

УДК 635.342: 631.524.86

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ГИБРИДНЫХ КОМБИНАЦИЙ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ ЛИНИЙ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ К *PLASMODIOPHORA BRASSICAE* WOR.

Минейкина А.И. – аспирант

Ушаков А.А. – кандидат с.-х. наук, с.н.с. лаб. иммунитета и защиты растений

Бондарева Л.Л. – доктор с.-х наук, зав. лаб. селекции и семеноводства капустных культур

ФГБНУ "Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур"

143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14

E-mail: anna-batmanova@mail.ru, vniissok@mail.ru, lyuda_bondareva@mail.ru

Один из наиболее вредоносных возбудителей болезней растений семейства Brassicaceae – *Plasmodiophora brassicae* Wor., поражение которым приводит к снижению урожая капусты белокочанной на 10-60% и более. Целью исследования являлось изучение генетического разнообразия линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной, полученных методом культуры изолированных микроспор *in vitro*, для возможности отбора устойчивых к *P. brassicae* и на их основе создание гибридных комбинаций с высокой устойчивостью к болезни. Фитопатологическая оценка устойчивости 10 линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной к возбудителю проведена в контролируемых условиях климатической камеры путем инокуляции растений патогеном в фазе рассады. В результате оценки устойчивости линий была отмечена высокая распространенность болезни от 25 до 100%, однако развитие достигало 68%. При этом балл поражения варьировал от 0,5 до 3,3, что не превышало стандарт, балл поражения которого составлял 3,5. Среди растений линии 3-3-3 не было отмечено поражений, что свидетельствует об эффективности ее генов устойчивости, либо о гетерогенности патогена. Выделенные линии удвоенных гаплоидов капусты белокочанной были использованы в качестве доноров устойчивости при создании F1 гибридов. В результате скрещивания методом топ-кросс с использованием выделенных линий были получены 42 гибридные комбинации на основе самонесовместимости. Оценка полученных комбинаций проведена на искусственном инфекционном фоне открытого грунта в Московской области. На основании 2-летних данных по степени поражения растений килой все комбинации были распределены по группам устойчивости. Они были отнесены к группам относительно устойчивых и слабовосприимчивых к возбудителю, это составило 52,4 и 45,2% к общему числу испытуемых соответственно. Одна гибридная комбинация с использованием линии 3-3-3 оказалась толерантна. Балл поражения гибридных комбинаций варьировал от 0 до 1,8. Балл поражения стандарта составлял 2,5. Распространенность болезни достигала 80%, при этом развитие болезни варьировало 0 - 25%.

Ключевые слова: капуста белокочанная, линии удвоенных гаплоидов, гибридные комбинации, *Plasmodiophora brassicae*, устойчивость к киле, инокуляция.

Введение

Капусту белокочанную в нашей стране выращивают повсеместно, но наибольший удельный вес среди возделываемых овощных растений она имеет в Нечерноземной зоне. Широкое распространение этой культуры обусловливается рядом ее ценных хозяйственных особенностей.

Одно из главных направлений селек-

ции капусты белокочанной – селекция на устойчивость к болезням и вредителям. Актуальность этого направления объясняется тем, что в узкоспециализированных хозяйствах большая насыщенность культурой приводит к постоянным нарушениям севооборота и способствует быстрому накоплению специфических болезней, с которыми не в состоянии справиться предупреди-

тельные и агротехнические мероприятия. Поэтому наиболее эффективным методом в борьбе с болезнями и вредителями является внедрение устойчивых сортов и гибридов (Пивоваров В.Ф., Старцев В.И., 2006).

В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются технологии получения удвоенных гаплоидов (ДН-

технологии) (Dunwell, 2010). Среди таких технологий ведущее место занимает культура микроспор *in vitro*, которая не только обеспечивает гомозиготность получаемых удвоенных гаплоидов (DH-линии), но и способствует расширению спектра формообразования генетических рекомбинантных форм, в том числе с рецессивными признаками (Шмыкова Н.А. и др., 2015).

Использование удвоенных гаплоидных линий позволяет проводить более эффективно отбор желательных генотипов из сравнительно небольших популяций по сравнению с традиционной технологией выделения самоопыленных генотипов (Lazar M.D. 1984). Получение стабильных гомозиготных линий из популяции облегчает поиск редких генотипов, в том числе устойчивых к болезням.

