# **STRESZCZENIE**

**Zmienność genetyczna populacji grzyba *Venturia inaequalis* w Polsce**

Parch jabłoni, powodowany przez grzyb *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., jest uważany za najbardziej szkodliwą chorobę jabłoni we wszystkich rejonach uprawy tego gatunku na świecie, ze względu na wysokie koszty ochrony przed chorobą, jak również straty owoców. Pomimo poznanej epidemiologii, nowoczesnych systemów prognozujących, szerokiego asortymentu środków ochrony oraz wprowadzania do uprawy odmian tolerancyjnych lub odpornych, parch jabłoni w dalszym ciągu ma duży wpływ na jakość i ilość plonu. Po pewnym czasie od zastosowania nowego sposobu ograniczania choroby, w sadzie pojawiają się nowe, odporne formy grzyba. Przyczyn tego stanu rzeczy należy upatrywać w dużej zmienności genetycznej, umożliwiającej patogenowi adaptację do dotychczas niekorzystnych dla niego warunków środowiska. Poznanie mechanizmu powstawania zmian na poziomie szczepów oraz populacji *V. inaequalis* jest konieczne w kontekście długoterminowej skutecznej ochrony przed tą ważną chorobą.

Celem niniejszej pracy była analiza zmienności genetycznej grzyba *V. inaequalis*, zachodzącej w odpowiedzi na różne strategie zwalczania patogena: stosowanie fungicydów z grupy strobiluryn oraz uprawę odmian jabłoni posiadających różne geny odporności na parcha jabłoni. W ramach badań zastosowano narzędzia biologii molekularnej, bazujące na technice PCR: konwencjonalnej oraz ilościowej, sekwencjonowanie metodą Sangera oraz programy bioinformatyczne, umożliwiające analizę danych (wielkości alleli mikrosatelitarnych DNA) oraz sekwencji DNA badanych genów w celu umożliwienia wnioskowania na temat pokrewieństwa, pochodzenia, zróżnicowania genetycznego, przepływu genów czy procesów ewolucyjnych oddziałujących na badane szczepy i/lub populacje grzyba *V. inaequalis.*

W oparciu o DNA jednozarodnikowych kultur grzyba, charakteryzujących się wrażliwością (‘Sens’) lub odpornością (‘Res’) na fungicydy strobilurynowe, opracowano metodę oznaczania częstości wystąpienia allelu zawierającego mutację punktową G → C w genie kodującym cytochrom *b* skutkującą substytucją glicyny na alaninę w 143 pozycji aminokwasowej powstającego białka. Ta zmiana warunkuje odporność grzyba na strobiluryny. W 2009 roku, z każdego z 15 sadów towarowych zlokalizowanych w Polsce centralnej, w których do ochrony jabłoni przed parchem stosowano m.in. strobiluryny, oraz z dwóch sadów bez żadnej ochrony pobrano 20-30 liści z wyraźnymi objawami choroby. Z plam grzyba na liściach izolowano DNA i poddano go analizie przy użyciu nowoopracowanej metody detekcji, określając procentowy udział mutacji G143A w DNA każdej badanej populacji, reprezentującej dany sad, w odniesieniu do krzywych standardowych wyznaczonych dla DNA szczepów referencyjnych. Zmierzono, że w sadach towarowych poziom odporności był zróżnicowany i mieścił się w zakresie od 50 do 100%, natomiast w sadzie ekologicznym dla 2 badanych populacji wynosił odpowiednio 1 i 46%.

