

DOI: 10.31676/0235-2591-2024-6-5-14

Поиск морфологических, биохимических
и микробиологических маркеров устойчивости
сортов малины к *Botrytis cinerea* Pers.

С. Н. Евдокименко, М. А. Подгаецкий, В. В. Бобкова, К. В. Павлов, М. Е. Мертвищева
Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия
ORCID: Евдокименко С. Н. – 0000-0001-9187-7593,
Подгаецкий М. А. – 0000-0002-0289-1092,
Бобкова В. В. – 0000-0002-2797-7394,
Мертвищева М. Е. – 0000-0001-9126-747X.

Резюме. Для ускорения селекционного процесса были проведены исследования по поиску морфологических, биохимических и микробиологических маркеров устойчивости малины к *Botrytis cinerea* Pers. Объектами исследований являлись листья сортов и форм, различных по устойчивости к серой гнили. С помощью световой микроскопии установили, что на абаксиальной стороне листа устойчивых сортов имеются множественные трихомы (волоски), которые размещены не только по жилкам, но и в межжилковом пространстве, а также находятся часто расположенные мелкие железки желтого цвета. На абаксиальной стороне листа восприимчивых сортов редкие трихомы располагаются по центральной жилке листа, железок не наблюдается. Методом электронной микроскопии показано, что адаксиальная сторона устойчивых сортов настолько густо покрыта переплетающимися волосками разной длины, что кутикула не просматривается. У восприимчивых сортов волоски реже, можно увидеть кутикулу. Проведенный корреляционный анализ содержания в листьях минеральных веществ и степени поражения сортов малины *Botrytis cinerea* выявил среднюю и слабую зависимость между этими показателями, что не позволяет использовать их в качестве надежных маркеров устойчивости к серой гнили плодов. В результате анализа метаболомного профиля установлено, что устойчивые сорта в составе эпикуткулярного слоя листьев содержат повышенное количество (в 1,5-23,6 раза) соединений, обладающих антимикробным (фунгицидным) действием: лигноцериновая, декановая, пеларгоновая кислоты; этилгаллат, арабинофураноза, 1-бутанамин, которые можно считать биохимическими маркерами устойчивости к *B. cinerea* и использовать для ранней диагностики сеянцев. Из листьев устойчивого сорта 'Жар-Птица' и отборной формы № 11-165-10 выделены штаммы культивируемых форм ЭБ с установленной антифунгальной активностью по отношению к *Botrytis cinerea*.

Ключевые слова: малина, сорт, устойчивость, серая гниль плодов, *Botrytis cinerea* Pers., световая микроскопия, химический состав, эндофитные бактерии.

Благодарности. Исследования выполнены по теме ФГБНУ ФНЦ Садоводства FGUW-2022-0009 «Создание сортов малины, толерантных к *Botrytis cinerea* Pers. на основе анатомо-морфологических и физиолого-биохимических маркеров устойчивости».

Адрес для переписки: Евдокименко Сергей Николаевич Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, ул. Загорьевская. 4, г. Москва, 115598, Россия serge-evdokimenko@yandex.ru	Address for correspondence: Sergej N. Evdokimenko Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, 4, Zagorevskaya str., Moscow, 115598, Russia serge-evdokimenko@yandex.ru
---	---

Образец цитирования: Евдокименко С. Н., Подгаецкий М. А., Бобкова В. В., Павлов К. В., Мертвищева М. Е. Поиск морфологических, биохимических и микробиологических маркеров устойчивости сортов малины к <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Садоводство и виноградарство. 2024;6:5-14 doi: 10.31676/0235-2591-2024-6-5-14 © Евдокименко С. Н. и др., 2024	For citation: Evdokimenko S. N., Podgaetskiy M. A., Bobkova V. V., Pavlov K. V., Mertvishcheva M. E. Search for morphological, biochemical, and microbiological markers of resistance of raspberry cultivars to <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sadovodstvo i vinogradarstvo. 2024;6:5-14 doi: 10.31676/0235-2591-2024-6-5-14
---	--

Search for morphological, biochemical, and microbiological markers of resistance of raspberry cultivars to *Botrytis cinerea* Pers.

S. N. Evdokimenko, M. A. Podgaetskiy, V. V. Bobkova, K. V. Pavlov, M. E. Mertvishcheva

Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

ORCID: Evdokimenko S. N. – 0000-0001-9187-7593,

Podgaetskiy M. A. – 0000-0002-0289-1092,

Bobkova V. V. – 0000-0002-2797-7394,

Mertvishcheva M. E. – 0000-0001-9126-747X.

Abstract. To accelerate the breeding process, studies were conducted to identify morphological, biochemical, and microbiological markers of raspberry resistance to *Botrytis cinerea* Pers. The research objects were leaves of cultivars and forms differing in their resistance to gray mold. Using optical microscopy, we found that the abaxial surface of resistant cultivar leaves had multiple trichomes (hairs) not only along the veins, but also in the interveinal spaces. Moreover, closely spaced yellow glandules were discovered there as well. On the abaxial leaf surface of susceptible cultivars, rare trichomes were located along the primary leaf vein (midrib). No glandules were observed. Electron microscopy convincingly demonstrated that the adaxial side of resistant cultivars was so densely covered with intertwined hairs of different lengths that the plant cuticle was not visible. In susceptible cultivars, the hairs were sparse, and the cuticle could be seen. The correlation analysis between the mineral content in the leaves and the extent of damage to raspberry cultivars by *Botrytis cinerea* revealed a medium and weak dependence between these indicators. Thus, they cannot be used as reliable markers of resistance to gray mold of fruits. As a result of metabolomic profile analysis, resistant cultivars were found to contain an increased amount (1.5-23.6 times) of compounds with antimicrobial (fungicidal) action in the composition of the epicuticular layer of leaves. They are as follows: lignoceric, decanoic (capric), pelargonic acids, as well as ethyl gallate, arabinofuranose, 1-butanamine. These compounds can be considered biochemical markers of resistance to *B. cinerea* and used for early seedling disease diagnosis. Strains of cultivated endophytic bacteria forms with established antifungal activity against *Botrytis cinerea* were isolated from the leaves of the resistant cultivar *Zhar-Ptica* and selected form No. 11-165-10.

