

УДК 632.35:635.34

ПРОЯВЛЕНИЕ СИМПТОМОВ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА У КАПУСТНЫХ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ИНОКУЛЮМА *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*

Г.Ф. МОНАХОС, ВО ТХИ НГОК ХА, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*В результате скрининга коллекции инбредных линий и коммерческих гибридов F₁ капусты белокочанной выявлены источники расоспецифической устойчивости к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Установлено, что у линии Цр2-1 устойчивость — рецессивный признак, ее проявление зависит от концентрации инокулюма. Устойчивость линии B. carinata PI 199947 к расам 1, 3 и 4, контролируемая геном Rb, проявляется независимо от инфекционной нагрузки. Для более надежного скрининга исходного селекционного материала предложено проводить инокуляцию при концентрации патогена 10⁴–10⁵ КОЕ/мл с обязательным использованием восприимчивого стандарта и учет зараженности начинать с 7-го дня после искусственного заражения.*

Ключевые слова: сосудистый бактериоз капусты, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, устойчивость.

Сосудистый бактериоз, вызываемый *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, является одним из самых распространенных и вредоносных заболеваний капусты [15]. Наиболее перспективный способ борьбы с этой болезнью — выращивание устойчивых гибридов. Однако селекция на устойчивость затруднена в связи с наличием у патогена физиологических рас. Катоун с соавторами при заражении различных сортов и гибридов *Brassica rapa* и *Brassica juncea* возбудителем сосудистого бактериоза впервые выделили пять рас патогена, различающихся по способности заражать растения-хозяева с генами расоспецифическими устойчивости [8].

Впоследствии было показано, что расу 1 можно подразделить на две или три расы на основе их реакции с новыми генотипами *B. oleracea* [13, 14]. В результате инокуляции расой 1 растений амфитриплоида с геномной формулой AABVCC была выделена раса 0 [3]. Анализ расового состава популяции возбудителя позволил установить, что в России наиболее распространены расы 1, 3 и 4 [4]. Имеется сообщение о том, что F₁ гибриды Доминанта, Престиж, Церокс, Синтекс, Браксан и Агрессор обладают высокой устойчивостью к некоторым расам [1].

Успешность селекции на устойчивость во многом определяется выбором метода инокуляции растений и оценки поражения исходного материала.

При оценке нерасспецифического типа устойчивости было установлено, что инокуляция через гидатоды обеспечивала более тесную связь с результатами поле-

вой оценки на естественном инфекционном фоне по сравнению с заражением через травмированные жилки [2]. Однако при оценке расоспецифического типа устойчивости исследователи используют метод инокуляции уколом в жилку как более простой, не требующий создания условий высокой влажности и позволяющий провести на одном растении инокуляцию различными расами возбудителя.

При планировании селекционной работы важно знать, оказывает ли инфекционная нагрузка влияние на экспрессию генов устойчивости. Существует мнение, что при расоспецифической устойчивости концентрация инокулюма не влияет на ее проявление [5]. При оценке устойчивости у капустных культур исследователи использовали различные концентрации инокулюма. Так, для выявления устойчивых образцов у *B. napus* и *B. oleracea* растения инокулировали суспензией с концентрацией 5×10^8 колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЕ/мл) *X. campestris* pv. *campestris* [9], а у *Brassica rapa* и *B. napus* — 10^6 КОЕ/мл [4]. Guo (1991) для заражения *B. napus* и *B. campestris* использовал суспензию в концентрации $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для идентификации рас патогена Vicente с соавторами проводили инокуляцию растений-дифференциаторов в концентрации 10^8 – 10^9 КОЕ/мл [13, 14].

Для создания устойчивых гибридов F_1 , необходимы скрининг коллекций исходного материала, выявление устойчивых генотипов и изучение характера наследования устойчивости. При этом знание особенностей влияния концентрации инокулюма на проявление устойчивости у генотипов с различным типом генетического контроля позволит оптимизировать иммунологическую оценку.

Материал и методы

В работе, проведенной в 2013–2014 гг., испытывали на устойчивость к сосудистому бактериозу 31 линию из коллекции Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева, а также гибриды F_1 и сорт капусты белокочанной Офелия. Для оценки устойчивости из коллекции, состоящей из более 70 штаммов *X. campestris* pv. *campestris*, были отобраны представители каждой расы. Использовали штамм расы 0-AF2, расы 1-276NZ, расы 3-306 NZ и расы 4-277NZ. Для инокуляции брали 48-часовую культуру бактерий, выросшую при 26°C на среде YDC.

