

УДК 632.938.1:634.23

**ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫЕ
АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ
БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
УСТОЙЧИВОСТИ ФОРМ РОДА
CERASUS MILL. К КОККОМИКОЗУ¹**

Кузнецова Анна Павловна

канд. биол. наук

Щеглов Сергей Николаевич

д-р биол. наук

Волчков Юрий Андреевич

д-р биол. наук

Шестакова Вера Владимировна

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садоводств-
ва и виноградарства Россельхозакадемии,
Краснодар, Россия*

С помощью генетико-статистических подходов проведены исследования годовой и сезонной динамики концентраций биохимических показателей при поражении коккомикозом форм рода *Cerasus Mill* в системе хозяин-возбудитель-среда. Изучение структуры изменчивости биохимических показателей в процессе вегетации растений позволило найти генетико-статистические подходы к выявлению корреляций с иммунитетом, а также разработать экспресс-метод оценки устойчивости к болезни. Обнаруженная экологическая составляющая изменчивости биохимических признаков позволяет разрабатывать новые методы прогнозирования развития инфекции.

Ключевые слова: УСТОЙЧИВОСТЬ, *CERASUS MILL*, КОККОМИКОЗ, БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ГЕНЕТИКО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

UDC 632.938.1:634.23

**GENETICAL SELECTION ASPECTS
OF THE DEVELOPMENT
DIAGNOSTIC CRITERIA OF
BIOCHEMICAL PARAMETERS
RESISTANT FORMS OF THE GENUS
CERASUS MILL TO *BLUMERIELLA*
JAAPII (REHM.)**

Kuznetsova Anna

Cand. Biol. Sci.

Shcheglov Sergey

Dr. Biol. Sci.

Volchkov Yury

Dr. Biol. Sci.

Shestakova Vera

*State scientific organization North Cauca-
sian Regional Research Institute of Horticul-
ture and Viticulture of the Russian Academy
of agricultural sciences,
Krasnodar, Russia*

Using genetic-statistical approaches researches of annual and seasonal dynamics of concentration of biochemical parameters at defeat *Blumeriella jaapii* (Rehm.) forms of genus *Cerasus Mill* in the system owner-activator-environment are studied. Studying of structure of variability of biochemical parameters during vegetation of plants has allowed to find genetic-statistical approaches to establish of correlations with immunity, and also to develop the express train-method of an estimation of stability to illness. The observed ecological component of variability of biochemical attributes allows to develop new methods of forecasting of development of infection.

Key words: STABILITY, *CERASUS MILL*, *BLUMERIELLA JAAPII* (REHM), BIOCHEMICAL PARAMETERS, PHENOLIC CONNECTIONS. GENETIC-STATISTICAL ANALYSIS

¹Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и администрации Краснодарского края № 06-04-97602 и № 09-04-96601

Введение. Важнейшим фактором конструирования эффективно функционирующих плодовых агроценозов, с точки зрения адаптивного растениеводства, является мобилизация генетических ресурсов плодовых растений – сортов и подвоев, обладающих самостоятельными механизмами и структурами саморегуляции, которые в двухкомпонентной системе (сорт-подвойная комбинация) претерпевают определенные изменения.

Разработка ускоренной оценки хозяйственно-ценных параметров интродуцированных растительных ресурсов и новых отечественных, полученных методами высокой селекции, на основе использования инструментальных методов последнего поколения, является весьма актуальной с позиций фундаментальных исследований, ориентированных на разработку ресурсо-экономных, экологически безопасных и экономически оправданных технологий возделывания плодовых культур (А.П. Кузнецова, 2009) [6].

Одна из целей нашей работы состояла в обосновании необходимости изучения биохимических показателей листьев вишни в различных экологических условиях (разные года и сезоны) для разработки ускоренной оценки и прогнозирования поражения коккомикозом хозяйственно-ценных форм рода *Cerasus*.

