY .....	36
Place and time of the study .....	36
Characterization of the diversity of Latvia's population of <i>V. inaequalis</i> and <i>V. pyrina</i> .....	36
Characteristics of morphological features of <i>Venturia inaequalis</i> and <i>V. pyrina</i> .....	37
Characterization of genetic diversity of the population of <i>Venturia inaequalis</i> with SSR markers .....	37
Determination of virulence of <i>Venturia inaequalis</i> and <i>V. pyrina</i> isolates and resistance of apple and pear cultivars <i>in vitro</i> .....	38
Determination of the race composition of <i>Venturia inaequalis</i> in Latvia, using races differential <i>Malus</i> genotypes .....	40
Mathematical data analyses .....	41
RESULTS .....	42

<i>Characterization of morphological features of Venturia inaequalis and V. pyrina isolates</i> .....	42
<i>Characterization of the diversity of Latvia's population of V. inaequalis, the causal agent of apple scab, using SSR markers</i> .....	45
<i>Characterization of virulence of Venturia inaequalis isolates and determination of resistance of apple cultivars in vitro</i> .....	48
<i>Characterization of virulence of Venturia pyrina isolates and determination of resistance of pears cultivars in vitro</i> .....	49
<i>Determination of racial composition of Venturia inaequalis from 2017 to 2022 in the plantation of races differential Malus genotypes</i> .....	50
<b>CONCLUSIONS</b> .....	51
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	52
<b>PĒTĪJUMA REZULTĀTU APROBĀCIJA / APPROBATION OF THE SCIENTIFIC WORK</b> .....	53

## IEVADS

Mājas ābele (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) un Eiropas bumbiere (*Pyrus communis* L.) ir vieni no izplatītākajiem augļaugiem ne tikai Latvijā, bet arī visā pasaulē. Pēc statistikas datiem 2017. gadā Latvijā saražotas 8000 t ābolu (EU-28 Fresh Deciduous Fruit Annual, 2018). Saskaņā ar Lauku atbalsta dienesta datiem 2018. gadā ābeļu komercdārzu platība Latvijā bija 2662.38 ha, no tiem 321.54 ha bija bioloģiskie dārzi. Savukārt bumbieru stādījumi kopā aizņēma ap 200 ha, no kuriem 100 ha bija komerciālie stādījumi, no tiem tikai 14.73 ha bioloģiskie dārzi.

Ābolus un bumbierus patērētājiem svaigā veidā var nodrošināt gandrīz visu gadu. Ražas apjomu un to kvalitāti ietekmē slimības, kas var bojāt visas augu daļas. Ābeļu un bumbieru slimības ierosina gan sēnes, gan baktērijas, gan vīrusi.

Ik gadu ekonomiski nozīmīgus zaudējumus ābeļu un bumbieru audzētājiem Latvijā un pasaulē rada ābeļu kraupis (ier. *Venturia inaequalis*) un bumbieru kraupis (ier. *Venturia pyrina*). Kraupja rezultātā ražas zudumi bioloģiskajā audzēšanas sistēmā var sasniegt 40–80% (Capocek, 2011), un atsevišķos gadījumos, ja augu aizsardzības līdzekļi netiek izmantoti, ražas zudumi var sasniegt pat 100% (Kienholz, 1937; Liu, Richards, Shabi, 1990; Smith, 2009; Sugar, Hilton, 2011).

Izmaiņas agrotehnikā, jaunu šķirņu ieviešana, kā arī klimata pārmaiņas ietekmē *V. inaequalis* un *V. pyrina* populācijas, veidojas jaunas un agresīvākas rases, kas spēj pielāgoties mainīgajiem vides apstākļiem (MacHardy, Gadoury, Gessler, 2001; Ebrahimi et al., 2016). Ābeļu kraupja ierosinātajam *V. inaequalis* ir zināmas 14 rases, bumbieru kraupja ierosinātajam *V. pyrina* piecas rases (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015; Patocchi et al., 2020). Patogēni spēj pielāgoties un pārvarēt šķirņu rezistenci, kā arī tiem veidojas rezistence pret fungicīdiem (Chevalier et al., 2004; Jamar et al., 2007; Lespinasse et al., 2008; Ebrahimi et al., 2016; González-Domínguez et al., 2017).

Patogēnu populāciju daudzveidības raksturošana un rasu sastāva noskaidrošana ļauj precīzāk prognozēt patogēnu agresivitāti un jaunu rasu veidošanos. Šīs zināšanas sniedz atbalstu selekcijas materiāla izvērtēšanā un jaunu rezistentu šķirņu ieviešanā dārzos.

**Darba mērķis** — raksturot *V. inaequalis* un *V. pyrina* vietējo populāciju daudzveidību un noskaidrot *V. inaequalis* rasu sastāvu Latvijā.

### **Darba uzdevumi:**

- raksturot *V. inaequalis* un *V. pyrina* Latvijas populāciju daudzveidību;
- raksturot *V. inaequalis* izolātu virulenci un noteikt ābeļu genotipu izturību *in vitro* apstākļos;
- raksturot *V. pyrina* izolātu virulenci un noteikt bumbieru genotipu izturību *in vitro* apstākļos;
- noteikt *V. inaequalis* rasu sastāvu Latvijā, izmantojot rases diferencējošos *Malus* genotipus lauka apstākļos.

### **Darba novitāte:**

- pirmo reizi raksturotas ābeļu kraupja ierosinātāja *V. inaequalis* un bumbieru kraupja ierosinātāja *V. pyrina* Latvijas populāciju morfoloģiskās īpatnības;
- raksturota ābeļu kraupja ierosinātāja *V. inaequalis* Latvijas populāciju ģenētiskā daudzveidība, izmantojot 12 mikrosatelītu (*SSR*) marķierus;
- pirmo reizi raksturota *V. inaequalis* un *V. pyrina* izolātu virulence un noteikta ābeļu un bumbieru genotipu izturība *in vitro* apstākļos, izmantojot lapas un augļu aizmetņus;
- pirmo reizi noteikts *V. inaequalis* Latvijas populācijas rasu sastāvs, izmantojot rases diferencējošos *Malus* genotipus.

**Darba hipotēze** — Latvijā kraupja ierosinātāju *V. inaequalis* un *V. pyrina* populācijas ir daudzveidīgas, kā arī sastopamas vairākas *V. inaequalis* rases.

### **Aizstāvamās tēzes**

- Latvijā *V. inaequalis* un *V. pyrina* populācijas ir daudzveidīgas;
- Kraupja ierosinātāju daudzveidība un virulence ir atkarīgi no saimniekaugu genotipu dažādības dārzos;
- Latvijā sastopamas vairākas *V. inaequalis* rases.

**Promocijas darbs** strukturēts trijās nodaļās — Literatūras apskats, Pētījuma apstākļi un metodika, Rezultāti un diskusija. Promocijas darba apjoms 91 lpp. (bez bibliogrāfijas saraksta un pielikumiem); darbā ir 30 tabulas, 14 attēli; 443 bibliogrāfiskie avoti, kā arī 27 pielikumi.

**Pētījuma datu aprobācija:** par šī pētījuma rezultātiem ir sagatavotas piecas publikācijas, kas indeksētas *Scopus* vai *Web of Science* datubāzēs. Sniegti pieci mutiskie un seši stenda ziņojumi zinātniskās konferencēs.

## **PĒTĪJUMA APSTĀKĻI UN METODIKA**

### **Pētījuma vieta un laiks**

Pētījumi veikti laikā no 2014. gada līdz 2022. gadam APP Dārzkopības institūta (tālāk DI) Augu patoloģijas un entomoloģijas nodaļā:

— kraupju ierosinātāju daudzveidība raksturota uz kartupeļu dekstrozes agara (*PDA, potato dextrose agar*) pēc izolātu morfoloģiskajām īpašībām;

— ābeļu kraupja ierosinātāju *V. inaequalis* ģenētiskā daudzveidība raksturota ar mikrosatelītu (*SSR*) marķieriem;

— raksturota *Venturia inaequalis* un *V. pyrina* izolātu virulence un noteikta ābeļu un bumbieru genotipu izturība. Pētījuma laikā no 2013. gada līdz 2016. gadam tika veikti pieci *in vitro* inficēšanas eksperimenti, izmantojot ābeļu/bumbieru lapas un ābeļu/bumbieru auglaizmetņus.

— *Venturia inaequalis* rasu sastāvs noteikts DI teritorijā ierīkotā stādījumā ar 15 *V. inaequalis* rases diferencējošiem *Malus* genotipiem.

### ***Venturia inaequalis* un *V. pyrina* Latvijas populācijas daudzveidības raksturošana**

Pētījuma vieta. Laikā no 2010. līdz 2017. gadam izveidota kraupja ierosinātāju izolātu kolekcija. Kolekcijai izmantoti izolāti, kas bija ievākti no 19 ābeļu un astoņiem bumbieru genotipiem, apsekojot 16 ābeļu un 15 bumbieru stādījumus piecos Latvijas reģionos.

Paraugu ievākšana. Kopumā ievākti 167 ābeļu un 53 bumbieru augu materiāla paraugi: ābeļu un bumbieru lapas un/vai augļi ar kraupim raksturīgiem bojājumiem. *Venturia* sugas identificēja laboratorijā pēc saimniekauga piederības un patogēna morfoloģiskajām pazīmēm, izmantojot binokulāro lupu “XT12/13/24B2” un stereomikroskopu “Leica DMLS”.

Izolātu kolekcijas izveide. *Venturia inaequalis* un *V. pyrina* viensporas kultūras iegūtas no konīdijām uz augļu un lapu bojājumu vietām, un saglabātas kolekcijā uz dažādām barotnēm – uz kartupeļu dekstrozes agara (*PDA*), auzu agara (*OMA*, *oatmeal agar*) un sterilā destilētā ūdenī ( $H_2O$ ).

Izolātu sagatavošana pētījumiem. Pirms pētījumu uzsākšanas izolātu augšana atjaunota Petri traukā ar *PDA* barotni. Pēc uzsēšanas sēnes inkubēja 14 dienas istabas temperatūrā ( $22 \pm 2$  °C) 65% gaisa relatīvajā mitrumā. Tālāk katram pētījumam atsevišķi izolātus pārsēja vai nu uz *PDA* barotnēm (morfoloģijas pazīmju raksturošanai un inokulēšanas eksperimentiem), vai kartupeļu dekstrozes šķidrā barotnē (*PDB*, *potato dextrose broth*) (DNA izdalīšanai).

### ***Venturia inaequalis* un *V. pyrina* morfoloģisko pazīmju raksturošana**

*Venturia inaequalis* un *V. pyrina* izolātu morfoloģiskās pazīmes raksturotas, izmantojot Kirkhama (Kirkham, 1957) un Nasonova un Jakubas (Насонов и Якуба, 2020) modificēto *V. inaequalis* koloniju klasificēšanas metodi. Izolāti audzēti uz *PDA* barotnēm un inkubēti istabas temperatūrā ( $22 \pm 2$  °C) vienu mēnesi.

Raksturotas morfoloģiskās pazīmes: koloniju diametrs, gaisa micēlija veids, kolonijas malas veids, sporulēšanas intensitāte, koloniju krāsa, kolonijas centrālā augšanas punkta krāsa un kolonijas centrālā augšanas punkta micēlija veids. Sporulācijas esamību noteica vizuāli, izmantojot gaismas mikroskopu (“Leica DMLS”). Sporulācijas intensitāti katram izolātam klasificēja atkarībā no tā, cik sporu redzams mikroskopa redzes laukā ( $400\times$  palielinājumā). Izolātu kolonijas izmērs aprēķināts kā vidējais rādītājs no diviem kolonijas mērījumiem —



horizontālā un vertikālā. Kolonijas krāsu noteica, izmantojot Karaliskās dārzkopības biedrības izstrādāto krāsu skalu augiem (*RHS Colour Chart, UK*).

### ***Venturia inaequalis* populācijas ģenētiskās daudzveidības raksturošana ar SSR markieriem**

DNS izdalīšanai izolāti 21–28 dienas audzēti *PDB* šķidrā barotnē istabas temperatūrā ( $22 \pm 2$  °C). Micēliju izžāvēja, to liofilizējot, un saberza smalkā pulverī, izmantojot šķidro slāpekli. DNS izdalīta ar “DNeasy Plant Mini Kit” (“Qiagen”, Vācija) reaģentu komplektu atbilstoši ražotāja instrukcijām. Katram paraugam novērtēja izdalītās DNS koncentrāciju un tīrību ar spektrofotometru “ND-1000” (“NanoDrop”). Izdalītos DNS paraugus uzglabāja –20 °C temperatūrā.

Pirms *V. inaequalis* populācijas ģenētiskas analīzes veikta 31 SSR mikrosatelītu praimeru pāru (Tenzer et al., 1999; Guerin et al., 2004; Xu et al., 2009) pārbaude, izmantojot paraugu kopu ar 18 izolātiem no dažādiem saimniekaugu genotipiem, ka arī ir ar atšķirīgu izcelsmi. Pēc *V. inaequalis* paraugu kopas testēšanas kraupja ierosinātāju kolekcijas analizēšanai atlasīti 12 SSR praimeru pāri (1. tab.).

Mikrosatelītu marķieru PCR amplifikāciju veica 25 µL reakcijas apjomā vienam paraugam. Amplifikāciju veica termociklera iekārtā “EP 45 Gradient” (“Eppendorf”) ar PCR apstākļiem: sākotnējā denaturācija – 5 min, +95 °C, denaturācija — 30 sek., +95 °C, hibridizācija 90 sek., 56°C (vai 60 °C atkarībā no marķiera), elongācija — 30 sek., +72 °C, beigu elongācija — 30 min, +60 °. Hibridizācijas temperatūra, kas bija nodrošināta katram mikrosatelītu marķierim, atspoguļota 1. tabulā.

Iegūtie PCR amplifikācijas produkti un to aptuvenie garumi pārbaudīti ar elektroforēzi 4.0 % agarozes gelā (“AppliChem”), pievienojot etīdija bromīdu (*ethidium bromide*), lai gelā esošos DNS fragmentus vizualizētu ar ultravioleto starojumu. Fragmentu garumus noteica ar garumu marķieri “*O’RangeRuler 20 bp Ladder*” (“Thermo Scientific”).

***Venturia inaequalis* populācijas polimorfisma analizēšanai izmantotie SSR marķieri / SSR markers used for polymorphism analysis of *Venturia inaequalis* population**

Praimeri / Primers	Hibridizācijas temperatūra, °C / Annealing temperature, °C	Amplikona garums (bp) saskaņā ar literatūru / Amplicon length (bp) according to the literature	Aptuvenais amplikona garums (bp) atlasē / Approximate amplicon length (bp) in this study
Vicacg8/42 F-R	60	196–232	200–250
Vitg11/70 F-R	60	184–196	180–200
Vigtg10/95 F-R	58	134–169	130–160
Vica9/152 F-R	58	167–191	160–200
Vitc2/D F-R	58	184–278	195–280
Viga7/116 F-R	60	159–173	140–175
Vigt10/ε F-R	60	171–173	160–185
Vict1/130 F-R	58	132–152	140–165
EMVi0029 F-R	50–55	nd	180–230
Itc1g F-R	58	111–185	105–170
Itc1b F-R	58	149–210	140–185
Itc1a F-R	58	109–187	110–160

nd — nav datu / no data.

Amplificēto fragmentu garumus noteica Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā “Silava”, izmantojot ģenētisko analizatoru “3130xl” (“Applied Biosystems”, ASV).

***Venturia inaequalis* un *V. pyrina* virulences un ābeļu un bumbieru šķirņu izturības noteikšana *in vitro* apstākļos**

Augu materiāls. Pētījuma laikā veikti pieci inficēšanas eksperimenti, izmantojot ābeļu/bumbieru lapas un ābeļu/bumbieru augļzaimētņus. Katrai genotipu un izolātu kombinācijai inficēja divas līdz piecas jaunās lapas (33. AE pēc BBCH skalas, Meier et al., 2001) un augļzaimētņus (74.–75. AE) atkarībā no to pieejamības katrā veģetācijas periodā.

Lapas un augļzaimētņus ievāca bez vizuāli redzamiem bojājumiem no DI ģenētisko resursu kolekcijā augošajiem kokiem, kuri nebija apstrādāti ar fungicīdu. Lapu inficēšanu veica divos eksperimentos (1. un 3. eksperiments), bet augļzaimētņu inficēšanu – trijos eksperimentos (2., 4. un 5. eksperiments).

Kopumā eksperimentos pārbaudīti astoņi ābeļu un 18 bumbieru genotipi ar dažādu kraupja izturību/ieņēmību lauka apstākļos, kā arī pieci no eksperimentos pārbaudītajiem *Malus* genotipiem ar zināmu rezistenci. Genotipus

eksperimentiem atlasīja, lai aptvertu pēc iespējas plašāku genotipu klāstu – gan vietējās un plaši audzētās šķirnes komerciālajos augļdārzos un piemājas dārzos, gan arī šķirnes, ko plaši audzē citās Eiropas valstīs.

Izolāti un inokulāta sagatavošana. Kraupja ierosinātāju virulences pārbaudei eksperimentos iekļauti deviņi *V. inaequalis* un septiņi *V. pyrina* izolāti, kas bija iegūti no dažādiem saimniekaugu genotipiem un kam bija dažāda ģeogrāfiskā izcelsme. Četri *V. inaequalis* izolāti (147, 333, 1634 un 2408) bija izdalīti no Latvijā audzētiem ābeļu genotipiem, viens izolāts — no Polijā audzēta genotipa, un pārējie četri bija references izolāti ar zināmu rases piederību 2., 4., 5. un 8. rasei un virulenti *Malus* genotipiem ar rezistences gēniem *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5* un *Rvi8* (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015; V. Caffier, personiska komunikācija par izolātu 333).

Eksperimentā iekļautie *V. pyrina* izolāti bija izdalīti tikai no Latvijā tiem saimniekaugu genotipiem, un to rases piederība un virulence nebija zināma.

