

УДК 634.23:632.4.01/.08:551.586

ОЦЕНКА ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ ИММУННЫХ И ВЫСОКО УСТОЙЧИВЫХ К БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОРАМ ФОРМ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ АГРОЭКОСИСТЕМ С ВЫСОКИМ ЗАЩИТНО-КОМПЕНСАТОРНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Кузнецова А.П., канд. биол. наук

Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии
(Краснодар)

Реферат. Представлены результаты изучения коллекции отдаленных гибридов рода *Cerasus* Mill., полученных в результате селекции на устойчивость к коккомикозу. На базе выявленных взаимосвязей в системе «хозяин – патоген – среда» выделены формы с долговременной устойчивостью к болезни.

Ключевые слова: коккомикоз, устойчивость, популяции, биотипы, расы, биохимические методы

Summary. The results of study of collection of distant hybrids of genus *Cerasus* Mill. received by selection for resistance to coccomycosis are presented. On the basis of identified interactions in the system «host – pathogen – environment» the forms with long-term resistance to the disease are selected.

Key words: *Cerasus* Mill., resistance, populations, biotypes, races, biochemical methods

Введение. Почвенно-климатические условия юга России наиболее благоприятны для экономически успешного производства ценнейших в рационе питания человека плодов косточковых культур. При этом основным лимитирующим биотическим стрессором в условиях региона является поражаемость черешни и вишни грибными болезнями, наиболее вредоносным из которых является коккомикоз (*Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx.).

При конструировании агроэкосистем важно учитывать способность к защитно-компенсаторным и другим адаптивным реакциям, важнейшей из которых является иммунитет – один из механизмов саморегуляции, наименее энергоёмкий в общем биоэнергетическом балансе продукционного процесса.

Среди сортового материала черешни и вишни иммунных форм к коккомикозу не найдено. Трудность анализа генетического контроля у диких форм — источников иммунитета заключается в том, что при межвидовых разноплоидных скрещиваниях наблюдается всхожесть только в пределах от 0 до 2%. Виды вишни, входящие в состав рода *Cerasus* Mill., связаны сложными филогенетическими отношениями. Это отражается на структуре изменчивости по признакам устойчивости к коккомикозу не только между крупными таксонами, но и внутри изучаемых видов. Сведения о механизмах устойчивости — от сроков прохождения фенологических фаз до изменённой клеточной структуры листа – противоречивы и показывают существование нескольких систем генетического контроля.

Изучение генетической структуры видов по признакам устойчивости к патогенам – задача, которая может быть решена только с применением комплекса методов генетики, фитопатологии, иммунологии, гистологии, биохимии, экологии, а также методов биотехнологии.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в коллекционных насаждениях в Краснодарском крае на базе опытных хозяйств СКЗНИИСиВ, «ОПХ Центральное», «ОПХ им. К.А. Тимирязева». Искусственное заражение и оценку дисков-высечек листьев форм рода *Cerasus* монопустульными изолятами осуществили в отделе генетики ВИР (СПб). Оценка устойчивости форм к коккомикозу выполнена в полевых и лабораторных условиях по методике Чеботаревой-Ленивцевой [1]. Статистическая обработка данных проводилась с помощью дисперсионного и кластерного анализов [2, 3].

Обсуждение результатов. Оценка генотипической структуры популяций рода *Cerasus* Mill. включает обязательное всестороннее изучение сложной системы «хозяин – патоген – среда». Правильно оценить результат сложного взаимодействия в этой системе, преобразующейся в соответствии с условиями года и зоны, возможно с использованием методов генетико-статистического анализа, а также с учётом средовой компоненты изменчивости.

Изучение компонентов среды было начато с анализа метеоданных по Краснодарскому краю за 1950-2011 гг. с помощью кластерного, дисперсионного и дискриминантных анализов. Было доказано, что 10 из последних 13 лет выделяются наибольшей абсолютной величиной средней, максимальной и минимальной суточной температуры, и это негативно отразилось на состоянии плодовых растений [4, 5]. Смещение климата в сторону увлажнения и повышения температур удлиняет период вегетации и затягивает подготовку растений к зиме, делая их более уязвимыми к низким зимним температурам, значительно ослабляет иммунитет растений. Резкие температурные перепады негативно влияют на устойчивость растений к биотическим стрессорам.