В предварительном исследовании определили взаимосвязь между концентрацией КОЕ патогена и оптической плотностью клеточной суспензии при 600 нм (OD 600) на спектрофотометре *Eppendorf Bio Photometr plus*. В дальнейших опытах концентрацию бактерий измеряли спектрофотометрически.

Рассаду селекционных образцов выращивали из семян в кассетах до стадии 4–5 настоящих листьев, а затем пересаживали в горшки с торфяным субстратом объемом 0,5 л. Инокуляцию возбудителем осуществляли методом уколов препаровальной иглой, смоченной в бактериальной суспензии, проводя по 5 уколов на каждом листе. Скрининг устойчивости коллекции инбредных линий, сортов и гибридов F_1 проводили тремя расами (0, 1, 3) в концентрации $10^{4\dots 5}$ КОЕ/мл. У каждого растения селекционного образца заражали по 3 листа (на 1 листе по 5 уколов одной расой). Учет проводили на 7-й и 20-й дни после инокуляции.

Во втором эксперименте изучали влияние концентрации инокулюма на проявление симптомов заражения у восприимчивого стандарта и линии Цр 2-1, показавшей в первом эксперименте высокую устойчивость. Кроме того, использовали линию удвоенного гаплоида Цр1dh1, полученную в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур от устойчивого растения Цр 1. В качестве стандар-

та восприимчивости использовали линию Мег2ф2, которая обладает очень высокой восприимчивостью ко всем использованным в экспериментах расам возбудителя.

Линии высевали повторно и по 5–6 растений инокулировали расами 0, 1, 3 и 4 в концентрации бактериальной суспензии от 10^3 до 10^9 КОЕ/мл. Температура в теплице после инокуляции днем составляла 28–30°C, ночью — 23–25°C. Учет зараженности проводили, начиная с 7-го дня после инокуляции, и ежедневно до 15-го дня. Отмечали наличие симптомов в зоне укола. За положительный результат принимали наличие хотя бы одного успешного инфицирования. Эксперимент проводили в двух повторностях.

Результаты исследований

Результаты заражения 35 сортообразцов 3-мя расами возбудителя представлены в таблице 1.

Таблица 1

Оценка расоспецифической устойчивости селекционного материала капусты
(концентрация инокулума $10^{4\dots 5}$ КОЕ/мл, % устойчивых растений)

№ п/п	Сорта, гибриды и линии капусты	Раса					
		0		1		3	
		Период после инокуляции, сут.					
		7	20	7	20	7	20
1	F ₁ Церокс	100	100	33,3	33,3	66,7	33,3
2	F ₁ Агрессор	66,7	66,7	0	0	0	0
3	F ₁ Таурус	0	0	0	0	100	100
4	F ₁ Колобок	0	0	0	0	0	0
5	с. Офелия	0	0	0	0	33,3	0
6	PI 199947 <i>B. carinata</i>	0	0	100	100	100	100
7	НАН 1-1611	0	0	0	0	0	0
8	НАН 2-312	0	0	0	0	33,3	0
9	НАН 2-311	0	0	0	0	0	0
10	НАН 1-1521	0	0	0	0	0	0
11	НАН 1-1532	100	100	100	100	33,3	0
12	НАН1-1561	0	0	33,3	0	33,3	0
13	НАН 1-1511	0	0	0	0	0	0
14	AMC 2-3	33,3	0	0	0	0	0
15	AMC	0	0	0	0	0	0