Keywords: raspberry, cultivar, resistance, gray mold of fruits, *Botrytis cinerea* Pers., optical microscopy, chemical composition, endophytic bacteria.

Acknowledgments. The research was conducted on the topic FGUW-2022-0009 «Creation of raspberry cultivars tolerant to *Botrytis cinerea* Pers. based on anatomical and morphological, as well as physiological and biochemical resistance markers» of the Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery.

Введение

Серая гниль плодов, вызываемая возбудителем *Botrytis cinerea* Pers., является одной из самых распространенных и опасных болезней растений рода *Rubus* [1]. Она поражает не только генеративные, но и вегетативные органы малины. В отдельные годы, благоприятные для развития гриба, потери урожая могут достигать 50-76 % [2]. Кроме того, *Botrytis cinerea* наносит существенный ущерб в период послеуборочного хранения плодов, что делает его одним из наиболее вредоносных патогенов малины.

Оптимальные условия для развития *Botrytis cinerea* складываются при температуре 20-25 °C и наличии капельной влаги [3]. В сухую погоду споры гриба не способны прорасти и остаются в латентном состоянии. Основное заражение происходит во время цветения, но наиболее сильно болезнь проявляется в период созревания урожая в дождливую погоду. Пораженные костянки покрываются серым налетом, гриб быстро распространяется по всему плоду, захватывая плодоложе, а иногда и цветоножку. Эти споры способствуют вторичному инфицированию генеративных и вегетативных органов растений [4]. Пораженные плоды непригодны для использования в свежем виде и для переработки.

Среди существующего сортимента малины отсутствуют сорта, иммунные к этому заболеванию. Вместе с тем, наблюдается сортовая специфичность устойчивости к *Botrytis cinerea*. Так, в Ленинградской области наиболее восприимчивым оказался сорт 'Золотые Куполы' (развитие болезни 99,4 %), а самым устойчивым – сорт 'Геракл' (развитие болезни 25,3 %) [5]. В наших ранних исследованиях относительную устойчивость к ботритиозу проявляли сорта 'Атлант', 'Бриллиантовая', 'Жар-Птица', 'Карамелька', 'Driscolls Maravilla' [6]. Следовательно, имеются предпосылки для отбора форм и ведения селекционного процесса в направлении создания сортов малины, устойчивых к серой гнили плодов.

Объективную оценку поражаемости исходных форм и гибридного потомства *Botrytis cinerea* в полевых условиях можно проводить только в сезоны с избыточным увлажнением. Для ускорения селекционного процесса и получения возможности диагностики сеянцев на ранних этапах нами были проведены исследования по поиску морфологических, биохимических и микробиологических маркеров устойчивости малины к *Botrytis cinerea* в лабораторных условиях.

Материал и методика исследований

Исследования выполнялись в 2022-2024 гг. Объектами изучения были листья 12 сортов ('Атлант', 'Жар-Птица', 'Медвежонок', 'Карамелька', 'Пингвин', 'Поклон Казакову', 'Подарок Кашину', 'Оранжевое Чудо', 'Салют', 'Margarita', 'Maravilla', 'Engrosadira') и 5 отборных форм (№№9-113-1, 1-60-1, 1-135-31, 10-165-11, 11-165-10) малины. Микроскопические и биохимические исследования эпидермиса листьев проводили в лаборатории аналитической биохимии и физиологии сельскохозяйственных растений ФГБНУ ФНЦ Садоводства по следующим методикам: световая микроскопия в соответствии с правилами работы на микроскопе; визуализация микрорельефа объектов и определение зольных элементов в соответствии с правилами работы на аналитическом растровом электронном микроскопе (РЭМ) и «Методическими рекомендациями по выполнению анализа методом энергодисперсионной спектроскопии на аналитическом РЭМ» [7]; метаболомный анализ с использованием «Методики подготовки проб и проведения ГХМС-анализа» [8]; идентификацию веществ ГХМС-анализа осуществляли по параметрам удерживания и масс-спектрам библиотеки NIST-5 National Institute of Standards and Technology (США); определение фотосинтетических пигментов в соответствии с «Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes» [9]. В отделе агрохимии и почвоведения ФГБНУ ФНЦ Садоводства определяли содержание антоцианов в листьях малины в соответствии со «Спектрофотометрическим определением содержания антоцианов в винограде» [10]; углеводы – методом капиллярного электрофореза на системе

«Капель-105М» [11]; содержание в листьях основных элементов минерального питания – по К. Е. Гинзбург и Г. М. Щегловой [12]; учет численности ЭБ в листьях – методом Коха путем выделения культивируемых форм эндофитных бактерий из поверхностно стерилизованных образцов листьев и посева на плотных питательных средах TSA (богатая среда) и R2A-агар (обедненная среда), подсчетом таксономических единиц с помощью счетчика колоний Scan 500. Тесты на антифунгальную активность по отношению к возбудителю *Botrytis cinerea* проводили методом «колодцев» на картофельно-декстрозном агаре. Фунгицидную активность оценивали по диаметру зон ингибирования. Корреляционный анализ выполняли в соответствии с «Методикой полевого опыта» [13].