Kā pozitīvo kontroli visos eksperimentos izmantoja sporas suspensiju, kuras pagatavošanai bija ievāktas inficētas lapas un augļi no dažādiem DI stādījumā augošo saimniekaugu genotipiem (*Malus* vai *Pyrus* – atkarībā no eksperimenta), kur nebijatiek izmantoti fungicīdi. Destilētais ūdens eksperimentos tika izmantots kā negatīvā kontrole.

Inficēšana un inkubēšana. Lapu un augļaižmetņu inficēšanu visos eksperimentos veica ar sporu suspensiju, uzklājot to divos veidos: (1) ar pipeti uzpilot divus līdz četrus 50 µL suspensijas pilienus uz lapas vai augļa virsmas (1. un 2. eksperiments), un (2) uzklājot suspensiju uz lapas un augļa virsmas ar otu, kas divas reizes iegremdēta suspensijā (3., 4. un 5. eksperiments).

Pirms inficēšanas 1. un 2. eksperimentā (2013. gads) lapas un augļi nebija dezinficēti, tikai trīs reizes mazgāti ar destilētu ūdeni. Dezinficēšana šajos eksperimentos netika veikta, lai izvairītos no kutikulas un epidermas bojājumiem un saglabātu maksimāli dabisku lapu un augļu stāvokli. Nākamajos eksperimentos (3., 4. un 5. eksperimentā, 2014.–2016. gads) lapas un augļaižmetņi dezinficēti ar 70% etanola šķīdumu, vienu minūti tos iemērcot dezinficējošā šķīdumā un pēc tam trīs reizes noskalojot sterilā destilētā ūdenī.

Pēc inficēšanas lapas inkubēja mitrās kamerās Petri traukos (1. eksperimentā, 2013. gads) un alumīnija folijas paplātē uz floristikas putām (3. eksperimentā, 2014. gads). Augļaižmetņus inkubēja mitrās kamerās caurspīdīgās plastmasas kastēs ar vāku (2. eksperimentā, 2013. gads) un alumīnija folijas paplātē uz floristikas putām, kas bija samitrinātas ar sterilu destilētu ūdeni (4. un 5. eksperimentā, 2015.–2016. gads).

Augļaižmetņi 1. eksperimentā turēti caurspīdīgās kastēs ar vāku laboratorijā uz galda dabiskā apgaismojumā un inkubēti istabas temperatūrā. Lapu un augļu inkubāciju 2.–5. eksperimentā veica kontrolētos apstākļos – augu augšanas kamerās (“Binder KBW 720”) temperatūrā no +20 līdz +22 °C gaismā (16 stundas) un +18 °C temperatūrā tumsā (8 stundas), ar 80% gaisa relatīvo mitrumu.

Novērojumu metodika. Visiem izmēģinājumiem veikta simptomu digitālā dokumentācija. Pirmo reizi lapu un augļaižmetņu vērtēšanu veica pēc vienas nedēļas no inficēšanas dienas, tālāk – atkārtoti reizi nedēļā līdz visu eksperimentu noslēgumam. Ieņēmības vai rezistences izpausmes, kas radušās mijiedarbības procesā starp *V. inaequalis* izolātiem un ābeļu genotipiem un starp *V. pyrina* izolātiem un bumbieru genotipiem, vērtētas pēc Ševaljē un kolēģu (Chevalier et al., 1991, 2004) aprakstītās metodikas, kur: 0 — nav makroskopisku pazīmju un nav novērojamas auga audu reakcijas pazīmes; 1 — hipersensitīva reakcija; 2 — hloroze vai nekroze bez sporulācijas; 3.a — hloroze vai nekroze ar ierobežotu sporulāciju; 3.b — hloroze vai nekroze ar bagātu sporulāciju; 4 — bagāta sporulācija bez augu audu reakcijas. Novērotās mijiedarbības tālāk klasificētas saskaņā ar Caffier et al. (2015), kur mijiedarbības ar vērtējumu 0–2 tiek uzskatītas par rezistentām (nesaderīgās); 3.a — vidēji izturīgas (nesaderīgās); 3.b — daļēji ieņēmīgas (saderīgās) un 4 — ieņēmīgas (saderīgās). Lai apstiprinātu novērotās audu reakcijas, kā arī *V. inaequalis* un *V. pyrina* sporulācija esamību, veikta katras makroskopiskās pazīmes pārbaude, izmantojot binokulāro stereomikroskopu.

### ***Venturia inaequalis* rasu sastāva noteikšana Latvijā, izmantojot rases diferencējošos *Malus* genotipus**

Dārzkopības institūtā 2010. gadā “Vinqest” projekta ietvaros *V. inaequalis* rasu sastāvu noteikšanai izveidota kolekcija ar 15 diferencējošiem *Malus* genotipiem no Šveices, *Agroscope Changins-Wadenswil* (ACW) (2. tab.).

Rases diferencējošo *Malus* genotipu stādījums ierīkots DI ģenētisko resursu dārzā (Dobeles novada Krimūnu pagastā) 2016. gada 15. oktobrī. Katrs rases diferencējošo *Malus* genotips tika pavairots, acojot to uz maza auguma potcelmiem ‘B396’, piecus stādus katram genotipam. Koki stādīti ar attālums starp kokiem rindā — 1.2 m; izolācijas attālums starp kokiem — 3 m. Ābeles stādītas piecos blokos pēc “Vinqest” stādīšanas shēmas; katrā blokā viens koks katram genotipam. Iztrūkstošos genotipus (h(16)–h(20)) aizstāja ar genotipu ‘Golden Delicious’ /h(1).

Ābeles stādītas velēnu karbonātu augsnē (Vki), pēc augsnes granulometriskā sastāva (smilšmāls (sM), augsnes reakcija pH<sub>KCl</sub> 7.3; trūdvielu saturs — 2.9%; fosfora (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) saturs –132 mg kg<sup>-1</sup>; kālija (K<sub>2</sub>O) saturs – 170 mg kg<sup>-1</sup>). Stādījumam izvēlēta vieta bija piemērota ābeļu audzēšanai.

Augu audzēšanā ievērota vispārēja stratēģija, ņemot to, ka stādījumā netika izmantoti fungicīdi. Sakot ar 2021. gadu, veikti sanitārie pasākumi nobirušo lapu noārdīšanai. Lai novērstu zaļo ābeļu laputu (*Aphis pomi*) izplatīšanos, tika izmantoti insektiķīdi.

**Diferencējošie *Malus* genotipi *V. inaequalis* rasu sastāva noteikšanai\* /  
*Differential Malus genotypes for determining the races composition of  
V. inaequalis***

Saimniekauga kods / <i>The code of host</i>	Rases diferencējošie genotipi / <i>Races differential Malus genotypes</i>	Rezistences gēns / <i>Resistance gene</i>
h(0)	‘Gala’	nav
h(1)	‘Golden Delicious’	<i>Rvi1</i>
h(2)	TSR34T15	<i>Rvi2</i>
h(3)	Q71	<i>Rvi3</i>
h(4)	TSR33T239	<i>Rvi4</i>
h(5)	9-AR2T196	<i>Rvi5</i>
h(6)	‘Priscilla’	<i>Rvi6</i>
h(7)	<i>M. floribunda</i> 821	<i>Rvi7</i>
h(8)	B45	<i>Rvi8</i>
h(9)	J34 (F <sub>1</sub> no ‘Dolgo’)	<i>Rvi9</i>
h(10)	A723–6	<i>Rvi10</i>
h(12)	Hansen’s <i>baccata</i> #2	<i>Rvi12</i>
h(13)	‘Durello di Forlì’	<i>Rvi13</i>
h(14)	‘Dülmener Rosen’	<i>Rvi14</i>
h(15)	GMAL2473	<i>Rvi15</i>

\* — tabula sagatavota pēc Bus et al. (2011) / *Table adapted from Bus et al. (2011).*

Lauka novērojumu metodika *V. inaequalis* rasu raksturošanai diferencējošo *Malus* genotipu stādījumā. Ābeļu kraupja izplatība un attīstības pakāpe “Vinquest” stādījumā vērtēta divas reizes sezonā, sākot ar 2017. gadu. Pirmā vērtēšana veikta 19. attīstības etapā, kad ābelēm pirmās lapas sasniedza raksturīgo lielumu (Meier et al., 1994); otrā vērtēšana veikta 33. augu attīstības etapā (Meier et al., 1994). Slimības attīstības pakāpe noteikta vizuāli, vērtējot katru koku individuāli un vērtēšanā izmantojot deviņu ballu skalu saskaņā ar “Vinquest” metodi (3. tab.) (Lateur, Populer, 1994; Patocchi et al., 2009).

Pēc “Vinquest” metodikas, vērtējot kraupja attīstības pakāpi, vērā ņem tikai *V. inaequalis* bojājumus bez augu audu reakcijas, kas liecina par *Malus* genotipu rezistences gēna pārvarēšanu un *V. inaequalis* rases klātbūtni esošajā stādījumā (populācijā).

**Kraupja vērtēšanas skala\*** / *Scab rating scale*

Balles / Score	Simptomi / <i>Symptoms</i>	Bojāto lapu/augļu daļa, (%) / <i>Proportion of affected leaves / fruits, (%)</i>
0/n	Nav novērojumu (nav koka/augļu)	—
1	Nav redzamu bojājumu	0
2	Tikai dažī bojājumi	0 līdz 1
3	Bojājumi, kas koncentrēti tikai dažās koka vietās	1 līdz 5
4	Starpstāvoklis	> 5
5	Plaši izplatīti, daudz bojājumu lielākajā koka daļā	≈ 25
6	Starpstāvoklis	> 25
7	Smaga infekcija, puse lapu (vai augļu) ar vairākiem plankumiem	≈ 50
8	Starpstāvoklis	≈ 75
9	Praktiski viss koks ar smagu infekciju	> 90

\* — avots: <https://www.vinquest.ch/monitoring/collection.htm> / *source of information: https://www.vinquest.ch/monitoring/collection.htm*

Meteoroloģisko apstākļu raksturojums. Meteoroloģiskie apstākļi ir būtiski, jo tie ietekmē *V. inaequalis* attīstību ābeļu veģetācijas sezonā. Tādēļ tika raksturots nokrišņu daudzums un vidējā gaisa temperatūra no aprīļa pirmās dekādes līdz septembra trešajai dekādei. Meteoroloģiskie dati iegūti no DI lauka meteostacijas “Lufft” 2017.–2022. gadā.

Salīdzinot meteoroloģiskos apstākļus visā pētījuma laikā no 2017. līdz 2022. gadam, vismazāk nokrišņu novēroja aprīlī un maijā gandrīz visos gados, izņemot 2021. un 2022. gadu. Nokrišņu daudzums šajā periodā ietekmē *V. inaequalis* primārās infekcijas veidošanos un attīstību stādījumos.

Savukārt 2022. gadā vasaras kopējais nokrišņu daudzums Dobelē bija par 5% vairāk (233 mm) nekā rāda ilggadīgi novērojumi (222.6 mm). Dobelē nokrišņu daudzums 2021. un 2022. gada augustā bija lielāks nekā 2017.–2020. gadā, līdz ar to pastiprinājās kraupja ierosinātāja sekundārās infekcijas veidošanās un attīstība, kā arī izplatības risks ražas laikā un glabātavā. 2018. un 2019. gada vasaras bija karstas un sausas. 2020. gads Latvijā bija siltākais gads meteoroloģisko novērojumu vēsturē (kopš 1924. gada).

## Datu matemātiskā apstrāde

*Venturia inaequalis* un *V. pyrina* izolātu morfoloģisko pazīmju sastopamība starp izolātiem noteikta ar programmas “SPSS 17.0” (Norman, Dale, Hadlai, 1968) aprakstošās statistikas moduli. Sakarību ciešuma noteikšanai starp izolātu morfoloģisko pazīmju vērtējumiem aprēķināts Pīrsona korelācijas koeficients ( $r$ ). Izolātu grupēšana morfortipos pēc morfoloģiskajām īpašībām veikta ar hierarhijas analīzes palīdzību.

Ar “GenALEX 6.41” (Peakall, Smouse, 2006) datorprogrammu veikta ģenētiskās daudzveidības parametru raksturošana katram *SSR* marķierim: alēļu garums, alēļu skaits lokusā ( $N_a$ ), efektīvo alēļu skaits lokusā ( $N_e$ ) (Nei, 1987), privāto alēļu skaits ( $P_a$ ) katrā populācijā, Šenona (*Shannon*) informatīvais indekss ( $I$ ) (Lewontin, 1972) un gēnu daudzveidības indekss ( $h$ ) (Nei, 1973).

*Venturia inaequalis* ģenētiskās daudzveidības sadalījums Latvijas populācijā raksturots ar molekulārās variācijas analīzi (*AMOVA, analysis of molecular variance*), aprēķinot ģenētiskās diferenciācijas koeficientu (*PhiPT*). Polimorfisma informatīvais indekss (*PIC, polymorphic information content*) aprēķināts, izmantojot Lamboja (*Lambo*) *SSR* datorprogrammu (personiskā komunikācija ar G. Lāci).

*Venturia inaequalis* populāciju ģenētiskā struktūra un diferenciācija novērtēta, izmantojot haploīdus datus, kas analizēti ar Beijesa pieeju (*Bayesian approach*) “Structure 2.3.4.” datorprogrammā (Pritchard et al., 2000). Lai noteiktu visticamāko populāciju skaitu ( $K$ ) starp *V. inaequalis* izolātiem, izmantots modelis nesajauktām populācijām (*no admixture*), kas atkarīgs no alēļu frekvences katrā mikrosatelīta marķierī (*burn-ins* 100 000 atkārtojumi un 300 000 atkārtojumi pēc Monte-Karlo metodes ar Markova ķēdēm (*MCMC – Markov chain Monte-Carlo*)). Visas varbūtības atkārtotas 20 reizes katrai  $K$  (analizējot diapazonā 2–12), lai apstiprinātu atbilstību logaritmiskās ticamības (*log-likelihood*) varbūtībai. Visticamākā grupēšana vizualizēta, izmantojot “CLUMPP 1.1” (Jakobsson, Rosenberg, 2007) un “Structure Plot V2.0” (Ramasamy et al., 2014) programmas.

Ābeļu kraupja attīstības pakāpes vērtējumam (ballēs no 1 līdz 9) “Vinqest” stādījumā datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot programmas “MS Excel” iespējas. Aprēķināti aprakstošās statistikas rādītāji: aritmētiskais vidējais, standartnovirze, standartklūda, minimums un maksimums.

## REZULTĀTI

### ***Venturia inaequalis* un *V. pyrina* izolātu morfoloģisko pazīmju raksturojums**

Kraupja ierosinātāju *V. inaequalis* un *V. pyrina* Latvijas populāciju daudzveidība raksturota pēc morfoloģiskajām pazīmēm DI kolekcijā esošajiem izolātiem — 183 *V. inaequalis* un 104 *V. pyrina* izolātiem.

Analizēto izolātu kolonijas izmērs (diametrs) uz pētījumā izmantotās barotnes variēja no 0.6 līdz 5.7 cm *V. inaequalis* izolātiem un no 0.7 līdz 5.2 cm *V. pyrina* izolātiem. Visvairāk *V. inaequalis* un *V. pyrina* izolātu ietilpst grupā ar kolonijas diametru  $\geq 2.1$  cm.

Gaisa micēlija veids bija atšķirīgs *V. inaequalis* un *V. pyrina* izolātiem. Ābeļu kraupja ierosinātāja izolātiem novēroti četri gaisa micēlija veidi: vāji izteikts, irdens, biezs vilnains un biezs voilokveida; bumbieru kraupja ierosinātāju izolātiem konstatēti tikai divi gaisa micēlija veidi: biezs vilnains un biezs voilokveida.

Kolonijas malas veids. Lielākai daļai *V. inaequalis* un *V. pyrina* izolātu bija vidēji izteikta kolonijas mala. Vāji izteiktu kolonijas malu novērotas tikai *V. inaequalis* izolātiem, savukārt *V. pyrina* izolātu ar tādu kolonijas malas veidu nebija vispār.

Sporulācijas intensitāte. Pētījuma laikā ābeļu un bumbieru kraupja ierosinātāju izolātiem novērotas sporulācijas intensitātes variācijas no vājas vai neesošas (nav) līdz bagātīgai. Bagātīgu sporulāciju *V. inaequalis* izolātiem novērota biežāk nekā *V. pyrina* izolātiem, savukārt lielākajai daļai *V. pyrina* izolātu sporulācija bija vāja vai tās nebija vispār.

Kolonijas centrālā punkta krāsas raksturojums. Šajā pētījumā kraupja ierosinātāju izolātiem novērotas tikai trīs no sešām agrāk aprakstītajām īpašībām: krāsa līdzīga kolonijas pamatkrāsai, krāsa tumšāka nekā kolonijas pamatkrāsa, un krāsa gaišāka nekā kolonijas pamatkrāsa.

Kolonijas centrālā punkta micēlija makroskopiskais raksturojums. Šajā pētījumā kraupja ierosinātāju izolātiem šai īpašībai novērotas tikai divas no piecām aprakstītajām variācijām: biezs vilnains un biezs voilokveida micēlijs.

Micēlija krāsa variēja lielā spektrālā diapazonā. *Venturia inaequalis* izolātiem novērota 21 micēlija krāsa, savukārt *V. pyrina* izolātiem krāsu dažādība bija mazāka — tikai astoņas micēlija krāsas. Abu sugu izolātiem varēja novērot arī izolātus ar micēlija krāsu zonējumu, ar 2–3 krāsu riņķveidīgu nokrāsu, kas apgrūtināja precīzu micēlija krāsas noteikšanu.

*Venturia inaequalis* izolātu grupēšana morfortipos. Lai varētu veikt *V. inaequalis* izolātu grupēšanu morfortipos, ar Pīrsona korelācijas analīzi tika atlasītas tās izolātu morfoloģiskās īpašības, kuru korelācijas koeficients nebija mazāks par  $r = 0.300$  (vidēja līdz cieša korelācija).



Balstoties uz Pīrsona korelācijas analīzi, *V. inaequalis* izolāti sagrupēti morfortipos pēc trim morfoloģiskajām pazīmēm: gaisa micēlija veida, sporulācijas intensitātes un kolonijas malas veida.