Ранее нами было доказано, что в летние месяцы до 1990-х гг. разница температур достигала 14 и более градусов, а с начала 1990-х гг. стала сокращаться, а в осенние и весенние месяцы разница температур несколько увеличилась. При анализе метеоданных за 62 года стрессовый характер метеорологических параметров был подтвержден. На диаграмме, построенной по многолетним данным абсолютной разницы между максимальной и минимальной температурами воздуха (более 21 тыс. дней), четко отражен многолетний тренд изменения температуры атмосферного воздуха (рис. 1). Просматривается волнообразный характер изменения: наиболее жаркие летние месяцы в начале 1950-х гг. постепенно становятся прохладнее, а с 2000-х гг. постепенно становятся жарче. Весенние и осенние месяцы с течением лет становятся теплее.

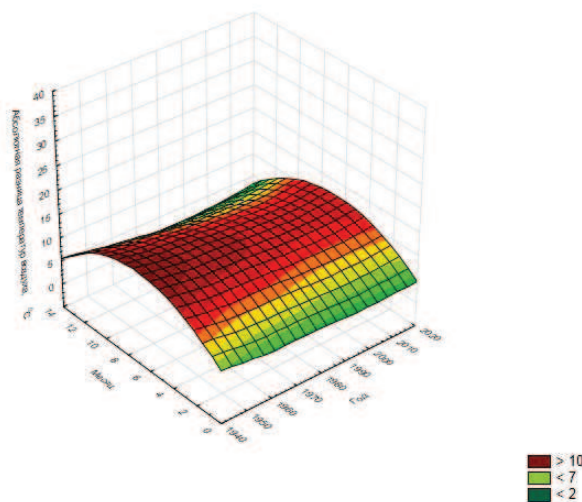


Рис. 1. Абсолютная разница максимальной и минимальной температур атмосферного воздуха (1950-2012 гг.)

Нестабильность климата Краснодарского края создает условия для биотических и абиотических стрессов для многолетних культур, стимулируя увеличение вредоносности многих заболеваний, а также проявление новых биотипов и рас патогенов. Популяции патогенных грибов проявляют свои паразитические свойства только при контакте с хозяином. Они не образуют самостоятельных систем, а входят в состав биогеоценозов. Извест-

тен также полиморфизм популяций фитопатогенных грибов, который сохраняется вследствие действия стабилизирующего отбора [6, 7]. Очень высокую степень гетерозиготности популяций растений по генам устойчивости обеспечивает аллелизм генов [8]. Наличие полиморфизма и гетерозиготности популяций фитопатогенных грибов доказывает необходимость изучения внутривидовой дифференциации и структуры популяции коккомикоза, что также необходимо в целях определения эффективности генов устойчивости и для слежения за приспособлением паразита к устойчивости сортов [9, 10, 11, 12].

Как показали наши исследования, с изменением погодно-климатических условий усилилась вредоносность коккомикоза, значительно снижающего урожайность и зимостойкость деревьев косточковых культур (черешни, вишни). Увеличилась частота прохождения фитопатогенеза в форме эпифитотий. Так, из последних семи лет наблюдений (2006-2012 гг.) 6 лет были эпифитотийными. В селекции на устойчивость к болезням участились явления, когда происходит потеря устойчивости образцов в связи с изменчивостью патогенов. Поэтому поиск и создание новых устойчивых форм необходимо вести параллельно с изучением изменчивости гриба.

При сравнительном анализе популяций гриба из Краснодарского края, Тамбовской и Ленинградской областей было четко доказано, что популяция из Краснодарского края обладает наиболее широким спектром вирулентности, в ней доминируют раса 4 (27-40,9%), которая является самой вирулентной, она преодолевает моногенную устойчивость вишни, контролируемую геном А.

В Краснодарском крае раса обнаружена еще в 1986 году, в других регионах России раса 4 долгий период времени не выявлялась [13, 14, 15, 16]. В популяциях Тамбовской и Ленинградской областей раса 4 распространена значительно меньше, в первой – от 29 до 34%, во второй – от 4 до 11%.

Проводимые совместные с институтом растениеводства им. Н.И. Вавилова (СПб) исследования внутривидовой дифференциации 3-х популяций коккомикоза по материалам 2006-2008 гг. подтвердили данные о появлении вирулентных биотипов. Внутри четвертой расы выделены биотипы 1МС, 3КМ, 8КС, 5КС, 3КС, 1КС, которые рекомендуется включать в исследования по изучению устойчивости черешни и вишни к коккомикозу для создания форм с долговременной устойчивостью [16].