Результаты исследований

Морфологические исследования листьев предварительно устойчивых ('Атлант', 'Карамелька', 'Жар-Птица') и восприимчивых ('Пингвин', 'Оранжевое Чудо', 'Подарок Кашину') к *Botrytis cinerea* Pers. сортов позволили установить различия абаксиальной и адаксиальной сторон листа. Исследования, выполненные методом световой микроскопии, показали, что на абаксиальной стороне листа устойчивых сортов имеются множественные трихомы (волоски), которые размещены не только по жилкам, но и в межжилковом пространстве, и часто расположенные мелкие железки желтого цвета (рис. 1 а, б). На абаксиальной стороне листа восприимчивых сортов редкие трихомы располагаются по центральной жилке листа, железок не наблюдается (рис. 1 с).



Рис. 1. Абаксиальные стороны листьев: а, б – устойчивого сорта 'Атлант', с – восприимчивого сорта 'Подарок Кашину', световая микроскопия, 2022 г.

Fig. 1. Abaxial leaf surfaces: a, b – the resistant cultivar 'Atlant', c – the susceptible cultivar 'Podarok Kashinu', optical microscopy, 2022

Методом электронной микроскопии получена дополнительная информация о морфологических особенностях листьев. Установлено, что на поверхности листьев устойчивых сортов четко просматриваются часто расположенные короткие трихомы, в основном вдоль жилок и микрожилки листа, и реже – длинные (рис. 2). На абаксиальной стороне листьев восприимчивых сортов трихом в несколько раз меньше, располагаются они значительно реже, но преимущественно

это длинные волоски. При детальном рассмотрении обнаружено, что у устойчивого сорта 'Атлант' короткие волоски представлены двумя размерами – средней длиной 96,32 мкм и 38,42 мкм. На листьях восприимчивого сорта 'Оранжевое Чудо' средняя длина коротких трихом составила 92,49 мкм. Размеры длинных волосков у этих сортов примерно равны и составляют 180-200 мкм.

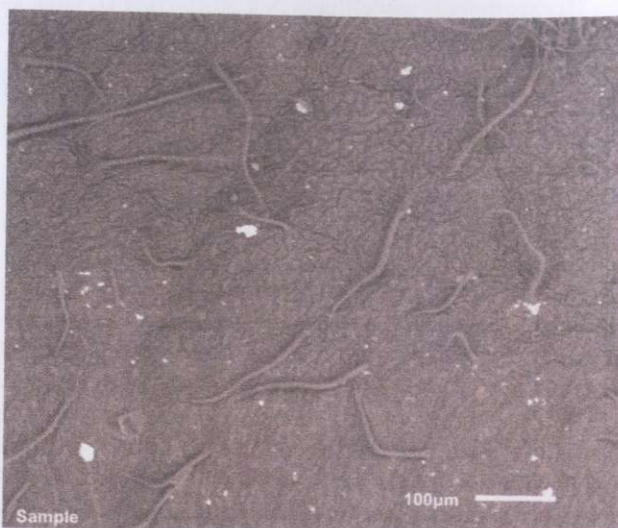
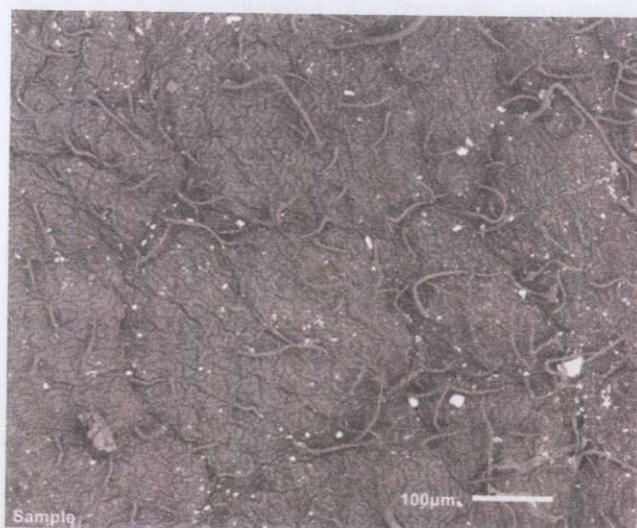


Рис. 2. Абаксальные стороны листьев устойчивого сорта 'Атлант' (слева) и восприимчивого сорта 'Оранжевое Чудо' (справа), электронная микроскопия, 2022 г.

Fig. 2. Abaxial leaf surfaces of the resistant cultivar 'Atlant' (left) and the susceptible cultivar 'Oranzhevoe Chudo' (right), electron microscopy, 2022

Адаксиальная сторона листьев у всех сортов покрыта множественными извитыми трихомами, и различия между устойчивыми и восприимчивыми сортами методом световой микроскопии установить сложно. Методом электронной микроскопии убедительно показано, что адаксиальная сторона устойчивых сортов (рис. 3 а)

настолько густо покрыта переплетающимися волосками разной длины, которые возвышаются над поверхностью листа, что кутикула не просматривается. У восприимчивых сортов волоски реже, можно видеть кутикулу (рис. 3 б).