Окончание табл. 1

№ п/п	Сорта, гибриды и линии капусты	Раса					
		0		1		3	
		Период после инокуляции, сут.					
		7	20	7	20	7	20
16	ПМ4Ф2	33,3	0	0	0	0	0
17	ЦР 1-1	100	100	100	66,7	100	100
18	ЦР 1-2	100	100	66,7	33,3	100	100
19	ЦР 1-3	0	0	0	0	33,3	0
20	ЦР1-4	0	0	0	0	0	0
21	ЦР2-1	100	100	100	100	100	100
22	(ДМ1×Т5)(13)1-1	0	0	0	0	0	0
23	В64п 2-1	0	0	33,3	0	33,3	0
24	НИК 2-3	0	0	33,3	0	0	0
25	КАУ 1-81	0	0	33,3	0	0	0
26	С110Ф1-17	100	100	33,3	33,3	66,7	66,7
27	ЮБ 1-3	0	0	33,3	0	33,3	0
28	Хт5к1-3	33,3	0	0	0	0	0
29	ХДХ(20)2	0	0	0	0	0	0
30	ГЕС2-2546	0	0	0	0	100	100
31	ФУ4-93	0	0	0	0	0	0
32	Зму7д1-1	0	0	33,3	0	0	0
33	Цв9р7	0	0	0	0	0	0
34	Мег2ф2	0	0	0	0	0	0
35	АГР2-1	0	0	0	0	0	0
36	ЗА1-1	0	0	33,3	33,3	66,7	66,7

Результаты показывают, что среди испытанных сортообразцов расоспецифической устойчивостью обладают гибриды F₁ Агрессор, F₁ Церокс и F₁ Таурус. Растения гибрида Таурус F₁ показали устойчивость к 3-й расе, а растения гибрида F₁ Агрессор — к расе 0. Растения гибрида F₁ Церокс обладали более широкой устойчивостью, однако этот гибрид оказался гетерогенным. В нем выявлены растения, устойчивые ко всем трем расам, а также растения, устойчивые к двум или только к одной расе. Поэтому при использовании этого гибрида как источника в селекции на устойчивость

необходимо предварительно провести инокуляцию, отбор устойчивых растений ко всем трем расам и затем получать от них потомство. Полную устойчивость к расам 1 и 3 показала линия абиссинской капусты PI 199947. Эта линия входит в состав набора растений-дифференциаторов. И то, что она в наших экспериментах поразилась только расой 0, подтверждает достоверность используемых нами рас. Отсутствие устойчивости отмечено у гибрида F₁ Колобок, сорта Офелия и у большинства изучаемых линий. Полную устойчивость ко всем трем расам показала линия Цр2-1. В селекционных линиях Цр1-1, Цр1-2 и С110ф1-17 также имеются растения с устойчивостью к трем расам, т.е. в этих линиях возможен отбор растений с устойчивостью к трем расам. У линии Нан1-1532 выявлены растения, устойчивые к расам 0 и 3, а в линии Гес2-2546 — устойчивые к расе 3.

Результат анализа потомства от скрещивания высоковосприимчивой линии Мег2ф2 с устойчивой к трем расам линией Цр2-1 показал, что устойчивость является рецессивной, так как все растения потомства были поражены всеми четырьмя расами (табл. 2).

Таблица 2

Распределение устойчивых и восприимчивых растений у гибрида F₁ Мег2ф2×Цр2-1 при инокуляции X.c. pv. *campesiris* (концентрация инокулума 10⁶ КОЕ/мл)

Гибридная комбинация	Расы	0		1		3		4	
	Число растений	R	S	R	S	R	S	R	S
Мег2ф2(S)×Цр2-1(R)	5	0	5	0	5	0	5	0	5

Примечание. R — устойчивые, S — восприимчивые.

С целью усовершенствования методики оценки устойчивости селекционного материала были проведены эксперименты по уточнению оптимальных инфекционной нагрузки и сроков проведения учетов на восприимчивых и устойчивых гомозиготных линиях с различными генами расоспецифической устойчивости.

При инокуляции линии абиссинской капусты (*B. carinata*) PI 199947 разными концентрациями установлено, что действие доминантного гена Rb, контролирующего устойчивость этой линии, не зависит от концентрации бактериального инокулума. При заражении совместимой расой проявление симптомов начиналось уже на 7-е сут. после инокуляции даже при самой низкой концентрации патогена (табл. 3).

При заражении устойчивой линии удвоенного гаплоида Цр1dh1 на 7-й день после инокуляции симптомы отсутствовали даже при высокой концентрации патогена (табл. 4). На 15-е сут. симптомы появились при инокуляции расами 1 и 3 только при высокой инфекционной нагрузке — 10⁸ и 10⁹ КОЕ/мл. При инокуляции расами 0 и 4 симптомы обнаруживались при более низкой концентрации 10⁶ и 10⁵ КОЕ/мл соответственно.