О необходимости постоянного мониторинга популяции Краснодарского края свидетельствуют и сравнительные данные, полученные в 2009-2012 годах. Так, в последние годы при увеличении количества биотипов в условиях Краснодарского края отмечено поражение образцов вишни Маака 1 и 4, вишни серрулата Б1, вишни сахалинской БГ-35 и 1-215, вишни курильской №2, №13, Ветровое 10, Ветровое 11, Псевдосеразус-1, Бриллиант, которые ранее считались иммунными.

В результате направленной селекции на устойчивость к коккомикозу в СКЗНИИСиВ создана коллекция отдаленных гибридов рода *Cerasus* Mill., полученных в результате отдаленной гибридизации представителей видов *Cerasus vulgaris* Mill, *Cerasus avium* (L.) Moench с образцами восточно-азиатских видов, которые были ранее выделены как устойчивые к коккомикозу при заражении их 77 изолятами гриба из разных эколого-географических районов страны [14], а также производные черемухи Маака.

Для выявления форм, не поражаемых коккомикозом, проводили наблюдения в полевых и лабораторных условиях. В искусственных условиях осуществляли заражение и оценку дисков-высечек листьев монопустульными изолятами по методике Чеботаревой-Ленивцевой [1]. Искусственное заражение образцов провели в отделе генетики ВИР популяциями коккомикоза из Краснодарского края, которые по предыдущим исследованиям отличались наличием самых вирулентных биотипов.

Высокая (до 100%) эффективность устойчивости выявлена на созданных в институте с помощью отдаленной гибридизации образцах 11-14, 10-13, 10-15, АИ 1, 5-44 (табл.).

В условиях 2009-2012 гг. (насыщенных стресс-факторами различного происхождения: длительная засуха, высокие летние и низкие зимние температуры) среди форм селекции СКЗНИИСиВ выявлены образцы, не поражающиеся коккомикозом в поле и при искусственном заражении: АИ-1, 10-18, 11-17, 10-15, 3-115, 7-42, 5-44, 3-106, 5-40, которые обоснованно могут быть использованы как источники высокой устойчивости к болезни.

Таблица 1. Эффективность устойчивости к коккомикозу перспективных форм подвоев селекции СКЗНИИСиВ

Название образца	Количество клонов	Распределение по баллам поражения					% авирулентных клонов
		0	1	2	3	4	
АИ 1	52	52	0	0	0	0	100
10-15	52	52	0	0	0	0	100
5-44	52	52	0	0	0	0	100
10-13	30	30	0	0	0	0	100
Любская	30	0	0	2	24	4	

Полученные данные о наличии у выделенных форм долговременной устойчивости были подтверждены и с помощью новых биохимических методов экспресс-оценки, разработанных с привлечением современного инструментария (методов капиллярного электрофореза, СВЧ минерализации, кондуктометрического метода с использованием стеклоуглеродного электрода), которые базировались на полученных автором фундаментальных исследованиях, а именно:

– выявленных взаимовлияниях качественного состава фенольных соединений в листьях косточковых на устойчивость к болезни на основе использования высокоэффективного метода капиллярного электрофореза: в экстракте листового материала обнаружено присутствие определенного фенолкарбонового соединения – производного галловой кислоты, являющегося определяющим признаком непоражаемости коккомикозом (патент РФ № 2316951 от 20.02.2008 г.) [17];

– установленных с помощью математико-статистических методов, из категории многомерных, корреляций между количественными показателями, – содержанием катионов двухвалентных металлов (магния, кальция), кофейной, янтарной кислот в листовом экстракте и устойчивостью к коккомикозу, что позволило вывести математическое неравенство и провести классификацию, обеспечивающую объективное разделение неизвестных образцов на устойчивые или неустойчивые типы.

У всех выделенных с помощью искусственного заражения форм было найдено вещество – производное галловой кислоты (рис. 2), обнаруженное и при проведении исследований с помощью капиллярного электрофореза, и с помощью кондуктометрического метода с использованием стеклоуглеродного электрода. Последний метод позволяет наиболее быстрое обнаружение идентификатора устойчивости (до 2 мин.), так как обладает повышенной чувствительностью к фенольным соединениям (патент РФ № 2349079 от 20.03.2009 г.) [18]. Здесь об устойчивости форм свидетельствовало наличие пика вещества, проявляющегося на стеклографитовом электроде при потенциале вещества 0,4 В.