а



б

Рис. 3. Адаксиальные стороны листьев: а – устойчивый сорт 'Атлант', б – восприимчивый сорт 'Оранжевое Чудо', электронная микроскопия, 2022 г.

Fig. 3. Adaxial leaf surfaces: a – the resistant cultivar 'Atlant', b – the susceptible cultivar 'Oranzhevoe Chudo', electron microscopy, 2022

Основываясь на данных о том, что микроэлементы выполняют роль сигнальных молекул в устойчивости растений к микроорганизмам [14] и их

поступление в растения генетически обусловлено, было предположено, что содержание макро- и микроэлементов в листьях может быть одним из

маркерных признаков устойчивости сортов малины к *Botrytis cinerea*. Энергодисперсионный анализ показал, что накопление в листьях как отдельных зольных элементов, так и их суммы зависит от сорта (табл. 1).

Таблица 1. Содержание макро- и микроэлементов в листьях малины, масс %, 2022 г.

Table 1. Macro- and micronutrient content in raspberry leaves, wt %, 2022

Элемент	Устойчивые сорта					Восприимчивые сорта				
	‘Margarita’	‘Maravilla’	‘Атлант’	‘Карамелька’	‘Жар-Птица’	‘Мелвежонок’	‘Пингвин’	‘Оранжевое Чудо’	‘Поклон Казакову’	‘Салют’
Na	0,013	0,025	0,345	0,265	0	0,145	0	0,038	0,225	0,138
Mg	5,04	6,985	6,183	4,435	3,98	3,395	6,185	5,59	7,238	4,845
Si	0,885	0,32	1,0125	0,6775	0,41	1,583	0,95	0,965	1,095	0,493
P	4,008	2,923	3,105	3,583	4,63	5,845	3,728	3,7	4,633	4,408
S	0,255	0,353	0,18	0,303	0,647	0,455	0,3975	0,248	0,443	0,343
Cl	1,123	0,133	0,195	0,245	0,78	0,493	2,795	0,163	0,295	0,473
K	5,085	5,518	11,4	7,58	11,863	10,66	13,32	8,023	8,788	11,11
Ca	10,483	8,55	5,665	10,23	3,8	4,207	6,383	8,49	7,215	4,218
Mn	0,14	0,313	0,203	0,233	0	0,13	0,105	0,865	0,073	0
Fe	0,295	0,148	0,135	0,35	0,367	0	0,043	0	0,63	0,43
Co	0	0,453	0,555	0,215	0,173	0,195	0,11	0,53	0,263	0,035
Ni	0,4	0,193	0,29	0	0,427	0,343	0,41	0,545	0,565	0,7
Cu	0	0	0,995	1,17	0,143	0	0,06	0,025	0,148	0,145
Zn	0,4425	0,185	0	0	0	1,06	0	0,65	0,353	0,133
Se	0,095	0,2	0,08	0,055	0,093	0,098	0,1	0,12	0,113	0,298
Mo	1,088	0,57	2,1425	1,65	0,95	1,38	1,385	1,93	1,29	1,573

Наибольшим содержанием минеральных веществ характеризовались сорта ‘Атлант’ (32,485 масс %), ‘Подарок Кашину’ (33,363 масс %) и ‘Пингвин’ (35,97 масс %). При этом сорт ‘Атлант’ отличался повышенной устойчивостью к *Botrytis cinerea*, сорт ‘Подарок Кашину’ – повышенной восприимчивостью, сорт ‘Пингвин’ – высокой восприимчивостью. Последовательность содержания элементов в листьях устойчивых и восприимчивых сортов в порядке убывания различалась и в среднем выглядела следующим образом: устойчивые сорта – K>Ca>Mg>P>Mo>Si>Cl>Cu>S>Co>Ni>Fe>Mn>Na>Zn>Se; восприимчивые сорта – K>Ca>Mg>P>Mo>Si>Cl>Ni>Zn>S>Mn>Co>Fe>Se>Na>Cu. Однако внутри этих групп указанные последовательности строго не соблюдались.

Проведенный корреляционный анализ содержания в листьях минеральных веществ и степени поражения сортов малины *Botrytis cinerea* выявил среднюю отрицательную связь ($r = 0,47$) с накоплением Ca, т.е. при увеличении содержания Ca в органах растений снижается степень поражения грибом. Это согласуется с ранее проведенными исследованиями на землянике, где установлено ингибирующее действие Ca на развитие *Botrytis cinerea* [15]. Обнаружена средняя положительная связь ($r = 0,62$) с накоплением K, что, однако, противоречит литературным данным [16]. Для уточнения этой связи необходимо повторить анализ или определить содержание K другими методами. Показатель отношения содержания Ca/(K + Mg), по данным

энергодисперсионного анализа, для устойчивых сортов был равен 0,57, для восприимчивых – 0,38, т.е. был ниже на 33,3 %. По остальным элементам связь была слабой ($r < 0,3$). Уровень достоверности полученных связей составил 1,0-16,8 %.

Аналогичная тенденция установлена при анализе листьев, определенных по методу по К. Е. Гинзбург и Г. М. Щегловой [12], отобранных осенью 2024 г. по окончании вегетации растений (табл. 2).

