

## ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ЛИНИЙ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ КАК ЭТАПА В ПРОЦЕССЕ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВОГО ГИБРИДА

*Царев Дмитрий Алексеевич – студент 4 курса Института агробиотехнологии*

*ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева*

*Научный руководитель – Поддымкина Людмила Михайловна, к.с.-х.н., доцент, доцент кафедры защиты растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева*

**Аннотация:** процесс создания устойчивой линии растений занимает длительное время, при этом на каждой итерации процесса требуется проводить оценку устойчивости для выделения устойчивых растений и отбраковки негодных, при этом сам процесс можно проводить различными способами. Автором статьи была проведена оценка различных способов инокуляции и учета пораженных растений и создана собственная форма учета в рамках производственной задачи.

**Ключевые слова:** капуста белокочанная, сосудистый бактериоз, устойчивость, учет пораженности, *Xanthomonas campestris*

Сосудистый бактериоз – распространенное заболевание крестоцветных, вызываемое патогеном *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (далее Хсс), наносящее существенный ущерб посевам капусты каждый год. Впервые это бактериальное заболевание капусты было описано в 1890 году на опытной станции в США, штат Кентукки. Сам возбудитель сосудистого бактериоза был выявлен позднее – в 1895 году, официальная публикация о заболевании полностью вышла в 1896 году [4. С. 229], при этом свое окончательное название патоген получил только в 1939 году. На территории России сосудистый бактериоз впервые был обнаружен в 1905 году. По состоянию на 2019 год, он охватывал 10,3 % посевных площадей капусты и являлся самым распространенным из четырех исследованных заболеваний. Наиболее активные проявления сосудистого бактериоза были зафиксированы на территориях Приволжского и Сибирского федеральных округов, а также в республике Удмуртия и Саратовской области [2. С. 624].

Сосудистый бактериоз – *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* – поражает сосудистую систему растения и вызывает характерные V-образные некрозы вдоль жилок листа. Сами жилки при этом со временем чернеют из-за выделения патогеном в окружающую среду экзополисахарида ксантана, приводящего к закупорке проводящей системы. Пораженная сосуди-

стым бактериозом зрелая капуста непригодна для употребления в пищу, а молодые растения либо погибают в начале вегетации, либо у них возникают проблемы с образованием кочанов. Сам возбудитель может проникать в растения различными способами: чаще всего это происходит через корневую систему, через внешние повреждения и гуттационные капли, образующиеся при высокой влажности. В последнем случае, бактерии не могут эффективно распространяться в тканях растений, и симптомы заболевания проявляются локально.

Так как сосудистый бактериоз имеет бактериальную природу, бороться с ним крайне затруднительно из-за ограниченного ассортимента антибактериальных препаратов на рынке, применение которых на регулярной основе может явиться причиной выработки возбудителем резистентности. Оптимальными широко распространенными методами противодействия данному патогену являются: контроль его содержания в посевном материале, почве, и уборка растительных остатков после сбора урожая. Наиболее эффективным методом борьбы является создание устойчивых сортов и гибридов капусты. При этом на различных этапах селекционного процесса обязательно требуется проводить оценки устойчивости организмов к данному заболеванию. В настоящее время существует несколько различных методик проведения оценки растений, поэтому вопрос выбора подходящего способа становится значительно более актуальным при необходимости проводить оценку большой выборки, в связи с ограниченным человеческим ресурсом и различной потребностью в получаемых данных.

У *Xanthomonas campestris* есть множество рас и патоваров, которые выявлялись определялись на протяжении длительного времени. Однако, в рамках защиты капусты от такого заболевания, как сосудистый бактериоз рассматриваются только наиболее распространенные расы у наиболее активного на данной культуре патовара. В данном случае, это расы 1, 4, 3 (и, реже 0) [1] у серологической группы S3 *Xanthomonas campestris*, как группы с наиболее характерной симптоматикой, и, следовательно, обозначенной наиболее агрессивной [3. С. 1455-1456].

Первая проблема, с которой сталкиваются исследователи, заключается в выборе штаммов патогена и сортов/гибридов образцов, которые будут использоваться в дальнейшей работе. Основная масса работ по созданию выборки растений-индикаторов была проведена в 2000 – 2007 годах, с постепенным добавлением новых гибридов и видов капусты, как индикаторов, позволяющих отличать новосформированные расы возбудителя. Частью проблемы, которую приходится решать в настоящее время, является недоступность некоторых из этих гибридов. Данная проблема частично преодолевается подбором альтернативных сортов/гибридов из существующих на данный момент и предназначенных к использованию исключительно в рамках производственных задач.