Также высокоустойчивые формы значительно отличались по количественному содержанию биохимических веществ, характеризующих устойчивость к патогену (патент РФ № 2343697 от 2009 г.) [19]. Отнесение генотипа к устойчивому осуществлялось на основе сравнения максимальных классификационных значений содержания кофейной и янтарной кислот, катионов магния и кальция, полученных при умножении этих показателей на установленные для каждого из них коэффициенты.

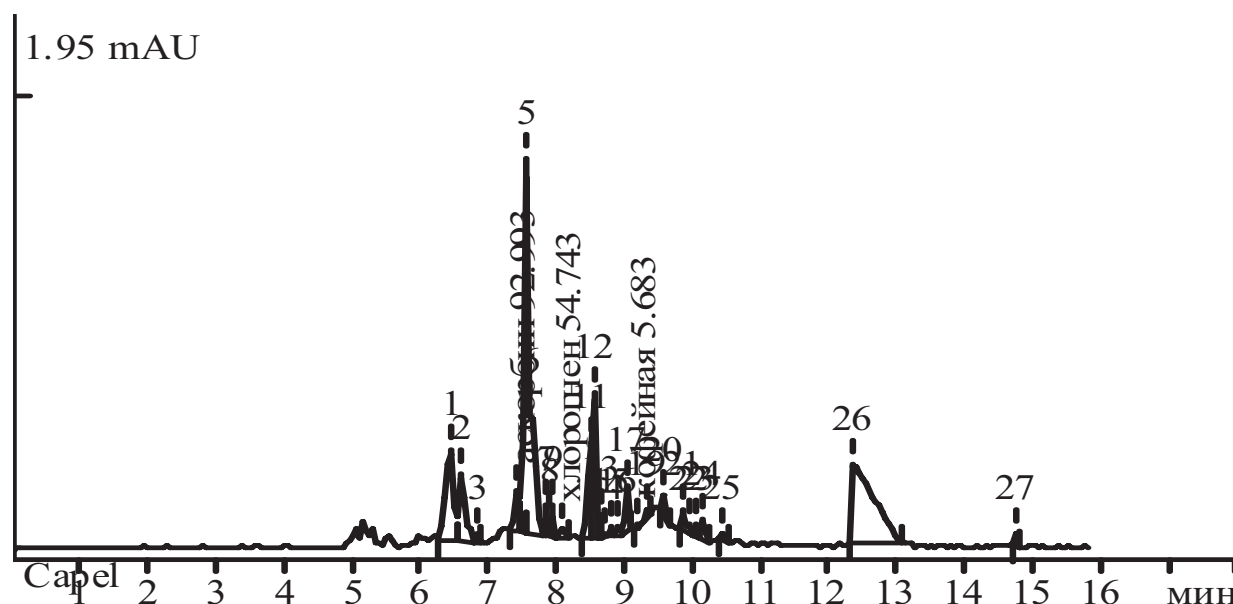


Рис. 2. Электрофореграмма фенольных соединений экстракта листьев устойчивого к коккомикозу образца АИ 1 (наличие на электрофореграмме характерного пика производного галловой кислоты со временем выхода 12,3 мин. свидетельствует об устойчивости данной формы к коккомикозу)

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об изменчивости в системе «хозяин – возбудитель – среда», которые зависят от ареала возделывания и условий года, характеризующих внутривидовую дифференциацию и структуру популяций коккомикоза в различных эколого-географических зонах.

С помощью всесторонней оценки коллекции устойчивых к патогену форм выделены высоко устойчивые к болезни растения на фоне самых вирулентных биотипов и рас, что позволяет проводить опережающую селекцию на устойчивость к вирулентным биотипам, которые в местных популяциях еще не обнаруживаются.

Найденные в результате биохимических исследований связанные с устойчивостью показатели могут служить маркерами для скрининга больших популяций генетически разнородных растений и быть ориентиром в создании селекционных моделей.