Таблица 2. Содержание в листьях основных элементов питания, 2024 г., %
Table 2. Content of essential nutrients in leaves, 2024, %

Сорт	Ca	Mg	K	N
устойчивые				
‘Атлант’	1,1	0,24	1,36	2,20
‘Жар-Птица’	1,5	0,55	0,75	1,07
‘Enrosadira’	1,6	0,30	0,90	1,81
№ 11-165-10	1,6	0,49	0,93	2,00
Среднее	1,45	0,40	0,99	1,77
восприимчивые				
‘Оранжевое Чудо’	1,9	0,73	1,23	1,91
‘Пингвин’	1,0	0,30	1,36	1,81
‘Салют’	1,3	0,55	0,58	1,69
‘Подарок Кашину’	1,6	0,43	1,00	1,69
Среднее	1,3	0,50	1,04	1,78

При этом показатель отношения содержания Ca/(K + Mg) для устойчивых сортов был равен 1,04, для восприимчивых – 0,84, что на 19,2 % ниже. Не выявлено и существенной разницы в накоплении N в листьях этими группами сортов, что не позволяет использовать содержание минеральных веществ в качестве надежных маркеров устойчивости к серой гнили плодов.

ГХМС-анализ эпикуткулярного слоя листьев малины показал, что компонентный состав экстрактов

(количество химических соединений на хроматограммах) у сортов существенно различался. Так, на основании базы данных установлено, что у сорта ‘Жар-Птица’ идентифицировано 21 химическое соединение, а у сорта ‘Атлант’ – 39. Содержание основных 14 идентифицированных веществ, относящихся к органическим кислотам и углеводам, также имело сортовую специфичность (табл. 3).

Таблица 3. Содержание метаболитов в экстрактах эпикуткулярного слоя листьев, % (июль 2023 г.)
Table 3. Metabolite content in leaf epicuticular layer extracts, % (July 2023)

№	Rt, (мин)	Соединения	‘Поклон Казакову’	‘Жар-Птица’	‘Атлант’	‘Подарок Кашину’	‘Пингвин’	‘Оранжевое Чудо’
			% шкалы пиков					
1	11:02	Пеларгоновая кислота	2,10	0,68	5,29	0,99	0,30	0,83
2	12:15	Декановая кислота	1,25	-	2,84	-	0,12	-
3	12:55	Салициловая кислота	1,15	-	1,71	-	0,25	0,62
4	13:13	1-Бутанамин	3,35	2,48	5,21	2,06	0,69	1,45
5	16:11	Арабинофураноза	1,45	0,84	1,92	0,99	0,38	-
6	17:40	Этилгаллат	1,31	-	1,47	-	-	-
7	18:32	Пальмитиновая кислота	7,97	4,16	13,87	2,94	1,37	7,33
8	18:56	Кофейная кислота	0,80	-	1,79	-	0,39	1,00
9	20:18	Стеариновая кислота	1,52	1,66	3,34	0,6	0,31	2,04
10	22:47	Докозанол	3,54	1,21	5,36	0,89	0,31	2,51
11	24:34	Лигноцериновая кислота	2,88	-	10,31	-	-	-
12	27:13	1-Гексакозанол	33,39	15,51	34,36	11,78	27,24	15,55
13	31:31	1-Октакозанол	7,75	5,31	11,18	4,74	6,25	6,94
14	35:59	1-Триакозанол	5,87	3,32	11,00	5,49	4,47	8,47

Все 14 веществ были идентифицированы лишь в листьях сорта 'Атлант' с повышенной устойчивостью к *Botrytis cinerea* и сорта 'Поклон Казакову' со средней устойчивостью. Соответственно, у этих генотипов и суммарное содержание метаболитов было тоже наибольшим. При этом сорт 'Атлант' был абсолютным лидером по максимальному накоплению биохимических веществ. В эпикуткулярном слое листьев этого сорта содержалось в 1,6 раза больше стеариновой кислоты и в 1,8 раза больше кофейной кислоты, чем в восприимчивом сорте 'Оранжевое Чудо'. Содержание салициловой, пальмитиновой и декановой кислот было в 6,8, 10,1 и 23,6 раза выше, чем у восприимчивого сорта 'Пингвин'.

Накопление пеларгоновой, декановой, салициловой, пальмитиновой кислот, арабинофуранозы, 1-бутанамина, 1-гексакозанола, 1-октакозанола в эпикуткулярном слое листьев среднеустойчивого сорта 'Поклон Казакову' также превышало их содержание в восприимчивых сортах 'Пингвин', 'Оранжевое Чудо' и средневосприимчивом сорте 'Подарок Кашину'. При этом необходимо отметить, что перечисленные соединения обладают антимикробными свойствами [17, 18]. Этилгаллат и лигноцериновая кислота обнаружены лишь в восковом слое листьев сортов 'Поклон Казакову' и 'Атлант'.

Корреляционный анализ содержания метаболитов и степени поражения листьев *Botrytis cinerea* подтвердил высокую отрицательную связь с накоплением пальмитиновой кислоты ($r=-0,67$), докозанола ($r=-0,70$), лигноцериновой кислоты ($r=-0,75$), декановой кислоты ($r=-0,77$), этилгаллата ($r=-0,78$), пеларгоновой кислоты ($r=-0,78$). Но наиболее сильная обратная связь ($r=-0,94$) установлена между содержанием арабинофуранозы и восприимчивостью к серой гнили, а также содержанием 1-бутанамина (рис. 4). Следовательно, эпикуткулярный воск листьев малины, содержащий повышенное количество перечисленных соединений, является барьером защиты от поражения *Botrytis cinerea* Pers.

