

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PRUNUS* L. ДЛЯ ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К КЛЯСТЕРОСПОРИОЗУ

С.М. Мотылева, В.С. Симонов, Д.В. Панищева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Москва, Россия, vstisp@vstisp.org

Аннотация. Методами спектрофотометрии и газовой хромато-масс-спектрометрии был исследован метаболит листьев представителей рода *Prunus* L. разной степени устойчивости к клястероспориозу. В листьях сортов с баллом поражения 2 и 3 водорастворимых веществ синтезируется на 10% больше, чем в листьях устойчивых сортов. Спектральные кривые неустойчивых генотипов в видимой области имеют характерные максимумы в области 480, 530 и 615 нм. В восковом слое устойчивых к клястероспориозу генотипов обнаружено в 2 раза больше веществ, обладающих антимикробным действием, по сравнению с сортами, имеющими балл поражения «2 и 3».

Ключевые слова: род *Prunus* L., лист, устойчивость, клястероспориоз, метаболомный подход

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-531-534

Негативные внешние факторы подвергают садоводство дополнительному риску - уменьшается урожайность и качество продукции. Селекционная ценность исходного материала определяется характеристиками, обеспечивающими устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды, заключается в комплексном подходе к разработке приемов диагностики признаков адаптации плодовых растений к стрессорам внешней среды, и выявлении механизмов адаптации по морфологическим и физиологическим - биохимическим показателям листа [Гудковский и др., 2005; Еремин, 2008; Жученко, 2001]. Одним из абиотических стрессов окружающей среды, которые испытывают плодовые растения род *Prunus* L. в Центральном регионе России являются вспышки клястероспориоза [Морозова, Симонов, 2017]. Выявление адаптивных к клястероспориозу сортов сливы является важной и актуальной проблемой генетико-селекционных исследований. Использование химико - аналитических подходов остается мало используемым и плохо изученным направлением селекции. Новым направлением молекулярно-генетических исследований является метаболомика, основанная на качественном и количественном анализе метаболитов для выявления изменений в разных этапах развития организма или изменений при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды.

Цель работы – анализ низкомолекулярных метаболитов листьев представителей рода *Prunus* L. разной степени устойчивости к клястероспориозу и выявление маркеров устойчивости к заболеванию.

Исследования проведены в 2017 году, насаждения *Prunus* L. размещены на участке сортоизучения ФГБНУ ВСТИСП. Объектами исследований были листья 12 сортообразцов сливы, различающиеся по степени устойчивости к клястероспориозу: 5 сортов сливы *Prunus domestica* L. (Яичная синяя, Опал, Память Тимирязева – балл поражения 3: Синий дар, Скоропелка красная – балл поражения 2), сорт Скороплодная (балл поражения 0) - *Prunus salicina* L., 3 сорта *Prunus rossica* Erem. (Мара, Кубанская комета – балл поражения 0,5; Шатер – балл поражения 0) и 3 сложных гибрида (6/24, ГПТ – балл поражения 0,5; Величавая – балл поражения 2). Образцы листьев в количестве 50г (не менее чем с 10 деревьев) отбирались со средней части побега в соответствии с

методикой [Ермаков, 1987]. Аналитические исследования проводили в лаборатории физиологии и биохимии Центра генофонда и биоресурсов растений ФГБНУ ВСТИСП. Листья гомогенизировали и выделяли метаболиты дистиллированной водой и метанолом. Определяли суммарную антиоксидантную активность (АА) [Brand-Williams et al., 1995], исследовали профили спектров в диапазоне длин волн 400 - 750 нм на спектрофотометре Helios Y («Thermo Electron Corporation», США). Целые листья экстрагировали хлороформом и исследовали качественный состав метаболитов в экстракте методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на масс – спектрометре JEOL JMS-Q1050GC Ultra Quad GC/MS («JEOL Ltd», Япония). Использовали капиллярную колонку DB-5HT («Agilent», США; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,52 мкм; газ-носитель — гелий). Температурный градиент — от 40 до 300°C, температура инжектора и интерфейса 280° С, ионного источника — 200 °С. Скорость потока газа в колонке 2,0 мл/мин, время анализа 45 мин, режим ввода с делением потока, объем вводимой пробы 1 мкл. Для определения веществ проводили дериватизацию с использованием силилирующего агента N, O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА) [Robbins, 2003]. Идентификацию веществ осуществляли по параметрам удерживания и масс-спектрам библиотеки NIST-5 National Institute of Standards and Technology (США). Диапазон сканирования 33-900 m/z.

Наблюдения за изменением суммарной антиоксидантной активности листьев сливы в процессе вегетации позволили выявить, что антиоксидантная активность водного экстракта листьев имеет максимальные значения в июне у всех сортов и колеблется от 76 – 84% (Скороплодная, Кубанская комета, Мара) до 90 – 93% (ГПТ и сорт Яичная синяя). За период вегетации у сортов Скороплодная, Мара и Кубанская комета отмечена тенденция снижения антиоксидантной активности в среднем на 12%, у сортов Яичная синяя и ГПТ существенных изменений АА в динамике не выявлено. АА спиртового экстракта листьев имеет максимальные значения в июле (в период налива плодов) и колеблется незначительно от 92, 88% (сорт Мара) до 93,89% (сорт Кубанская комета) и в пределах 90 - 93% (ГПТ и сорт Яичная синяя). В июне и августе антиоксидантная активность спиртовых экстрактов ниже, чем в июле в среднем на 1%. Установлено, что в листьях сортов с высоким баллом поражения (2 и 3) водорастворимых веществ синтезируется на 10% больше, чем в листьях устойчивых сортов. В спиртовых экстрактах такой зависимости не выявлено (рисунок).

