

На правах рукописи

Шестакова
Вера Владимировна

МОРФО-АНАТОМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
КРИТЕРИИ СЕЛЕКЦИОННОЙ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ФОРМ РОДА
CERASUS MILL. К КОККОМИКОЗУ

Специальность: 06.01.05 – Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
сельскохозяйственных наук

Краснодар – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» (ФГБНУ СКЗНИИСиВ)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Кузнецова Анна Павловна

Официальные оппоненты:

Смыков Анатолий Владимирович,
доктор сельскохозяйственных наук,
старший научный сотрудник,
Никитский Ботанический сад, отдел
плодовых культур, заведующий

Ахматова Зулайха Пашаевна,
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент, ФГНУ «Северо-Кавказский
научно-исследовательский институт
горного и предгорного садоводства»,
отдел селекции и сортоизучения
плодовых культур,
ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Майкопская опытная станция ВИР

Защита состоится «24» апреля 2015 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.006.056.01 в ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» по адресу: 350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» [http: //www.kubansad.ru](http://www.kubansad.ru).

Автореферат разослан «02» марта 2015 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью организации, с указанием почтового адреса, телефона, электронной почты организации, фамилии, имени, отчества, должности лица, подготовившего отзыв, просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу : 350901, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39, тел./факс 8(861) 257-57-02, e-mail: kubansad@kubannet.ru.

Ученый секретарь

диссертационного совета, кандидат с.-х. наук

В.В. Соколова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одной из задач экологизации садоводства является введение в производство устойчивых к грибным заболеваниям форм плодовых культур. Для повышения адаптивности к биострессорам растений необходим поиск новых генов устойчивости у диких форм и их интрогрессия в селекционируемые сорта (Еремин, 2009; Седов, 2011; Егоров, 2013). В последние годы под влиянием меняющихся климатических условий значительно возросла вредоносность листовых пятнистостей, в том числе коккомикоза – одного из наиболее опасных грибных заболеваний косточковых культур (Ищенко, 2003; Джигадло, 2006; Ленивцева, 2010).

Вредоносность патогена проявляется в преждевременном опадении пораженных листьев, что резко снижает фотосинтетическую деятельность растений, ведет к ослаблению деревьев, уменьшению урожайности, ухудшению зимостойкости и другим негативным последствиям. В отдельные годы деревья бывают поражены на 80-100 %, поэтому необходимо внедрение в производство форм, устойчивых к коккомикозу.

Данные многолетних наблюдений за развитием болезни на черешне и вишне в условиях сада представляют собой наиболее информативный материал для оценки устойчивости образцов. Однако недостатком полевого метода многолетних наблюдений является значительная продолжительность и трудоёмкость процесса, а также неточность определения степени устойчивости форм из-за того, что развитие болезни и поражаемость во многом зависят от складывающихся погодных условий.

В связи с этим для ускорения селекционного процесса необходимы экспресс-методы, основанные на показателях, связанных с устойчивостью к патогену, позволяющих наиболее точно определять поражаемость форм рода *Cerasus* Mill. коккомикозом на самых ранних стадиях развития растения. До настоящего времени комплексный анализ физиолого-биохимических и анатомо-морфологических характеристик генотипов рода *Cerasus* Mill., различающихся по типам устойчивости к данному заболеванию не проводился.

Цель работы – комплексная анатомо-морфологическая и физиолого-биохимическая оценка устойчивости межвидовых гибридов к коккомикозу на

основе использования современных генетико-статистических методов для выделения форм рода *Cerasus* Mill. перспективных для селекции.

В связи с этим решались следующие задачи:

1. Изучить потенциал устойчивости к коккомикозу генофонда форм рода *Cerasus* Mill. коллекции СКЗНИИСиВ;
2. Выявить анатомо-морфологические признаки устойчивости представителей рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу;
3. Определить физиолого-биохимические показатели устойчивости к коккомикозу у форм рода *Cerasus* Mill. с помощью современных генетико-статистических методов;
4. Усовершенствовать методы разделения форм косточковых по степени устойчивости на основе биохимических и морфологических показателей;
5. Выделить перспективные генотипы представителей рода *Cerasus* Mill., устойчивые к коккомикозу;
6. Провести эколого-экономическую оценку эффективности использования в селекции выделенных форм рода *Cerasus* Mill., устойчивых к коккомикозу.

Научная новизна работы. В коллекции форм рода *Cerasus* Mill. селекции ФГБНУ СКЗНИИСиВ выделены межвидовые гибриды – новые источники устойчивости к коккомикозу: не поражаемые наиболее вирулентной популяцией коккомикоза из Краснодарского края, в том числе с моногенным типом устойчивости (впервые среди форм производных от восточно-азиатских видов по реакции сверхчувствительности); с полигенным типом устойчивости; с поздним развитием инфекции.

Впервые в условиях Юга России, где отмечается наибольшее проявление вредоносности болезни коккомикоза, на основе комплексной полевой, анатомо-морфологической оценки и физиолого-биохимической характеристики (при использовании оптимизированных методик) установлены показатели устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу.

С использованием генетико-статистического анализа по комплексу морфологических и физиолого-биохимических показателей предложены подходы к выделению форм рода *Cerasus* Mill. с различными типами устойчивости к коккомикозу.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Классификация гибридных форм ФГБНУ СКЗНИИСиВ по степени и типам устойчивости к коккомикозу в полевых условиях на основе анализа балла поражения.
2. Выделение анатомо-морфологических (количественных и качественных) показателей, связанных с устойчивостью к коккомикозу, у форм рода *Cerasus* Mill. для разработки экспресс-оценки поражаемости растений на ранних стадиях развития.
3. Разделение форм рода *Cerasus* Mill. по степени и типам устойчивости к коккомикозу на основе биохимических показателей, определенных с помощью автоматизированных систем капиллярного электрофореза и современных генетико-статистических методов.