Одна из наиболее вредоносных болезней растений семейства Brassicaceae – кила, возбудителем которой является *Plasmodiophora brassicae* Wor. Заражение капусты килой возможно в течение всей вегетации растения, при этом наибольшая вредоносность проявляется при заражении рассады. Заболевание поражает корни с фазы первого - второго листа и в период формирования боковых корней. Под воздействием возбудителя клетки корней усиленно делятся, что приводит к образованию вздутий в форме утолщений, желваков. У взрослых растений кила вызывает сильное угнетение роста и развития. Листья

становятся вялыми, желтеют, кочаны недоразвиты, а при раннем и сильном заражении совсем не завязываются, так как поражённые корни не обеспечивают надземную массу водой и питательными веществами. Поражения *Plasmodiophora brassicae* Wor. приводят к снижению урожая капусты белокочанной на 10-60% и более (Donald, 2009). В России *Plasmodiophora brassicae* Wor. распространена от Архангельской области до Закавказья, она захватывает Нечерноземный округ, Центрально-Черноземный округ и Дальний Восток, включая Сахалин и Якутию. По данным Монахоса Г.Ф., Джалилова Ф.С. (2009) в Северо-Западных районах России ежегодно поражается килой до 50-75% от общего количества выращенных растений капусты белокочанной. Наиболее надёжным средством борьбы с этим заболеванием является возделывание устойчивых сортов.

Для создания устойчивых сортов и гибридов культур *Brassica oleracea* в мире проведено много работ по поиску источников устойчивости внутри вида. Однако большинство из них легко преодолевается патогеном в полевых условиях (Crute I.R. et al., 1980; Dixon G., 1986).

Целью исследования являлось изучение генетического разнообразия линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной для возможности отбора устойчивых к *Plasmodiophora brassicae* Wor. и на их основе создание гибрид-

ных комбинаций с высокой устойчивостью к возбудителю.

Материалы и методы

В качестве материала использовали линии удвоенных гаплоидов капусты белокочанной и гибридные комбинации на их основе, полученные в лабораториях биотехнологии и селекции и семеноводства капустных культур ФГБНУ ВНИИССОК. Растения удвоенных гаплоидов получены методом культуры изолированных микроспор *in vitro* по методике, описанной ранее (Шумилина Д.В. и др., 2015).

Анализ на устойчивость растений к *Plasmodiophora brassicae* проводили в контролируемых условиях климатической камеры на базе ФГБНУ ВНИИФ и на искусственном инфекционном фоне открытого грунта лаборатории иммунитета и защиты растений ФГБНУ ВНИИССОК.

В качестве объекта заражения капусты белокочанной килой в условиях климатической камеры использовали желваки пораженных растений, которые измельчали с помощью бытовой терки и разводили в 1 литре воды. Концентрацию спор возбудителя полученной суспензии определяли с помощью камеры Горяева, которая составила $66 \cdot 10^6$ спор КОЕ/л. Заражение рассады капусты белокочанной проводили в фазе 4-5 настоящих листьев» при t 20...22°C и влажности до 90% добавлением в ячейки кассет 2 мл рабочей суспензии инокулюма. Оценку проводили



Рис. 1. Шкала пораженности капусты белокочанной *Plasmodiophora brassicae*.

1. Результаты оценки устойчивости линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной к *Plasmiodiophora brassicae* при инокуляции растений возбудителем в фазе рассады в условиях климатической камеры, 2014 год

Вариант	Балл поражения	Распространенность, %	Развитие болезни, %
1-18-2	1,6	93	39
1-18-1	0,5	25	12,5
1-19-2	1,5	90	38
11-68	1,7	100	43
2-45-1	2,7	100	68
2-123-3	2,0	100	65
2-123-1	3,3	100	56
5-13	1,8	85	44
5-13-2	1,4	60	35
3-3-3	0	0	0
St	3,5	100	100

через 50 суток после инокуляции с использованием следующей шкалы: 0 баллов – отсутствие симптомов, 1 – мелкие желваки на боковых корнях, 2 – слабое поражение центрального корня, 3 – слабое поражение центрального корня и сильное боковых корней, 4 – сильное поражение центрального и боковых корней. Определяли балл поражения, распространенность и развитие болезни в сравнении со стандартом. Дифференциатором восприимчивости был сорт Слава 1305 (Квасников, 1970; Методические рекомендации, 1985).