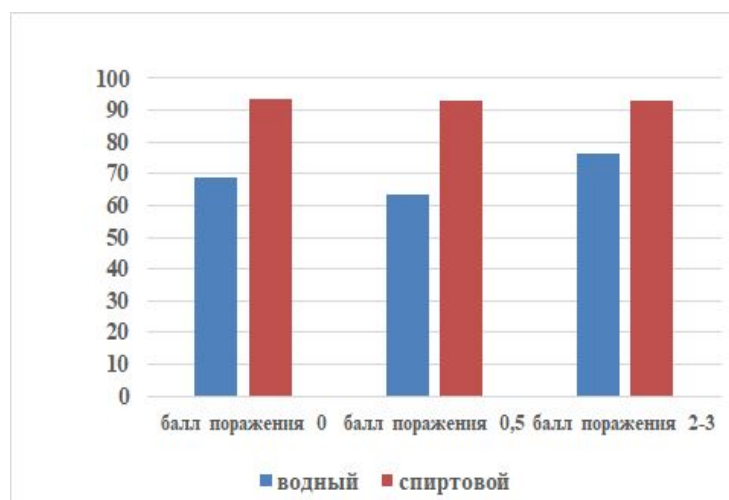


Рисунок. Антиоксидантная активность листьев сливы разной степени устойчивости к лясстероспориозу. %.

Сравнение спектральных кривых спиртовых экстрактов листьев сливы, полученных в видимой области спектра, позволило установить четко выраженные пики, характерные для хлорофиллов а (680нм) и b (656 нм). Содержание хлорофилла b у поражаемых сортов выше, чем у устойчивых. В экстрактах менее- и неустойчивых сортов отмечается наибольшее содержание фенольных соединений (в области 480нм); максимумы поглощения наблюдаются также в области 530 и 615нм.

Компонентный состав индивидуальных веществ, содержащихся в хлороформной вытяжке листьев исследован методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС). В состав эпидутикулярного воска входит 47 индивидуальных соединений, относящихся к классам: жирные кислоты, алканы, спирты, углеводороды, органические кислоты. Компонентный состав воска зависит от сорта. Общими являются 10 химических соединений: этандиовая кислота, жирные кислоты – эритропентановая, стеариновая, фталевая, пальмитиновая, миристиновая, спирты - гексаказанол, тетраказанол, кониферилловый. Наибольшее количество веществ (30 наименований), формирующих эпидутикулярный слой листьев, обнаружено у сортов Скороплодная и Кубанская комета. 10 из этих веществ обладают антимикробными свойствами (тиогликолиевая кислота, катехол, пирогалол, салициловая кислота, бензтриол, ксилоновая кислота, бутандиол, кониферилловый спирт, гидроксизокапроновая кислота).

В результате проведенных исследований обоснованы новые подходы к оценке устойчивости генотипов сливы к клястероспориозу с использованием спектрофотометрического и ГХ/МС анализа.

Литература

Гудковский В.А., Каширская Н.Я., Цуканова Е.М. Стресс плодовых растений: Монография. – Воронеж: Кварт, 2005. – 128 с.

Еремин Г.В. Физиологические особенности формирования адаптивно-сти, продуктивности и качества плодов у косточковых культур в предгорной зоне Северо-Западного Кавказа / Г.В. Еремин, Л.Г. Семенова, Т.А. Гасанова; под. общ. ред. Г.В. Еремина. – Майкоп: Адыг. респ. кн. изд-во, 2008. – 210 с., ил.

Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений/ А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош, Ю.В. Перушанский, Г.А., Луковникова, М.И. Иконникова. – Л.: Агропромиздат. Ленинг. отд-ние, 1987. – 430с., ил.

Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). – М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, ООО «Изд. Агро-рус», 2001. – Т. 1. – 780 с.

Морозова Н.Г., Симонов В.С. Новые сорта косточковых культур, выведенные в ФГБНУ ВСТИСП // Садоводство и виноградарство. – 2017. – № 2. – С. 40–46.

Brand – Williams W., Cuvelier M.E., Bersed C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensmittel Wissenschaft und Technologic - Food and Science and Technology. – 1995. – V. 28. – P. 25–30.

Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – V. 51. – P. 2866-2887 (doi: 10.1021/jf026182t).

**METABOLIC PROFILING OF LEAVES OF REPRESENTATIVES
OF THE GENUS PRUNUS L. FOR SEARCHING FOR BIOMARKERS
OF STABILITY TO CLASTEROSOROSUM**

S.M. Motyleva, V.S. Simonov, D.V. Panischeva

All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow,
Russia, vstisp@vstisp.org

Abstract. Spectrophotometry and gas chromatography-mass spectrometry was investigated by metabolome of leaves of the genus *Prunus L.*, different degrees of resistance to clasterosporium. In the leaves of grades with a point of defeat of 2 and 3 water-soluble substances it is synthesized for 10% more, than in leaves of steady grades. Spectral curves of unstable genotypes in the visible region have characteristic maxima of 480, 530 and 615 nm. In the wax layer is resistant to clasterosporium genotypes detected in 2 times more substances with antimicrobial action, in comparison with varieties with a score of defeat "2 and 3".

Keywords: *genus Prunus L., leaf, resistance, klyasterosporiosis, metabolic genus Prunus L., leaf, resistance, klysterosporiosis, metabolic approach*