Практическая значимость работы:

- выделены формы рода *Cerasus* Mill., являющиеся источниками устойчивости к коккомикозу для селекции: производные *C. lannesiana* №2, *C. incisa*, *C. serrulata* Ht., *C. judii* (F₁, F₂, F₃).
- выделены хозяйственно-ценные формы рода *Cerasus* Mill.: среди образцов с поздним развитием инфекции – вишня Тимирязевская (П-5-14-48), отличающаяся стабильно высокими урожаями, оригинальными вкусовыми качествами плодов, устойчивостью к монилиозу, к низким зимним и высоким летним температурам; среди растений с полигенным типом устойчивости, которые были выделены по признакам урожайности и устойчивости к абиотическим факторам среды – вишня Южанка, обладающая крупными плодами – выше 4,8 г, и низкорослая форма вишни АИ 70, отличающаяся слаборослостью и компактной кроной.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ СКЗНИИСиВ (2011-2014 гг.) и на научно-практических конференциях молодых ученых: «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (КГАУ, 2009-2013 гг.), «Научное решение актуальных проблем производства, качества и безопасности сельхозпродукции» (ГНУ ВНИИТТИ, 2010 г.), «Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий» (КГУ, 2012, 2014 гг.), «Ломоносов-2014» (МГУ им. Ломоносова, 2014).

Публикации результатов исследований. Основные положения диссертации опубликованы в 16 печатных работах, в том числе 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, выводов, предложений для селекции и производства. Работа содержит 10 таблиц, 21 рисунок и 8 приложений. Список использованной литературы включает 208 источников, в том числе 52 – на иностранном языке.

УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Место проведения исследований – ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», ЗАО «ОПХ Центральное» (г. Краснодар). Коллекционный сад расположен в Прикубанской зоне центральной подзоны плодородства.

Условия проведения исследований. Для возбудителя коккомикоза оптимальными погодными условиями являются температура воздуха от 17 °С до 23 °С и наличие капельно-жидкой влаги.

Погодно-климатические условия в период проведения исследований были благоприятными для развития патогена, так как особенности зим позволили грибу успешно перезимовать (низкие температуры не опускались ниже минус 15 °С). Условия весенне-летних периодов были благоприятными для развития коккомикоза (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние погодных условий на распространение и интенсивность развития коккомикоза в условиях Прикубанской зоны Краснодарского края

Год	Температура воздуха, °С	Относительная влажность воздуха, %	Распространение болезни (Р), %	Интенсивность развития (R), %
	средние показатели			
2011	22,6	60	90-100	72-80
2012	24,2	63	81-92	52-60
2013	22,2	63,3	92-96,5	62-72
2014	22,8	62,5	90-100	75

Отмечено, что даже при высоких температурах (выше +30 °С) патоген не терял жизнеспособности, так как зафиксировано нарастание распространения и интенсивности развития болезни в течение всех лет исследований.

Объекты исследований. В качестве материала для оценки устойчивости к коккомикозу в полевых условиях (естественном фоне поражения) была использована коллекция форм рода *Cerasus* Mill. (328 растений), в основном представленная гибридами селекции СКЗНИИСиВ (280 растений), полученными с помощью методов отдаленной гибридизации и биотехнологии в результате направленной селекции на адаптивность к биострессорам в изменяющихся условиях среды. Год посадки коллекционных участков – 2008, 2009; схема посадки – 5 × 1 м. Для выявления морфологических показателей, связанных с устойчивостью к коккомикозу, использовались сеянцы (56 шт.) семьи (вишня Булатниковская × (*C. lannesiana* №2 × черешня Франц Иосиф)) первого и второго года жизни.

Методы исследований. Оценка устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу определялась в соответствии с методическими рекомендациями М.С. Ленивцевой (2010), оценка хозяйственно-ценных признаков – по общепринятой методике «Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур», Орел (1999).

Физиолого-биохимическая оценка устойчивости представителей рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу выполнялась на приборной базе лаборатории физиологии и биохимии растений и ЦКП Проблемно-аналитический ФГБНУ СКЗНИИСиВ. Содержание белка, пигментов (суммы хлорофиллов *a* и *b*,

каротинов) определяли спектральным методом на приборе UNICO 2800 UV/VIS, лигнина – весовым методом согласно общепринятым методикам.

Содержание в экстракте листьев свободных форм ионов металлов, фенолкарбоновых кислот, общего количества органических кислот выполняли на системах капиллярного электрофореза серии Капель, пробоподготовку – на СВЧ-минерализаторе Минотавр 1 с использованием методик, разработанных в проблемно-исследовательской лаборатории СКЗНИИСиВ (2004, 2011). При определении свободных форм щелочных и щелочно-земельных металлов использовали модифицированный метод, в котором рабочий электролит, содержащий бензимидазол, краун-эфир и винную кислоту, модифицировали добавлением однопроцентного раствора изопропанола, что позволило улучшить разделение изучаемых катионов от органических катионов (амины, основания аммония, амиды и аминокислоты), содержащихся в вытяжке листа. Анатомо-морфологические признаки изучали с помощью светового микроскопа Olympus BX41. Морфологические и биометрические показатели сеянцев – согласно Методическим рекомендациям «Апробация посадочного материала плодовых, ягодных и орехоплодных культур в южной зоне плодородства» (2007). Для статистической обработки использовались стандартные биометрические методы (корреляционный, регрессионный, дисперсионный анализы), а также методы из категории многомерных: дискриминантный и кластерный анализы по Г.Ф. Лакину (1990) и С.Н. Щеглову (2005). Все необходимые вычисления выполнены на IBM PC с помощью пакета программ Stat Soft STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полевая оценка гибридного материала коллекции СКЗНИИСиВ по степени устойчивости к коккомикозу. В условиях эпифитотийного развития болезни была проведена оценка форм рода *Cerasus* Mill. по степени и по типам устойчивости к коккомикозу, в том числе гибридов коллекции СКЗНИИСиВ, полученных от образцов восточно-азиатских видов *C. serrulata*, *C. lannessiana* №2, *C. yedonensis*, *C. incisa*, *C. judii*, *C. canescens* (F₁, F₂, F₃). Коллекция была разделена на четыре группы в зависимости от балла поражения коккомикозом. К первой

группе были отнесены устойчивые к коккомикозу растения (балл поражения 0-0,1) – 119 форм, что составило 42,5 % от общего количества образцов; ко второй группе – с полигенным типом устойчивости (балл поражения до 2) – 33 формы – 11,8 %; к третьей группе (с поздним развитием инфекции) – 53 образца – 18,9 % (до 3 баллов); к четвертой группе – (сильно поражаемые – балл поражения 3 и более) – 75 форм – 26,8 % (рисунок 1).