W celu poznania struktury genetycznej populacji *V. inaequalis* zdolnych do wywołania choroby na jabłoniach posiadających gen odporności *Rvi6*, obserwowanych w Polsce od 2009 roku, oraz ich relacji z populacjami grzyba, dotychczas występującymi na terenie naszego kraju na jabłoniach z innymi genami odporności (tu: *Rvi1, Rvi17*) lub bez znanych genów odporności, przeprowadzono genotypowanie w obrębie 11 loci mikrosatelitarnych DNA u łącznie 606 szczepów grzyba, podzielonych na 20 populacji – według odmian i sadów, z których pochodziły. W wyniku przeprowadzonych analiz bazujących na dystansach oraz modelach bayesowskich populacje patogena pochodzące z różnych odmian jabłoni zostały podzielone na dwie wyraźne, różniące się od siebie genetycznie grupy szczepów o zróżnicowanej wirulencji: grupę wirulentną oraz awirulentną w stosunku do odmian z genem *Rvi6.* Obserwowane wartości *HD*, FST oraz dystansu genetycznego wg. Nei (1978) wyraźnie pokazały, że populacje wirulentne w stosunku do odmian z genem *Rvi6* wykazywały zredukowaną różnorodność genową w odróżnieniu od pozostałych populacji oraz były genetycznie bliższe z innymi populacjami z odmian z genem *Rvi6*, w szczególności pochodzącymi z tych samych sadów. Z drugiej jednak strony, grupa populacji z odmian z genem *Rvi6* była najbardziej wewnętrznie podzieloną grupą; populacje te różniły się znacząco między sadami, z których pochodziły, podczas gdy pozostałe populacje stanowiły heterogenną grupę bez wyraźnych podziałów, co wskazywałoby na introdukcję nowych *Rvi6-*wirulentnych szczepów na teren Polski w kilku niezależnych zdarzeniach migracyjnych. Wyjątek w testach stanowiły sady (w okolicach Lublina i Nowym Dworze), z których pobrano i zbadano oba typy populacji: pochodzących z odmian jabłoni z genem *Rvi6* oraz z jabłoni bez znanych genów odporności. Obliczenia wskazały na bliskość genetyczną i przepływ genów między nimi, co korespondowało z wynikami uzyskanymi w analizach grupowania i algorytmach przypisania szczepów, potwierdzających obecność migrantów w populacjach występujących na odmianach jabłoni bez żadnych genów odporności (DND oraz MGL) z populacji *Rvi6* z tych samych sadów*.* Dowody na ponowne spotkanie się i możliwy, choć mocno ograniczony, przepływ genów między szczepami o odmiennej wirulencji, współwystępującymi na jednej odmianie jabłoni - bez genu *Rvi6* - zostały przedstawione tutaj po raz pierwszy na świecie dla populacji *V. inaequalis* pochodzących z naturalnych infekcji w sadach.

W celu znalezienia odpowiedzi na pytania, czy na wybrane geny metabolizmu podstawowego, kodujące: czynnik elongacyjny 1 alfa (EF-1α) oraz beta-tubulinę (β-tubulina), oraz związane z patogenicznością: kodujące białko z rodziny mannozydaz oraz z rodziny glukozydaz patogena, działa presja wywierana przez główne geny odporności jabłoni na chorobę *R*, oraz czy na poziomie badanych genów można zaobserwować podział szczepów *V. inaequalis* na populacje, skorelowany z ich zdolnością do zakażania różnych odmian jabłoni z określonymi genami *R*, przeprowadzono analizę sekwencji fragmentów tych genów dla łącznie 100 wybranych szczepów *V. inaequalis*, reprezentujących 20 uprzednio badanych populacji. Topologia uzyskanych dendrogramów, będących graficznym przedstawieniem wyniku analizy grupowania szczepów, nie wykazała związku między cechami genetycznymi a pochodzeniem szczepów, odmianą jabłoni czy rasą grzyba, a co za tym idzie, nie zaznaczył się wyraźny podział na populacje: awirulentne i wirulentne w stosunku do odmian jabłoni z genem *Rvi6*, wynikający z poprzednich analiz loci mikrosatelitarnych przeprowadzonych na tych samych populacjach. Analiza grupowania ujawniła, poprzez niskie współczynniki poparcia dla odgałęzień w uzyskanych dendrogramach, niskie zróżnicowanie szczepów w poszczególnych klastrach. Wśród badanych sekwencji genów, największą różnorodność wykryto w obrębie genu EF-1α, podczas gdy najmniejsze zróżnicowanie obserwowano dla genu mannozydazy. Badanie polimorfizmu neutralnego i nieneutralnego pozwoliło zauważyć, że geny EF-1α i glukozydaza były poddane selekcji różnicującej, β-tubulina - selekcji neutralnej, zaś sekwencja mannozydazy była najbardziej zachowana ewolucyjnie. Mierniki przepływu genów wskazywały, że obserwowane w naszych sadach populacje patogena porażające odmiany *Rvi6* były bardziej zdystansowane genetycznie między sobą w przeciwieństwie do populacji pochodzących z odmian jabłoni bez tego genu; porównanie tych dwóch grup populacji pozwoliło zaobserwować jednak pewien rodzaj selekcji na nie działający, związany w typem wirulencji patogena. Obserwowany brak rekombinacji między założonymi grupami populacji o różnym typie wirulencji jest zgodny z modelem populacji izolowanych. Najprawdopodobniej w tym przypadku czynnikiem izolującym nie była odległość geograficzna, lecz bariera biologiczna, skutkująca brakiem krzyżowania się szczepów z grup o odmiennym typie wirulencji, co zostało także potwierdzone w teście, w którym hipoteza o swobodnej rekombinacji miedzy wszystkich szczepami oraz pomiędzy grupami szczepów została odrzucona.