У линии Цр 2-1 на 7-й день симптомы отсутствовали при инокуляции всеми расами даже при максимальных инфекционных нагрузках (табл. 5). На 15-е сут. при инокуляции расой 4 симптомы проявлялись уже при концентрации патогена 10⁴ КОЕ/мл, расами 3 и 0 при концентрации 10⁶ КОЕ/мл, а расой 1 — только при концентрациях 10⁸ и выше.

Таблица 3

**Проявление симптомов сосудистого бактериоза у линии абиссинской капусты
B. carinata PI 199947 при различной инфекционной нагрузке возбудителя**

Расы	Период после инокуляции, сут.	Концентрация инокулюма (КОЕ/мл)						
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
1	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—
3	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—
4	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—
0	7	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. “+” — наличие симптомов, “—” — отсутствие симптомов.

Таблица 4

**Проявление симптомов сосудистого бактериоза
у устойчивой линии удвоенного гаплоида Цр1dh1
при различных инфекционных нагрузках возбудителя**

Расы	Период после инокуляции, сут.	Концентрация инокулюма (КОЕ/мл)						
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
1	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	+	+
3	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	+	+
4	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	+	+	+	+	+
0	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	+	+	+	+

Примечание. “+” — наличие симптомов, “—” — отсутствие симптомов.

Как следует из таблицы 6, у восприимчивого стандарта — линии Мег2ф2 — при инокуляции 4-й расой симптомы появились, начиная с концентрации патогена 10⁴ КОЕ/мл, на 7-й день и продолжали развиваться до конца периода учета, при более слабой концентрации патогена 10³ КОЕ/мл симптомы не обнаруживались даже

Таблица 5

Проявление симптомов сосудистого бактериоза у устойчивой линии Цр2-1 при различных инфекционных нагрузках рас *X. campestris* pv. *campestris*

Расы	Период после инокуляции, сут.	Концентрация инокулума (КОЕ/мл)						
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
1	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	+	+
3	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	+	+	+	+
4	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	+	+	+	+	+	+
0	7	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	+	+	+	+

Примечание. “+” — наличие симптомов, “—” — отсутствие симптомов.

на 15-е сут. При инокуляции расами 0, 1 и 3 симптомы наблюдали на 7-е сут. только при инфекционной нагрузке свыше 10⁷ КОЕ/мл. На 15-е сут. при инокуляции расами 0 и 1 симптомы появились даже при самой низкой инфекционной нагрузке патогена 10³ КОЕ/мл.

Таблица 6

Проявление симптомов сосудистого бактериоза у восприимчивой линии капусты Мег2Ф2 при различных инфекционных нагрузках *X. campestris* pv. *campestris*

Расы	Период после инокуляции, сут.	Концентрация бактерий (КОЕ/мл)						
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
1	7	—	—	—	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+
3	7	—	—	—	—	+	+	+
	15	—	+	+	+	+	+	+
4	7	—	+	+	+	+	+	+
	15	—	+	+	+	+	+	+
0	7	—	—	—	—	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. “+” — наличие симптомов, “—” — отсутствие симптомов.

Таким образом установлено, что доминантный ген устойчивости Rb у линии PI 199947 *B. carinata* является сильным и устойчивость к расам 1, 3 и 4-я, контролируемая им, не зависит от концентрации патогена. Показано, что устойчивость линии Цр2-1 является рецессивным признаком, и ее проявление зависит от концентрации бактериального инокулюма. В связи с тем, что четкие симптомы поражения у восприимчивого стандарта — линии Мег2ф2 — обнаруживаются при концентрации бактерий 10^4 КОЕ/мл и выше, для более надежного скрининга исходного селекционного материала предлагаем проводить инокуляцию концентрацией 10^4 – 10^5 КОЕ/мл с обязательным использованием восприимчивого стандарта. Если условия благоприятны для развития заболевания, учет зараженности рекомендуется начинать с 7-го дня после искусственного заражения.