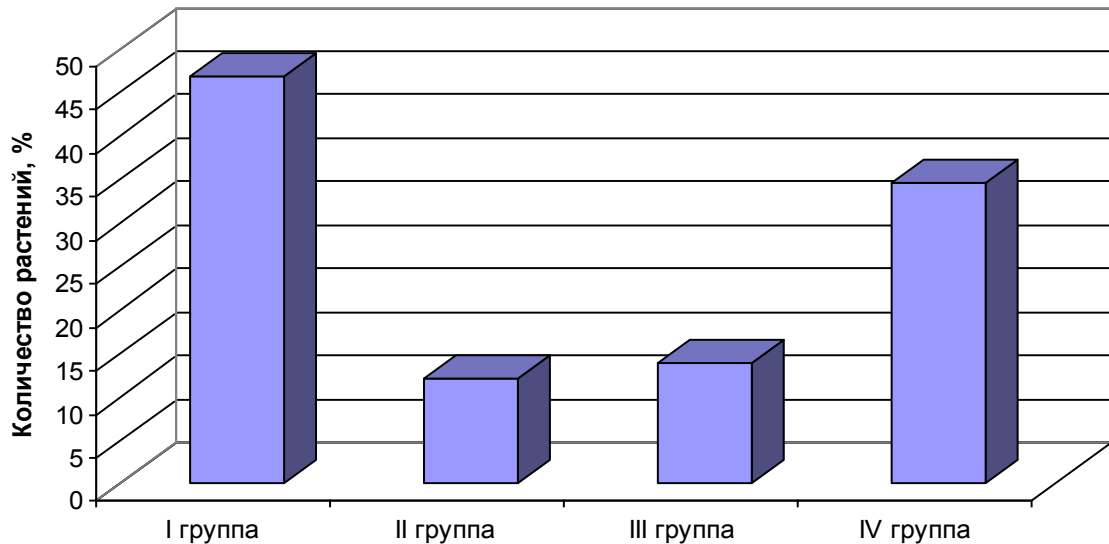


Рисунок 1 – Соотношение растений с различной степенью устойчивости к коккомикозу, %

Выделены образцы, которые не поражались болезнью, давали стабильный урожай и могут быть рекомендованы в качестве источников устойчивости к коккомикозу: производные *C. lannesiana* №2 – 13 форм; производные *C. incisa* – 2 образца; производные *C. serrulata* Ht. – 2 формы. Среди непоражаемых форм впервые выявлены образцы с моногенной устойчивостью – реакцией сверхчувствительности: производные *C. lannesiana* № 2 – 4 формы, производные *C. incisa* – 3 образца, производные *C. serrulata* Ht. – 1 форма.

Среди растений с полигенным типом устойчивости выделены по хозяйственно-ценным признакам две формы: вишня Южанка (3-28) и АИ 70, из образцов с поздним развитием инфекции – вишня Тимирязевская (II-5-14-48).

В результате исследований определены модельные объекты с реакцией растений на поражение, характерной для различных типов устойчивости, для выявления физиолого-биохимических и анатомо-морфологических показателей, связанных с устойчивостью к коккомикозу.

Анатомо-морфологическая оценка устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу. Устойчивость растений к заболеваниям находится под комплексным генетическим контролем и складывается из множества механизмов, которые проявляются в разных сочетаниях у различных видов, обеспечивая эффективную защиту от патогенов. Для разработки подхода к выделению морфологических параметров, связанных с устойчивостью форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу, были проанализированы данные по 37 признакам сеянцев (56 штук) семьи (вишня Булатниковская × (*C. lannesiana* №2 × черешня Франц Иосиф)). Все показатели были разделены на количественные и качественные для использования в генетико-статистическом анализе. При проведении дисперсионного анализа на установление доли влияния фактора поражаемость коккомикозом на морфологические признаки в разные периоды развития инфекции найдены наибольшие различия у гибридов в период максимального поражения коккомикозом по следующим морфологическим показателям: размер чечевичек, размер вегетативной почки, глубина надреза края листа, количество нектарников. Кластерный анализ по выделенным в дисперсионном анализе параметрам, связанным с устойчивостью, доказал, что оценка степени поражения изучаемых гибридов возможна (рисунок 2).

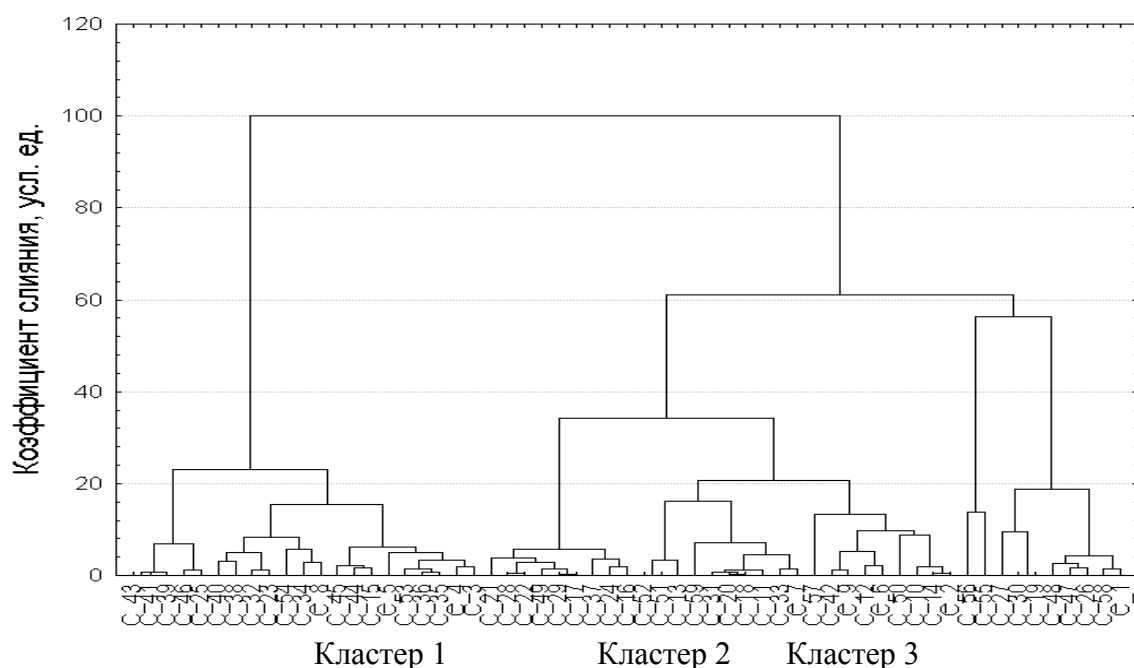


Рисунок 2 – Результаты кластерного анализа морфологических признаков сеянцев, полученных в результате отдалённой гибридизации вишни Булатниковская × (*C. lannesiana* №2 × черешня Франц Иосиф)

Доказательством правильного разделения по выделенным признакам послужило то, что попавшие в первый и третий кластеры растения резко различались по поражаемости. В первый кластер попали формы, похожие на материнскую (поражаемую коккомикозом вишню Булатниковская) – 21 шт., в третью – похожие на не поражаемую болезнью отцовскую форму, производную от *C. lannesiana* №2 – 10 шт.