Pamatojoties uz hierarhijas analīzē iegūtajiem rezultātiem, *V. inaequalis* izolāti sagrupēti astoņos morfortipos.

*Morfotips 1* (1. (a) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu vilnainu gaisa micēliju, bagātīgu sporulāciju, dažādiem kolonijas diametriem. Izolātiem novērota plašu gaisa micēlija krāsu dažādība. Šajā grupā ietilpst 37 izolāti, no kuriem 59% (n = 22) izdalīti no lapām.

*Morfotips 2* (1. (b) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, irdenu gaisa micēliju, bagātīgu sporulāciju, 1.6 cm un lielāku diametru. Lielākai daļai (86%) izolātu gaisa micēlija krāsa bija zaļgani pelēka un gaiši zaļgani pelēka. Grupā ietilpst septiņi izolāti, no kuriem 71% (n = 5) izdalīti no lapām.

*Morfotips 3* (1. (c) att.). Kolonijas ar vāji izteiktu malu, irdenu gaisa micēliju, bagātīgu sporulāciju, 1.6 cm un lielāku diametru. Visiem izolātiem gaisa micēlija krāsa bija pelēcīgi zaļa. Grupā ir pieci izolāti, no kuriem 80% (n = 4) izdalīti no lapām.

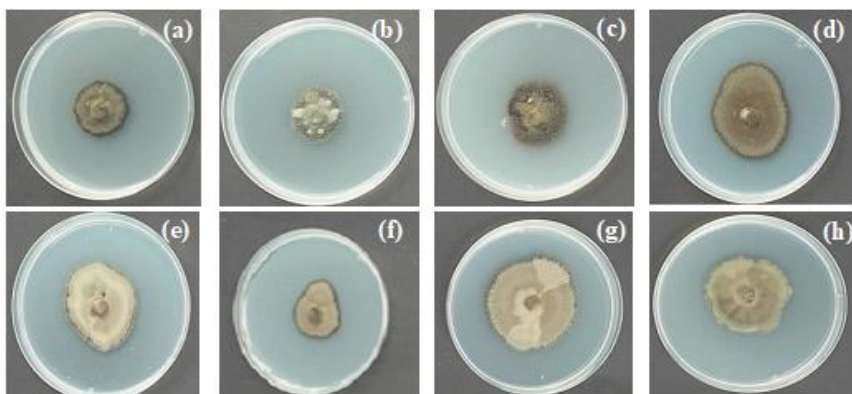
*Morfotips 4* (1. (d) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu vilnainu gaisa micēliju, vidēju sporulācijas intensitāti, 2.1 cm un lielāku diametru. Izolātiem bija plaša gaisa micēlija krāsu dažādība. Grupā ietilpst 29 izolāti. Sadalījums pēc augu materiāla, no kura izdalīti izolāti, ir gandrīz vienāds — 51% (n = 15) no augļiem un 49% (n = 14) no lapām.

*Morfotips 5* (1. (e) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu voilokveida gaisa micēliju, vidēju sporulācijas intensitāti, 1.6 cm un lielāku diametru. Plaša gaisa micēlija krāsu dažādība. Grupā ietilpst 46 izolāti, no kuriem 72% (n = 33) izdalīti no lapām.

*Morfotips 6* (1. (f) att.). Kolonijas ar izteiktu malu, biezu voilokveida gaisa micēliju, sporulācija netika novērota, kolonijas diametrs — 1.6 cm un lielāks. Plaša gaisa micēlija krāsu dažādība. Grupā ietilpst 15 izolāti, no kuriem 73% (n = 11) izdalīti no lapām.

*Morfotips 7* (1. (g) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu vilnainu gaisa micēliju, sporulācija netika novērota, dažādi kolonijas diametri un plaša gaisa micēlija krāsu dažādība. Grupā ietilpst deviņi izolāti. Sadalījums pēc augu materiāla, no kura izdalīti izolāti, ir gandrīz vienāds — 51% (n = 5) no lapām un 49% (n = 4) no augļiem.

*Morfotips 8* (1. (h) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu voilokveida gaisa micēliju, sporulācija netika novērota, kolonijas diametrs — 1.6 cm un lielāks. Plaša gaisa micēlija krāsu dažādība. Grupā ietilpst 31 (n = 18) izolāts, no kuriem 58% izdalīti no lapām.



1. att. *Venturia inaequalis* izolātu astoņu morfortipu grupu vizuālais raksturojums:

morfortips 1 (a), morfortips 2 (b), morfortips 3 (c), morfortips 4 (d), morfortips 5 (e), morfortips 6 (f), morfortips 7 (g), morfortips 8 (h) /

*Fig 1. Visual characterization of eight morphotype groups of Venturia inaequalis isolates:*

*morphotype 1 (a), morphotype 2 (b), morphotype 3 (c), morphotype 4 (d), morphotype 5 (e), morphotype 6 (f), morphotype 7 (g), morphotype 8 (h)*

*Venturia pyrina* izolātu grupēšanai morfortipos tika atlasītas tikai tās īpašības, kurām korelācijas koeficients nebija mazāks par  $r = 0.300$ .

*Venturia pyrina* izolāti grupēti morfortipos, balstoties uz trim morfoloģiskajām īpašībām: gaisa micēlija veids, kolonijas malas veids un sporulācijas intensitāte. Pamatojoties uz hierarhijas analīzē iegūtajiem rezultātiem, *V. pyrina* izolāti sagrupēti četros morfortipos.

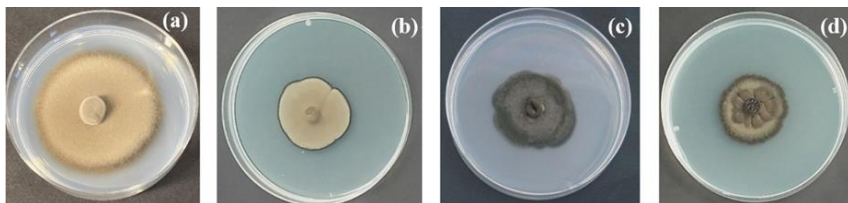
*Morfotips 1* (2. (a) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu voilokveida gaisa micēliju, atšķirīgiem kolonijas diametriem. Sporulācija vāja vai netika novērota. Vairāk nekā pusei izolātu (63%) novēroti gaiši olīvpelēki vai gaiši pelēcīgi olīvkrašas gaisa micēliji. Grupā ietilpst 27 izolāti, no kuriem 52% ( $n = 14$ ) izdalīti no augļiem.

*Morfotips 2* (2. (b) att.). Kolonijas ar izteiktu malu, biezu voilokveida gaisa micēliju, 2.1 cm un lielāku diametru, plašu gaisa micēlija krāsu dažādību. Sporulācija netika novērota. Šajā grupā ir septiņi izolāti, no kuriem 57% ( $n = 4$ ) izdalīti no lapām.

*Morfotips 3* (2. (c) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu vilnainu gaisa micēliju, 2.1 cm un lielāku diametru. Vairāk nekā pusei izolātu (63%) bija mēreni olīvbriņa krāsa. Sporulācijas intensitāte vidēja un vāja; lielākai daļai izolātu ( $n = 47$  no 67) sporulācija netika novērota vispār. Grupā ietilpst 67 izolāti, no kuriem 73% ( $n = 49$ ) izdalīti no augļiem.

*Morfotips 4* (2. (d) att.). Kolonijas ar vidēji izteiktu malu, biezu vilnainu gaisa micēliju, bagātīgu sporulāciju, 2.1 cm un lielāku diametru. Lielākai daļai izolātu

(71%) novēroja mēreni olīvbrūnu krāsu. Grupā ir septiņi izolāti, visi izdalīti no augļiem.



2. att. *Venturia pyrina* izolātu četrus morfortipu grupu vizuālais raksturojums:

morfortips 1 (a), morfortips 2 (b), morfortips (c) un morfortips 4 (d) /

Fig. 2. Visual characteristics of four morphotype groups of *Venturia pyrina* isolates: morphotype 1 (a), morphotype 2 (b), morphotype 3 (c), morphotype 4 (d)

Iegūtie rezultāti norāda, ka Latvijā ir liela *V. inaequalis* un *V. pyrina* genotipu fenotipiskā daudzveidība.

### Ābeļu kraupja ierosinātāja *V. inaequalis* Latvijas populācijas daudzveidības raksturojums, izmantojot SSR marķierus

*Venturia inaequalis* Latvijas populācijas daudzveidības raksturošanai pēc iegūtajiem rezultātiem no iepriekš pārbaudītā 31 SSR praimeru pāra no tālākiem pētījumiem izslēgti 19 SSR praimeru pārus, no kuriem 11 (1aac3b, 1aac4h, Vigt8/146, Viagg8/1, Vitcca7/P, Vitc2/16, Vigt9/99, Vica9/x, ViaacS10, Vica9/134, Vigt9/129) bija monomorfi, seši (1aac4b, 1aac4f, EMVi 001b, EMVi0032c, Viga3/z, Vica10/154) uzrādīja vairākus grūti interpretējamus amplikonus un divi SSR praimeru pāri (Vitic1/82 un Vitic1/2) vairāk nekā 10 analizētajiem izolātiem neuzrādīja nevienu amplikonu (4. tab.).

4. tabula / Table 4

### Mikrosatelītu marķieru polimorfisma raksturojums / Characteristics of the polymorphism of microsatellite markers

Marķieris / Markers	Amplificēta parauga garuma robežas, bp / Amplified sample length range, bp	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	I	h	PIC
Vicacg8/42	192–226	13	2.75	1.42	0.64	0.627
Vitg11/70	186–210	11	5.79	1.96	0.83	0.823
Vigtg10/95	128–157	9	2.30	1.14	0.57	0.549
Vica9/152	152–185	9	2.65	1.42	0.62	0.602
Vitic2/D	188–252	29	14.31	2.88	0.93	0.934

## 4. tabulas turpinājums / Table 4 continued

Marķieris / Markers	Amplificēta parauga garuma robežas, bp / Amplified sample length range, bp	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	I	h	PIC
Viga7/116	139–174	9	3.55	1.53	0.72	0.710
Vigt10/ε	174–176	2	1.01	0.04	0.01	0.013
Vict1/130	149–157	5	1.68	0.87	0.40	0.405
EMVi029	163–218	15	4.20	1.91	0.76	0.746
1tc1g	112–188	27	9.27	2.63	0.89	0.884
1tc1b	151–191	10	2.44	1.31	0.59	0.604
1tc1a	109–160	19	13.62	2.73	0.93	0.925

N<sub>a</sub> — alēļu skaits lokusā; N<sub>e</sub> — efektīvo alēļu skaits lokusā; I — Šenona informatīvais indekss; h — gēnu daudzveidības indekss (Nei); PIC — polimorfisma informatīvais indekss / N<sub>a</sub> — total number of alleles; N<sub>e</sub> — effective number of alleles; I — Shannon's information index; h — gene diversity (Nei); PIC — polymorphic information content.

Balstoties uz *V. inaequalis* paraugkopas izvērtēšanā iegūtajiem rezultātiem, ābeļu kraupja ierosinātāju Latvijas populācijas daudzveidības raksturošanai bija izvēlēti tikai 12 SSR praimeru pāri, kuri amplificēja vienu fragmentu un uzrādīja fragmentu garumu atšķirības starp testētajiem izolātiem (4. tab.).

Pētījuma laikā ar atlasītajiem SSR marķieriem no sākotnējiem 183 izolātiem, kuriem jau iepriekš bija raksturotas morfoloģiskās pazīmes, tika genotipēta 143 *V. inaequalis* izolātu paraugkopā. Atlikušie 40 izolāti izslēgti no tālākiem pētījumiem paraugu piesārņojuma dēļ. Analizētie *V. inaequalis* izolāti ievākti no diviem galvenajiem ābolu audzēšanas reģioniem Latvijā – Zemgales un Kurzemes, no dažādiem saimniekauga genotipiem, kas audzēti dažāda veida dārzos (5. tab.).

## 5. tabula / Table 5

**Malus genotipi, no kuriem izdalīti pētījumā iekļautie *V. inaequalis* izolāti / Malus genotypes from which *V. inaequalis* strains included in this study were extracted**

Malus genotips / Malus genotypes	Izdalīto <i>V. inaequalis</i> izolātu skaits / Number of isolated <i>V. inaequalis</i> strains	
	Zemgale	Kurzeme
Komercdārz* / Commercial orchards		
‘Lobo’	19	6
‘Auksis’	7	2
‘Kovalenkovskoje’	0	7
‘Belorusskoje Maļimovoje’	0	14
‘Rubin’	0	6
<i>Malus domestica</i>	0	9

## 5. tabulas turpinājums / Table 5 continued

Malus genotips / <i>Malus</i> genotypes	Izdalīto <i>V. inaequalis</i> izolātu skaits / Number of isolated <i>V. inaequalis</i> strains	
	Zemgale	Kurzeme
Piemājas dārzs / Home gardens		
‘Huvitus’	11	0
‘Sister of Liberty’	1	0
‘Antonovka’	2	0
‘Auksis’	1	0
‘Vista Bella’	1	0
‘Rudens Svītraīnais’	5	0
<i>Malus domestica</i>	2	3
Hibrīdu lauks / Germplasm collections		
‘Rāja’	7	0
Nr.16-97-109	5	0
‘Belorusskoje Malinovoje’	5	0
Nr.29-97-1	6*	0
‘Stars’	5*	0
‘Popes ābele’	1*	0
Apstādījumi / Greenery		
Kolonnveida ābele	10	0
‘Carnikava’	4	0
<i>Malus toringo</i>	4	0
Kopā:	96	47

\* — dārzos pielietoti augu aizsardzības līdzekļi / used the plant protection products

Mikrosatelītu (SSR) marķieru polimorfisma raksturojums. Kopumā 143 *V. inaequalis* izolātiem bija amplificētas 158 alēles, un to skaits ( $N_a$ ) svārstījās no divām līdz 29 alēlēm vienā lokusā (4. tab.).

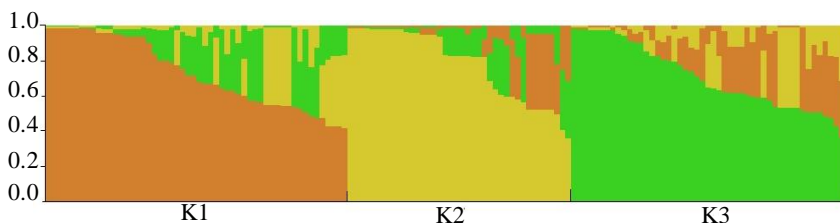
Alēļu skaits atspoguļo *V. inaequalis* Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības līmeni un ir līdzīgs (ar nelielām novirzēm) rezultātiem, kas iegūti pētījumos par *V. inaequalis* populācijām citās valstīs (Tenzer et al., 1999; Guerin et al., 2004; Xu et al., 2012; Mezghina et al., 2014; Koopman et al., 2017; Kozlovskaja et al., 2021).

Vismazākais polimorfisms ( $N_a = 2$ ) novērots marķierim Vigt10/ε. Augsts polimorfisms novērots marķieriem Vitc 2/D (29 alēles vienā lokusā) un 1tc1g (27 alēles vienā lokusā). Latvijā *V. inaequalis* populācijās konstatētais alēļu skaits Vitc 2/D lokusā ir lielāks (29) nekā analogiskos pētījumos iegūtie rādītāji (16) (Mezina et al., 2014), ASV (6) (Sitther et al., 2017) un Krievijā, Ziemeļkaukāzā (6) (Suprun et al., 2018).

Efektīvo alēļu skaits ( $N_e$ ) svārstījās no 1.01 (Vigt10/ε) līdz 14.31 (Vitic2/D) alēlēm lokusā. Nei ģēnu daudzveidības indekss (h) svārstījās no 0.01 līdz 0.93 atkarībā no marķiera. Lielākie rādītāji bija marķieriem Vitc2/D, 1tc1g un 1tc1a (4. tab.). Šenona informatīvais indekss (I) svārstījās no 0.04 līdz 2.88.

Polimorfisma informatīvais indekss (*PIC*, *polymorphic information content*) svārstījās no 0.013 (*Vigt10/ε*) līdz 0.934 (*Vitc2/D*). Jo lielāka konkrēta marķiera Šenona informatīvais indekss (*I*) un *PIC* vērtība, jo informatīvāks tas skaitās.

*Venturia inaequalis* populāciju raksturojums. Uzsākot pētījumu, bija izvirzīts pieņēmums, ka *V. inaequalis* populācija varētu būt saistīta ar ābeļu audzēšanas reģioniem (Zemgale un Kurzeme), tomēr pēc “Structure” programmas veiktās analīzes grupējuma *V. inaequalis* populācija tika sadalīta trīs ģenētiskās grupās K1 – K3 neatkarīgi no ābeļu audzēšanas reģioniem: ( $K = 3$ ,  $\Delta K = 8.94$ ,  $\ln Pr (X/K) \pm -2720.58 \pm 4.58$  (3. att.).



3. att. *Venturia inaequalis* izolātu grupējums trīs ģenētiskās grupās ( $K = 3$ ), izmantojot “Structure” datorprogrammu, balstoties uz 143 izolātu genotipēšanas datiem, tam izmantojot 12 *SSR* marķierus /

Fig. 3. Grouping of *Venturia inaequalis* isolates into three genetic groups ( $K = 3$ ) by the computer program “Structure” based on the genotyping data of 143 isolates with 12 *SSR* markers

Pirmajā grupā (K1) tika iekļauti 38% ( $n = 54$ ) *V. inaequalis* izolātu ar gandrīz vienādu izolātu skaitu no Latvijas reģioniem — Zemgales un Kurzemes. Šajā grupā lielākā daļa izolātu bija monokonīdiju izolāti ( $n = 46$ ), kas bija iegūti līdz 2013. gadam ( $n = 44$ ) divos galvenajos auglīkopības centros Latvijā (Dobelē un Pūrē;  $n = 44$ ): no augļiem ( $n = 33$ ), komerciālajos dārzos ( $n = 32$ ) un stādījumos ar fungicīdu apstrādi ( $n = 36$ ).