Литература

1. Ленивцева, М.С. Изучение устойчивости косточковых культур к коккомикозу. Методические указания / М.С. Ленивцева / СПб.: ВИР, 2010. – 28 с.
2. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.– 1990. – 352 с.
3. Олдендерфер, М.С. Кластерный анализ // Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / М.С. Олдендерфер, Р.К. Блэшфилд. – М.– 1989. – 215 с.
4. Кузнецова, А.П. Разработка подходов к оценке сорто-подвойных комбинаций сливы в условиях меняющегося климата / А.П. Кузнецова, С.Н. Щеглов // Фундаментальные и прикладные разработки, формирующие современный облик садоводства и виноградарства. – Краснодар: СКЗНИИСиВ.– 2011. – С. 51-55.
5. Кузнецова, А.П. Новые подходы к оценке продуктивности сорто-подвойных комбинаций сливы в нестабильных условиях внешней среды / А.П. Кузнецова, С.Н. Щеглов // Плодоводство и ягодоводство России.– 2011.– Т. XXVIII.– №2.– С. 8-14.
6. Работнов, Т.А. О состоянии изучения грибов как компонентов биогеоценозов / Т.А. Работнов // Микология и фитопатология. 1977. – Т. 11. – Вып. 6. – С. 521–524.
7. Левитин, М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов / М.М. Левитин. – Л.– 1986. – 208 с.

8. Mode, C. J. A mathematical model for the co-evolution of obligate parasites and their hosts / C. J. Mode // *Evolution*. – 1958. – Vol. 12. – P. 158-165.
9. Browning D. Grown rust epydemiology and heterogenous oat cultivar-rust race population / D. Browning, L. L. Jowett // *Phytopathology*. – 1970. – Vol. 60 – P. 1288.
10. Herrmann, L. S. A new tool for entry and analysis of virulence data for plant pathogens / L. S. Herrmann // *Plant Pathology*. – Vol. 48. – P. 154-158.
11. Zadoks, J. C. Epidemiology of wheat rusts in Europe / J. C. Zadoks // *FAO Plant. Prof. Bull.* – 1965. – Vol. 13. – № 5. – P. 98-108.
12. Ленивцева, М.С. Расовый состав популяций возбудителя коккомикоза *Blumeriella jaapii* (Rehm) v. Arx. / М.С. Ленивцева, А.П. Кузнецова // *Тр. по прикл. бот., ген. и сел.* – 2011. – Т. 168. – С. 162-164.
13. Ленивцева, М.С. Встречаемость рас возбудителя коккомикоза *Blumeriella jaapii* (Rehm) v. Arx. / М.С. Ленивцева, А.П. Кузнецова, О.А. Соколов // *Плодоводство и ягодоводство России*. – 2012. – Т. XXXIV. – № 1. – С. 439-445.
14. Чеботарева, М.С. Оценка устойчивости черешни и вишни к коккомикозу / М.С. Чеботарева // *Науч.-техн. бюл. ВИР*. – 1986. – Вып. 162. – С. 27-29.
15. Кузнецова, А.П. Специализация и внутривидовая дифференциация возбудителя коккомикоза / А.П. Кузнецова / *Оптимизация, фитосанитарное состояние садов в условиях погодных стрессов*. – Краснодар, 2005. – С. 82-88.
16. Ленивцева, М.С. Внутривидовая дифференциация коккомикоза и тест-клоновый анализ устойчивости гибридных комбинаций / М.С. Ленивцева, А.П. Кузнецова, М.В. Маслова / *Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция : матер. науч. конф., посвящ. 110-летию академика ВАСХНИЛ и Россельхозакадемии М.С. Дунина*. – М.– 2011. – Т. 4. – Ч. 1. – С. 152-157.
17. Ленивцева, М.С. Изучение устойчивости косточковых культур к коккомикозу. Методические указания / М.С. Ленивцева / СПб.: ВИР, 2010. – 28 с.
18. Способ определения устойчивых к коккомикозу форм вишни и черешни: пат. Рос. Федерация / А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба; заявитель и патентообладатель ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии. – № 2316951; опубл. 2008, Бюл. № 5.
19. Способ определения устойчивых к коккомикозу форм вишни и черешни: пат. 2349079 Рос. Федерация / А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба; заявитель и патентообладатель ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии; опубл. 20.02.2008, Бюл. № 8.
20. Способ определения устойчивых к коккомикозу форм вишни и черешни: пат. 2343697 Рос. Федерация / А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба, С.Н. Щеглов; заявитель и патентообладатель ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии; опубл. 20.01.2009, Бюл. № 2.