W niniejszej pracy udowodniono, że różne sposoby zwalczania parcha jabłoni stosowane przez człowieka mają wpływ na kierunek zmian genetycznych, który może zostać wykryty i zmierzony na poziomie pojedynczych szczepów oraz całych populacji grzyba *V. inaequalis.*

**Słowa kluczowe:** parch jabłoni, odporność na strobiluryny, PCR specyficzny do allelu, detekcja G143A, odporność jabłoni na parcha jabłoni, przełamanie odporności, populacje sympatryczne, struktura populacji, wnioskowanie filogenetyczne, wirulencja rasy

# **ABSTRACT**

**Genetic variability of *Venturia inaequalis* populations in Poland**

Apple scab, caused by the fungus *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., is considered the most harmful apple disease in all apple growing regions in the world due to the high cost of protection against the disease as well as yield losses. Despite the known epidemiology, modern prognostic systems, a wide range of protection measures and the introduction of tolerant or resistant apple varieties to cultivation, apple scab still has a significant impact on the quality and quantity of the crop. Some time after the application of the new method of disease control, new, resistant forms of the fungus appear in the orchard. The reasons for this status should be sought in the high genetic variability, which allows the pathogen to adapt to the previously unfavorable environmental conditions. Understanding the mechanism of changes at the strain and population level of *V. inaequalis* is necessary in the context of effective long-term protection against this important disease.

The aim of this study was to analyse the genetic variability of *V. inaequalis* in response to various pathogen control strategies: the use of fungicides from the strobilurin group and the cultivation of apple varieties with different resistance genes to apple scab. As part of the research, molecular biology tools based on the conventional and quantitative PCR technique, Sanger sequencing and bioinformatics programs were used, enabling the analysis of data (size of DNA microsatellite alleles) and DNA sequences of the studied genes in order to infer about relationship, origin and genetic diversity, gene flow or evolutionary processes affecting the strains and/or populations of the fungus *V. inaequalis*.

Based on the DNA of monoconidial fungus cultures characterized by sensitivity ('Sens') or resistance ('Res') to strobilurin fungicides, a method was developed to determine the frequency of the allele containing the G → C point mutation in the gene encoding cytochrome *b* resulting in glycine to alanine substitution in resulting protein, in position 143. This change determines the fungus resistance to strobilurins. In 2009, from each of the 15 commercial orchards located in central Poland, where i.a. strobilurins were used to protect apple trees against scab, and from two orchards without any protection, 20-30 leaves with clear symptoms of the disease were collected. DNA was isolated from the scab lesions on the leaves and analysed using a newly developed detection method, determining the percentage of the G143A mutation in the DNA of each examined population, representing a given orchard, with reference to the standard curves determined for the DNA of the reference strains. It was measured that in commercial orchards the level of resistance varied from 50 to 100%, while in the ecological orchard for 2 studied populations it was 1 and 46%, respectively.