При оценке качественных показателей был применен корреляционный анализ с использованием коэффициента Чупрова. На основе предложенных классификаций по типам устойчивости с помощью морфологических признаков были получены уравнения регрессии (три варианта), позволяющие проводить оценку сеянцев изучаемых гибридов по степени устойчивости к коккомикозу в возрасте от 0,5 до 1 года. Для определения типа устойчивости образцов требуется подставить в уравнения регрессии значения признаков нового образца и получить тип устойчивости (от 1 до 3) в зависимости от варианта классификации. Было выбрано уравнение регрессии, построенное по второму варианту классификации, где выбраны показатели, не зависящие от влияния среды и качества проведения агротехнических мероприятий.

Рекомендуемый вариант классификации: 1 – полностью иммунные (балл поражения 0-0,1); 2 – слабо поражаемые (полигены) (балл поражения до 2); 3 – поражаемые (балл поражения больше 2).

Уравнение регрессии:

$$X = 0,795533 - 0,176518 \cdot A_1 + 0,525544 \cdot A_2 + 0,630241 \cdot A_3,$$

где X – устойчивость к коккомикозу, A_1 – антоциановая окраска кончика однолетнего побега, A_2 – форма вершины вегетативной почки однолетнего побега, A_3 – угол вершины листовой пластинки.

Разработанный подход по выделению морфологических показателей, связанных с устойчивостью к коккомикозу, позволит ускорить оценку генотипов на ранних стадиях развития растений.

Анатомические особенности строения листа имеют значение для внедрения и распространения патогенов в растении. Нами были изучены

следующие анатомо-морфологические параметры листовой пластинки у форм с различной степенью устойчивости к коккомикозу: толщина кутикулы, опушенность (в виде волосков), количество устьиц. В результате изучения устьичного аппарата (количества устьиц на 1 мм²) установлены статистически достоверные различия между сильно поражаемыми образцами и непоражаемыми или слабо поражаемыми (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика устьичного аппарата у форм рода *Cerasus* Mill. с разной степенью поражения коккомикозом

Образец	Сильно поражаемые формы (балл поражения более 3)	Непоражаемые и слабо поражаемые формы (балл поражения не более 2)
Количество устьиц на 1 мм ² , шт.	570	313
t-критерий Стьюдента	40,26**	

У восприимчивых форм отмечено наличие опушенности в виде волосков в отличие от непоражаемых гибридных форм.

Установлено, что у непоражаемых форм и с полигенным типом устойчивости толщина кутикулы больше (среднее значение признака 11,43 мкм, $t = 3,40$ при $p < 0,05$; 8,36 мкм, $t = 2,35$ при $p < 0,05$, соответственно) по сравнению с поражаемыми (4,96 мкм).

Оценка устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу по физиолого-биохимическим показателям в системе хозяин-патоген-среда. Большинство исследователей отмечает, что заболевание растений сопровождается значительным ослаблением их фотосинтетической активности.

Генетико-статистический анализ по четырем годам исследований за весь вегетационный период показал, что содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* статистически достоверно отличается у форм с различной степенью поражения коккомикозом. У сильно поражаемых содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* ниже (5,01 мг/г сух. вещества), чем у форм с полигенным типом устойчивости (7,15 мг/г сух. вещества) ($t = 5,02$, при $p < 0,05$). У непоражаемых и слабо поражаемых образцов содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* выше (6,33 мг/г

сух. вещества), чем у поражаемых (5,01 мг/г сух. вещества) ($t = 2,54$, при $p < 0,05$).

Наибольшие различия по содержанию в листьях суммы хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов найдены в мае в период активного роста растений. У устойчивых и с полигенным типом устойчивости форм содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* выше, чем у поражаемых в 1,3 раза.

Фактором устойчивости растений к факультативным паразитам может служить высокое содержание в тканях белков и промежуточных продуктов белкового обмена. Была изучена концентрация белка у тех же образцов в течение 2012-2014 гг. в разные периоды развития инфекции. Установлено, что у форм, не поражаемых коккомикозом, содержание белка выше, чем у сильно поражаемых, до проявления болезни в 1,3 раза, у форм с полигенным типом устойчивости выше, чем у сильно восприимчивых, как до проявления болезни (в 1,4 раза), так и в начале эпифитотийного развития коккомикоза (в 2,8 раза) (рисунок 3).

