

*На правах рукописи*

МАЗУРИН ЕВГЕНИЙ СЕРГЕЕВИЧ

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА  
КАПУСТЫ И МЕРЫ ЗАЩИТЫ

специальность 06.01.11. – защита растений

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории защиты растений и на кафедре фитопатологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Джалилов Февзи Сеид-Умерович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Калашникова Елена Анатольевна

кандидат биологических наук, старший  
научный сотрудник Кузнецова Мария

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский  
институт овощеводства

Защита состоится «25»ноября 2009 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д220.043.04. при ФГОУ ВПО “Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева” по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Приглашаем Вас принять участие в работе совета или прислать свой отзыв в двух экземплярах, заверенных гербовой печатью, по адресу указанному выше.

Автореферат разослан “20” октября 2009 г. и размещён на сайте университета [www.timacad.ru](http://www.timacad.ru)

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

А. Н. Смирнов

**Актуальность темы.** Сосудистый бактериоз, вызываемый *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Pammel 1895) (Хсс), является одним из самых вредоносных заболеваний капусты. Вредоносность болезни проявляется в угнетении роста растения, снижении содержания сухого вещества, в виде прямых потерь урожая и снижении лежкости при хранении. Исследования, проведенные в Тимирязевской академии, показали, что заражение капусты сосудистым бактериозом, в период рассады, приводило к снижению массы кочанов на 24-37% (Джалилов и др., 1989) в зависимости от устойчивости сорта. Пораженность кочанов сосудистым бактериозом существенно снижает их лежкость. Это снижение через 7 месяцев хранения позднеспелых гибридов составляло 18-30%, что в 2-3 раза больше, чем потери при хранении здоровых кочанов. Кроме того, развитие сосудистого бактериоза способствует более сильному проявлению не менее опасных болезней, таких как слизистый бактериоз.

Наиболее важным источником инфекции возбудителя являются зараженные сосудистым бактериозом семена капусты (Hunter et al., 1975; Randawa et al., 1984). Поэтому использование для посева семенного материала, свободного от инфекции, является одним из самых важных элементов интегрированной защиты капусты от сосудистого бактериоза.

Тестирование зараженности семян является достаточно сложной задачей, так как возбудитель находится в семенах в небольших количествах. К тому же установлено, что достаточно 0,05% зараженных семян для того, чтобы после посева вызвать развитие эпифитотии. Таким образом, метод тестирования зараженности семян должен обладать чувствительностью, позволяющей надежно выявлять наличие не менее 5 зараженных семян в пробе из 10 тысяч семян.

Для целей обнаружения семенной инфекции используют микробиологический метод (выделение патогена на селективных питательных средах) и серологические методы (агглютинацию, ИФА, РИФ). Но наибольшей чувствительностью обладает метод молекулярно-генетической диагностики. Однако до сих пор не решена проблема поиска праймеров специфично реагирующих со всеми штаммами патогена и не дающих перекрестных реакций с другими патоварами *X. campestris*, видами ксантонад и сапротрофными бактериями, встречающимися на семенах капусты. Требуется также оптимизация методика пробоподготовки и диагностики семенного материала.

Для предотвращения распространения инфекции через семена необходимо грамотно сочетать диагностику зараженности и методы обеззараживания семян. К основным способам снижения зараженности семян можно отнести гидротермическую обработку, протравливание химическими препаратами, обработку препаратами на основе антибиотических веществ и обработку препаратами на основе антагонистических бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Известные в настоящее время методы обработки семян позволяют только снизить инфекционную нагрузку в семенном материале, но не обеспечивают 100%-ной эффективности. Поэтому поиск новых методов обеззараживания семян является приоритетной задачей в борьбе с сосудистым бактериозом.

Учитывая отсутствие эффективных против этого заболевания бактерицидов, большие надежды возлагаются на использование индукторов устойчивости.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы являлось усовершенствование приемов защиты капусты от сосудистого бактериоза.

Для достижения этой цели решали следующие задачи:

1. Изучить разнообразие популяции возбудителя по вирулентности, серологическим свойствам и генетической структуре.
2. Разработать эффективные и достоверные методы диагностики зараженности семян.
3. Сравнить эффективность различных современных препаратов против возбудителя сосудистого бактериоза капусты.