Вторая проблема заключается в том, что сами по себе растения-индикаторы неспособны давать однозначный ответ касательно того, какая раса была нанесена на данное растение, особенно, в случаях, когда был использован подобранный в качестве альтернативы сорт/гибрид. Для того, чтобы получить однозначный результат требуется либо каждый раз проводить анализ по всем растениям-индикаторам, указывающим на различные расы, либо иметь возможность определить расу возбудителя напрямую. Параллельно с созданием выборки растений-индикаторов, научными коллективами в различных странах велась работа по более глубокому изучению возбудителя на молекулярно-генетическом уровне, и были созданы маркеры для определения наиболее распространенных рас и генов авирулентности. В процессе работы с различными штаммами были получены сведения о том, что многие маркеры оказывались неэффективными в качестве индикаторов рас для некоторых локальных штаммов, несмотря на успешность их применения на штаммах из коллекции исследователей. Поэтому у тех ученых, которые занимаются работой с данным патогеном или генами устойчивости к нему, как правило, имеется своя сформированная в начале и неизменная в дальнейшем выборка штаммов установленных рас, маркеров к ним и сортов/гибридов-индикаторов. Следовательно, есть потребность в сохранении имеющихся штаммов и маркеров для неизменности методики на протяжении всего периода работы. Обычно оригиналы штаммов хранят в глицероловом стоке в морозильной камере.

Третья проблема, которую необходимо решить в начале работ – определение концентрации патогена, которая способна давать стабильный характерно проявляющийся результат на восприимчивых сортах и не быть избыточной для ожидаемо резистентных. Установление искомой концентрации – довольно трудоемкий процесс, заключающийся в создании:

- градуированных растворов определенных степеней разведения;
- создании карты оптических плотностей или карты высот графиков проточной цитометрии для дальнейшего сопоставления с ними концентраций в КоЕ/мл;
- проведение посева культуры и дальнейшем подсчете количества образовавшихся колоний на указанных концентрациях;
- создание растворов инокулюма основанных на уже известных картах КоЕ;
- инокуляция большой выборки восприимчивых и резистентных растений.

При появлении явно выраженных признаков поражения на восприимчивой линии результаты сопоставляются с соответствующей итерацией на резистентной линии и, после сравнения, принимается решение о том, является ли данная концентрация показательной. В случае с Хсс для разных исследователей оптимальными концентрациями являются  $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^8$  –  $1 \times 10^9$  КоЕ/мл. Так как процедура картирования оптических

плотностей является весьма затратной как по труду, так и по времени, данные берутся из уже существующих исследований. Таким образом, из имеющихся данных за  $1 \times 10^8$  КоЕ принято значение в 0,26-0,28А на электрофотометре (например, Biophotometer plus (Eppendorf)) с длиной волны 600 nm.

Только после решения трех проблем можно приступить к проведению анализа образцов на устойчивость к заданным расам.

Первым этапом процесса проведения анализа является посев семян исследуемого объекта (капусты). Несмотря на то, что суть процесса достаточно прямолинейна, в нем следует учитывать несколько нюансов. В зависимости от места, методов посева, контроля за условиями и ухода за растениями можно получать более точные результаты. Однако, обратной стороной является увеличением денежных затрат и большие трудозатраты. Также ограничивающими факторами служат объем выборки, объем рабочей силы и наличие места с возможностью более точного контроля над условиями окружающей среды и допущенное для контаминации возбудителем. Такие особенности, как температура окружающей среды, длительность светового дня, и срок выращивания перед инокуляцией иногда могут отражаться в методике выращивания, если эти показатели в ней учитывались. Впрочем, более детальные методики ухода за растениями, как правило, почти нигде не указываются. Следует отметить, что подкормка растений не должна проводиться в течении недели до и после инокуляции, с целью повышения уязвимости растений к возбудителю.