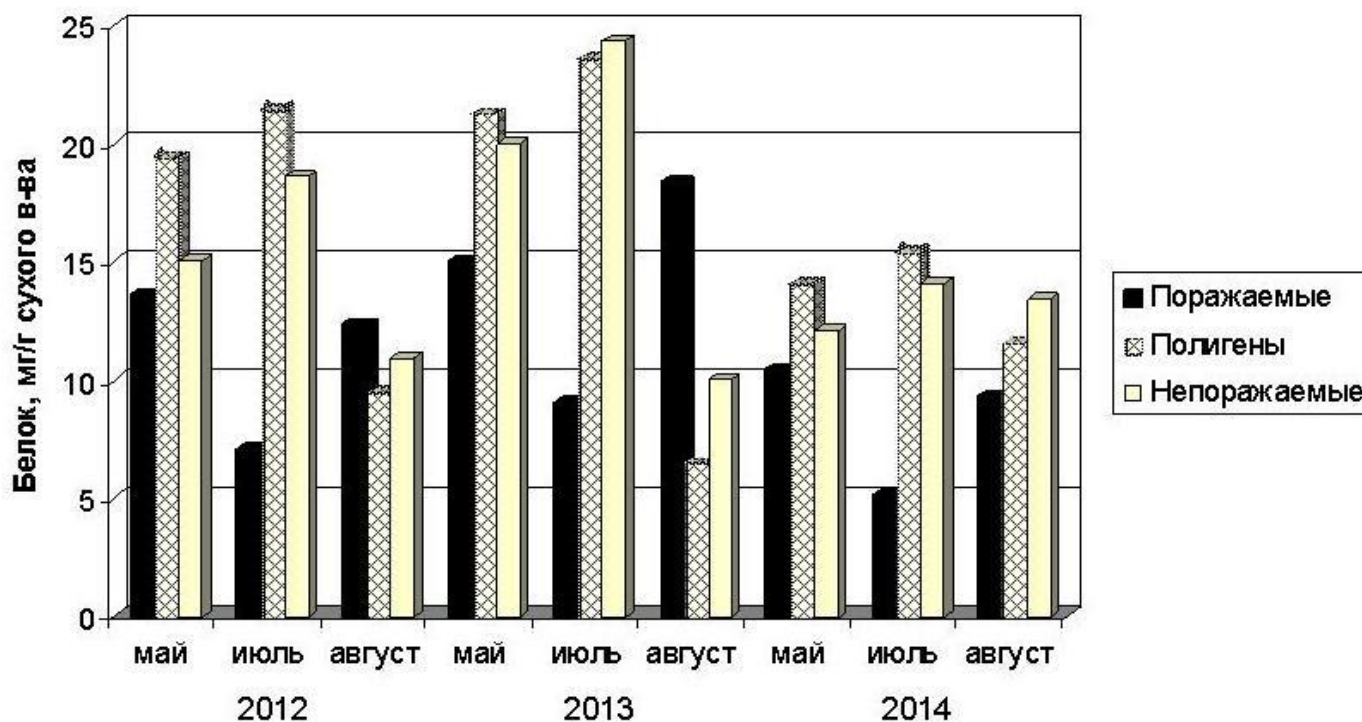


Рисунок 3 – Содержание белка в листьях форм рода *Cerasus* Mill., различающихся по степени устойчивости к коккомикозу

Содержание белка и пигментов было изучено в листьях форм с проявлением реакции сверхчувствительности (РСЧ) – с моногенным типом устойчивости в период эпифитотийного развития инфекции (в июле). Сравнительный анализ данных до проявления реакции и после выявил, что количество белка и суммы хлорофиллов $a+b$ в листьях выше у форм, где не наблюдалось проявление РСЧ.

Для многих патогенов барьером при проникновении через клеточную стенку служат отложения лигнина. Впервые для растений рода *Cerasus* Mill. было изучено содержание лигнина в листьях форм с различными типами устойчивости к болезни: поражаемые, с полигенным типом устойчивости, непоражаемые, с проявлением РСЧ. Отмечено, что в период эпифитотии содержание хлорогеновой кислоты (предшественника лигнина) в 7 раз выше, а самого лигнина в 4,4 раз выше в листьях форм с проявлением РСЧ (моногенный тип устойчивости), чем у сильно поражаемых болезнью (рисунок 4).

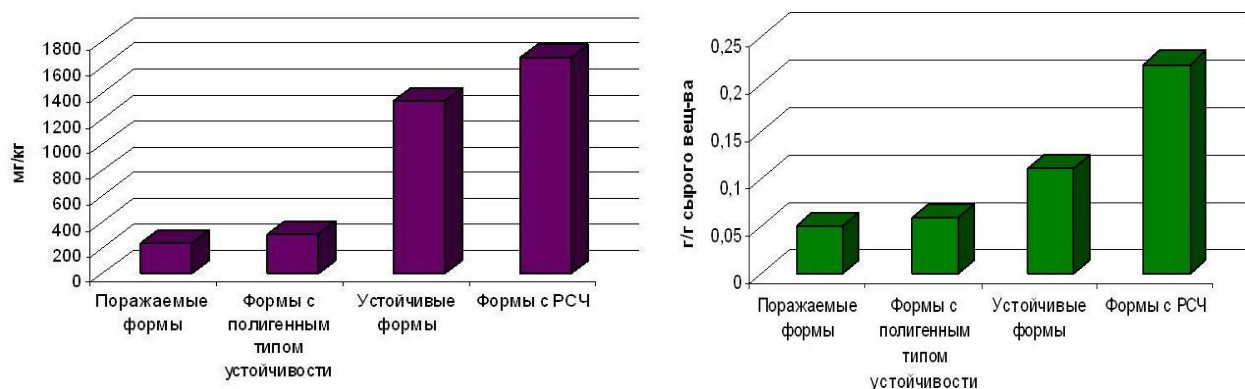


Рисунок 4 – Содержание хлорогеновой кислоты (слева) и лигнина (справа) в листьях форм рода *Cerasus* Mill., различающихся по типам устойчивости к коккомикозу

Большая роль в механизмах устойчивости против патогенов отводится фенольным соединениям, органическим кислотам, катионам. В листьях растений рода *Cerasus* Mill., различающихся по типам устойчивости, по многолетним исследованиям в течение сезона в системе хозяин-патоген-среда найдены закономерности в динамике свободных форм катионов калия и магния, кофейной и янтарной кислот.

Установлено, что концентрация данных веществ в период эпифитотийного проявления инфекции (июле) повышалась у поражаемых форм и с полигенным типом устойчивости в течение всех лет исследований, но скорость нарастания исследуемых веществ в листовом экстракте у вторых по мере развития инфекции была более высокой, что особенно четко проявилось в динамике содержания кофейной кислоты (в 2 раза).

Разработка генетико-статистических подходов к оценке степени и типов устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу по биохимическим показателям. В результате ранее проведенных многолетних исследований А.П. Кузнецовой, Ю.Ф. Якубой, С.Н. Щегловым (2009 г.) в ФГБНУ СКЗНИИСиВ с помощью новых методов, разработанных в институте с использованием систем капиллярного электрофореза и дискриминантного анализа, были получены функции классификации и неравенство, позволяющее выделять из неизвестных форм устойчивые образцы на самом раннем этапе развития растения:

$$X_1 = 0,1015 \cdot Y_1 + 5,2659 \cdot Y_2 + 0,0122 \cdot Y_3 + 0,0277 \cdot Y_4 - 12,1629 >$$

$$X_2 = 0,01997 \cdot Y_1 - 7,46984 \cdot Y_2 + 0,00950 \cdot Y_3 + 0,02763 \cdot Y_4 - 5,90917$$

где X_1 – значение первого неравенства, X_2 – значение второго неравенства, Y_1 – содержание кофейной кислоты, Y_2 – содержание янтарной кислоты, Y_3 – содержание магния, Y_4 – содержание кальция.

Одной из задач наших исследований была апробация предложенного метода разделения форм рода *Cerasus* Mill. на две категории: устойчивые и неустойчивые. Достоверность этого неравенства мы проверили на образцах (51 шт.), взятых из различных эколого-географических районов, проводя биохимический анализ листьев в мае, до эпифитотийного развития.