В полевых условиях (на искусственном инфекционном фоне с нагрузкой 10^6 спор КОЕ/см³) растения размещали рендомизированно в двухкратной повторности в количестве 10 шт. в каждом варианте. Оценку проводили в период уборки растений согласно методике (Квасников Б.В., Антонов Ю.П., 1972; Маслова А.А. и др., 2014) с использованием 5-балльной шкалы (рис. 1). Все образцы были отнесены к группам устойчивости согласно шкале дифференциации: 1 – относительно-устойчивые – степень поражения 0-10%, 2 – слабовосприимчивые – 11-

25%, 3 – средневосприимчивые – 26-50%, 4 – сильновосприимчивые – >50%.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010.

Результаты исследований

Так как метод культуры изолированных микроспор *in vitro* предполагает расширение спектра генетического разнообразия получаемых растений-регенерантов, мы предположили о возможности отбора из полученного материала генотипов, устойчивых к *Plasmiodiophora brassicae*. Для этого нами были оценены 10 линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной из 5-ти генетических популяций (табл. 1).

Как видно из таблицы 1 все растения восприимчивого стандарта полностью поражались, что подтверждает надежность инокуляции. Среди растений линии 3-3-3 не было отмечено поражений, что свидетельствует об эффективности ее генов устойчивости, либо о гетерогенности патогена. Линия 2-123-1 имела балл поражения соотносительный стандарту и тем самым, можно

сделать вывод о неустойчивости ее к возбудителю. Линия 1-18-1 проявила высокую устойчивость к *Plasmiodiophora brassicae* Wor., ее показатели устойчивости были наименьшими. Остальные линии обладали относительной устойчивостью, балл поражения не превышал стандарт. В большинстве вариантов распространенность болезни составляла 100%, однако, развитие болезни находилось в пределах от 12,5 до 68%, что является ниже развития болезни у стандарта. Таким образом, в результате оценки линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной при инокуляции растений в фазе рассады в климатической камере, были выделены линии с высокой устойчивостью, которые были использованы в качестве доноров устойчивости в дальнейшей селекционной работе при создании F₁ гибридов.

В результате скрещивания методом топ-кросс с использованием линий с высокой устойчивостью к киле в зимне-весенний период в камере искусственного климата были получены 42 гибридные комбинации на основе самонесовместимости.

2. Распределение гибридных комбинаций удвоенных гаплоидов капусты белокочанной по степени устойчивости к *Plasmiodiophora brassicae* в полевых условиях на искусственном инфекционном фоне, 2014-2015 годы

Группа устойчивости	Тип устойчивости	Степень поражения, %	Пораженность килой	
			Число гибридных комбинаций, шт	% к общему числу
I	Относительно устойчивые	0-10	22	52,4
II	Слабовосприимчивые	11-25	19	45,2
III	Средневосприимчивые	26-50	-	-
IV	Сильновосприимчивые	>50	-	-

На основании двухлетних данных по степени поражения растений килой на искусственном инфекционном фоне в полевых условиях все гибридные комбинации были распределены по группам устойчивости (табл. 2). Балл поражения гибридных комбинаций варьировал от 0 до 1,8. Балл поражения стандарта составлял 2,5. Распространенность болезни достигала 80%, при этом развитие болезни составляло 0 - 25%.

Таким образом, все гибридные комбинации были отнесены к группам относительно устойчивых и слабовосприимчивых к возбудителю, это составило 52,4 и 45,2% к общему числу испытуемых соответственно. Одна гибридная комбинация с использованием

линии 3-3-3 оказалась толерантна. Средне- и сильновосприимчивых гибридных комбинаций к *Plasmiodiophora brassicae* Wor. не выявлено.

Заключение

Оценка линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной при инокуляции возбудителем в фазе рассады позволила выделить генотипы с высокой устойчивостью к *Plasmiodiophora brassicae* Wor.. Все изученные гибридные комбинации при полевой оценке на искусственном инфекционном фоне отнесены к группам слабо- и средневосприимчивых к возбудителю. Одна гибридная комбинация оказалась толерантна.