Второй этап в процессе проведения анализа на устойчивость – инокуляция. Для создания инокулюма требуется свежая колония бактерий, на выращивание которой уходит 48–72 часа. Колонии Xcc выращивают на таких питательных средах, как среда Кинга и среды YDC и YGCA, в зависимости от доступности и удобства приготовления и хранения для конкретного исследователя. Посев бактерий делают в такой срок, чтобы по окончании их роста приготовление инокулюма и инокуляция образцов происходила бы непрерывно (рис. 1)



**Рис. 1.** Оборудование для приготовления раствора инокулюма

Второй этап в процессе проведения анализа на устойчивость – инокуляция. Для создания инокулюма требуется свежая колония бактерий, на выращивание которой уходит 48-72 часа. Колонии Хсс выращивают на таких питательных средах, как среда Кинга и среды YDC и YGCA, в зависимости от доступности и удобства приготовления и хранения для конкретного исследователя. Посев бактерий делают в такой срок, чтобы по окончании их роста приготовление инокулюма и инокуляция образцов происходила бы непрерывно (рис. 1). Ранее упоминалась методика получения концентраций для приготовления инокулюмов. Концентрации и объем приготовленного раствора зависит от методики исследования и личных предпочтений исследователя (в рамках допустимого методикой). Объем готового раствора инокулюма, зависит от метода инокуляции. Для инокуляции прокалыванием достаточно 10 мл готового раствора на каждую расу патогена. Сама инокуляция может проводиться различными методами: пролив зараженной воды под корень; закрепление смоченной в инокулюме ваты на листе в влажных условиях окружающей среды; прокалывание листьев иглами; прокалывание листьев хирургическими пинцетами. У каждого из перечисленных способов есть свои положительные и отрицательные стороны. Первые два являются имитацией более естественных способов проникновения патогена в растения, однако, пролив воды под корень сложно контролировать для создания однородных условий и сроков проявления результата, а закрепление смоченной в инокулюме ваты на листьях является слишком трудозатратным и требовательным к обеспечению внешних условий (высокая температура и влажность, которые снижают через некоторое время после инокуляции). Из оставшихся двух прокалывание смоченными в инокулюме иглами также является проблемным из-за неравномерности количества попадающего в рану раствора. В связи с этим, исследователи, предпочитают использовать хирургические пинцеты,

обмотанные смоченной в инокулюме ватой, что позволяет повысить точность результатов ценой увеличения трудозатрат (рис. 2). Окончательный выбор методики второго этапа зависит и от потребностей в создании более реалистичных условий, и от необходимости получения более точного результата, и от количества имеющейся рабочей силы.



**Рис. 2.** Пример листа белокачанной капусты проколотого методом хирургических пинцетов

После инокуляции растения оказываются в прямом контакте с патогеном, и, в случае с *Xsc* симптомы проявляются в среднем через 2-3 недели, в зависимости от температуры и влажности окружающей среды. После массового и явного проявления признаков пораженности начинается третий этап – сбор данных. Собираемые данные зависят от конечных целей исследователя. В большинстве случаев собираются обобщенные относительные данные (как правило, индексы пораженности через определенные периоды времени или индекс площади поражения), однако, при некоторых обстоятельствах, относительные параметры не могут дать требуемой информации, потому собираются абсолютные данные (балл пораженности, % пораженной площади листа или, в некоторых случаях, совместимость/несовместимость).

Цель исследования состояла в организации учета пораженности растений при проверке устойчивости гибридных линий белокачанной капусты. Проблема учета данных линий заключается в том, что при переносе гена, который проявляет себя как единый ген устойчивости к трем расам (1, 3, 4) в исходном виде, после интеграции наблюдается расщепление гена в каждом следующем поколении на три независимо наследуемых. Изначально поставленная задача заключается в повторяющемся скрещивании устойчивых растений (по результатам предыдущих испытаний) с устойчивым предшественником с целью закрепления генов устойчивости в геноме

целевого вида для последующего создания чистой устойчивой линии. Так как упомянутый выше ген устойчивости расщепляется на три независимо наследуемых, отвечающих за разные расы, то в каждой испытываемой линии не существует равномерности проявления признака. Следовательно, есть потребность вести учет исключительно по абсолютным данным.

Штаммы и растения-индикаторы для контроля были предоставлены лабораторией и протестированы. Среда выращивания бактерий YDC, срок выращивания 72 часа. Концентрация бактерий  $1 \times 10^6$ . Было обработано 43 линии, и 10 единичных образцов, отобранных с предыдущего учета для повторной инокуляции с целью подтверждения результатов. В каждой линии было посажено от 8 до 32 растений в кассеты  $8 \times 8$ , в зависимости от количества доступного исходного материала. По причине всхожести отличной от 100 % итоговое количество обработанных растений меньше посаженного. Инокуляция проводилась через 30 дней после посева методом проколов хирургическими пинцетами для более точных результатов на неравномерной выборке. Согласно данному методу, на каждом растении прокалывается один или несколько листьев, проколы наносятся поверх вторичных жилок листа в количестве 8-12 проколов на лист, в зависимости от размера листа (рис. 2). Когда требуется получить данные по всем расам на каждом растении (например, в процессе отбора индивидуальных образцов), то перед процедурой прокалывания листья подписывают несмываемым маркером, для того чтобы впоследствии иметь возможность определить расу, которой был обработан каждый лист. Учет проводился через 21 день после инокуляции по абсолютной бальной шкале. Группа из двух человек проводила, по специально созданной форме учета, позволяющей отражать базовые данные, расположение растений в кассетах и иные дополнительные редкие, но характерные признаки. Характеристика бальной шкалы определялась по фактическим признакам пораженности растений на момент учета с согласованием мнений обоих участников процесса, чтобы избежать оценок не отражающих действительность.