Диагностику проводили в период активного роста листьев путем определения в них количественного содержания свободных форм катионов магния, кальция, кофейной и янтарной кислот с помощью систем капиллярного электрофореза. Отнесение генотипа к устойчивому или неустойчивому к патогену 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 (таблица 3).

Таблица 3 – Выделение устойчивых форм рода *Cerasus* Mill. с помощью экспресс-метода оценки устойчивости к коккомикозу

Сорт, гибрид	Максим. балл поражения	Янтарная кислота, г/кг	Кофейная кислота, мг/кг	Магний, мг/кг	Кальций, мг/кг	Значение I-го неравенства	Значение II-го неравенства
6/8-к	0	0,6	31	1765	597	39,60	36,76
Любская (2010)	4	0,2	18	284	381	4,74	6,18

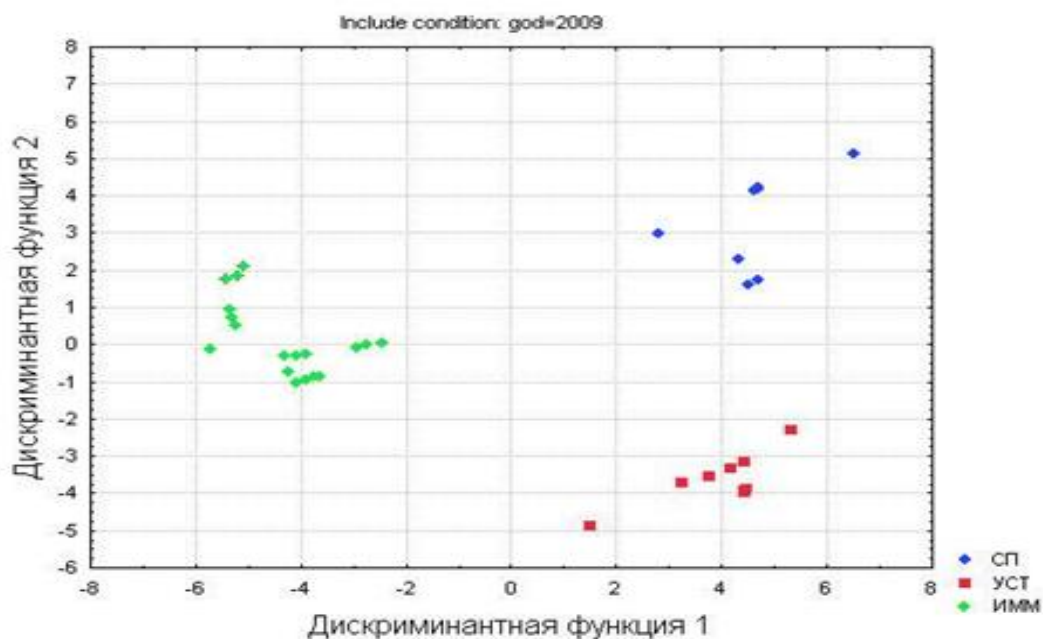
Если полученное значение первого неравенства больше, чем значение второго неравенства, то образец устойчив к коккомикозу. Если значение первого неравенства меньше значения второго неравенства, то образец неустойчив к болезни.

Все взятые нами сорта и формы были успешно разделены на устойчивые и не устойчивые к коккомикозу, результаты достаточно хорошо соответствовали экспертной оценке, полученной в полевых и лабораторных условиях.

Для разделения форм рода *Cerasus* Mill. по биохимическим параметрам не на две категории, а на три: высоко устойчивые или непоражаемые (балл поражения 0-0,1); с полигенным типом устойчивости (балл поражения не более 2) и поражаемые (балл поражения 3 и более) были вовлечены в опыт модельные объекты (22 формы), выделенные в результате полевых исследований. Концентрации биохимических показателей вычислялись с помощью методик, разработанных в СКЗНИИСиВ, в том числе оптимизированной для систем капиллярного электрофореза. Сущность введенных изменений – добавление однопроцентного раствора изопропанола в рабочий электролит для лучшего извлечения катионов металлов.

В результате проведенного дисперсионного анализа полученных данных биохимических веществ по трем срокам измерения (весна, лето, осень)

выявлено, что генотип сорта оказывает существенное влияние на большинство изучаемых свободных форм следующих показателей: содержание кофейной, яблочной, янтарной, лимонных кислот, катионов калия, натрия и магния. Отмечено значительное влияние условий года на концентрацию хлорогеновой и аскорбиновой кислот. Дисперсионный анализ также показал, что доля влияния фактора «поражаемость» на данные показатели сильно варьирует в разные годы исследований, и разрешающей способности его не достаточно для идентификации степени поражаемости болезнью. Поэтому был использован дискриминантный анализ, позволивший определить правило отнесения новых объектов к известным группам. Необходимой в этих условиях минимизации изменчивости, связанной с различиями условий года, решили достичь за счет построения специальных линейных комбинаций комплекса признаков – дискриминантных функций. Их значения служат оценкой устойчивости к коккомикозу изучаемых форм. Учитывая существенные различия данных за разные годы исследований, анализ проведен за каждый год отдельно. В качестве примера на рисунке 5 представлено распределение сортов по устойчивости к коккомикозу в 2009 г.



СП – сильно поражаемые коккомикозом, УСТ – с полигенным типом устойчивости, ИММ – не поражаемые коккомикозом

Рисунок 5 – Распределение сортов по устойчивости к коккомикозу в пространстве дискриминантных функций в 2009 году

В каждом году исследований наблюдалась практически идеальная ординация сортов по поражаемости в пространстве дискриминантных функций, которые являются не чем иным, как линейной комбинацией исходных биохимических признаков.

У форм с полигенным типом устойчивости найдено наибольшее количество показателей, влияющих на устойчивость, в июле – в период, когда наблюдалось максимальное развитие инфекции (таблица 4).

Таблица 4 – Содержание биохимических веществ в экстрактах листьев у форм косточковых, различающихся по типам устойчивости (июль 2011-2012 гг.)