EVALUATION OF RESISTANCE TO PLASMIDIOPHORA BRASSICAE OF HYBRID COMBINATIONS OF WHITE HEAD CABBAGE DEVELOPED BASED ON DOUBLED HAPLOID LINES

Mineikina A.I., Ushakov A.A., Bondareva L.L.

Federal State Budgetary Scientific Research Institution «All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production»
143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district, p. VNISSOK, Selectionnaya street, 14
E-mail: vniissok@mail.ru

Summary

Plasmiodiophora brassicae Wor. is the one of the causative agent of disease of the family of Brassicaceae, that results in decrease of white head cabbage yield up to 10-60%. The aim of the work was the study of genetic variability of doubled haploid lines of white head cabbage obtained by the isolated microspore culture in vitro aimed at selection of the lines resistant to *P. brassicae* and development of resistant hybrids. The doubled haploid lines of white head cabbage were evaluated for resistance to *Plasmiodiophora brassicae* using the method of inoculation of seedlings by pathogen in the control condition of the chamber room. As a result of assessment, the high disease distribution among doubled haploid lines was found (25-100%), but disease development was not higher than 68%. The score of infestation was 0.5-3.3, that was comparable with the standard (3.5). The plants of the lines 3-3-3 did not exhibit any symptoms of disease that can indicate of efficiency of its gene resistance or pathogen heterogeneity. The lines with high resistance to *P. brassicae* were used as a parental lines for development of F1 hybrids. Using the top-crossing method the forty-two hybrid combinations were developed based on self-incompatibility. These hybrid combinations were analyzed for clubroot resistance in the field conditions on an artificial infectious background in Moscow region. Based on the data of two-year experiments, all tested hybrid combinations were divided into the groups of relatively tolerant (52.4%) and susceptible (45.2%) genotypes. Only one hybrid combination developed with line 3-3-3 has proved to be tolerant. The score of infestation of hybrid combinations varied from 0 to 1.8. The score of infestation of the standard was 2.5. The disease distribution reached 80% but disease development varied from 0 to 25%.

Keywords: White head cabbage, doubled haploid lines, hybrid combinations, *Plasmiodiophora brassicae*, resistance to clubroot, inoculation.

Литература

1. Квасников Б.В., Белик Т.А. Методика оценки сортов капусты на устойчивость к киле. – М. ВАСХНИЛ., 1970. – 16 с.
2. Квасников Б.В., Антонов Ю.П. Килоустойчивость сортов и видов крестоцветных культур. – Защита растений. – 1972. – №9.
3. Маслова А.А., Ушаков А.А., Старцев В.И., Бондарева Л.Л. Результаты исследования по устойчивости растений капусты белокочанной к *Plasmiodiophora brassicae* // Овощи России. - 2014. - №1. – 68 с.
4. Методические рекомендации по выявлению устойчивости сортов овощных культур к болезням и вредителям. Л. 1985. – С.38.
5. Монахос, Г.Ф. Оценка устойчивости капусты к киле (возбудитель – *Plasmiodiophora brassicae* Wor.): уч.-метод. Пособие / Г.Ф. Монахос, Ф.С. Джалилов, С.Г. Монахос. - М.: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2009b. - 24 с.
6. Пивоваров В.Ф., Старцев В.И. Капуста, её виды и разновидности (разнообразие и способы выращивания) – М.: ВНИССОК, 2006. – 92 с.
7. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у растений рода *Brassica* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – №1. – С. 111-120.
8. Шумилина Д.В., Шмыкова Н.А., Бондарева Л.Л., Супрунова Т.П. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор капусты китайской *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Ласточка // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – №4. – 368 с.
9. Crute, I.R. Variation in *Plasmiodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops / I.R. Crute, P.C. Gray, S.T. Buczacki // Plant Breed Abstr. – 1980. – Vol. 50. – P. 91-104.
10. Dixon, G. The susceptibility of *Brassica oleracea* cultivars to clubroot / G. Dixon, D. Robinson // Plant Pathol. – 1986. – Vol. 35 - P. 101-107.
11. Donald, E.C. Integrated control of clubroot / E.C. Donald, I.J. Porter // Journal of Plant Growth Regulation. – 2009. – Vol. 28. – P. 289-303.
12. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // Plant Biotechnol. J. 2010. V.8.P. 377-424.
13. Lazar, M.D. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum*) anther culture /M.D. Lazar //Theor. Appl.