Otrajā grupā (K2) bija iekļauti 28% ( $n = 40$ ) *V. inaequalis* izolātu, kas galvenokārt bija no Zemgales (82%;  $n = 33$ ) un bija iegūti no augļiem, vai lapām dažādos gados, un auglīdārzos ar fungicīdu apstrādi ( $n = 22$ ) vai bez tās ( $n = 18$ ). Puse šīs grupas izolātu bija iegūti komerciālajos dārzos ( $n = 20$ ) un īpaši no šķirnes ‘Lobo’ ( $n = 17$ ).

Trešajā grupā (K3) bija 34% ( $n = 49$ ) *V. inaequalis* izolātu, no kuriem 73% bija iegūti Zemgalē ( $n = 36$ , īpaši Dobelē  $n = 31$ ). Šajā grupā ir vienāds to izolātu skaits, kas iegūti no augļiem ( $n = 24$ ) vai lapām ( $n = 25$ ). Lielākais daudzums izolātu ir monokonīdiju izolāti ( $n = 30$ ), kas kolekcijā bija ievākti līdz 2013. gadam ( $n = 33$ ) no dažāda veida auglīdārzos ar fungicīdu apstrādi ( $n = 21$ ) un bez tās ( $n = 28$ ). Puse no šīs grupas izolātiem bija izdalīti no šķirnēm ‘Huvitus’ ( $n = 10$ ), ‘Belorusskoje Maļinovoje’ ( $n = 9$ ) un ‘Lobo’ ( $n = 5$ ).

Analizējot iegūtos rezultātus un salīdzinot *V. inaequalis* izolātu grupējumu trīs ģenētiskās grupas (K1, K2, K3), izolātu grupēšanā netika atrastas nekādas sakarības. Izolāti bija sagrupēti neatkarīgi no šķirnes, no kuras patogēns bija izdalīts, un neatkarīgi no augu materiāla veida (lapas vai augļi) un ģeogrāfiskās izcelsmes.

Gēnu daudzveidība (h) *V. inaequalis* izolātu trīs ģenētiskās grupās (K) svārstās diapazonā no 0.53 līdz 0.64. Šenona informatīvais indekss (I) svārstās no 1.18 (K2) līdz 1.51 (K3). Otrajā ģenētiskajā grupā (K2) novērots privāto alēļu ( $P_a$ ) trūkums, vismazākais alēļu skaits ( $N_a$ ) un arī zemākais gēnu daudzveidības rādītājs (h) starp pētāmajām grupām (6. tab.).

6. tabula / Table 6

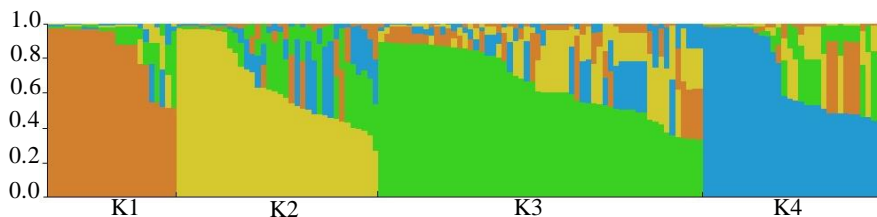
***Venturia inaequalis* Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības raksturojums pēc grupēšanas trīs ģenētiskajās grupās\*** / *Characterization of the genetic diversity in three genetic groups of V. inaequalis population in Latvia\**

Grupa	N	$N_a$	$P_a$	$N_e$	k	I	h
K1	54	7.33	1.67	3.60	14	1.33	0.59
K2	40	6.08	0.92	3.71	11	1.18	0.53
K3	49	9.00	2.75	4.57	14	1.51	0.64

\* — tabulā atspoguļotas visu analizēto marķieru vidējās vērtības; N — izolātu skaits;  $N_a$  — alēļu skaits lokusā;  $P_a$  — privāto alēļu skaits;  $N_e$  — efektīvo alēļu skaits lokusā; k — *Malus* genotipu skaits; I — Šenona informatīvais indekss; h — gēnu daudzveidība (Nei) / \* — the table shows the average values of all analyzed markers; N — number of isolates;  $N_a$  — total number of alleles;  $P_a$  — private alleles;  $N_e$  — effective number of alleles; k — number of *Malus* genotypes; I — Shannon's information index; h — gene diversity (Nei).

Lai izprastu iespējamo *V. inaequalis* izolātu grupēšanās iemeslu, neatkarīgi no audzēšanas reģiona (Zemgale un Kurzeme), no dārza veida vai saimniekauga genotipa, tika veikta vēl viena strukturālā analīze, 143 izolātiem no Latvijas papildus iekļaujot tajā vēl sešus *V. inaequalis* references izolātus ar zināmām rasēm un iepriekš raksturotu virulenci (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015). Šajā analīzē 149 *V. inaequalis* izolātus sadalīja četrās ģenētiskajās grupās: (K = 4,  $\Delta K = 9.86$ ,  $\ln \text{Pr}(X/K) \pm -2814.29 \pm 2.97$ ) (4. att.).

Šajā gadījumā grupēšana četrās ģenētiskajās grupās K1–K4 kopumā atbilst pirmās analīzes grupējumam; izņēmums ir viena lielākā grupa K3 (n = 58), kurā ietilpa trīs references izolāti — EU-B04, 1634 un 2408 — ar jau zināmu virulenci uz *Malus* genotipiem ar *Rvi1*, *Rvi4* un *Rvi8* rezistences gēniem (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015). Šajā grupā ietilpa 67 % Zemgalē ievāktu izolātu (n = 37) un 33% Kurzemē ievāktu izolātu (n = 18), kas pārsvarā bija iegūti kā monokonidiju izolāti no augļiem un kuri bija ievākti līdz 2013. gadam (n = 47). Lielākā daļa izolātu bija ievākti komercdārzos (n = 32) ar intensīvu fungicīdu apstrādi.



4. att. *Venturia inaequalis* izolātu grupēšana četrās ģenētiskajās grupās ( $K = 4$ ), izmantojot “Structure” datorprogrammu, balstoties uz 149 izolātu genotipēšanas datiem, tam izmantojot 12 SSR marķierus /

Fig. 4. Grouping of *Venturia inaequalis* isolates into four genetic groups ( $K = 4$ ) by the computer program “Structure” based on the genotyping data of 149 isolates with 12 SSR markers

Trijs citi rases references izolāti — 147, 1127 un 333, kuri ir virulenti uz *Malus* genotipiem ar citiem rezistences gēniem — *Rvi5*, *Rvi6* (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015) un *Rvi2* (V. Caffier, personīga komunikācija) un *Rvi2* — sagrupējās K2 grupā vēl ar 36 *V. inaequalis* izolātiem no DI kolekcijas. Šajā grupā ietilpa monokonīdiju ( $n = 14$ ) vai askusporu ( $n = 16$ ) izolāti no tuvu augošiem augļdārziem (bez fungicīdu apstrādi,  $n = 28$ ) Zemgalē ( $n = 30$ ) un pārsvarā Dobelē ( $n = 28$ ) ievāktām ābeļu lapām.

7. tabula / Table 7

***Venturia inaequalis* Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības raksturojums pēc izolātu grupēšanas četrās ģenētiskajās grupās, pievienojot sešus rases references izolātus\*** / *Characterization of the genetic diversity in four groups of Venturia inaequalis population in Latvia, including six race reference isolates\**

Grupa	N	$N_a$	$P_a$	$N_e$	k	I	h
K1	23	4.67	0.42	2.94	7	1.03	0.50
K2	36	8.00	2.00	4.13	14	1.42	0.62
K3	58	7.67	1.83	3.92	14	1.32	0.58
K4	32	5.42	0.75	3.10	9	1.17	0.56

\* — tabulā atspoguļotas visu analizēto marķieru vidējās vērtības; N — izolātu skaits;  $N_a$  — alēļu skaits lokusā;  $P_a$  — privāto alēļu skaits;  $N_e$  — efektīvo alēļu skaits lokusā; k — *Malus* genotipu skaits; I — Šenona informatīvais indekss; h — gēnu daudzveidība (Nei) / \* — the table shows the average values of all analyzed markers; N — number of isolates;  $N_a$  — total number of alleles;  $P_a$  — private alleles;  $N_e$  — effective number of alleles; k — number of *Malus* genotypes; I — Shannon’s information index; h — gene diversity (Nei).



Vislielākais efektīvo alēļu skaits ( $N_e$ ), gēnu daudzveidība ( $h$ ), Šenona informatīvais indekss ( $I$ ) un privāto alēļu skaits ( $P_a$ ) starp četrām ģenētiskajām grupām bija grupās K2 (2.00) un K3 (1.83), kur ietilpa references izolāti (7. tab.).

Salīdzinot trīs AMOVA rezultātus, varēja novērot augstu ģenētisko variāciju gan populāciju iekšienē, gan starp populācijām (8. tab.). Zemu ģenētisko variāciju starp populācijām Zemgalē un Kurzēmē apstiprināja zema  $\Phi_{IPT}$  vērtība. Savukārt populācijā ar sešiem rases references izolātiem novērotas augstākas variācijas populāciju iekšienē (85%) nekā starp populācijām (15%) (8. tab.).

8. tabula / Table 8

***Venturia inaequalis* Latvijas populācijas ģenētisko grupu molekulārās variācijas analīzes rezultāti / Results of the molecular variation analysis of *Venturia inaequalis* genetic groups in the Latvian population**

Variāciju avots / <i>Source of variation</i>	Brīvības pakāpe / <i>Degrees of freedom</i>	Noviržu kvadrātu summa / <i>Sum of squares</i>	Variācijas komponents / <i>Variance components</i>	Procentuālā variācija / <i>Percentage variation</i>	$\Phi_{IPT}$	p-vērtība / <i>Probability</i>
Starp divām ģenētiskajām grupām (Zemgale un Kurzeme)	1	17.33	0.21	5	0.05	0.001
Iekšpopulāciju	141	546.74	3.88	95	–	–*
Kopā	143	564.03	4.10	100	–	–
Starp trim ģenētiskajām grupām (“Structure” K = 3)	2	57.41	0.53	13	0.13	0.001
Iekšpopulāciju	140	507.65	3.63	87	–	–
Kopā	143	565.06	4.16	100	–	–
Starp četrām ģenētiskajām grupām (“Structure” K = 4)	3	76.10	0.61	15	0.15	0.001
Iekšpopulāciju	145	511.69	3.53	85	–	–
Kopā	149	587.79	4.14	100	–	–

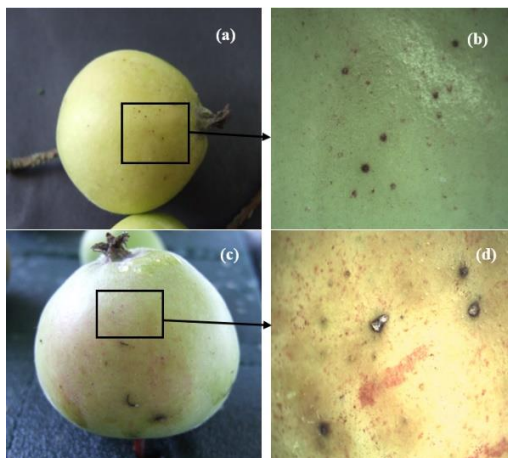
$\Phi_{IPT}$  — ģenētiskā diferenciacija; \* — nav kritērija raksturojuma /

$\Phi_{IPT}$  — genetic differentiation among populations; \* — no criterion characterization.

## ***Venturia inaequalis* izolātu virulences raksturošana un ābeļu šķirņu izturības noteikšana *in vitro* apstākļos**

Pirmās *V. inaequalis* izolātu un *Malus* genotipu mijiedarbības reakcijas visos eksperimentos konstatētas jau 1–2 nedēļas pēc inficēšanas. No piecām citos pētījumos aprakstītām reakcijām (Chevalier, Lespinasse, Renaudin, 1991; Martínez-Bilbao et al., 2012; Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015) šajā pētījumā novērotas tikai četras: hlorozi vai/un nekrozi, hlorozi vai/un nekrozi ar ierobežotu sporulāciju, hlorozi vai/un nekrozi ar bagātīgu sporulāciju un bagātīgu sporulāciju bez saimnieauga audu reakcijas.

Kopumā eksperimentos ar viena veida augu materiāla (lapu vai augļu) izmantošanu iegūtie rezultāti bija līdzīgi, izņemot atsevišķās kombinācijās, kas varētu būt saistīts ar lapu un augļu ontogēzes procesiem (Gessler, Stumm, 1984; Xu, Robinson, 2005).

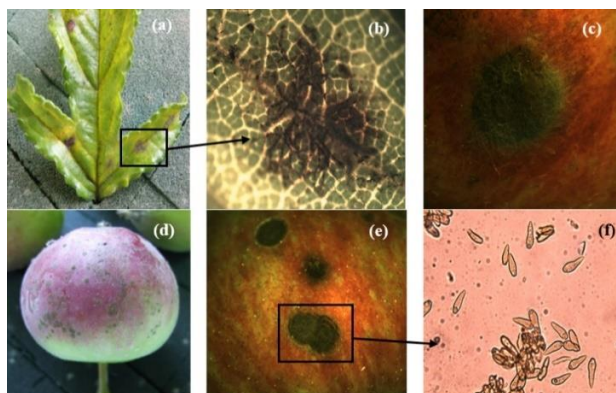


5. att. Ābeļu genotipu un *V. inaequalis* izolātu nesaderīgas mijiedarbības izpausmes uz augļiem: (a) un (b) — nekroze un punktveida iegrimumi ‘Priscilla’ augļa mizā pēc inficēšanas ar lauka populāciju; (c) un (d) — nekroze un punktveida iegrimumi ‘Edite’ augļa mizā vienu nedēļu pēc inficēšanas ar M146.2.21 izolātu / Fig.5. The phenotype of incompatible interaction of apple genotypes and *V. inaequalis* isolates on fruits: (a) and (b) — necrosis and spots resembling pin-points on ‘Priscilla’ fruits after inoculation with the field population; (c) and (d) — spots resembling pin-points and necrosis on ‘Edite’ fruits one week after inoculation with M146.2.21

Lielākā daļa pārbaudīto mijiedarbību kombinācijām (80%) novērotas nesaderīgas reakcijas: nekroze un/vai hloroze bez patogēna sporulācijas vai ar ierobežotu sporulāciju.

Visi eksperimentos iekļautie *V. inaequalis* izolāti un lauka populācijas bija nesaderīgas ar šķirni 'Priscilla'. Vienā no eksperimentiem, kurā inficēšana veikta ar otiņas palīdzību, genotipi 'Priscilla' un 'Edite' kombinācijās ar lauka populāciju un *V. inaequalis* izolātu M146.2.21 uz augļiem uzrādīja rezistences reakcijas, kas atgādināja punktveida iegrimumus (5. att.).

Lielākā daļa genotipu bija daļēji ieņēmīgi, kas izpaužas kā hloroze vai/un nekroze ar bagātīgu sporulāciju (6. att. (a-c)). Mijiedarbības rezultātā ar lielāko daļu no pārbaudītajiem izolātiem uz genotipa 'Lobo' augļiem arī novērotas daļējas ieņēmības reakciju (6. att. (c)). Ieņēmības reakciju konstatētas tikai dažiem genotipiem kombinācijā ar vismaz vienu *V. inaequalis* izolātu un tikai atsevišķos eksperimentos (6. att. (d-f)).



6. att. Ābeļu genotipu un *V. inaequalis* izolātu mijiedarbības izpausmes uz lapām un augļiem: (a) un (b) — hloroze un nekroze ar bagātīgu sporulāciju uz

*M. toringo* lapas pēc inficēšanas ar izolātu M146.2.21;

(c) — kraupja bojājumi ar ierobežotu sporulāciju uz genotipa 'Lobo' augļiem pēc inficēšanas ar izolātu M137.1.1; (d) — kraupja bojājumi ar sporulāciju uz genotipa 'Lobo' augļiem pēc inficēšanas ar izolātu M146.2.21; (e) un (f) — kraupja bojājumi ar bagātīgu sporulāciju uz genotipa 'Lobo' augļiem pēc inficēšanas ar lauka populāciju.

Palielinājums: (b) un (e) — 35x; (f) — 400x /

*Fig. 6. Interaction phenotypes of apple genotypes and V. inaequalis on leaves and fruits: (a) and (b) — chlorosis and necrosis with abundant sporulation on M. toringo leaf after inoculation with M146.2.21; (c) — scab lesions with limited sporulation on 'Lobo' fruits after inoculation with M137.1.1; (d) — scab lesions with sporulation on 'Lobo' fruit after inoculation with M146.2.21; (e) and (f) — scab lesions with abundant sporulation on 'Lobo' fruits after inoculation with field population.*

*Magnifications: (b) and (e) — 35x; (f) — 400x*

Virulences atšķirības novērotas visiem eksperimentos iekļautajiem *Venturia inaequalis* izolātiem. Katrs *V. inaequalis* izolāts bija virulents uz atšķirīgiem genotipiem, kas apstiprina to izcelsmes atšķirību. Latvijas izcelsmes izolāti bija virulenti un spēja izraisīt saslimšanu tieši Latvijā plaši audzētiem

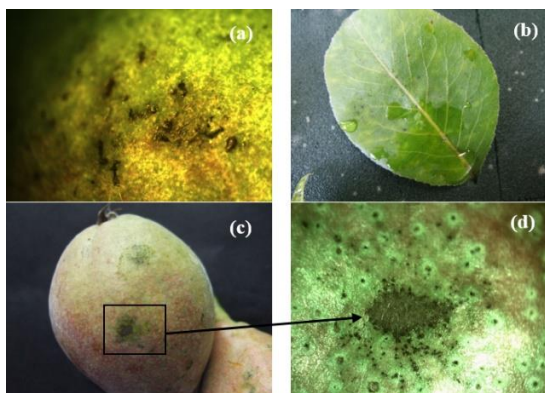
genotipiem, kas liecina par vietējo *V. inaequalis* populāciju adaptāciju Latvijā audzētajiem genotipiem. Divi izolāti, M139.1.1 un M142.1.1, kas bija izdalīti no genotipa 'Lobo', bija virulenti uz tā paša genotipa. Izolāts M146.2.21, kas izdalīts no *M. toringo*, bija virulents uz genotipiem 'Lobo', *M. toringo* un 'Gala'. *Venturia inaequalis* izolāts M1.1.1, kas bija izdalīts no Polijā audzēta genotipa 'Gala', bija virulents tikai uz genotipiem 'Gala', 'Golden Delicious' un 'Belorusskoje Maļinovoje', bet ne uz citiem Latvijā plaši audzētiem genotipiem vai genotipiem ar rezistences gēnu *Rvi6*.