Группы сортов	С полигенным типом устойчивости (балл поражения до 2)	Поражаемые формы (балл поражения 3 и более)	t-критерий Стьюдента
Хлорогеновая кислота, мг/кг	4917,1	1806,26	2,43*
Кофейная кислота, мг/кг	38,37	25,91	1,75*
Янтарная кислота, г/кг	0,12	0,08	0,56*
Яблочная кислота, г/кг	11,56	11,75	2,51
Лимонная кислота, г/кг	4,73	3,45	1,17*
Калий, мг/кг	4685,2	3141,2	2,75*
Натрий, мг/кг	92,63	74,67	1,92
Магний, мг/кг	1724,2	1324,4	2,5*
Кальций, мг/кг	1588,5	1372,3	2,41*
Аскорбиновая кислота, мг/кг	404,5	202,2	2,54*

Таким образом, установлено, что разделение форм рода *Cerasus* Mill. на три группы по типам устойчивости к коккомикозу: непоражаемые, с полигенным типом устойчивости, поражаемые на основе биохимических показателей – возможно и для этого целесообразно применять дискриминантный анализ.

Эколого-экономическая эффективность использования выделенных устойчивых к коккомикозу форм и модифицированного экспресс-метода оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу по биохимическим показателям.

Использование выделенных устойчивых к коккомикозу форм сокращает затраты на защиту от болезней на 12-14 % и уменьшает количество обработок и пестицидную нагрузку на 12 %. Результаты экономической эффективности применения модифицированной методики для разделения форм рода *Cerasus* Mill. по степени устойчивости к коккомикозу представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Экономическая эффективность использования модифицированной методики для разделения форм рода *Cerasus* Mill. по степени устойчивости к коккомикозу

Показатели	До модификации методики	После модификации методики	Отклонение, +/-
Кол-во анализов, шт.	600	700	100
Стоимость анализа, руб./шт.	1500	1200	– 300
Цена анализа, руб./шт.	1800	1800	
Доход от оказания услуг, тыс.руб.	1080	1260	180
Затраты на оказание услуг, тыс.руб.	900	840	– 60
Прибыль от реализации, тыс.руб.	180	420	240
Рентабельность услуг, %	20	50	30

Модификация экспресс-метода оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу позволила снизить себестоимость анализа на 20 % за счет применения доступных химических реактивов, выбора оптимальных условий разделения компонентов и достижения необходимой точности и достоверности измерений. Рост рентабельности проводимых исследований возрастает на 30 процентных пунктов.

ВЫВОДЫ

1. В результате полевой оценки устойчивости к коккомикозу форм рода *Cerasus* Mill. коллекции СКЗНИИСиВ проведено разделение по типам устойчивости: непоражаемые (в том числе с реакцией сверхчувствительности –

моногенный тип устойчивости), с полигенным типом устойчивости и с поздним развитием инфекции.

2. Установлены анатомо-морфологические показатели, связанные с устойчивостью представителей рода *Cerasus Mill.* к коккомикозу: толщина кутикулы (в 2,3 раза больше у устойчивых, чем у поражаемых), количество устьиц (у не поражаемых коккомикозом или слабо поражаемых форм в 1,6 раза меньше, чем у сильно поражаемых), опушенность листа в виде волосков характерна для поражаемых форм.

3. Выявлено повышенное содержание пигментов в 1,3 раза и белка в 1,2 раза до проявления болезни в листьях не поражаемых коккомикозом форм, относительно неустойчивых. Отмечено, что у форм с полигенным типом устойчивости количество белка выше: до проявления болезни в 1,4 раза и в период эпифитотийного развития инфекции в 2,8 раза относительно сильно поражаемых.

4. Установлено, что количество лигнина в 4,4 раза и хлорогеновой кислоты (предшественника лигнина) в 7 раз больше у форм с моногенным типом устойчивости (с реакцией сверхчувствительности), чем у сильно поражаемых в период максимального развития коккомикоза.

5. В результате изучения годовой и сезонной динамики содержания химических веществ выявлены закономерности изменения следующих биохимических показателей: свободных форм катионов калия и магния, кофейной, янтарной кислот. У не поражаемых коккомикозом форм концентрация данных веществ в листовом экстракте выше до поражения и уменьшается в период эпифитотийного развития инфекции, а у восприимчивых и с полигенным типом устойчивости отмечено повышение концентрации по мере развития инфекции. Установлено, что скорость накопления исследуемых веществ в листьях у форм с полигенным типом устойчивости идет интенсивнее.

6. Выявлено, что анатомо-морфологические и физиолого-биохимические признаки, включаемые в комплекс оценки устойчивости форм рода *Cerasus Mill.* к коккомикозу, зависят от условий года. Необходимой в этих условиях

минимизации изменчивости, связанной с различиями условий года, можно достичь за счет построения специальных линейных комбинаций комплекса признаков – дискриминантных функций. Их значения служат оценкой устойчивости изучаемых сортов и гибридов к коккомикозу.

7. Предложен генетико-статистический подход для разделения форм рода *Cerasus* Mill. по типам устойчивости к коккомикозу на основе биохимических показателей: непоражаемые, с полигенным типом устойчивости, поражаемые.

8. Установлен оптимальный срок для выделения форм с полигенным типом устойчивости по биохимическим показателям – период максимального проявления инфекции.

9. Выделены перспективные генотипы рода *Cerasus* Mill. для селекции и производства: не поражаемые болезнью – *C. serrulata* (2 формы), *C. incisa* (2 формы), *C. lannesiana* №2 (13 форм), в том числе образцы с моногенным типом устойчивости (8 форм); с полигенным типом устойчивости (16 форм).

10. Применение модифицированного метода оценки устойчивости относительно общепринятых методов повысит рентабельность на 30 процентных пунктов. Установлено, что использование выделенных форм, устойчивых к коккомикозу, позволит сократить затраты на защиту от болезней на 12-14 % и уменьшит количество обработок и пестицидную нагрузку на 12 %.

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ И ПРОИЗВОДСТВА

1. Использовать в селекционной работе для создания форм с долговременной устойчивостью генотипы, различающиеся по типам устойчивости:

– 1-59-08 (сеянец от свободного опыления 10-15 [*C. incisa* × Полянка]), 2-88-08 (сеянец от свободного опыления 10-15 [*C. incisa* × Полянка]), 3-13-08 (Булатниковская × А9 (*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф)), 3-38-08 (Молодежная × 11-17 [*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф]), 3-57-08 (свободное опыление Рубин), 2-83-08 (сеянец от свободного опыления 11-15 [*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф]), 3-21-17 (сеянец от свободного опыления АИ5 [*C. serrulata* × Норд Стар]), 3-106-17 (*C. serrulata* × Полянка), 2-50-08