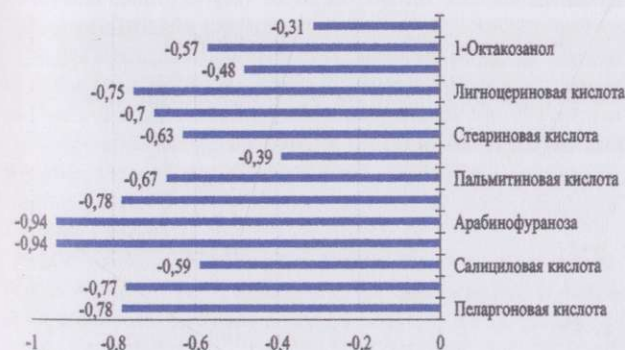


Рис. 4. Корреляционная зависимость (r) степени восприимчивости генотипов малины к *Botrytis cinerea* Pers. от содержания метаболитов в листьях

Fig. 4. Correlation (r) of the degree of susceptibility of raspberry genotypes to *Botrytis cinerea* Pers. with metabolite content in leaves

Анализ генотипов малины по содержанию арабинофуранозы позволил разделить сорта на две группы (рис. 5). В первую группу вошли восприимчивые сорта 'Оранжевое Чудо' и 'Пингвин', во вторую – генотипы со средней поражаемостью ('Подарок Кашину', 'Жар-Птица'). Средневосприимчивый сорт 'Поклон Казакову' находился на некотором удалении от группы, но он содержал несколько большее количество арабинофуранозы. Сорт 'Атлант', отличающийся повышенной устойчивостью к патогену и содержащий наибольшее количество вещества, не вошел ни в одну из групп. Необходимо отметить, что все сорта расположились вдоль линии прогноза. Незначительно отдалались лишь сорта 'Пингвин' и 'Жар-Птица', при этом отбор устойчивых генотипов по содержанию арабинофуранозы можно проводить с долей вероятности 89 %. Похожее распределение устойчивости сортов было и по содержанию 1-бутанамина.



Рис. 5. Зависимость степени поражения листьев *Botrytis cinerea* Pers. от содержания арабинофуранозы
Fig. 5. Dependence of the extent of damage to leaves by *Botrytis cinerea* Pers. on arabinofuranose content

Определение содержания в листьях малины фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a* и *b*, каротиноиды), суммы фенольных соединений, антоцианов, сахарозы, глюкозы, фруктозы не выявило достоверных связей со степенью поражения гриба. Лишь крайние группы сортов по устойчивости (с повышенной устойчивостью к *Botrytis cinerea* и с высокой восприимчивостью) имели небольшие различия в накоплении в листьях хлорофилла *a* и каротиноидов (табл. 4). Среди генотипов со средней устойчивостью и с повышенной восприимчивостью были представители как с низким, средним, так и высоким уровнем содержания этих веществ. Коэффициент корреляции содержания хлорофилла *a* составил -0,45, каротиноидов -0,51, что недостаточно для использования их в качестве биохимических маркеров устойчивости к *Botrytis cinerea*.

Таблица 4. Содержание фотосинтетических пигментов и суммы фенольных соединений в листьях сортов малины, август 2023 г.
Table 4. Content of photosynthetic pigments and total phenolic compounds in leaves of raspberry cultivars, August 2023

Сорт, форма	Экстракт 95 % спирт, мг/г навески			Сумма фенольных соединений мг-экв. галловой кислоты/г навески
	хлорофилл		каротиноиды	
	<i>a</i>	<i>b</i>		
с повышенной устойчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.				
№ 9-113-1	1,5464	0,6157	0,3144	9,132
‘Карамелька’	2,6017	1,0521	0,4925	12,180
‘Атлант’	1,4690	1,0997	0,0971	14,412
№ 11-165-10	2,2352	0,8146	0,4912	25,476
со средней устойчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.				
‘Жар-Птица’	1,3156	0,9657	0,0889	10,524
№ 1-60-1	1,3543	0,5810	0,2729	17,364
‘Поклон Казакову’	1,2794	0,9469	0,0774	18,156
№ 1-135-31	1,1332	0,4299	0,2653	19,272
с повышенной восприимчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.				
№ 10-165-11	1,8250	0,7406	0,4048	11,670
‘Подарок Кашину’	1,3072	0,9650	0,1043	12,072
‘Салют’	0,7002	0,3784	0,1606	18,900
с высокой восприимчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.				
‘Пингвин’	1,3647	1,0058	0,0651	11,712
‘Оранжевое Чудо’	1,1080	0,8181	0,0762	13,240

Известно, что эндофитная микробиота является важным фактором адаптационной способности растений [19]. У форм с высоким уровнем адаптации отмечено увеличение частоты тестирования бактерий, подавляющих рост грибных патогенов в чистом виде и в составе смешанной инфекции [20]. Численность культивируемых форм эндофитных бактерий, выделенных из листьев малины осенью 2024 г., существенно различалась по сортам. При этом наименьшее количество ЭБ в листьях на питательной среде TSA было у устойчивого сорта ‘Атлант’ (1913 КОЕ/г), а на среде R2A-агар – у устойчивой формы № 11-165-10 (5344 КОЕ/г) (табл. 5). Наибольшей численностью культивируемых форм эндофитных бактерий отличался среднеустойчивый сорт ‘Жар-Птица’ (на питательной среде TSA – 46539; на среде R2A-агар – 106730 КОЕ/г). В целом по сортам не выявлено явной зависимости между численностью ЭБ в листьях и степенью пораженности *Botrytis cinerea*.