Объекты и методы исследований. Объекты исследований – представители рода *Cerasus Mill.*, поражаемые коккомикозом сорта: вишня Любская, Малышка, Краснодарская сладкая, черешня сорта Франц Иосиф и не поражаемые формы - сеянцы от свободного опыления образцов *C.lannesiana №2* (Иммунная 6), *C. serrulata Halle Tolibetto*, гибрид *C.lannesiana*×Франц Иосиф (Иммунная 7, селекции СКЗНИИСиВ), а так же подвой косточковых ВП1, ВСЛ-2. Биохимический анализ листьев иммунных и поражаемых коккомикозом форм проводился в течение 2003-2006 гг.– весной, летом и осенью. Исследовали образцы листьев, взятые с приростов текущего года, отобранные в разных зонах Краснодарского края. Содержание калия, натрия, магния, кальция, нитрита, нитрата, хлорида,

сульфата, фенольных соединений и органических кислот в экстракте листьев определяли с помощью СВЧ-минерализатора «Минотавр-1», рН-метра рН 410, системы капиллярного электрофореза «Капель-103Р» [3, 9]. Статистическая обработка проводилась с помощью стандартных биометрических методов (дисперсионный анализ) и многомерных методов (кластерный, дискриминантный анализ и метод главных компонент [2, 7].

Обсуждение результатов. В работах ряда исследователей сведения о механизмах устойчивости к патогену противоречивы [1, 8]. Необходимые данные по выявлению особенностей физиолого-биохимических процессов в клетке листа при поражении коккомикозом (*Blumeriella jaapii* (Rehm.)) в литературе отсутствуют.

В ряде научных работ отмечается, что при изучении природы устойчивости растений к другим фитопатогенам особое внимание необходимо уделять веществам вторичного происхождения – фенолам, связанным с дыханием, фотосинтезом и иммунитетом растения [4, 10, 11].

Важную роль в поглощении воды, превращении энергии играет калий. Резкий недостаток калия, вызывает ослабление иммунитета растений, они чаще подвергаются различным, особенно грибковым заболеваниям, снижается их сопротивляемость неблагоприятным факторам среды. Ионы Mg и Ca активируют ферментные системы цикла Кребса, стабилизируют клеточные мембраны и устойчивость растений к стресс-факторам увеличивается.

Для изучения различных физиолого-биохимических процессов растительной клетки большое внимание уделяется влияющим на эти процессы органическим кислотам, которые функционируют в цикле Кребса – лимонной, янтарной, яблочной и фумаровой. Известно, что данные кислоты легко проникают в митохондрии и быстро используются. Более высокое содержание кислот цикла Кребса свидетельствует о более интенсивных

обменных процессах и процессах дыхания, что может быть проявлением защитных реакций.

Исследовано содержание в клеточном соке катионов металлов (магния, кальция, калия, натрия), органических кислот (лимонной, яблочной, янтарной) и фенольных соединений. Дана количественная оценка влияния генотипа представителей рода *Cerasus* (сорт) и года выращивания на химические показатели с помощью двухфакторного дисперсионного анализа.

Установлено, что генотип и год выращивания оказывают статистически достоверное влияние на все химические показатели. Результаты дисперсионного анализа данных за четыре года свидетельствовали о различной структуре изменчивости химических показателей в соке листьев растений.

Для нахождения оптимальных сроков выявления максимальных различий, достоверно подтверждаемых статистическими методами, химический анализ клеточного сока каждый год проводился весной, летом и осенью. С помощью однофакторного дисперсионного анализа доказаны статистически значимые различия в результатах измерений по каждому году и по временам года.

Дана количественная оценка влияния года, видов рода *Cerasus*, срока исследования и их взаимодействия на биохимические признаки (таблица 1).

Различия обнаружены по всем без исключения признакам, а доля влияния фактора «год» варьирует от 4,1 до 30,8%, фактора «вид» от 0,9 до 13,1%, фактора «срок измерения» от 2,4 до 27,9%, взаимодействия «год x вид» от 4,7 до 16,4%, взаимодействия «год x срок измерения» от 7,7 до 41,7%, взаимодействия «вид x срок измерения» от 2,6 до 21,3%, взаимодействия «год x вид x срок измерения» от 15,6 до 33,7% (табл. 1).