(Булатниковская × 11-17 [*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф]), 2-82-08 (сеянец от свободного опыления 11-15 (*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф), 3-32-08 (Молодежная × 11-17 [*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф]), 3-40-08, 3-39-08 (Булатниковская × [Молодежная × *C. lannesiana* №2]), 1-59-09, 1-60-09, 1-61-09 (сеянец от свободного опыления от АИ 43 [Молодежная × *C. lannesiana* №2]), АИ13 (сеянец от свободного опыления Студенческая × *C. lannesiana* №2], 6/8-к (Норд Стар × 11-17 [*C. lannesiana* №2 × Франц Иосиф]), 1-11-09 сеянец антипки американской *C. mahaleb*;

– в том числе с моногенным типом устойчивости: производные *C. lannesiana* № 2 (второе поколение) – 4 формы, производные *C. incisa* (второе поколение) – 3 образца, производные *C. serrulata* Ht. – 1 форма;

– с полигенным типом устойчивости: 2-39-08, 2-40-08, 2-47-08, 3-2-08, 3-26-08, 3-32-08 (№21) – (Булатниковская × 11-17 [*C. lannesiana* × Франц Иосиф], 2-28-09 сеянец от свободного опыления вишня Булатниковская, 3-28-08, 3-29-08 (вишня Молодежная × А18), 1-49-09, 1-28-09, 1-29-09, 1-51-09, 1-52-09, 1-2-09, 2-3-09 – сеянцы от свободного опыления вишня Южанка (3-28);

– с поздним развитием инфекции – 2-63-08, 2-64-08, 3-43-08, 3-42-08, 3-44-08, 1-42-09, 1-43-09, 1-44-09, 2-12-09, 2-15-09, 2-23-09, 2-24-09 (сеянцы от свободного опыления (*C. canescens* × *C. avium*), вишня Тимирязевская (П-5-14-48).

2. Рекомендовать испытание сортов: с поздним развитием инфекции вишня Тимирязевская, с полигенным типом устойчивости – вишня Южанка (3-28) и АИ 70, которые выделяются по комплексу хозяйственно-ценных признаков (урожайность, крупноплодность, вкус плодов).

Публикации по теме диссертации.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. Савельев, Н.И. Адаптивный потенциал подвоев косточковых культур / Н.И. Савельев, О.Е. Богданов, А.Н. Юшков, М.В. Маслова, А.П. Кузнецова, В.В. Шестакова // Садоводство и виноградарство. – 2009. – №6. – С.16-17.
2. Кузнецова, А.П. Генетико-статистические подходы и экологические аспекты создания новых методов оценки и прогноза поражения хозяйственно-ценных форм рода *Cerasus* Mill. / А.П. Кузнецова, В.В. Шестакова, С.Н. Щеглов // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – №6. – С.85-88.
3. Кузнецова, А.П. Разработка новых методов оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу / А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба, В.В. Шестакова // Плодоводство и ягодоводство России. – М.–2010. – Т. XXIV. – Ч. 2. – С.424-430.
4. Кузнецова, А.П. Возможности использования биохимических показателей для идентификации устойчивости сортов и гибридов рода *Cerasus* к коккомикозу / А.П. Кузнецова, В.В. Шестакова, С.Н. Щеглов // «Агро XXI». – 2011. – № 1-3. – С.24 – 26
5. Кузнецова, А.П. Выделение эффективных источников устойчивости к коккомикозу из форм подвоев для мелкокосточковых селекции СКЗНИИСиВ / А.П. Кузнецова, М.С. Ленивцева, В.В. Шестакова, О.А. Соколов // Плодоводство и ягодоводство России. – 2012. – Т. XXXIV. – С. 407-413
6. Шестакова, В.В. Оценка нового гибридного материала коллекции СКЗНИИСиВ по степени устойчивости к коккомикозу / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – Т. XXXX. – Ч. 1. – № 1. – С. 365-368

Публикации в других изданиях:

7. Кузнецова, А.П. Генетико-селекционные аспекты разработки диагностических критериев биохимических показателей устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу для оптимизации адаптивного сорта косточковых / А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба, С.Н. Щеглов, В.В. Шестакова // Наука Кубани. – 2010. – №1. – С.18-23
8. Шестакова, В.В. Использование биохимических и анатомо-морфологических показателей для изучения устойчивости представителей рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Наука Кубани. – 2013. – №1. – С. 16-21
9. Шестакова, В.В. Разработка методов оценки устойчивости к коккомикозу форм рода *Cerasus* Mill. на основе изучения морфо-физиологических параметров / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Научные труды СКЗНИИСиВ «Методологическое обеспечение селекции садовых культур и винограда на современном этапе». – Краснодар, 2013. – Т.1. – С. 149-152

10. Шестакова, В.В. Оценка устойчивости сорто-форм черешни и вишни к коккомикозу по анатомо-морфологическим признакам // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2010. – № 20 (2). – С. 76-81. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/13/02/09.pdf>
11. Шестакова, В.В. Оценка устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. селекции СКЗНИИСиВ к коккомикозу / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Новината за напреднали наука - 2014 материали за х международна научна практична конференция. Редактор: Милко Тодоров Петков. София, 2014. – С. 75-77.
12. Кузнецова, А.П. Генетико-селекционные аспекты разработки диагностических критериев биохимических показателей устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу / А.П. Кузнецова, С.Н. Щеглов, Ю.А. Волчков, В.В. Шестакова // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2010. – № 2 (1). – С. 64-69. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/10/01/07.Pdf>
13. Шестакова, В.В. Биохимическая характеристика устойчивости представителей рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу/ В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2010. – № 3 (2). – С. 61-67 – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/10/02/09.Pdf>
14. Шестакова, В.В. Физиолого-биохимическая характеристика форм рода *Cerasus* Mill. с различной степенью устойчивости к коккомикозу / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова, А.С. Романенко // Материалы международной научно-методической конференции «Физиологические основы продуктивности, устойчивости и качества продукции в современном садоводстве» посвященная 80-летию со дня рождения А.С. Овсянникова, Мичуринск-наукоград. – 2013. – С. 144-149.
15. Шестакова, В.В. Разработка метода экспресс-оценки устойчивости вишне-черешневых гибридов по морфологическим признакам / В.В. Шестакова, А.П. Кузнецова // Материалы Международной научно-практической конференции «Современные научные исследования: методология, теория, практика». – Челябинск: Сити-Принт, 24 февраля, 2014. – С. 143 – 147.
16. Шестакова, В.В. Оптимизация методов экспресс-оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу с помощью биохимических и морфологических параметров/ В.В. Шестакова // XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», МГУ им. Ломоносова, 7-11 апреля, 2014, г. Москва. – С. 308-309.