### ***Venturia pyrina* izolātu virulences raksturošana un bumbieru šķirņu izturības noteikšana *in vitro* apstākļos**

Visos eksperimentos pirmos kraupja simptomus vai rezistences reakcijas novērotas gan makroskopiski, gan mikroskopiski 1–2 nedēļas pēc inficēšanas. Šajā pētījumā arī konstatētas visas piecas iepriekš aprakstītās reakcijas (Chevalier et al., 2004), kas norāda uz *V. pyrina* izolātu atšķirīgo virulenci un bumbieru šķirņu dažādajiem rezistences vai ieņēmības līmeņiem, ko novērojuši citi zinātnieki (Chevalier et al., 2004, 2008a; Brewer et al., 2009; Bouvier et al., 2012).

Līdzīgi kā *V. inaequalis* /*Malus* genotipu inficēšanas eksperimentos arī šajā pētījumā dažām mijiedarbības kombinācijām tika novēroti atšķirīgi rezultāti, kas varētu būt saistīts ar ontoģenētiskām izmaiņām lapās un augļos (Kemp, van Dieren, 2000). Lielākai daļai pārbaudīto genotipu un *V. pyrina* izolātu kombināciju (82%) bija nesaderīgas mijiedarbības reakcijas, kas izpaudās kā nekroze vai hloroze bez sporulācijas un kā nekroze vai hloroze ar ierobežotu sporulāciju (7. att.).

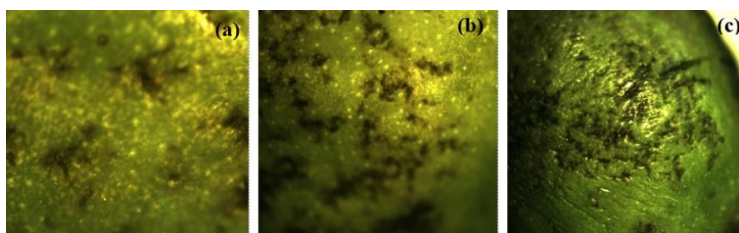
Genotipi 'Condo', 'Laurina' un 'Schedraja' mijiedarbībā ar visiem eksperimentos iekļautajiem *V. pyrina* izolātiem un arī ar lauka populācijām visos pētījuma gados uzrādīja rezistences un daļējas rezistences reakcijas.



7. att. **Bumbieru genotipu un *V. pyrina* izolātu mijiedarbības izpausmes uz augļiem un lapām:** (a) — nekroze bez patogēna sporulācijas uz genotipa ‘Pepi’ augļiem pēc inficēšanas ar Py31.1.3 izolātu; (b) — hloroze un nekroze bez patogēna sporulācijas uz genotipa ‘Schedraya’ lapām pēc inficēšanas ar Py35.1.1; (c) un (d) — nekroze un hloroze ar ierobežotu patogēna sporulāciju uz genotipa ‘Moskovskaja’ augļiem pēc inficēšanas ar Py48.2.1 /

*Fig. 7. Interaction phenotypes of pear genotypes and *V. pyrina* on leaves and fruits: (a) — necrosis without pathogen's sporulation on 'Pepi' fruit after inoculation with Py31.1.3; (b) — chlorosis and necrosis without pathogen's sporulation on 'Schedraya' leaf after inoculation with Py35.1.1; (c) and (d) — chlorosis and necrosis with limited pathogen's sporulation on 'Moskovskaya' fruit after inoculation with Py48.2.1*

Zvaižņveida nekroze bez vai ar ierobežotu sporulāciju novērota uz genotipa ‘Talgarskaja Krasavitsa’ augļiem mijiedarbībā ar pieciem *V. pyrina* izolātiem (Py28.2.4, Py29.1.3, Py31.1.3, Py35.1.1 un Py48.2.1) un arī ar lauka populācijām (8. att.), kā arī uz genotipiem ‘Nojabrskaja’, kas inokulēts ar *V. pyrina* izolātu Py48.2.1, un ‘Mašuk’, kas inokulēts ar Py28.2.4.

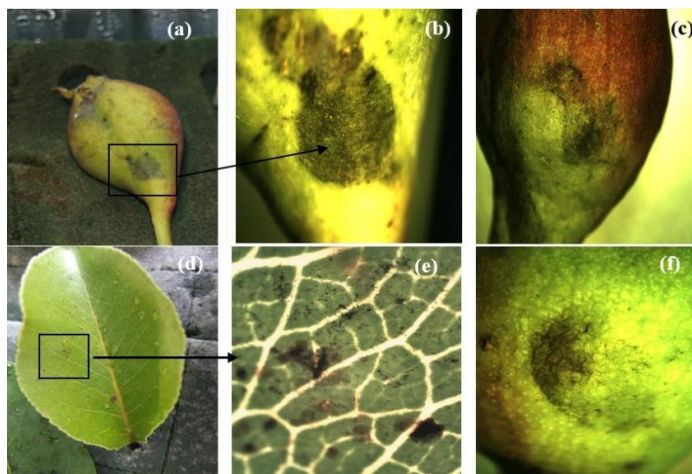


8. att. **Nesaderīgas mijiedarbības izpausme zvaižņveida nekrozes veidā uz bumbieres genotipa ‘Talgarskaja Krasavitsa’ augļiem:** pēc inficēšanas ar *V. pyrina* izolātiem Py28.2.4 (a), Py35.1.1 (b) un Py48.2.1 (c) /

*Fig. 8. Stellate necrosis, as the incompatible interaction phenotype on 'Talgarskaya Krasavitsa' fruit after inoculation with *V. pyrina* isolates: Py28.2.4 (a), Py35.1.1 (b) and Py48.2.1 (c)*

Zvaigžņveida nekroze uz genotipiem var liecināt par iespējamu *Rvp1* rezistences gēna klātbūtni (Bouvier et al., 2012). Šīs rezistences reakcijas novērotas eksperimentos, kur inficēšanu veica ar otiņas palīdzību.

Eksperimentos lielākā daļu bumbieru genotipu novērtēti kā 3.b klase jeb daļēji ieņēmīgas, uzrādot nekrozi ar bagātīgu patogēna sporulāciju (9. att. (a–e)). Pilnīgi ieņēmīgas reakcijas (4. klase) bija retas.



9. att. **Bumbieru genotipu un *V. pyrina* izolātu mijiedarbības izpausmes uz augļiem un lapām:**

nekroze ar bagātīgu patogēna sporulāciju uz genotipa ‘Serenāde’ augļiem (a un b) un uz genotipa ‘Hortensia’ augļiem (c) pēc inficēšanas ar lauka populāciju; (d) un (e) — nekroze ar bagātīgu patogēna sporulāciju uz genotipa ‘Talgarskaja Krasavitsa’ lapām pēc inficēšanas ar Py48.2.1 izolātu; (f) — bagātīga patogēna sporulācija bez audu reakcijas uz genotipa ‘Talgarskaja Krasavitsa’ augļiem pēc inficēšanas ar Py47.1.1.

Palielinājums: (b), (c) un (f) — 5 mm; (e) — 50 μm /

*Fig. 9. The interactions phenotypes of pear genotypes and *V. pyrina* on fruits and leaves:*

*necrosis with abundant pathogen's sporulation on 'Serenāde' fruits (a and b) and on 'Hortensia' fruits (c) after inoculation with field population; (d) and (e) — necrosis with abundant pathogen's sporulation on 'Talgarskaja Krasavitsa' leaf after inoculation with Py48.2.1; (f) — abundant pathogen's sporulation without host tissue reaction on 'Talgarskaja Krasavitsa' fruits after inoculation with Py47.1.1; Magnifications: (b), (c) and (f) — 5 mm; (e) — 50 μm*

Patogēna sporulācija bez saimnieka audu reakcijas novērota tikai uz genotipiem ‘Conference’, ‘Moskovskaja’, ‘Belorusskaja Pozdņaja’, ‘Talgarskaja Krasavitsa’ un ‘Pepi’ kombinācijā ar atsevišķiem izolātiem (9. att. (f)).

Pilnīgi ieņēmīgas reakcijas (4. klase) bija retas arī šajā pētījumā. Patogēna sporulācija bez saimnieka audu reakcijas konstatēta tikai genotipiem

‘Conference’, ‘Moskovskaja’, ‘Belorusskaja Pozdnaja’, ‘Talgarskaja Krasavitsa’ un ‘Pepi’ kombinācijā ar atsevišķiem izolātiem (9. att. (f)).

Visi eksperimentos iekļautie *V. pyrina* izolāti bija virulenti pret vismaz vienu *Pyrus* genotipu un vismaz vienā no veiktajiem eksperimentiem. Katrs *V. pyrina* izolāts bija virulents uz atšķirīgiem genotipiem, kas apstiprina patogēnu populāciju atšķirību, kura novērota arī citos pētījumos pētījumos (Stanton, 1953; Chevalier et al., 2002, 2008a). Lielākā daļa *V. pyrina* izolātu bija saderīgi ar vienu līdz četriem bumbieru genotipiem, savukārt izolāti Py47.1.1 un Py48.2.1, kas izolēti no dažādās vietās audzētās šķirnes ‘Mļejevskaja Raņņaja’, bija virulenti uz sešiem *Pyrus* genotipiem.

### ***Venturia inaequalis* rasu sastāva noteikšana no 2017. gada līdz 2022. gadam rases diferencējošo *Malus* genotipu stādījumā**

Apkopojot sešu gadu datus, konstatēts, ka kraupja attīstības pakāpes uz lapām rases diferencējošo *Malus* genotipu stādījumā atšķirās gan vienas veģetācijas sezonas garumā, gan visā novērošanas periodā. Slimības attīstības pakāpe variēja plašā diapazonā: no 1 līdz astoņām ballēm (9. tab.).

9. tabula / Table 9

### **Kraupja attīstības pakāpes vērtējums uz *V. inaequalis* rases diferencējošiem *Malus* genotipiem veģetācijas sezonās no 2017. gada līdz 2022. gadam / Evaluation of scab severity on *V. inaequalis* races differential *Malus* genotypes in the vegetation seasons from 2017 to 2022**

Genotips / <i>Genotype</i>	Rezisten- ces gēns / <i>Resistance gene</i>	Kraupja vērtēšana pa gadiem, balles (1–9)* un standartnovirze (SN) / <i>Apple scab severity scores in the each year (1-9)* and standard deviation (SD)</i>					
		2017	2018	2019	2020	2021	2022
‘Gala’	nav	1.2**±0.4	1.1±0.3	1.1±0.3	1.2±0.4	3.6±1.1	2.2±0.2
‘Golden Delicious’	<i>Rvi1</i>	1.2±0.4	1.1±0.3	1.5±0.8	1.4±0.7	3.6±0.7	2.0±0.3
TSR34715	<i>Rvi2</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
Q71	<i>Rvi3</i>	1.0±0	1.0±0	1.9±1.2	3.3±0.7	5.4±2.5	2.0±0
TSR33T239	<i>Rvi4</i>	1.1±0.3	1.0±0	1.4±0.8	2.8±0.9	5.8±2.0	2.2±0.2
9-AR2T196	<i>Rvi5</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
‘Priscilla’	<i>Rvi6</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
<i>M. floribunda</i>	<i>Rvi6, Rvi7</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
B45	<i>Rvi8</i>	1.0±0	1.0±0	1.5±0.8	2.2±0.9	4.2±2.9	2.0±0

9. tabulas turpinājums / Table 9 continued

Genotips / Genotype	Rezisten- ces gēns / Resistance gene	Kraupja vērtēšana pa gadiem, balles (1–9)* un standartnovirze (SN) / Apple scab severity scores in the each year (1-9)* and standard deviation (SD)					
		2017	2018	2019	2020	2021	2022
J34	<i>Rvi9</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.2±0.4	1.0±0
A723-6	<i>Rvi10</i>	1.2±0.4	1.0±0	1.2±0.4	1.2±0.4	1.9±0.3	1.8±0.2
‘Hansen’s baccata 2’	<i>Rvi12</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
‘Durello de Forlì’	<i>Rvi13</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.1±0.3	1.0±0
‘Dulmener Rosenapfel’	<i>Rvi14</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0
GMAL2473	<i>Rvi15</i>	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0

\* — slimība vērtēta vizuāli pēc 9 ballu skalas, kur: 1 — nav redzamu simptomu;

2 — viens vai daži atsevišķi bojājumi; 3 — bojājumi, kas sagrupēti atsevišķās koka daļās; 4 — starpposms starp 3 un 5; 5 — daudzi bojājumi, kas plaši izplatīti lielā koka daļā; 6 — starpposms starp 5 un 7; 7 — smaga infekcija, puse no lapām ar vairākiem bojājumiem; 8 — starpposms starp 7 un 9; 9 — koks ir smagi skarts, gandrīz visām lapām ir vairāki bojājumi; \*\* — vērtības, kas atspoguļo vidējo slimības attīstības pakāpi gadā, individuāli novērtējot piecus kokus katram genotipam divas reizes sezonā /

\* — disease was scored visually following 1–9 scoring scale, where: 1 — no visible symptoms; 2 — one or very few individual lesions; 3 — lesions clustered in few parts of the tree; 4 — intermediate between 3 and 5; 5 — numerous lesions widespread over a large part of the tree; 6 — intermediate between 5 and 7; 7 — severe infection, half of the leaves with multiple lesions; 8 — intermediate between 7 and 9; 9 — tree severely affected, nearly all leaves with multiple lesions; \*\* — scores representing the average disease development rate per year by individually evaluating five trees for each genotype twice per season

Jau pirmajā vērtēšanas gadā novērota patogēna sporulēšana uz genotipiem ‘Gala’ /h(0), ‘Golden Delicious’ /h(1), TSR33T239 /h(4) un A723-6 /h(10). Sporulēšana uz šiem genotipiem norāda uz rasu 1., 4. un 10. klātbūtni *Vinaequalis* populācijā DI dārzā un rezistences gēnu *Rvi1*, *Rvi4* un *Rvi10* pārvarēšanu.

DI dārzā 2019. gadā tika apstiprinātas vēl divas rases 3. un 8. Kraupja bojājumi ar bagātīgu sporulāciju un bez audu reakcijas novēroti uz genotipu Q1/*Rvi3* un B45/*Rvi8* lapām. Slimības attīstības pakāpe šiem genotipiem DI stādījumā variēja plašā diapazonā, un 2021. gadā bija novēroti augstākie rādītāji 5.4 un 4.2 (9. tab.).

Līdz 2021. gadam kraupja ierobežošanai stādījumā nebija izmantots neviens augu aizsardzības līdzeklis, iespējams, patogēna lielās akumulācijas dēļ gadu



garumā 2021. gadā vēl diviem genotipiem — J34/*Rvi9* un ‘Durello de Forli’/*Rvi13* — konstatēti daži sporulējoši plankumui bez audu reakcijas.

Savukārt 2022. gada vasarā stādījumā būtiski bija samazinājusies slimības attīstības pakāpe (9. tab.), kas, iespējams, saistīts ar 2021. gada rudenī veiktajiem kraupja ierobežošanas pasākumiem.

Kopumā sešu gadu laikā sporulācija bez audu reakcijas novērota astoņiem genotipiem: ‘Gala’ /h(0), ‘Golden Delicious’ /h(1), Q71 /h(3), TSR33T239 /h(4), B45 /h(8), J34 /h(9), A723-6 /h(10) un ‘Durello di Forli’ /h(13), kas var liecināt par vairāku rezistences gēnu pārvarēšanu un rasu klātbūtni.

Vairākiem genotipiem: h(2), h(5), h(6), h(7), h(12), h(14) un h(15) kraupja pazīmes netika konstatētas ne uz lapām, ne uz augļiem. Rezistences gēni, kas, mūsaprāt, ir daudzsoļi ieviešanai selekcijā Latvijā ir *Rvi2*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi12*, *Rvi14* un *Rvi15*.

## SECINĀJUMI

1. *Venturia inaequalis* un *V. pyrina* Latvijas populācijās novērota izolātu morfoloģiskā daudzveidība katras sugas ietvaros, kas atspoguļo patogēnu iekšpopulāciju daudzveidību Latvijā. Izdalīti astoņi *V. inaequalis* un četri *V. pyrina* morfotipi. (1. tēze)
2. Izmantojot SSR marķierus, *Venturia inaequalis* populācija sadalīta vairākās ģenētiski atšķirīgās grupās. Jāturpina pētījumi, lai noskaidrotu faktoros, kas to nosaka. (1. tēze)
3. Gandrīz visiem ābeļu un bumbieru genotipiem izturības/ieņēmības novērtēšanas rezultāti *in vitro* eksperimentos sakrita ar iepriekšējos laika periodos un lauka apstākļos iegūtajiem rezultātiem. Katrs no *V. inaequalis* un *V. pyrina* izolātiem bija virulents uz atšķirīgiem genotipiem. Latvijas izcelsmes izolāti bija virulentāki attiecībā uz Latvijā plaši audzētiem genotipiem, kas liecina par vietējo kraupja ierosinātāju populāciju adaptāciju. (2. tēze)
4. Pamatojoties uz sešu gadu monitoringa rezultātiem, var secināt, ka Dārzkopības institūta dārzā *V. inaequalis* populācijā ir konstatētas vismaz četras *V. inaequalis* rases — 1., 3., 4., 8., un genotipu rezistence ar gēniem *Rvi1*, *Rvi3*, *Rvi4* un *Rvi8* ir pārvarēta. (3. tēze)
5. *Malus* genotipiem ar rezistences gēniem *Rvi2*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi12*, *Rvi14* un *Rvi15* netika konstatētas kraupja pazīmes ne uz lapām, ne uz augļiem, un mūsaprāt tie ir daudzsoļi ieviešanai selekcijā Latvijā. (3. tēze)

## PATEICĪBAS

Pētījuma dati iegūti, un promocijas darba izstrāde līdzfinansēta, pateicoties projektiem:

- ESF projekts Nr. 8.2.2.0/20/V/001 “LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli”.
- LZP-2019/1-0094 “Mašīnu dziļās mācīšanās un datizraces pielietošana augu un patogēnu mijiedarbības izpētei: ābeļu un bumbieru kraupja patosistēmas”.
- LZP grants “Ābeļu un bumbieru rezistences pret kraupi daudzveidības un iedzimtības izpēte, patogēnu *Venturia inaequalis* un *Venturia pyrina* rasu un populāciju daudzveidības raksturojums”.
- ESF projekts “Zinātniskās kapacitātes stiprināšana auglīkopības, mežu un informācijas tehnoloģijas nozarēs, nodrošinot videi draudzīgu audzēšanas risinājumu, produktu izstrādes un ieviešanas izpēti ar datortehnoloģiju atbalstu”.
- Globāls pētnieku un zinātnisko institūciju tīkls “Monitoring of *Venturia inaequalis* virulence’s”, *V. inaequalis* rases diferencējošo genotipu kolekcijas izveide un rasu parādīšanās ilggadīgs monitorings.