Таблица 1 – Доля в общей дисперсии факторов, влияющих на изменчивость биохимических признаков, %

Изменчивость	Биохимические признаки								
	хлорогеновая кислота	кофейная кислота	янтарная кислота	яблочная кислота	лимонная кислота	калий	натрий	магний	кальций
Между годами	16,2	7,3	12,2	4,1	16,8	8,7	30,8	8,5	4,7
Между видами	7,6	11,1	0,9	7,3	7,7	13,1	1,7	2,8	6,9
Между сроками	16,4	2,4	21,2	18,9	4,2	4,7	12,7	23,7	27,9
«год × вид»	10,2	16,4	5,6	10,9	7,8	14,0	4,7	6,4	14,8
«год × срок»	13,2	8,7	41,7	14,3	12,5	7,7	26,1	32,2	2,2
«вид × срок»	11,3	18,6	2,6	10,1	16,1	21,3	4,2	6,7	17,0
«год × вид × срок»	24,3	29,8	15,6	33,6	33,7	27,0	17,7	19,3	26,3
Остаточная	0,8	5,8	0,2	0,7	1,1	3,4	2,1	0,3	0,3

Таким образом, на фактор взаимодействия «год × вид × срок измерения» приходится наибольший вклад в общую изменчивость биохимических показателей. Для некоторых биохимических показателей отмечено высокое влияние условий года – 30,8% (содержание Na) и взаимодействия «год × срок исследования» – 41,7% (содержание янтарной кислоты).

Для решения вопроса о стабильности различий устойчивых и неустойчивых видов по биохимическим признакам было проведено сравнение их средних значений t-критерием Стьюдента по срокам измерения и годам исследования (табл. 2).

Таким образом, все биохимические признаки оказались задействованы в идентификации устойчивых и неустойчивых объектов исследований. Из таблицы 2 видно, что надежным идентификатором устойчивых и неустойчивых видов (показавшим статистически достоверные различия три года подряд) в мае является содержание янтарной и лимонной кислот, магния и

кальция; в июле – содержание хлорогеновой, кофейной и яблочной кислот, калия; в сентябре – содержание лимонной кислоты.

Таблица 2 – Различие значений биохимических показателей в разные периоды вегетации форм рода *Cerasus* Mill

Признак	Май			Июль			Сентябрь		
	2003 г.	2004 г.	2005 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.
Хлорогеновая кислота	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Кофейная кислота	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Янтарная кислота	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Яблочная кислота	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Лимонная кислота	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Калий	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Натрий	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Магний	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Кальций	+	+	+	-	+	-	-	-	-

+ статистически достоверные различия между устойчивыми и неустойчивыми формами рода *Cerasus*

Представляло интерес изучение содержания биохимических веществ в листьях до и после поражения коккомикозом. Сравнение проведено с помощью t-критерия Стьюдента (таблица 3).

Как видно из таблицы 3, выявлена экологическая составляющая содержания биохимических веществ в листьях вишни, зависящая от условий года. В течение трех лет обнаружены различия в содержании яблочной кислоты, натрия и кальция, количество которых стабильно повышается после поражения растений.

Таблица 3 – Средние значения биохимических признаков листа вишни до и после поражения коккомикозом (мг/кг)

Признак	2003 год			2004 год			2005 год		
	до	после	t	до	после	t	До	после	t
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Хлорогеновая кислота	947,53	870,64	0,2	2174,06	2113,05	0,2	1834,07	1627,39	0,5
Кофейная кислота	16,11	27,83	1,1	14,09	73,65	2,3*	23,14	12,62	2,4*
Янтарная кислота	0,45	0,93	4,7**	0,41	0,33	0,7	0,26	2,26	3,3**

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Яблочная кислота	6,20	28,81	5,2**	5,61	8,66	2,1*	2,32	11,71	3,9**
Лимонная кислота	3,23	7,60	3,6**	1,63	1,78	0,3	1,05	1,92	2,3*
Калий	2456,80	1880,21	2,0*	2418,19	3229,02	2,7**	3078,20	2921,09	0,4
Натрий	124,53	190,31	5,7**	30,49	96,29	5,9**	48,78	84,10	2,9**
Магний	811,97	1063,53	1,2	563,98	525,63	0,4	349,58	802,91	8,1**
Кальций	917,49	1757,75	4,3**	388,40	985,41	2,6*	280,54	1195,40	5,5**

Примечание: знаком * обозначены признаки, показавшие статистически достоверную разницу между средними значениями относительно контроля при уровне значимости меньше 0,05; ** – при уровне значимости меньше 0,01.