**Научная новизна.** Изучено разнообразие штаммов патогена по вирулентности, генетическим и серологическим свойствам.

Была оптимизирована методика пробоподготовки при диагностике возбудителя сосудистого бактериоза в семенах капусты

На основе подобранных праймеров разработана методика диагностики возбудителя сосудистого бактериоза методом БИО-ПЦР и ПЦР «в реальном времени».

Впервые показана способность препарата Бион повышать устойчивость капусты к сосудистому бактериозу.

**Практическая ценность работы.** Усовершенствованная методика экстракции и разработанные на ее основе БИО-ПЦР и ПЦР «в реальном времени» позволяет значительно повысить чувствительность диагностики возбудителя сосудистого бактериоза в семенах капусты. Использование ПЦР с парой праймеров Rare F1/R1 к регуляторной области гена *Cyt P450 X. campestris pv. campestris* позволяет избежать ложноположительных результатов при возможном присутствии в диагностируемом материале близкородственных бактерий рода *Xanthomonas*. Использование внутреннего контроля позволит предотвратить ложноотрицательные результаты диагностики, связанные с присутствием ингибиторов ПЦР в диагностируемом материале. Оптимизированный метод диагностики позволяет выявлять и браковать партии семян капусты, зараженные возбудителем сосудистого бактериоза на уровне 0,05%.

Впервые выявлена устойчивость новых F<sub>1</sub> гибридов компании Bejo Zaden к изолятам возбудителя сосудистого бактериоза различного географического происхождения.

По результатам исследований, рекомендована для регистрационных испытаний обработка капусты препаратом Бион, с целью повышения устойчивости к сосудистому бактериозу.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Оценка внутривидового генетического и серологического разнообразия возбудителя как основа достоверной диагностики.
2. Диагностика зараженности семян капусты сосудистым бактериозом на основе усовершенствованных методов БИО-ПЦР, ПЦР «в реальном времени» и ИФА.
3. Использование индукторов для повышения устойчивости капусты к сосудистому бактериозу.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 2007), Международной научно-практической конференции «Агротехнологии XXI века» (Москва, 2007), 59-ом Международном симпозиуме по защите растений (Гент, Бельгия), 5-ом Международном симпозиуме «по капустным» и 16-ом семинаре «по генетике капустных», (Лиллихаммер, Норвегия, 2008) и I-ой международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы» (ВНИИССОК, 2008).

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 1 статья в журнале, включенном в перечень журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов исследований, экспериментальной части, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Объем работы составляет 107 страниц. В диссертации содержится 14 рисунков и 19 таблиц. Список использованной литературы содержит 118 источников, в том числе 72 – иностранных авторов.

Автор искренне признателен директору Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева, к.с.-х.н. Монахосу Г.Ф., ведущему научному сотруднику Центра Биоинженерии РАН, д.б.н. Игнатову А.Н. и ведущему научному сотруднику ВНИИКХ им. А.Г. Лорха к.б.н. Варицеву Ю.А. за большую помощь в выполнении работы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Введение.** Обоснована актуальность темы исследования, сформулированы основная цель и задачи исследования.

### **Глава I. Обзор литературы**

В этой главе рассмотрены вопросы биологии патогена, особенности патогенеза и вредоносности. Приведены сведения о расовом составе возбудителя, основных методах его диагностики и мерах борьбы с заболеванием.

## Глава II. Методы и материалы

Работа была выполнена на кафедре фитопатологии и лаборатории защиты растений. Отдельные эксперименты были проведены в ВНИИ картофельного хозяйства.

Сбор растительного материала капусты для изоляции патогена проводили в 2006-2008 годах в овощеводческих хозяйствах. Растительный материал промывали водой в течение 1 часа и стерилизовали поверхность, погружая в раствор Жавель-Клейда 1 табл. /3 л воды (CLADE S.A., Франция), на 5-15 мин. Часть коллекции возбудителя сосудистого бактериоза была предоставлена лабораторией бактериальных болезней растений ГНУ ВНИИ фитопатологии РАСХН.

Оценку вирулентности 78-ми штаммов и изолятов коллекции *X.campestris* pv. *campestris* проводили инокуляцией растений F<sub>1</sub> гибрида капусты СБ-3, которые выращивали в зимней остекленной теплице при температуре +27...+32<sup>0</sup>С днем и +15<sup>0</sup>С...+20<sup>0</sup>С ночью. Инокуляцию проводили методом укола в жилку листа препаравальной иглой, предварительно смоченной в суспензии клеток патогена в концентрации 10<sup>6</sup> колоний-образующих единиц в миллилитре (КОЕ/мл). Учеты проводили на 10-12 сутки после заражения.