Izsaku pateicību darba kolēģiem no Dārzkopības institūta par atbalstu darba izstrādes procesā. Īpašs paldies kolēģim Edgaram Rubauskim par vērtīgajiem ieteikumiem datu apstrādē un Arturam Stalažam darba tehniskajā uzlabojumā.

Esmu pateicīga savai ģimenei par atbalstu un pacietību visā darba tapšanas procesā. Liels paldies manai kursabiedrenei Irinai Sivickai gan par morālo atbalstu, gan par vērtīgajiem ieteikumiem.

## INTRODUCTION

The domestic apple (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) and the European pear (*Pyrus communis* L.) are among the most common fruit plants not only in Latvia, but all over the world. Statistics show that as many as 8000 t of apples were produced in Latvia in 2017 (EU-28 Fresh Deciduous Fruit Annual, 2018). According to the data of the Rural Support Service, in 2018 the area of commercial apple orchards in Latvia was 2662.38 ha where organic orchards covered 321.54 ha. As regards pear plantations, they occupied almost 200 ha, with commercial plantations covering 100 ha of which only 14.73 ha were covered by organic gardens.

Fresh apples and pears can be provided to consumers almost all year round. However, the volume and quality of the yield are affected by diseases that can damage all parts of the plants. Apple and pear diseases are caused by fungi, bacteria and viruses.

Every year, apple and pear growers in Latvia and around the world suffer great economic losses because of apple scab (causal agent *Venturia inaequalis*) and pear scab (causal agent *Venturia pyrina*). As a result of scab, yield losses in organic farming systems can reach 40-80% (Capocek, 2011), and in some cases even 100 % if plant protection products are not used (Kienholz, 1937; Liu, Richards, Shabi, 1990; Smith, 2009; Sugar, Hilton, 2011).

Changes in agricultural techniques, introduction of new cultivars, as well as climate changes affect the populations of *V. inaequalis* and *V. pyrina*, new and more aggressive races are formed which are able to adapt to changing environmental conditions (MacHardy, Gadoury, Gessler, 2001; Ebrahimi et al., 2016). There are 14 known races of *V. inaequalis*, the causal agent of apple scab, and five races of *V. pyrina*, the causal agent of pear scab (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015; Patocchi et al., 2020). Pathogens are able to adapt and overcome cultivar resistance and develop resistance to fungicides (Chevalier et al., 2004; Jamar et al., 2007; Lespinasse et al., 2008; Ebrahimi et al., 2016; González-Domínguez et al., 2017).

The description of the diversity of pathogen populations and determination of the racial composition allow predicting more accurately the aggressiveness of pathogens and formation of new races. This information helps to evaluate breeding material and introduce new resistant cultivars in gardens.

**The aim:** to describe the population diversity of local *V. inaequalis* and *V. pyrina* and determine the composition of *V. inaequalis* races in Latvia.

**The tasks of research:**

- characterise the diversity of the populations of *V. inaequalis* and *V. pyrina* in Latvia;
- characterize the virulence of *V. inaequalis* isolates and determine the resistance of apple genotypes *in vitro*;

- characterize the virulence of *V. pyrina* isolates and determine the resistance of pear genotypes under *in vitro* conditions;
- determine the composition of *V. inaequalis* races in Latvia using race differentiating *Malus* genotypes in field conditions.

**Novelty of research:**

- for the first time, morphological characterisation of Latvian populations of apple scab causal agent *V. inaequalis* and pear scab causal agent *V. pyrina* have been performed, as well as the characterisation of genetic diversity of Latvian populations of apple scab causal agent *V. inaequalis* using 12 microsatellite (SSR) markers;
- characterisation of virulence of *V. inaequalis* and *V. pyrina* isolates performed for the first time, with determination of the resistance of apple and pear genotypes using leaves and newly developed fruit *in vitro*;
- for the first time, the composition of *V. inaequalis* races in Latvia has been determined by using *Malus* genotypes for discrimination.

**Research hypothesis:** the populations of the causal agents of apple and pear scab *V. inaequalis* and *V. pyrina* in Latvia are diverse, and several *V. inaequalis* races are present in Latvia.

**These to be defended:**

- in Latvia, the populations of *V. inaequalis* and *V. pyrina* are diverse;
- the diversity and virulence of scab agents depend on the diversity of host genotypes in gardens;
- several races of *V. inaequalis* occur in Latvia.

**Structure of the Doctoral Thesis:** introduction, literature review, Materials and methods, results and discussion, conclusions, reference list and annexes. The Ph. D. thesis has 91 pages (excluding bibliography and appendices); contains 30 tables, 14 figures; 443 bibliographic sources, as well as 27 annexes.

**Approbation of research data:** Five peer-reviewed scientific papers, that have been indexed either in Scopus or Web of Science databases, are published based on the results of this study. The results have been reported in five oral presentations as well as six poster presentations at scientific conferences.

# CONDITIONS AND METHODOLOGY OF THE STUDY

## Place and time of the study

The studies were conducted between 2014 and 2022 in the Unit of Plant Pathology and Entomology of the Institute of Horticulture (hereinafter — the Institute):

— the diversity of scab agents was characterised on potato dextrose agar (PDA) according to the morphological features of isolates;

— microsatellite markers (SSR) were used to characterise the genetic diversity of *V. inaequalis*, the causal agent of apple scab;

— the virulence of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina* isolates was measured and the resistance of apple and pear genotypes was determined. During the study, five *in vitro* inoculation experiments using apple/pear leaves and apple/pear immature fruits were carried out between 2013 and 2016;

— the race composition of *Venturia inaequalis* was determined in a plantation established in the territory of the Institute with 15 *V. inaequalis* races differential *Malus* genotypes.

## Characterisation of the diversity of Latvia's population of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina*

The place of the study. Between 2010 and 2017, a collection of isolates of causal agents of scab was created. The collection contained isolates that were collected from 19 apple and eight pear genotypes, surveying 16 apple and 15 pear plantations in five regions of Latvia.

Collection of samples. A total of 167 samples of apple and 53 samples of pear plant material were collected: apple and pear leaves and/or fruits with scab-like lesions. *Venturia* species were identified in the laboratory by host plant affiliation and morphological features of the pathogen using a binocular “XT12/13/24B2” and a stereomicroscope “Leica DMLS”.

Creation of an isolate collection. Single-spore cultures of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina* were obtained from conidia on fruit and leaf lesions and preserved in the collection on different media: on potato dextrose agar (PDA), oatmeal agar (OMA) and in sterile distilled water (H<sub>2</sub>O).

Preparation of isolates for the studies. Before the studies, the growth of isolates was restored in a Petri dish containing PDA medium. After sowing, fungi were incubated for 14 days at room temperature (22±2 °C) in 65% relative humidity. Then isolates were grown separately for each study, either on PDA media (for characterisation of morphological features and inoculation experiments) or in potato dextrose broth (PDB) (for DNA extraction).

## **Characterisation of morphological features of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina***

The morphology of *V. inaequalis* un *V. pyrina* isolates was described using *V. inaequalis* colony classification methodology of Kirkham (Kirkham, 1957) and Nasonov and Yakuba (Насонов и Якуба, 2020) what we had modified for our study. Isolates were grown on PDA media and incubated at room temperature ( $22 \pm 2$  °C) for one month.

The morphological features characterised: a diameter of colonies, the type of aerial mycelium, the type of the margin/edge of the colony, sporulation intensity, the colour of colonies, the colour of the central growing point of the colony and the type of mycelium of the central growing point of the colony. The presence of sporulation was determined visually with a light microscope (“Leica DMLS”).

The intensity of sporulation for each isolate was classified depending on the number of spores seen in the field of view of the microscope (at 400× magnification). The size of the isolate colony was determined as an average parameter of two colony measurements: horizontal and vertical. The colour of the colony was determined using the colour chart for plants developed by the Royal Horticultural Society (RHS Colour Chart, UK).

## **Characterisation of genetic diversity of the *Venturia inaequalis* population with SSR markers**

For DNA extraction, the isolates were grown for 21–28 days in a liquid medium (PDB) at room temperature ( $22 \pm 2$  °C). The mycelium was dried by lyophilisation and ground into a fine powder using liquid nitrogen. DNA was extracted with a reagent kit “DNeasy Plant Mini Kit” (“Qiagen”, Vācija) according to the manufacturer’s instructions. For each sample, the concentration and purity of the extracted DNA was assessed with a spectrophotometer “ND– 1000” (“NanoDrop”). The extracted DNA samples were stored at  $-20$  °C.

Before the genetic analysis of the *V. inaequalis* population, testing of 31 SSR microsatellite primer pairs (Tenzer et al., 1999; Guerin et al., 2004; Xu et al., 2009) was performed using a set of samples with 18 isolates from different host plant genotypes, which also had different origins. After testing a set of *V. inaequalis* samples, 12 SSR primer pairs were selected for analysis of the collection of causal agents of scab (Table 1).

PCR amplification of microsatellite markers was performed in a 25  $\mu$ L reaction volume per sample. Amplification was performed in a thermal cycler “EP 45 Gradient” (“Eppendorf”) with PCR conditions: initial denaturation for 5 minutes at 95 °C, denaturation for 30 seconds at 95 °C, hybridisation for 90 seconds at 56 °C (or 60 °C depending on the marker), elongation for

30 seconds at 72 °C, final elongation for 30 minutes at 60 °C. Table 1 shows the hybridisation temperature provided for each microsatellite marker.

The obtained PCR amplification products and their approximate lengths were checked by electrophoresis in a 4.0 % agarose gel (“AppliChem”), adding ethidium bromide to visualise the DNA fragments in the gel with ultraviolet light. The lengths of fragments were determined with a length marker “O’RangeRuler 20 bp Ladder” (“Thermo Scientific”).

The lengths of the amplified fragments were determined at the Latvian State Forest Research Institute “Silava”, with a genetic analyser “3130xl” (“Applied Biosystems”, ASV).

### **Determination of virulence of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina* and resistance of apple and pear cultivars *in vitro***

Plant material. During the study, five experiments were carried out infecting apple/pear leaves and apple/pear immature fruits. For each combination of genotypes and isolates, two to five young leaves (GS 33 according to the BBCH scale, Meier et al., 2001) and immature fruits (GS 74–75) were inoculated, depending on their availability during each vegetation period.

Leaves and fruits were collected without visual damage from trees growing in the genetic resource collection of the Institute which had not been treated with fungicide. Leaves were inoculated in two experiments (Experiments 1 and 3), and immature fruits were inoculated in three experiments (Experiments 2, 4 and 5).

In total, eight apple and 18 pear genotypes with different resistance/susceptibility to scab in field conditions were tested in the experiments, along with five *Malus* genotypes tested in the experiments with known resistance. The genotypes for the experiments were selected to cover as wide a range of genotypes as possible — both local and widely grown cultivars in commercial orchards and backyard gardens, as well as cultivars widely grown in other European countries.

Isolates and inoculum preparation. Nine *V. inaequalis* isolates and seven *V. pyrina* isolates, which were obtained from different host plant genotypes and had different geographical origins, were included in the experiments to test the virulence of causal agents of scab. Four *V. inaequalis* isolates were isolated from apple genotypes grown in Latvia, one isolate from a genotype grown in Poland, and the other four were reference isolates (147, 333, 1634 and 2408) with a known race, namely, belonging to races 2, 4, 5 and 8 and virulent to *Malus* genotypes with resistance genes *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5* and *Rvi8* (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015; V. Caffier, personal communication for strain 333). *V. pyrina* isolates included in the experiment were isolated only from host plant genotypes grown in Latvia, and their race affiliation and virulence were unknown.



As a positive control, spore suspension was used in all experiments, which was prepared by collecting infected leaves and fruits from different genotypes of host plants (*Malus* or *Pyrus* — depending on the experiment) growing in the Institute's plantation without fungicide treatment. Distilled water was used as a negative control in the experiments.

Inoculation and incubation. Inoculation of leaves and immature fruits was carried out in all experiments with spore suspension by applying it in two ways: (1) with a pipette applying two to four drops of 50  $\mu\text{L}$  suspension on the leaf or fruit surface (Experiments 1 and 2) and (2) by applying the suspension on leaf and fruit surfaces with a brush dipped twice in the suspension (Experiments 3, 4 and 5).

Before their inoculation in Experiments 1 and 2 (2013), leaves and fruits were not disinfected, only washed three times with distilled water. Disinfection was not performed in these experiments to avoid damage to the cuticle and epidermis and to preserve the maximum natural condition of leaves and fruits. In subsequent experiments (Experiments 3, 4, and 5 between 2014 and 2016), leaves and fruits were disinfected with a 70% ethanol solution by immersing them in a disinfectant liquid for one minute and then rinsing them three times in sterile distilled water.

After the inoculation, leaves were incubated in moist chambers in Petri dishes (Experiment 1 in 2013) and on an aluminium foil tray on floral foam (Experiment 3 in 2014). Fruits were incubated in moist chambers in transparent plastic boxes with lids (Experiment 2 in 2013) and on aluminium foil trays on floral foam moistened with sterile distilled water (Experiments 4 and 5 in 2015–2016).

Immature fruits in Experiment 1 were kept in transparent boxes with a lid in the laboratory on a table under natural light and incubated at room temperature. The incubation of leaves and fruits in Experiments 2–5 was carried out under controlled conditions — in plant growing chambers (“Binder KBW 720”) at a temperature between 20 to 22 °C in the light (16 hours) and at 18 °C in the dark (8 hours), with 80% relative humidity.

Methodology of observations. During all experiments symptoms were digitally documented. For the first time, leaves and fruits were assessed one week after the day of inoculation, then again once a week until the end of all experiments. Manifestations of susceptibility or resistance, which occurred in the process of interaction between *V. inaequalis* isolates and apple genotypes and between *V. pyrina* isolates and pear genotypes, were evaluated according to the methodology described by Chevalier et al., (1991, 2004) where: 0 — no macroscopic signs and no observable signs of plant tissue reaction; 1 — hypersensitivity reaction; 2 — chlorosis or necrosis without sporulation; 3.a — chlorosis or necrosis with limited sporulation; 3.b — chlorosis or necrosis with abundant sporulation; 4 — abundant sporulation without plant tissue reaction. The observed interactions were further classified according to Caffier et al. (2015), where interactions with a score of 0–2 are considered resistant

(incompatible); 3.a — moderately resistant (incompatible); 3.b — partially susceptible (compatible) and 4 — susceptible (compatible). In order to confirm the observed tissue reactions, as well as the presence of *V. inaequalis* and *V. pyrina* sporulation, each macroscopic feature was examined using a binocular and stereomicroscope.

### **Determination of the race composition of *Venturia inaequalis* in Latvia, using races differential *Malus* genotypes**

In 2010, as part of the “Vinqest” project, a collection of 15 differential *Malus* genotypes from Switzerland, *Agroscope Changins-Wadenswil* (Table 2) was created at the Institute of Horticulture to determine the racial composition of *V. inaequalis*.

The plantation of races differential *Malus* genotypes was established in the orchard of a germplasm collection of the Institute (in Krimūnu pagasts of Dobeles municipality) on 15 October 2016. Each races differential *Malus* genotype was propagated by grafting it onto dwarf rootstocks ‘B396’, five seedlings for each genotype. Trees were planted 1.2 × 4.0 m; isolation distance between trees — 3 m. Apples were planted in five blocks according to the “Vinqest” planting scheme, one tree for each genotype in each block. Genotypes that were not available (h(16)-h(20)) were replaced by genotype ‘Golden Delicious’ /h(1).

Apples were planted in a humus-rich carbonate soil (Vki), according to the granulometric composition of the soil (sandy clay (sM), soil reaction pH<sub>KCl</sub> 7.3; humus content – 2.9%; phosphorus content (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) – 132 mg kg<sup>-1</sup>; potassium content (K<sub>2</sub>O) – 170 mg kg<sup>-1</sup>). The place chosen for the plantation was suitable for growing apples.

In growing of plants a general strategy was applied, except for the fact that fungicides were not applied in the plantation. From 2021 onwards, sanitary measures were carried out for decomposition of fallen leaves. Insecticides were used to prevent the spread of green apple aphids (*Aphis pomi*).

Methodology of field observations for characterisation of *V. inaequalis* races in the plantation of differential *Malus* genotypes. The evaluation of scab occurrence and stage of development in the “Vinqest” plantation was assessed twice per season, starting in 2017. The first assessment was carried out at the 19<sup>th</sup> stage of plant growth (Meier et al., 1994), when the first leaves of apples reached the characteristic size; the second assessment was carried out at the 33<sup>rd</sup> stage of plant growth (Meier et al., 1994). The degree of disease development was determined visually by assessing each tree individually and using a nine-point scale in the evaluation, according to the “Vinqest” methodology (Table 3) (Lateur, Populer, 1994; Patocchi et al., 2009).

According to the “Vinqest” methodology, when assessing evaluation of scab severity, only *V. inaequalis* damage without the plant tissue reaction is taken into

account, which indicates the overcoming of the resistance gene of *Malus* genotypes and the presence of the *V. inaequalis* race in the existing plantation (population).