Библиографический список

1. Джалилов Ф.С., Во Тхи Нгок Ха. Защита капусты от болезней в период вегетации // Картофель и овощи. 2014. № 1. С. 20–23.
2. Джалилов Ф.С., Корсак И.В., Монахос Г.Ф. Сравнение методов оценки устойчивости капусты к сосудистому бактериозу // Известия ТСХА. 1995. Вып. 2. С. 147–153.
3. Игнатов А.Н., Монахос Г.Ф., Джалилов Ф.С. Появление расы 0 в результате спонтанной мутации изолята расы 1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* — возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных // Известия ТСХА. 2000. Вып. 4. С. 71–75.
4. Игнатов А.Н., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В., Политыко В.А., Матвеева Е.В., Ораевский А.А., Шаад Н.В. Устойчивость к возбудителю сосудистого бактериоза и листовой пятнистости у *Brassica rapa* L. и *B. napus* L. // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 1. С. 85–91.
5. Мазурин Е.С. Методы диагностики возбудителя сосудистого бактериоза капусты и меры защиты: Автorefерат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М.: ТСХА, 2009. 23 с.
6. Чекалин Н.М. Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам. Полтава: Изд-во «Интерграфіка», 2003. 186 с.
7. Guo H., Dickson M.H., Hunter J.E. *Brassica napus* Sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance // HortScience. 1991. Vol. 26(12). P. 1545–1547.
8. Kamoun S., Kadmar H.V., Tola E., Kado C.I. Incompatible interaction between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus // Molecular Plant- Microbe Interaction. 1992. V. 5. P. 22–33.
9. Lema M., Soengas P., Velasco P., Francisco M., Cartea M.E. Identification of sources of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica napus* crops // Plant Diseases. 2011. V. 95. P. 292–297.
10. Margarita L., Pablo V., Pilar S., Marta F., Maria E.C. Screening for resistance to black rot in *Brassica oleracea* crops // Plant Breeding. 2012. V. 131. P. 607–613.
11. Shaw J.J., Kado C.I. Whole plant wound inoculation for consistent reproduction of black rot of crucifers // Phytopathology. 1988. V. 78. P. 981–986.
12. Staub T., Williams P.H. Factors influencing black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage // Phytopathology. 1972. V. 62. P. 722–728.
13. Taylor J.D., Conway J., Roberts S.J., Astley D., Vicente J.G. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes // Bacteriology. 2002. Vol. 92. № 1. P. 105–111.
14. Vicente J.G., Conway J., Roberts S.J., Taylor J.D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars // Phytopathology. 2001. V. 91. P. 492–499.

15. Vicente J.G., Ignatov A., Conway J., Roberts S.J., Taylor J.D. Development of an improved Brassica differential series for the identification of races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // 7th Int. Cong. Plant Pathol., Edinburgh, UK. 1998. P. 2.2.71.
16. Williams P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers // Plant Disease. 1980. V. 64. № 8. P. 736–742.

PLANT REACTION TO VARIOUS INOCULUM CONCENTRATIONS OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* IN BLACK ROT RESISTANT BRASSICAS

G.F. MONAKHOS, VO THI NGOK HA, F.S. DZHALILOV

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

*Some new sources of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were identified during screening of cabbage inbred lines and commercial F₁ hybrids against different levels of pathogen inoculum. Inbred line CR2-1 possessed a recessive gene-controlled resistance that depended on the bacterial inoculum concentration. Resistance of *B. carinata* accession PI 199947 to races 1, 3 and 4 controlled by Rb gene was effective against all inoculum levels. It was advised to use 10⁴–10⁵ CFU/ml concentration for initial screening of brassicas breeding material to get more reliable results. It is necessary to use susceptible standards. The plant disease reaction should start to be recorded on the 7th day after inoculation.*

Key words: black rot of cabbage, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, resistance.

Монахос Григорий Федорович — к. с.-х. н., ген. директор ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева» (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 977-11-74; e-mail: breedst@mail.ru).

Во Тхи Нгок Ха — асп. кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-02-20; e-mail: ngochavo.88@gmail.com).

Джалилов Февзи Сейд-Умерович — д. б. н., проф., зав. лабораторией защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-12-79; e-mail: labzara@mail.ru).

Monakhos Grigoriy Fedorovich — PhD in Agricultural Sciences, Director General of LLC «N.N. Timofeev plant-breeding station» (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 977-11-74; e-mail: breedst@mail.ru).

Vo Thi Ngok Ha — PhD-student of the Department of Plant Protection, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 976-02-20; e-mail: ngochavo.88@gmail.com).

Dzhalilov Fevzi Seid-Umerovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Plant Protection, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 976-12-79; e-mail: labzara@mail.ru).