Коллекцию изолятов и штаммов бактерий хранили двумя способами: в стерильной воде при +4<sup>0</sup>С и 15%-ном глицерине при -70<sup>0</sup>С.

Изучение расового состава возбудителя проводили с использованием набора сортов-дифференциаторов описанного Kamoun (1992) и Vicente (2001), который включал репу *Brassica rapa* «Just Right» F<sub>1</sub>, «Tokyo Cross» F<sub>1</sub>, и «Seven Green Top», горчицу сарепскую *Brassica juncea* L. «Florida Broad Leaf Mustard», абиссинскую капусту PI 199947. Селекционной станцией РГАУ-МСХА имени Н.Н. Тимофеева были предоставлены семена линий капусты ПЕБ1-764, Б21-PI 436606. В качестве восприимчивого контроля использовали сорт цветной капусты Гарантия.

Каждым изолятом инокулировали по 2-3 листа на растении и не менее 3 растений каждого дифференциатора. Наличие или отсутствие типичных симптомов сосудистого бактериоза на растениях-дифференциаторах учитывали через 12-18 дней после заражения.

Изучение устойчивости новых гибридов белокочанной капусты голландской компании Vejo Zaden (Нидерланды) Vejo 2660, Invento F1, Vejo 2659, Jubilee F1, и Bronco (эталон) проводили на искусственном инфекционном фоне. В фазе 3-5 настоящих листьев суточной культурой патогена проводили инокуляцию не менее чем в 16 точках каждым из штаммов или изолятов. Учет проводили через 12 суток. Учитывали процент успешных заражений по отношению к общему числу точек инокуляции, рассчитывали эффект устойчивости по отношению к восприимчивому контролю (сорт Гарантия).

Выделение ДНК проводили по методике ранее описанной Цыганковой с соавторами (Tsygankova et al., 2004).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) стандартная реакционная смесь содержала 75 мкМ Трис-НСl, рН 8.8; 20 мкМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

0.01% Твин 20; 200 мкМ каждого dNTP; 20 пМ каждого праймера; 2 мкМ MgCl<sub>2</sub>; 1 единицу Smar Taq ДНК полимеразы (Диалат, Москва) и 2 нг целевой ДНК. Окончательный объем смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих температурно-временных параметрах: начальная денатурация (96°C, 15 мин), 35 циклов, включая денатурацию (95°C, 1,5 мин), отжиг (50°C, 60 сек), и элонгацию (72°C, 1 мин) и дополнительную одиночную элонгацию (72°C, 15 мин). ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Москва).

Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. ПЦР «в реальном времени» проводили в термоциклере Cepheid Smart Cycler II (США).

Иммунизацию кроликов для получения иммуноглобулинов проводили суточной культурой возбудителя (изоляты Dasch-2, Vel-5 и Bun-2) в концентрации 10<sup>9</sup> кл/мл в стерильном 0,9%-ном растворе NaCl. Непосредственно перед инъекциями клетки центрифугировали 10 мин при 14000g и ресуспендировали в физрастворе. Первую инъекцию проводили подкожно в область холки, вводя 1 мл суспензии с равным количеством неполного адьюванта Фрейнда. Через три недели делали серию внутривенных инъекций с 3-х суточным интервалом, используя 0,3 мл, 0,5 мл, 1 мл, 2 мл антигена соответственно. Через 10 дней после последней иммунизации брали кровь из ушной вены в мерные цилиндры. Отбирали сыворотку и консервировали мертиолятом натрия (0,2 мг/мл).

Иммуноглобулины выделяли на хроматографической колонке, заполненной аффинным сорбентом – А-белком *Staphylococcus aureus*, иммобилизованным на сефарозе (Егоров и др., 1991) на базе биотехнологического центра ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха.

Титр полученных антисывороток определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ослиных антител против глобулинов кролика, меченных пероксидазой производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея (г. Москва). Конъюгат иммуноглобулинов с пероксидазой хрена получали методом периодатного окисления. Для стабилизации основания Шиффа конъюгат обрабатывали боргидридом натрия (Nakane, 1980).