Обнаруженная экологическая составляющая изменчивости биохимических признаков позволит разрабатывать новые методы прогнозирования развития инфекции. Разработка всех форм прогнозов опирается на информацию, которую собирают в строго определенные фенологические периоды в жизненном цикле вредных видов и защищаемых растений. Достоверный прогноз наступления этих периодов упрощает систему отбора информации и уменьшает количество учетов и наблюдений. Учет и прогноз фенологии вредных организмов является важнейшей предпосылкой для оценки степени благоприятности для них сложившейся экологической обстановки сезона. Одновременно фенологические данные служат критерием для выбора сроков проведения защитных обработок.

По многолетним данным установлено, что весной в период активного роста обнаруживаются статистически достоверные различия по наибольшему числу биохимических показателей. Для разработки экспресс-метода сочли достаточным использовать данные, полученные весной, в период активного роста растений. Такая оценка значительно сокращает время изучения устойчивости сортов к коккомикозу, даже до развития инфекции. Сравнение средних значений химических показателей с помощью t- критерия Стьюдента между годами и дискриминантный анализ подтвер-

дрили вывод, что устойчивые и неустойчивые к коккомикозу формы статистически достоверно различаются по четырём признакам, содержанию магния, кальция, кофейной и янтарной кислот. В результате дискриминантного анализа были также получены функции классификации и неравенство, позволяющее выделить из неизвестных форм устойчивые образцы на самом раннем этапе развития растения. Подстановка в неравенство численных значений признаков, т.е. количественного содержания биохимических показателей в неизвестном образце в период активного роста, позволяет отнести его к устойчивым формам [4. 6].

Выводы. Изучение структуры изменчивости биохимических показателей в процессе вегетации растений позволило найти генетико-статистические подходы к выявлению корреляций с иммунитетом, а также разработать экспресс-метод оценки устойчивости к *Blumeriella jaarpilii*.

Обнаруженная экологическая составляющая изменчивости биохимических признаков позволяет разрабатывать новые методы прогнозирования развития инфекции.

Литература

1. Жуков, О.С. Селекция вишни/ О.С. Жуков, Е.Н.Харитоновна. – М.,1988. – 143 с.
2. Клекка, У.Р. Дискриминантный и кластерный анализ/ У.Р. Клекка //Факторный дискриминантный и кластерный анализ. – М., 1989. – С.78-137.
3. Комарова, Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель»/ Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. – СПб., 2006. – С. 79-93.
4. Кузнецова, А.П. Роль фенольных соединений в механизмах устойчивости рода *Cerasus* Mill при поражении коккомикозом/ А.П. Кузнецова// Плодоводство и ягодоводство Росси: Сб.науч. тр. ВСТИСП. – Т.Х1. – М., 2004. – С.403-410.
5. Кузнецова, А.П. Способ определения устойчивых форм вишни и черешни к коккомикозу/ А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба, С.Н.Щеглов // Патент РФ № 2343697 от 21.1.09. Бюл. №2.
6. Кузнецова, А.П. Системный анализ изменчивости при создании методов ускоренной оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу / А.П.Кузнецова, С.Н. Щеглов // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 103-107.
7. Лакин, Г.Ф. Биометрия/ Г.Ф. Лакин. – М., 1990. – 293 с.

8. Старых, В.В. Устойчивость черешни к коккомикозу в центральной зоне Ставропольского края/ В.В. Старых // Интенсивное садоводство Ставропольского края.– Ставрополь, 1984 – С. 101-109.

9. Якуба, Ю.Ф. Применение СВЧ-экстракции и высокоэффективного капиллярного электрофореза для анализа вегетативных органов растений/ Ю.Ф. Якуба // Материалы II Международной конференции «Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, растений и с/х сырья». – М., 2004. – С.71-74.

10. Uirich M., Richard E. Phenolic compounds in plant disease resistance// *Phytoparasitica*, 1988. V16, №2.

11. Peters N.K., Verma D.P. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant microbe interactions// *Mol. Plant – Microbe interact.* 1990. V.3. №1.