In order to investigate the genetic structure of the *V. inaequalis* populations able to cause disease on apple trees with the *Rvi6* resistance gene, observed in Poland since 2009, and their relationship with other fungal populations, so far present in our country in apple trees with other resistance genes (here: *Rvi1*, *Rvi17*) or without known resistance genes, genotyping was performed on 11 microsatellite DNA loci for a total of 606 strains of the fungus, divided into 20 populations - according to cultivars and orchards from which they originated. As a result of the conducted analyses based on distances and bayesian models, the pathogen populations from different apple cultivars were divided into two distinct, genetically different groups of strains with different virulence: virulent and avirulent to cultivars with the *Rvi6* gene. Observed values of *HD*, FST and genetic distance according to Nei (1978) clearly showed that the populations virulent to the *Rvi6* cultivars showed reduced gene diversity unlike the rest of the populations and were genetically closer to other *Rvi6* – virulent populations, in particular coming from the same orchards. On the other hand, the group of *Rvi6* – virulent populations was the most internally divided group; these populations differed significantly between the orchards they came from, while the rest of the populations constituted a heterogeneous group without clear divisions, which would indicate the introduction of new *Rvi6*-virulent strains to Poland in several independent migratory events. For the orchards from which both types of populations (virulent and avirulent to *Rvi6* gene) were collected and tested (Lublin and Nowy Dwór), exceptions in the tests were observed: the calculations indicated genetic closeness and gene flow between them, which corresponded to the results obtained in the grouping and strain assignment algorithms, confirming the presence of migrants in populations occurring on apple cultivars without *R* genes (DND and MGL) from the *Rvi6* populations co-ocurring in the same orchards. Evidence of secondary contact and possible, albeit severely limited, gene flow between strains of different virulence types co-occurring on one apple variety - without the *Rvi6* gene - has been presented here for the first time in the world for a population of *V. inaequalis* derived from natural orchard infections.

In order to answer the questions whether selected housekeeping genes, encoding elongation factor 1 alpha (EF-1α) and beta-tubulin (β-tubulin), and genes related to pathogenicity, encoding a protein from the mannosidase family and from the glucosidase family, are affected by the pressure exerted by the main genes of apple resistance to disease (*R*), and whether the division of *V. inaequalis* strains into populations can be observed at the level of the studied genes, correlated with fungus ability to infect various apple cultivars with specific *R* genes, sequence analysis of these genes fragments was performed for a total of 100 selected *V. inaequalis* strains, representing the 20 previously studied populations. The topology of the obtained dendrograms, being a graphical representation of the result of the strain grouping analysis, did not show any relationship between the genetic characteristics and the origin of the strains, apple variety or fungus race, and thus there was no clear division into populations: avirulent and virulent to apple varieties with the *Rvi6* gene, which was expected from previous analyses of microsatellite loci carried out on the same populations. The clustering analysis revealed, through low support values for nodes in the obtained dendrograms, low differentiation of strains in individual clusters. Among the tested gene sequences, the greatest diversity was found within the EF-1α gene, while the lowest diversity was observed for the mannosidase gene. Examination of the neutral and non-neutral polymorphism revealed that the EF-1α and glucosidase genes were subjected to differential selection, β-tubulin – to neutral selection, and the mannosidase sequence was the most evolutionarily conserved. The gene flow measures indicated that the populations infecting *Rvi6* cultivars observed in our orchards were genetically more distant from each other as opposed to populations derived from apple cultivars without this gene; the comparison of these two groups of the population allowed to observe, however, a certain type of selection acting on them, related to the type of virulence of the pathogen. The observed lack of recombination between the assumed groups of populations of different type of virulence is consistent with the model of isolated populations. Most likely, in this case, the isolating factor was not geographical distance, but a biological barrier, resulting in the lack of crossing between strains of a different type of virulence, which was also confirmed in the test in which the hypothesis of free recombination between all strains and between groups of strains was rejected.

In this study it was proven that the different manners of controlling apple scab have an impact on the direction of genetic changes, what can be detected and measured at the level of individual strains and entire populations of *V. inaequalis.*

**Key words:** apple scab, strobilurin resistance, allele-specific PCR, G143A detection, apple scab resistance, disease emergence, sympatric populations, population structure, phylogenetic inference, virulence of race