Оптимальную концентрацию конъюгата для постановки ИФА подбирали отдельно на чистой культуре Хсс в сравнении с фоновыми значениями (сапротрофная микрофлора с поверхности семян капусты и чистая культура *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). За положительную реакцию принимали значения, превышающие порог достоверных результатов (P), который рассчитывали по формуле:  $P = X + 3E$ , где X – средний показатель экстинкции в отрицательном контроле, E – максимальное отклонение от средней в отрицательном контроле. Оптимальной считали такую концентрацию конъюгата, при которой наблюдаются максимальные значения экстинкции для *X. campestris* pv. *campestris*, при этом фоновые значения для экстрактов здоровых семян были менее 0,1.

При постановке ИФА использовали методику, адаптированную для идентификации бактерий (Варицев Ю.А. и др., 2003). Оптическую плотность продукта ферментативной реакции в ИФА измеряли с помощью вертикального микропланшетного фотометра (Bio-Rad, модель 680) при длине волны 490 нм.

Постановку реакции двойной иммунодиффузии в агаре проводили по стандартной методике (Воробьева, 2006). Антигены готовили фенольным методом (De Boer et al., 1979).

Заражение семян проводили в условиях вакуума (-1,01 бар, 1 мин) суспензией *X. campestris pv. campestris* в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл, из расчета 100 мкл суспензии на 1000 семян. Зараженные семена хранили при +4<sup>0</sup> С.

Статистическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа с использованием программы STRAZ. Проверку допустимости проведения дисперсионного анализа оценивали по критерию Тьюки.

### **Глава III. Изучение изменчивости популяции *Xanthomonas campestris pv. campestris*.**

**3.1. Расовый состав популяции патогена и устойчивость новых гибридов белокочанной капусты компании Vejo Zaden (Нидерланды).** Результаты заражений набора растений-дифференциаторов по Kamoun et al. (1992) показали, что большинство испытанных штаммов и изолятов принадлежат к расе 1. Раса 1 была представлена как штаммами и изолятами зарубежного происхождения, так и отечественного. К ней относились большинство изолятов из республики Беларусь. Раса 0 не обнаружена среди изолятов из Московской области. К расе 0 принадлежал один изолят из Белоруссии, один из Австралии и один из США. Штаммы расы 3 были обнаружены в Московской, Ленинградской, Тульской областях, а также Японии и США. Лишь один штамм из Германии был определен как раса 4. Среди штаммов и изолятов изучаемой коллекции раса 2 обнаружена не была.

Использование новых растений-дифференциаторов позволило разделить известные расы по признаку вирулентности. Было показано, что дифференциаторы по Kamoun (1992) YRT, Seven Top Green и FBLM не достаточны для точной характеристики вирулентности изолятов патогена. Существующая система расовой дифференциации должна быть усовершенствована с учетом новых растений несущих гены устойчивости к сосудистому бактериозу и способных дополнительно дифференцировать популяцию патогена. К таким растениям следует отнести линию АМФ4ПЕБ, которая в отличие от FBLM не поражалась расой 0. Наиболее устойчивыми к сосудистому бактериозу оказались *B. juncea* L. «Florida Broad Leaf» и линия *B. carinata* PI 199947. Лишь несколько представителей имеющейся коллекции возбудителя сосудистого бактериоза были способны преодолеть гены устойчивости данных растений. Это позволяет рекомендовать их как наиболее перспективные доноры устойчивости для селекции новых сортов и гибридов на устойчивость к сосудистому бактериозу. Установлено, что устойчивость у этих



генотипов контролируется геном Rb, находящимся в хромосоме генома В (Ignatov et al., 1999, 2000).

Результаты инокуляции гибридов устойчивых к сосудистому бактериозу показали, что они заражались одними штаммами и изолятами и не заражались другими. Это указывает на то, что устойчивость данных гибридов вертикального типа и контролируется одним или несколькими генами устойчивости. Так 6 штаммов и изолятов расы 1 не смогли вызвать заражение гибрида Вежо 2660, а 13 штаммов и изолятов той же расы вызывали сильное заражение. Аналогичную картину наблюдали при заражении расой 1 по Камуи другого гибрида Вежо 2659. Соотношение штаммов и изолятов способных или неспособных вызвать заражение было 13 и 6 соответственно, но состав этих групп был разным.

При инокуляции F<sub>1</sub> гибридов Jubilee и Invento было обнаружено, что они гораздо меньше поражались наиболее распространенной во многих странах (Ignatov et al., 1998; Vicente et al., 2001) расой 1, чем гибриды упомянутые выше. Так соотношение вирулентных и авирулентных штаммов и изолятов здесь составляло 7 и 12 соответственно.