Description of meteorological conditions. Meteorological conditions are important because they affect the development of *V. inaequalis* during the growing season of apples. Therefore, the amount of precipitation and the average air temperature from the first decade of April to the third decade of September were described. Meteorological data was obtained from the field weather station “Lufft” of the Institute in 2017–2022.

Comparing meteorological conditions throughout the study period from 2017 till 2022, the least precipitation was observed in April and May in almost all years, except for 2021 and 2022. The amount of precipitation during this period affects the formation and development of the primary infection of *V. inaequalis* in plantations.

In 2022, the total amount of precipitation in the summer in Dobele (233 mm) by 5% exceeded the amount recorded during the long-term observations (222.6 mm). In Dobele, the amount of precipitation in 2021 and in August of 2022 was higher than in 2017–2020, thus the formation and development of the secondary infection of scab, as well as the risk of spread during the harvest and storage increased. The summers of 2018 and 2019 were hot and dry. The year 2020 was the warmest year in the history of meteorological observations in Latvia (since 1924).

### **Mathematical data analyses**

The presence of morphological characteristics of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina* isolates among the isolates was determined with the descriptive statistics module of the “SPSS 17.0” (Norman, Dale, Hadlai, 1968) software. Pearson’s correlation coefficient ( $r$ ) was calculated to determine how strong the relationships were between the established morphological characteristics of the isolates. The grouping of isolates into morphotypes according to their morphological characteristics was done using a hierarchy analysis.

“GenAlEx 6.41” (Peakall, Smouse, 2006) was used to characterise the parameters of genetic diversity for each SSR marker: the length of alleles, the number of alleles per a locus ( $N_a$ ), the number of effective alleles per a locus ( $N_e$ ) (Nei, 1987), the number of private alleles in each population ( $P_a$ ), Shannon’s information index ( $I$ ) (Lewontin, 1972) and the gene diversity index ( $h$ ) (Nei, 1973).

The distribution of genetic diversity of *Venturia inaequalis* in Latvia’s population was characterised by the analysis of molecular variance (AMOVA), calculating the coefficient of genetic differentiation ( $\Phi_{IPT}$ ). The polymorphism

information content (PIC) was calculated using using Lamboy's "SSRS" computer program (personal communication with G. Lāci).

The genetic structure and differentiation of *Venturia inaequalis* populations were evaluated using haploid data analysed with a Bayesian approach in the computer software "Structure 2.3.4." (Pritchard et al., 2000). To determine the most likely number of populations (K) among *V. inaequalis* isolates, a model for no admixed populations was used which depended on the allele frequency in each microsatellite marker (with 100,000 burn-ins and 300,000 Markov Chain Monte-Carlo (MCMC) repetitions). All probabilities were replicated 20 times for each K (analysing them over a range of 2–12) to confirm the probability of loglikelihood. The most probable grouping was visualised using the "CLUMPP 1.1" (Jakobsson, Rosenberg, 2007) and "Structure Plot V2.0" (Ramasamy et al., 2014) programmes.

For the assessment of the evaluation of scab severity (on a scale from one to nine) in the "Vinquest" plantation, statistical processing of data was performed using the "MS Excel" programme. Indicators of descriptive statistics were calculated: the arithmetic mean, the standard deviation, the standard error, the minimum and maximum values.

## RESULTS

### Characterisation of morphological features of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina* isolates

The diversity of Latvia's population of *V. inaequalis* and *V. pyrina*, the causal agents of scab, is characterised by the morphological features of the isolates contained in the Institute's collection, i.e. 183 *V. inaequalis* and 104 *V. pyrina* isolates.

The colony size (diameter) of the analysed isolates on the medium used in the study varied from 0.6 to 5.7 cm for *V. inaequalis* isolates and from 0.7 to 5.2 cm for *V. pyrina* isolates. The group with a colony diameter  $\geq 2.1$  cm included the largest number of *V. inaequalis* and *V. pyrina* isolates.

The type of aerial mycelia differed for *V. inaequalis* and *V. pyrina* isolates. There were four types of aerial mycelia for isolates of the causal agent of apple scab: weakly expressed, porous, thick woolly and thick felty; only two types of aerial mycelium were found for isolates of the causal agent of pear scab: thick woolly and thick felty.

The type of a colony margin/edge. Most of *V. inaequalis* and *V. pyrina* isolates had a moderately pronounced colony edge. Only *V. inaequalis* isolates had a weak colony edge (poorly defined), while *V. pyrina* isolates had no such a type of a colony edge at all.

Sporulation intensity. During the study, the variations in sporulation intensity observed for apple and pear scab pathogen isolates ranged from weak or absent (none) to abundant. Abundant sporulation was observed more often for *V. inaequalis* isolates than for *V. pyrina* isolates, while most of *V. pyrina* isolates had weak or no sporulation.

Characterisation of the colour in the centre of the colony. In this study, only three of the six previously described characteristics were observed in scab pathogen isolates: pigmentation similar to the base colour of the colony, pigmentation darker than the base colour of the colony, and pigmentation lighter than the base colour of the colony.

Macroscopic characterisation of the mycelium in the centre of the colony. In this study, only two of the five described variations for this characteristic were observed in isolates of the scab causal agents: the mycelium was thick woolly and thick felty.

The colour of the mycelium varied over a wide spectral range. For *Venturia inaequalis* isolates, 21 colours of the mycelium were observed, while for *V. pyrina* isolates the colours varied less significantly, namely, the mycelium had only eight colours. However, zones of mycelium colour with a ring-like shade of 2–3 colours could also be observed for the isolates of both species, what made it difficult to accurately determine the colour of the mycelium.

Grouping of *Venturia inaequalis* isolates into morphotypes. To group *V. inaequalis* isolates into morphotypes, Pearson's correlation coefficient was used to select the morphological characteristics of the isolates whose correlation coefficient was no less than  $r = 0.300$  (moderate to strong correlation).

Based on Pearson's correlation coefficient, *V. inaequalis* isolates were grouped into morphotypes according to three morphological characteristics: the type of the aerial mycelium, sporulation intensity and the type of the edge/margin of the colony.

On the basis of the results of the hierarchy analysis, *V. inaequalis* isolates were grouped into eight morphotypes.

*Morphotypes 1* (Fig. 1. (a)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick woolly aerial mycelium, abundant sporulation, different diameters of the colony. The isolates displayed a wide variety of colours of the aerial mycelium. This group includes 37 isolates, 59% ( $n = 22$ ) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 2* (Fig. 1. (b)). Colonies with a moderately pronounced edge, porous aerial mycelium, abundant sporulation, 1.6 cm and larger in diameter. The colour of the aerial mycelium of most of the isolates (86%) was greenish grey and light greenish grey. The group includes seven isolates, 71% ( $n = 5$ ) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 3* (Fig. 1. (c)). Colonies with a weakly pronounced edge, porous aerial mycelium, abundant sporulation, 1.6 cm and larger in diameter. The colour of the aerial mycelium of all isolates was greyish-green. There are five isolates in the group, 80% ( $n = 4$ ) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 4* (Fig. 1. (d)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick woolly aerial mycelium, medium intensity of sporulation, 2.1 cm and larger in diameter. The isolates showed a wide variety of aerial mycelium colours. The group includes 29 isolates. As regards their distribution according to the plant material from which the isolates were isolated, it is almost the same: 51% (n = 15) from fruits and 49% (n = 14) from leaves.

*Morphotypes 5* (Fig. 1. (e)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick felty aerial mycelium, medium intensity of sporulation, 1.6 cm and larger in diameter. There was a wide variety of aerial mycelium colours. The group includes 46 isolates, 72% (n = 33) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 6* (Fig. 1. (f)). Colonies with a distinct edge, thick felty aerial mycelium, sporulation was not observed, the diameter of the colony was 1.6 cm and larger. There was a wide variety of aerial mycelium colours. The group includes 15 isolates, 73% (n = 11) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 7* (Fig. 1. (g)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick woolly aerial mycelium, with no sporulation. Diameters of the colonies differed and there was a wide variety of aerial mycelium colours. The group includes nine isolates. As regards their distribution according to the plant material from which the isolates were isolated, it is almost the same: 51% (n = 5) from leaves and 49% (n = 4) from fruits.

*Morphotypes 8* (Fig. 1. (h)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick felty aerial mycelium, with no sporulation, the diameter of the colony was 1.6 cm and larger. There was a wide variety of aerial mycelium colours. The group includes 31 isolates, 58% (n = 18) of which were isolated from leaves.

For the grouping of *Venturia pyrina* isolates into morphotypes, only those characteristics for which the correlation coefficient was no less than  $r = 0.300$  were selected.

*V. pyrina* isolates were grouped into morphotypes on the basis of three morphological characteristics: the type of the aerial mycelium, the type of the edge/margin of the colony and sporulation intensity. According to the results obtained in the hierarchy analysis, *V. pyrina* isolates were grouped into four morphotypes.

*Morphotypes 1* (Fig. 2. (a)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick felty aerial mycelium, different diameters of the colonies. Sporulation was weak or absent. The aerial mycelia were light olive grey or light greyish olive for more than half of the isolates (63%). The group includes 27 isolates, 52% (n = 14) of which were isolated from fruits.

*Morphotypes 2* (Fig. 2. (b)). Colonies with a distinct edge, thick felty aerial mycelium, 2.1 cm and larger in diameter, displaying a wide variety of aerial mycelium colours. Sporulation was not observed. There are seven isolates in this group, 57% (n = 4) of which were isolated from leaves.

*Morphotypes 3* (Fig. 2. (c)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick woolly aerial mycelium, 2.1 cm and more in diameter. More than half of

the isolates (63%) had a moderate olive brown colour. The intensity of sporulation was medium and weak; most of the isolates (n = 47 out of 67) did not show any sporulation at all. The group includes 67 isolates, 73% (n = 49) of which were isolated from fruits.

*Morphotypes 4* (Fig. 2. (d)). Colonies with a moderately pronounced edge, thick woolly aerial mycelium, abundant sporulation, 2.1 cm and larger in diameter. A moderate olive brown colour was observed for most of the isolates (71%). There are seven isolates in the group, all isolated from fruits.

The obtained results show that there is a great phenotypic diversity of *V. inaequalis* and *V. pyrina* genotypes in Latvia.

### **Characterisation of the diversity of Latvia's population of *V. inaequalis*, the causal agent of apple scab, using SSR markers**

To characterise the diversity of Latvia's population of *Venturia inaequalis*, according to the obtained results, from the previously tested 31 SSR primer pairs, 19 SSR primer pairs were excluded from further studies, of which 11 (1aac3b, 1aac4h, Vigt8/146, Viaggt8/1, Vitcca7/P, Vitc2/16, Vitg9/99, Vica9/x, ViaacS10, Vica9/134, Vitg9/129) were monomorphic, six (1aac4b, 1aac4f, EMVi 001b, EMVi0032c, Viga3/z, Vica10/154) showed several difficult to interpret amplicons, and two primer pairs (Vitic1/82 un Vitic1/2) did not show any amplicons for more than 10 analysed isolates. On the basis of the results obtained after the evaluation of the sample set of *V. inaequalis*, only 12 SSR primer pairs were selected for characterising the diversity of Latvia's population of the causal agent of apple scab, which amplified one fragment and showed differences in fragment lengths among the tested isolates (Table 5).

During the study, a sample set of 143 *V. inaequalis* isolates was genotyped with the selected SSR markers from the initial 183 isolates whose morphological features had been characterised earlier. The remaining 40 isolates were excluded from further studies due to the contamination of samples. The analysed *V. inaequalis* isolates were collected from two main apple-growing regions in Latvia, namely, Zemgale and Kurzeme, from different genotypes of the host plant, grown in different types of gardens (Table 4).

Characterisation of polymorphism of SSR microsatellite markers. A total of 158 alleles were amplified in 143 *V. inaequalis* isolates, and the number of alleles ( $N_a$ ) varied from two to 29 alleles per locus (Table 5).

The number of alleles reflects the level of genetic diversity of Latvia's population of *V. inaequalis* and it is similar (with minor deviations) to the results obtained in the studies of *V. inaequalis* populations in other countries (Tenzer et al., 1999; Guerin et al., 2004; Xu et al., 2012; Mezghina et al., 2014; Koopman et al., 2017; Kozlovskaja et al., 2021). The smallest polymorphism ( $N_a = 2$ ) was observed for the marker Vigt10/ε. High polymorphism was observed for the

markers Vtc 2/D (29 alleles per locus) and 1tc1g (27 alleles per locus). The number of alleles in the Vtc 2/D locus found in *V. inaequalis* populations in Latvia is higher (29) than the indicators obtained in analogous studies in Belarus (16) (Mezina et al., 2014), the USA (6) (Sithter et al., 2017) and Russia, the North Caucasus (6) (Suprun et al., 2018).

The number of effective alleles ( $N_e$ ) ranged from 1.01 to 14.31 alleles per locus. Nei's gene diversity index ( $h$ ) ranged from 0.01 to 0.93 depending on the marker. The highest scores were for the markers Vtc2/D, 1tc1g and 1tc1a (Table 5). Shannon's information index ( $I$ ) ranged from 0.04 to 2.88. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.013 (Vigt10/ε) to 0.934 (Vtc2/D). The higher the Shannon's information index ( $I$ ) and the PIC value of a particular marker, the more informative it is considered to be.

Characterisation of *Venturia inaequalis* populations. At the beginning of the study, it was assumed that the *V. inaequalis* population could be associated with apple-growing regions (Zemgale and Kurzeme), however, after the grouping on the basis of the "Structure" analysis, the *V. inaequalis* population was divided into three genetic groups K1–K3 irrespective of the apple-growing regions: (K = 3,  $\Delta K = 8.94$ ,  $\ln \text{Pr}(X/K) \pm -2720.58 \pm 4.58$  (Fig. 3).

The first group (K1) included 38% ( $n = 54$ ) of *V. inaequalis* isolates, with an almost equal number of isolates from Latvia's regions, i.e. Zemgale and Kurzeme. In this group, the majority of isolates were monoconidial isolates ( $n = 46$ ) obtained until 2013 ( $n = 44$ ) in two main fruit-growing centres in Latvia (Dobele and Pūre;  $n = 44$ ): from fruits ( $n = 33$ ), in commercial gardens ( $n = 32$ ) and plantations with fungicide treatment ( $n = 36$ ).

The second group (K2) included 28% ( $n = 40$ ) of *V. inaequalis* isolates that came mainly from Zemgale (82%;  $n = 33$ ), which were obtained from fruits or leaves in different years and in orchards with ( $n = 22$ ) or without ( $n = 18$ ) fungicide treatment. Half of the isolates in this group were obtained from commercial gardens ( $n = 20$ ) and especially from the cultivar 'Lobo' ( $n = 17$ ).

The third group (K3) contained 34% ( $n = 49$ ) of *V. inaequalis* isolates, of which 73 % were obtained in Zemgale ( $n = 36$ , especially in Dobele  $n = 31$ ). This group contained an equal number of isolates that were obtained from fruits ( $n = 24$ ) or from leaves ( $n = 25$ ). The largest number of isolates was monoconidial isolates ( $n = 30$ ) collected until 2013 ( $n = 33$ ) from different types of orchards with ( $n = 21$ ) and without ( $n = 28$ ) fungicide treatment. Half of the isolates in this group were isolated from the cultivars 'Huvitus' ( $n = 10$ ), 'Belorusskoye Malinovoye' ( $n = 9$ ) and 'Lobo' ( $n = 5$ ).

Analysing the obtained results and comparing three genetic groups (K1, K2, K3) of the clusters of *V. inaequalis* isolates, no relationships were found in the grouping of isolates. Isolates were grouped irrespective of the cultivar from which the pathogen was isolated, and irrespective of the type of plant material (leaves or fruits) and geographic origin.



Gene diversity ( $h$ ) in three genetic groups ( $K$ ) of *V. inaequalis* isolates ranges from 0.53 to 0.64. Shannon's information index ( $I$ ) ranges from 1.18 to 1.51. The second genetic group ( $K_2$ ) shows absence of private alleles ( $P_a$ ), the lowest number of alleles ( $N_a$ ) and also the lowest gene diversity index ( $h$ ) among the groups analysed.

In order to understand the possible reason for the clusters of *V. inaequalis* isolates, irrespective of the growing region (Zemgale and Kurzeme), the type of the garden or the genotype of the host plant, another structural analysis was performed, where 143 isolates from Latvia were supplemented with six more *V. inaequalis* reference isolates with known races and previously characterised virulence (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015). In this analysis, 149 *V. inaequalis* isolates were divided into four genetic groups: ( $K = 4$ ,  $\Delta K = 9.86$ ,  $\ln \Pr(X/K) \pm -2814.29 \pm 2.97$ ) (Fig. 4).

In this case, the grouping into four genetic groups  $K_1$ – $K_4$  generally corresponds to the grouping of the first analysis; the exception is one larger group  $K_3$  ( $n = 58$ ), which included three reference isolates, namely, EU-B04, 1634 and 2408, with virulence to *Malus* genotypes with *Rvi1*, *Rvi4* and *Rvi8* resistance genes which was already known before (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015). This group included 67% ( $n = 37$ ) of the isolates collected in Zemgale and 33% of the isolates collected in Kurzeme ( $n = 18$ ), which were mostly obtained as monoconidial isolates ( $n = 33$ ) from fruits ( $n = 33$ ) and collected until 2013 ( $n = 47$ ). Most of the isolates were collected in commercial orchards ( $n = 32$ ) with intensive fungicide treatment.

Other three race reference isolates, namely, 147, 1127 and 333, which are virulent on *Malus* genotypes with other resistance genes, i.e. *Rvi5*, *Rvi6* (Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015) and *Rvi2* (V. Caffier, personal communication), clustered in the  $K_2$  group together with another 36 *V. inaequalis* isolates from the Institute's collection. This group included isolates of monoconidia ( $n = 14$ ) or ascospores ( $n = 16$ ) from apple leaves collected in nearby orchards (without fungicide treatment,  $n = 28$ ) in Zemgale ( $n = 30$ ) and mostly in Dobeles ( $n = 28$ ).