По результатам обследования было отобрано 7 предположительно иммунных растений (нет пораженности по всем расам) для дальнейшего повторного обследования и участия в дальнейших беккроссах. Также были собраны и описаны данные по каждой линии, охарактеризованы выявленные тенденции.

**Обобщенные результаты учета пораженности различных линий  
капусты белокочанной сосудистым бактериозом**

Потерянные листья: Целиком – 28 растений Раса 1 – 80 растений Раса 3 – 76 растений Раса 4 – 174 растения	Антоцианоз: Раса 1 – 22 листа Раса 3 – 18 листьев Раса 4 – 37 листьев	Некротические пятна: Раса 1 – 18 листьев Раса 3 – 34 листа Раса 4 – 18 листьев
Пораженность (по бальной шкале):		
Раса 1: 0 баллов – 89 растений 1 балл – 54 растения 2 балла – 95 растений 3 балла – 88 растений 4 балла – 56 растений 5 баллов – 12 растений	Раса 3: 0 баллов – 98 растений 1 балл – 105 растений 2 балла – 118 растений 3 балла – 44 растения 4 балла – 17 растений 5 баллов – 4 растения	Раса 4: 0 баллов – 79 растений 1 балл – 82 растения 2 балла – 88 растений 3 балла – 24 растения 4 балла – 9 растений 5 баллов – 1 растение

Таким образом было установлено, что растения капусты поражались расой 1 значительно активнее чем остальными, а 4-я раса, несмотря на большое количество потерянных листьев, поражала растения в наименьшей степени. Среди особых признаков было установлено, что антоцианоз чаще всего проявлялся на листьях, инокулированных патогеном расы 4, а некротические пятна на листьях, проколотых патогеном расы 3 (таб. 1). Помимо предположительно иммунных были также выявлены предположительно устойчивые растения, которые оказывались пораженными на 1 балл не более чем к 1 или 2 расам (пораженность оставшихся рас при этом должна быть строго 0 баллов). Благодаря картированию растений при учете, в дальнейшем, эти растения будет гораздо проще отследить до исходных материнских единиц.

**Библиографический список:**

1. Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С., Монахос Г.Ф. Анализ расового состава популяции *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow в России и селекция на устойчивость к сосудистому бактериозу / Игнатов А.Н., Ф.С. Джалилов, Г.Ф. Монахос // Генетические коллекции овощных растений. – СПб: ВИР – 2001 – С. 179-190.
2. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации в 2019 году и прогноз развития вредных объектов в 2020 году / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации – Москва, 2020 – 624 с.
3. Alvarez A.M., Benedict A.A., Mizumoto C.Y., Hunter J.E., D.W. Gabriel. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers / A.M. Alvarez, A.A. Benedict etc. //

Phytopathology. – Vol. 84. – No 12. – 994. – p. 1449-1457.

4. Garman H. Experiment station record, volume VI, 1894-1895 / H. Garman. US department of agriculture, office of experiment stations – Washington government printing office. – 1896. – p. 229

**SPECIFICS OF WHITE CABBAGE BLACK ROT RESISTANCE  
EVALUATION AS STAGE IN PROCESS OF CREATING  
RESISTANT HYBRID**

**Tsareov Dmitriy Alekseevich** – 4-rd year student of the Institute of Agrobiotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Russian Federation.

**Scientific supervisor – Poddymkina Lyudmila Mikhailovna** – Candidate of Agricultural Sciences, docent, assistant professor of the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Russian Federation.

**Abstract:** creation of resistant plant hybrid takes long time. At each iteration of this process, it is required to make resistance evaluation to filter resistant isolates and to reject ones that are not. Process itself can be performed by different methods. Evaluation of different inoculation and result collecting schemes was made and own way of recording data was created and used within a production task.

**Keywords:** white cabbage, black rot of crucifers, resistance, disease intensity evaluation, *Xanthomonas campestris*