Таблица 5. Численность культивируемых форм эндофитных бактерий в листьях малины
Table 5. Number of culturable forms of endophytic bacteria in raspberry leaves

Сорт, форма	Численность ЭБ в листьях, КОЕ/г	
	TSA	R2A-агар
с повышенной устойчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.		
‘Атлант’	1913	32826
‘Enrosadira’	5550	61967
№ 11-165-10	2291	5344
со средней устойчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.		
‘Жар-Птица’	46539	106730
с повышенной восприимчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.		
‘Подарок Кашину’	7100	73480
‘Салют’	3340	13760
с высокой восприимчивостью к <i>Botrytis cinerea</i> Pers.		
‘Пингвин’	2870	38019
‘Оранжевое Чудо’	8774	25419

По культурально-морфологическим признакам было выделено 7 культивируемых на питательных средах форм эндофитных бактерий, с которыми были проведены тесты на антифунгальную активность по отношению к возбудителю *Botrytis cinerea*. Из них только у двух установлена антифунгальная активность: штамм № 1070-1t – выделен из листьев растений среднеустойчивого сорта ‘Жар-Птица’ и № 1072-1t – из листьев растений отборной формы с повышенной устойчивостью № 11-165-10. Присутствие штаммов культивируемых форм ЭБ с антифунгальной активностью по отношению к *Botrytis cinerea* в листьях устойчивых и их отсутствие у восприимчивых сортообразцов может свидетельствовать об их устойчивости к данному фитопатогену, что требует дальнейших исследований.

Заключение

1. Проведенные микроскопические исследования выявили морфологические особенности абаксиальной и адаксиальной сторон листьев малины устойчивых и

восприимчивых к *Botrytis cinerea* Pers. сортов, которые можно использовать для предварительной оценки гибридных семян на ранних этапах развития.

2. Установлено, что эпикутикулярный воск листьев малины является барьером защиты от поражения *Botrytis cinerea* Pers. Устойчивые сорта в составе эпикутикулярного слоя листьев содержат повышенное количество (в 1,5-10 раз) соединений, обладающих антимикробным (фунгицидным) действием: лигноцериновая, декановая, пеларгоновая кислоты; этилгаллат, арабинофураноза, 1-бутанамин. Предварительно их можно считать биохимическими маркерами устойчивости к *B. cinerea* и использовать для ранней диагностики семян.

3. Важное значение в определении устойчивости сортов к *Botrytis cinerea* Pers. выполняют штаммы культивируемых форм ЭБ с антифунгальной активностью.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованной литературы/References

1. Полунина Т. С., Выборнова М. В., Лавринова В. А. Фитопатогены на ягодах малины, Научные труды СКФНЦБВ. 2020;29:210-213. DOI: 10.30679/2587-9847-2020-29-210-213.

Polunina T. S., Vybornova M. V., Lavrinova V. A. Phytopathogens on raspberries, Nauchnye trudy SKFNCB. 2020;29: 210-213. DOI: 10.30679/2587-9847-2020-29-210-213. (in Russ.).

2. Кашиц Ю. П. Подбор оптимальных сред для культивирования возбудителя серой гнили земляники садовой *Botrytis cinerea* Pers., Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. 2020;57-59. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-25.

Kashchits Yu. P. Selection of optimal nutrient media for cultivation *Botrytis cinerea* Pers. – the causal agent of grey mould on garden strawberry, Sovremennoe sostoyanie, problemy i perspektivy razvitiya agrarnoy nauki. 2020;57-59. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-25. (in Russ.).

3. Комардина В. С., Ярчакоская С. И., Михневич Р. Л. Биологический контроль серой гнили на малине, Защита растений. 2022;1(46):249-254.

Komardina V. S., Yarchakovskaya S. I., Mihnevich R. L. Biological control of gray rot on raspberries, Zashchita rastenij. 2022;1(46):249-254. (in Russ.).

4. Roca-Couso R., Flores-Félix J. D., & Rivas R. Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*, Journal of Fungi. 2021;7(12):1045. DOI: 10.3390/jof7121045.

5. Шевцов М. В., Шапиро Я. С. Сортовая устойчивость ремонтантной малины к серой гнили в условиях Ленинградской области, Вестник Студенческого научного общества. 2019;10(1):62-64.

Shevcov M. V., Shapiro Ya. S. Varietal resistance of repair raspberries to gray rot in the conditions of the Leningrad region, Bulletin of the Student Scientific Society. 2019;10(1):62-64. (in Russ.).

6. Евдокименко С. Н. Поиск и создание родительских форм малины ремонтантного типа для совершенствования её сортамента, Садоводство и виноградарство. 2020;1:10-16. DOI: 10.31676/0235-2591-2020-1-10-16.

Evdokimenko S. N. Search and creation of parental forms of primocane raspberry to improve its assortment, Sadovodstvo i vinogradarstvo. 2020;1:10-16. DOI: 10.31676/0235-2591-2020-1-10-16. (in Russ.).

7. Мотылева С. М. Методические рекомендации по выполнению анализа зольных элементов и минеральных включений в органах растений методом энергодисперсионной спектроскопии на аналитическом РЭМ-М.: ФГБНУ ВСТИСП; Саратов: Амирит, 2018, 40 с.

Motyleva S. M. Methodological recommendations for the analysis of ash elements and mineral inclusions in plant organs by energy dispersion spectrometry on analytical SEM-M.: FGBNU VSTISP; Saratov: Amirit, 2018, 40 c. (in Russ.).

8. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015, 204 с.