Among the four genetic groups, the highest number of effective alleles ( $N_e$ ), gene diversity ( $h$ ), Shannon's information index ( $I$ ) and the number of private alleles ( $P_a$ ) were in groups  $K_2$  (2.00) and  $K_3$  (1.83), which included reference isolates (Table 7).

Comparing the results of three analysis of molecular variance (AMOVA), a high genetic variance could be observed within as well as among the populations (Table 8). A low genetic variance among the populations in Zemgale and Kurzeme was confirmed by a low PhiPT value. Though, for the population with six race reference isolates, higher variations were observed within the population (85%) than among the populations (15%) (Table 8).

## Characterisation of virulence of *Venturia inaequalis* isolates and determination of resistance of apple cultivars *in vitro*

The first interaction reactions between *V. inaequalis* isolates and *Malus* genotypes were detected already 1–2 weeks after the inoculation in all experiments. Only four out of five reactions described in other studies (Chevalier, Lespinasse, Renaudin, 1991; Martínez-Bilbao et al., 2012; Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015) were observed in this study: chlorosis or/and necrosis, chlorosis or/and necrosis with limited sporulation, chlorosis or/and necrosis with abundant sporulation, and abundant sporulation without the host tissue reaction.

In general, the results obtained in experiments where one type of plant material (leaves or fruits) was used were similar, except in certain combinations, what is probably related to the ontogenetic processes in leaves and fruits (Gessler, Stumm, 1984; Xu, Robinson, 2005).

Most of the combinations of tested interactions (80 %) showed incompatible reactions: necrosis and/or chlorosis without pathogen sporulation or with limited sporulation.

All *V. inaequalis* isolates and field populations included in the experiments were incompatible with the cultivar ‘Priscilla’. In one of the experiments, in which the infection was carried out with a brush, the genotypes ‘Priscilla’ and ‘Edite’ in combination with the field population and the *V. inaequalis* isolate M146.2.21 showed resistance reactions on the fruits resembling pin-points (Fig. 5).

Most of the genotypes were partially susceptible what was evidenced by chlorosis and/or necrosis with abundant sporulation (Fig. 6 (a-c)). As a result of the interaction with most of the tested isolates, a partial susceptibility reaction was also observed on the fruits of the genotype ‘Lobo’ (Fig. 6 (c)). Only some genotypes in combination with at least one *V. inaequalis* isolate and only in individual experiments showed a susceptibility response (Fig. 6 (d-f)).

Differences in virulence were observed for all *V. inaequalis* isolates included in the experiments. Each *V. inaequalis* isolate was virulent on different genotypes what confirmed their different origin. The isolates of Latvian origin were virulent and could cause disease specifically for genotypes widely grown in Latvia what evidences the adaptation of local *V. inaequalis* populations to the genotypes grown in Latvia.

Two isolates M139.1.1 un M142.1.1, from the genotype ‘Lobo’ were virulent on the same genotype. The isolate M146.2.21 isolated from *M. toringo* was virulent on the genotypes ‘Lobo’, *M. toringo* and ‘Gala’. The *Venturia inaequalis* isolate M1.1.1, which was isolated from the genotype ‘Gala’ grown in Poland, was virulent only on the genotypes ‘Gala’, ‘Golden Delicious’ and ‘Belorusskoye Malinovoye’, but not on other genotypes widely grown in Latvia or genotypes with the resistance gene *Rvi6*.

## Characterisation of virulence of *Venturia pyrina* isolates and determination of resistance of pear cultivars *in vitro*

In all experiments, the first symptoms of scab or resistance reactions were observed both macroscopically and microscopically 1–2 weeks after the inoculation. As part of this study all five responses described above (Chevalier et al., 2004), were also identified showing the different virulence of *V. pyrina* isolates and the different levels of resistance or susceptibility of pear cultivars observed by other scientists (Chevalier et al., 2004, 2008a; Brewer et al., 2009; Bouvier et al., 2012).

Like in the experiments with the inoculation of *V. inaequalis* /*Malus* genotypes, different results were also observed in this study for some interaction combinations what may be related to ontogenetic changes in leaves and fruits (Kemp, van Dieren, 2000).

Most of the tested combinations of genotypes and *V. pyrina* isolates (82%) showed incompatible interaction responses, manifested as necrosis or chlorosis without sporulation and necrosis or chlorosis with limited sporulation (Fig. 7).

The genotypes ‘Condo’, ‘Laurina’ and ‘Schedraya’ showed resistance and partial resistance responses in interactions with all *V. pyrina* isolates included in the experiments and also with field populations in all years of the study.

Stellate necrosis without or with limited sporulation was observed on the fruits of the genotype ‘Talgarskaya Krasavitsa’ in interaction with five *V. pyrina* isolates (Py28.2.4, Py29.1.3, Py31.1.3, Py35.1.1 and Py48.2.1) and also with field populations (Fig. 8), as well as on the genotypes ‘Noyabrskaya’ inoculated with the *V. pyrina* isolate Py48.2.1, and ‘Mashuk’ inoculated with Py28.2.4. Stellate necrosis on genotypes may indicate the possible presence of the *Rvp1* resistance gene (Bouvier et al., 2012). These resistance responses were observed in experiments where inoculation was carried out with a brush.

In the experiments, most of the pear genotypes were evaluated as Grade 3.b or partially susceptible, showing necrosis with abundant sporulation of the pathogen (Fig. 9 (a–e)). Completely susceptible responses (Grade 4) were rare. Pathogen sporulation without the host tissue reaction was observed only on the genotypes ‘Conference’, ‘Moskovskaya’, ‘Belorusskaya Pozdnyaya’, ‘Talgarskaya Krasavitsa’ and ‘Pepi’ in combination with individual isolates (Fig. 9 (f)).

Completely susceptible responses (Grade 4) were rare also in this study. Pathogen sporulation without the host tissue reaction was found only in the genotypes ‘Conference’, ‘Moskovskaya’, ‘Belorusskaya Pozdnyaya’, ‘Talgarskaya Krasavitsa’ and ‘Pepi’ in combination with individual isolates (Fig. 9 (f)).

All *V. pyrina* isolates included in the experiments were virulent against at least one *Pyrus* genotype and in at least one of the experiments performed. Each *V. pyrina* isolate was virulent on different genotypes, which confirms the

difference in pathogen populations observed in other studies (Stanton, 1953; Chevalier et al., 2002, 2008a). Most of *V. pyrina* isolates were compatible with one to four pear genotypes, while isolates Py47.1.1 and Py48.2.1, isolated from the cultivar ‘Mleyevskaya Rannya’ grown in different locations, were virulent on six *Pyrus* genotypes.

### **Determination of the racial composition of *Venturia inaequalis* from 2017 to 2022 in the plantation of races differential *Malus* genotypes**

By summarising the data of six years, it was established that the severity score of scab development on the leaves in the plantation of races differential *Malus* genotypes differed over one vegetation season as well as throughout the observation period. The severity score of the disease varied in a wide range: on a scale of one to eight.

Already in the first year of scoring, the pathogen sporulation was recorded on genotypes ‘Gala’ /h(0), ‘Golden Delicious’ /h(1), TSR33T239 /h(4) and A723- 6 /h(10). Sporulation on these genotypes indicates the presence of races 1, 4 and 10 in the *V. inaequalis* population in the Institute’s orchard and the overcoming of the resistance genes *Rvi1*, *Rvi4* and *Rvi10*.

Two more races, namely, 3 and 8, were confirmed in the Institute’s orchard in 2019. Scab lesions with abundant sporulation and without tissue reaction were observed on leaves of genotypes Q71 /h(3) and B45 /h(8). The severity score of disease development for these genotypes in the Institute’s plantation greatly varied, reaching the highest rates of 5.4 and 4.2 in 2021 (Table 9).

Until 2021, no plant protection product was used in the plantation to control scab, probably due to build-up of the infection source over the years, in 2021, some sporulating spots without tissue reaction were detected on two more genotypes – J34 /h(9) and ‘Durello de Forli’ /h(13).

In the summer of 2022, the severity score of the disease in the plantation had significantly decreased (Table 9), what was probably related to the measures taken to control scab in the autumn of 2021.

In total, over six years, sporulation without tissue reaction was observed for eight genotypes: ‘Gala’ /h(0), ‘Golden Delicious’ /h(1), Q71 /h(3), TSR33T239 /h(4), B45 /h(8), J34 /h(9), A723-6 /h(10) and ‘Durello de Forli’ /h(13), what may indicate the overcoming of several resistance genes and the presence of races.

For several genotypes: h(2), h(5), h(6), h(7), h(12), h(14) and h(15), signs of scab were not detected either on leaves or on fruits. We believe that resistance genes, which are promising for introduction in breeding in Latvia, are *Rvi2*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi12*, *Rvi14* and *Rvi15*.

## CONCLUSIONS

1. Morphological diversity of isolates within each species was observed in Latvia's populations of *Venturia inaequalis* and *V. pyrina*, which reflects the diversity within the pathogen populations in Latvia. Eight *V. inaequalis* and four *V. pyrina* morphotypes were distinguished. (Thesis 1)
2. Using SSR markers, the population of *Venturia inaequalis* is divided into several genetically distinct groups, further studies should be carried out to find out the factors determining this. (Thesis 1)
3. For almost all apple and pear genotypes, the results of the assessment of resistance/susceptibility *in vitro* coincided with the results obtained in previous periods and in field conditions. Each of the *V. inaequalis* and *V. pyrina* isolates was virulent on different genotypes. Isolates of Latvian origin were more virulent on genotypes widely grown in Latvia, which indicates adaptation of local populations of causal agents of scab. (Thesis 2)
4. On the basis of six-year monitoring results, it can be concluded that at least four races of *V. inaequalis* have been detected in the *V. inaequalis* population in the orchard of the Institute of Horticulture, namely, 1, 3, 4, 8, and genotype resistance with genes *Rvi1*, *Rvi3*, *Rvi4* and *Rvi8* have been overcome. (Thesis 3)
5. *Malus* genotypes with resistance genes *Rvi2*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi12*, *Rvi14* and *Rvi15* did not show any signs of scab either on leaves or on fruits, and we believe that they show promise of favourable breeding in Latvia. (Thesis 3)

## ACKNOWLEDGEMENTS

The research data was obtained, and the development of the doctoral thesis was co-financed thanks to the projects:

- The ESF Project No 8.2.2.0/20/I/001 “Transition of LLU to the New Model of Funding of Doctoral Studies”.
- The Latvian Council of Science Project “Application of deep learning and datamining for the study of plant-pathogen interaction: the case of apple and pear scab”.
- The Latvian Council of Science Project “Studies on inheritance and diversity of apple and pear resistance to scab and characterization of races and population diversity of causal organisms – *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*”.
- The ESF Project “Scientific capacity building in fruit-growing, forestry and information technology sectors, providing research on environmentally friendly growing strategies, product development and introduction aided by computer technologies”.
- Global network of researchers and scientific institutions “*Venturia inaequalis* virulence’s monitoring”, creation of a collection of differential *Malus* genotypes and monitoring of *Venturia inaequalis* race.

I am very grateful to my colleagues at the Institute of Horticulture for their support during the development of the Thesis. I am particularly grateful to my colleagues Edgars Rubauskis for his valuable suggestions regarding data processing and Arturs Stalažs for technical improvement of my Thesis.

I am very much obliged to my family for their support and patience throughout the process of writing the Thesis. I would also like to thank my fellow student Irina Sivicka for her moral support and valuable suggestions.

## Pētījuma rezultātu aprobācija / *Approbation of the scientific work*

### Zinātniskie raksti, kas indeksēti SCOPUS un / vai Web of Science datu bāzēs /

*Articles indexed in SCOPUS and / or Web of Science data bases*

1. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2022). Screening of *Venturia inaequalis* virulence and resistance of *Malus* genotypes to apple scab using *in vitro* methodology. Rural Sustainability Research, Vol. 48, Issue 343, p.79 – 90.
2. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Lācis G. (2022). Genetic diversity of *Venturia inaequalis* in Latvia revealed by microsatellite markers. Pathogens, Vol. 11, p. 1165. (Scopus (citēts 3 reizes / quoted three times))
3. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2022). Evaluation of apple scab and occurrence of *Venturia inaequalis* races on differential *Malus* genotypes in Latvia. Proceedings of the Latvian Academy of Science. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences., Vol. 76, Issue 4, p. 488 – 494. (Scopus (citēts 2 reizes / quoted two times))
4. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2021). Evaluation of *Venturia pyrina* virulence on European pear (*Pyrus communis*) cultivars by an *in vitro* methodology. Journal of Phytopathology, Vol. 169, Issue 7 – 8, p. 461 – 470. (Scopus (citēts 3 reizes / quoted three times))
5. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Bankina B. (2014). Review of the pear scab caused by *Venturia pyrina* Aderh. In: Research for Rural Development 2014: annual 20th international scientific conference proceeding, 21 – 23 May, 2014, Jelgava. Latvia University of Agriculture. Jelgava: LLU. Vol. 1, p. 26 – 33.

### Citi zinātniskie raksti /

*Other scientific articles*

1. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2023). Evaluation of *Venturia inaequalis* virulence on apple immature fruits and detached leaves by an *in-vitro* methodology. IOBC-WPRS Bulletin, Vol. 164, p. 16 – 18.

### Konferenču tēzes /

*Conference abstracts*

1. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2022). Evaluation of *Venturia inaequalis* virulence on apple immature fruits and detached leaves by an *in-vitro* methodology. “International IOBC-WPRS Workshop on Pome Fruit Diseases”, 12 – 18.06.2022. Plovdiva, Bulgārija.
2. Sokolova O. (2022). Biological control of apple scab caused by *Venturia inaequalis*. Nova kursi “Biological control and the role of plant biomes in

- plant health”. NOVA PhD course in plant pathology May 2022, SLU, Älvkarleö, Sweden. p. 6.
3. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2017). Characterization of genetic diversity of *Venturia inaequalis* population in Latvia using microsatellites. “12th European Foundation for Plant Pathology (EFPP) – 10th French Society for Plant Pathology (SFP) Conference”, Dunkerque, France, Abstract Book, p. 103.
  4. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2016). Development of method for evaluation of apple resistance and *Venturia inaequalis* virulence *in-vitro*. “3rd International scientific conference “Sustainable fruit growing: from plant to product” Riga – Dobeles 2016, RPD Abstracts 2, p. 62.
  5. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Fatehi J. (2015). Molecular phylogeny and diversity of apple pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. and pear scab pathogen *Venturia pyrina* (Aderh.). “8th International Conference on Biodiversity Research”, Daugavpils University Institute of Life Sciences and Technology, Daugavpils, Latvia, Abstract Book, p. 142.
  6. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Fatehi J. (2014). Diversity of pear pathogen *Venturia pyrina*. “19th Symposium of the Baltic mycologists and lichenologists”, Šķēde, Latvia, September 2014, Abstract Book, p. 65.
  7. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2014). Development of method for evaluation of pear cultivar resistance to scab and *Venturia pyrina* virulence *in-vitro*. “11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology”, Krakow, Poland, September 2014, Abstract Book, p. 338.
  8. Moročko-Bičevska I., Sokolova O. (2014). Molecular phylogeny and diversity of apple pathogen *Venturia inaequalis*. “11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology”, Krakow, Poland, September 2014, Abstract Book, p. 244.
  9. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. (2022). Ābeļu kraupja izvērtējums un *Venturia inaequalis* rasu sastopamība uz patogēna rases diferencējošiem *Malus* genotipiem Latvijā. Zinātniski praktiskā konference “Līdzsvarota Lauksaimniecība”, 24.–25.02.2022., LLU, Jelgava, Latvija, p. 39.

**Referāti konferencēs /**  
*Presentations in scientific conferences*

1. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. Evaluation of *Venturia inaequalis* virulence on apple immature fruits and detached leaves by an *in-vitro* methodology. “International IOBC-WPRS Workshop on Pome Fruit Diseases”, Plovdiva, Bulgārija, 2022. gada 12–18. jūnijs.
2. Sokolova O. Biological control of apple scab caused by *Venturia inaequalis*. Nova kursi “Biological control and the role of plant biomes in plant health”. NOVA PhD course in plant pathology, SLU, Älvkarleö, Zviedrija, 2022. gada 9–13. maijs.



3. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. Diversity of *Venturia inaequalis* in Latvia. "International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018: Plant Health in A Global Economy", ASV, Bostona, 2018. gada 29.07.–03.08.
4. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. Characterization of genetic diversity of *Venturia inaequalis* population in Latvia using microsatellites. "12th European Foundation for Plant Pathology (EFPP) – 10th French Society for Plant Pathology (SFP) Conference", Dunkerque, Francija, 2017. gada 29.05.– 2.06.
5. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Fatehi J. Molecular phylogeny and diversity of apple pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. and pear scab pathogen *Venturia pyrina* (Aderh.). "8th International Conference on Biodiversity Research", Daugavpils University Institute of Life Sciences and Technology, Daugavpils, Latvija, 2015. gadā 14–15. aprīlis.
6. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Bankina B. Review of the pear scab caused by *Venturia pyrina*. 20th International Scientific Conference "Research for Rural Development 2014", University of Agriculture, Jelgava, Latvija, 21–23. maijs.
7. Sokolova O., Moročko-Bičevska I., Fatehi J. Diversity of pear pathogen *Venturia pyrina*. "19th Symposium of the Baltic mycologists and lichenologists", Šķēde, Latvija, 2014. gada 22.09. –26.09.
8. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. Development of method for evaluation of pear cultivar resistance to scab and *Venturia pyrina* virulence *in-vitro*. "11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology", Krakova, Polijā, 2014. gada 8–13. septembris.
9. Moročko-Bičevska I., Sokolova O. Molecular phylogeny and diversity of apple pathogen *Venturia inaequalis*. "11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology", Krakova, Polija, 2014. gada 8–13. septembris.
10. Sokolova O., Moročko-Bičevska I. Ābeļu kraupja izvērtējums un *Venturia inaequalis* rasu sastopamība uz patogēna rases diferencējošiem *Malus* genotipiem Latvijā. Zinātniski praktiskā konference "Līdzsvarota lauksaimniecība", LLU, Jelgava, Latvija, 2022. gadā 24. februāris (tiešsaistē).