Lebedev A. T. Mass spectrometry in organic chemistry. Moskva: TEKHNO SFERA, 2015, 204 c. (in Russ.).

9. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, Methods Enzymol. 1987;148:350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.

10. Ханько П. Н., Брайкова А. М. Спектрофотометрическое определение содержания антоцианов в винограде. Современный механизм функционирования торгового бизнеса и туристической индустрии: реальность и перспективы: сб. трудов междунар. науч. конф., г. Минск, 6-7 декабря 2018 г. Минск: БГЭУ, 2019, 396-398.

Han'ko P. N., Brajkova A. M. Spectrophotometric determination of anthocyanin content in grapes. The modern mechanism of functioning of the trade business and the tourism industry: reality and prospects: sb. trudov mezhdunar. nauch. konf., g. Minsk, 6-7 dekabrya 2018 g. Minsk: BGEU, 2019, 396-398. (in Russ.).

11. Ненько Н. И. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда: Учебно-методическое пособие. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015, 115 с.

Nen'ko N. I. Modern instrumental and analytical methods for the study of fruit crops and grapes: Uchebno-metodicheskoe posobie. Krasnodar: SKZNIISiV, 2015, 115 p. (in Russ.).

12. Гинзбург Е. К., Щеглова Е. К. Определение азота, фосфора и калия в растительном материале из одной навески, Почвоведение. 1960;5:100-105.

Ginzburg E. K., Shcheglova E. K. Determination of nitrogen, phosphorus and potassium in plant material from a single sample, Soil Science. 1960;5:100-105. (in Russ.).

13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб.: М.: Агропромиздат, 1985, 351 с.

Dospikhov B. A. The methodology of field experience (with the basics of statistical processing of research results). 5-e izd., dop. i pererab.: M.: Agropromizdat, 1985, 351 p. (in Russ.).

14. Morkunas I., Gmerek J. The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*, *J. Plant Physiol.* 2007;164(2):185-194. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.11.005.

15. Sun C., Zhu C., Tang Y., Ren D., Cai Y., Zhou G., ... & Zhu P. Inhibition of *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes by calcium propionate, *Food Quality and Safety*, 2021;5:fyab016. DOI: 10.1093/fqsafe/fyab016.

16. Türkan M., Özcan M., Erper İ. Antifungal effect of carbonate and bicarbonate salts against *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mould of kiwifruit, *Akademik Ziraat Dergisi*. 2017;6(2):107-114. DOI: 10.29278/azd.371066.

17. Крячко А. Н. Качественный и количественный анализ на содержание бензойной, салициловой, сорбиновой и глицирризиновой кислот в водном экстракте люцерны посевной, Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2023;85(2):116-122. DOI:10.20914/2310-1202-2023-2-116-122.

Kryachko A. N. Qualitative and quantitative analysis for the content of benzoic, salicylic, sorbic and glycyrrhizic acids in an aqueous extract of alfalfa. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2023;85(2):116-122. DOI: 10.20914/2310-1202-2023-2-116-122. (in Russ.)

18. Копытько Я. Ф. Летучие вещества спиртового извлечения из ахатины гигантской (*Achatina fulica*), *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2021;12:76-81.

Kopytko Ya. F. Volatile substances of alcoholic extracts from giant *Achatina (Achatina fulica)*, *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy*. 2021;12:76-81. (in Russ.).

19. Щербакова Л. А., Джавахия В. Г., Duan Y., Zhang J. Микробные белки – элиситоры устойчивости растений к фитопатогенам и их потенциал для экологически ориентированной защиты сельскохозяйственных культур (обзор), *Сельскохозяйственная биология*. 2023;58(5):789-820. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.5.789rus. (in Russ.).

Shcherbakova L. A., Dzhavakhiya V. G., Duan Y., Zhang J. Microbial proteins as elicitors of plant resistance to pathogens and their potential for eco-friendly crop protection in sustainable agriculture (review). *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2023;58(5):789-820. (in Russ.).

20. Козаева М. И., Зайцева К. В., Лукьянчук И. В. Определение адаптационного потенциала сортов ягодных растений на основе оценки эндофитной и эпифитной микробиоты, *Плодоводство и ягодоводство России*. 2020;62:179-186. DOI: 10.31676/2073-4948-2020-62-179-186.

Kozayeva M. I., Zaitseva K. V., Luk'yanchuk I. V. Determination most of adapted varieties of cultivated plants of the base of the assessment of biology and dynamics of development of epiphyte and endophyte microbiota, *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*. 2020;62:179-186. DOI: 10.31676/2073-4948-2020-62-179-186. (in Russ.).

Авторы:

Евдокименко С. Н. – доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, зав. отделом генетики и селекции садовых культур, Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Подгаецкий М. А. – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Бобкова В. В. – научный сотрудник, отдел агрохимии и почвоведения, Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Павлов К. В. – кандидат химических наук, научный сотрудник, Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Мертвищева М. Е. – лаборант-исследователь, Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Authors:

Evdokimenko S. N., Dr. Sci. (Agric.), Chief Researcher, Head of the Department genetics and selection of horticultural crops, Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

Podgaetskiy M. A., PhD (Agric.), Senior Researcher, Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

Bobkova V. V., Research, Department of Agrochemistry and Soil Science, Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

Pavlov K. V., PhD (Chem.), Research, Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

Mertvishcheva M. E., Laboratory Research Assistant, Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

Поступила: 18.11.2024

Принята к печати: 17.12.2024

Received: 18.11.2024

Accepted: 17.12.2024