Некоторые штаммы и изоляты расы 3 по Камуи (1992) практически не вызывали заражения устойчивых гибридов (изоляты Вун 1 и 2), однако штаммы Т<sub>5</sub> и 11386, также относящиеся к расе 3, вызывали сильное заражение почти всех изучаемых гибридов. Такие же неоднозначные результаты были получены при инокуляции растений штаммами расы 0. Штаммы *X. campestris* pv. *campestris* 53-4 и Bel 8 преодолевали устойчивость всех F<sub>1</sub> гибридов кроме Вронсо, а штамм 11392 вызывал заражение только F<sub>1</sub> гибрида Invento.

Анализируя полученные результаты можно заключить, что существующая система дифференциации рас возбудителя сосудистого бактериоза не полностью отражает реальную картину взаимодействия изолятов патогена и генотипов растений устойчивых к нему. F<sub>1</sub> гибриды Вежо Zaden меньше поражались изолятами, выделенными на территории РФ, чем имеющими зарубежное происхождение. Гибриды F<sub>1</sub> Jubilee и F<sub>1</sub> Invento не поражались изолятами, выделенными в Московской области.

**Генетическое и серологическое разнообразие.** Для проведения ДНК-фингерпринтинга использовали праймер С-152 5'-CTGGCGGCTG-3'.

Расстояние между штаммами определяли методом Сити-блок, который использовался для данных такого рода в предыдущих исследованиях (Игнатов, Поляков и др., 1998). В результате ПЦР анализа было получено 52 полиморфных фрагмента.

С помощью кластерного анализа штаммы были разбиты на 3 группы и 4 подгруппы (рис. 1) – 1а, 1б, 2, 3а и 3б), не отличавшихся по патогенности.

Группа 1 включала подгруппу 1а - 18 штаммов из Московской области и штаммы 53-4 и Егуса из дикорастущих капустных, США, и подгруппу 1б - 8 штаммов из Краснодарского края и республики Белорусь.

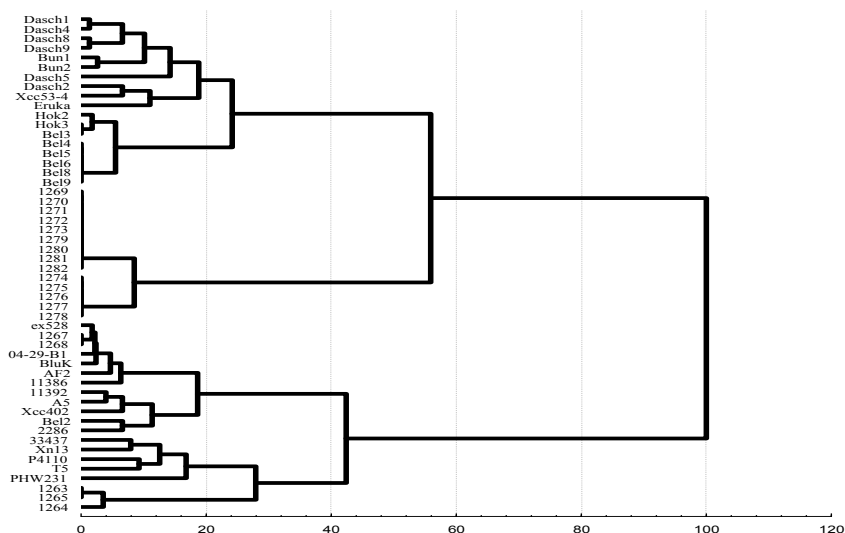


Рис. 1. Кластерный анализ методом Уарда (Ward's) генетических расстояний (% совпадения спектра фрагментов), полученных при RAPD-ПЦР анализе с праймером С-152 для 52 штаммов *X. campestris pv. campestris*

Группа 2 включала 14 штаммов из Краснодарского края. Группа 3 также состояла из 2 подгрупп: 3а – штаммы из Краснодарского края, республики Беларусь, Великобритании, США, и Германии, относящиеся к серотипу 3 (Alvarez et al., 1994). Типовой штамм NCPPB528T (#2286) и мутант расы 6, полученный из типового штамма (ex528) также были отнесены к этой подгруппе. В подгруппу 3b вошли штаммы из Краснодарского края, США, Японии и Германии, относившиеся к серотипу 1.

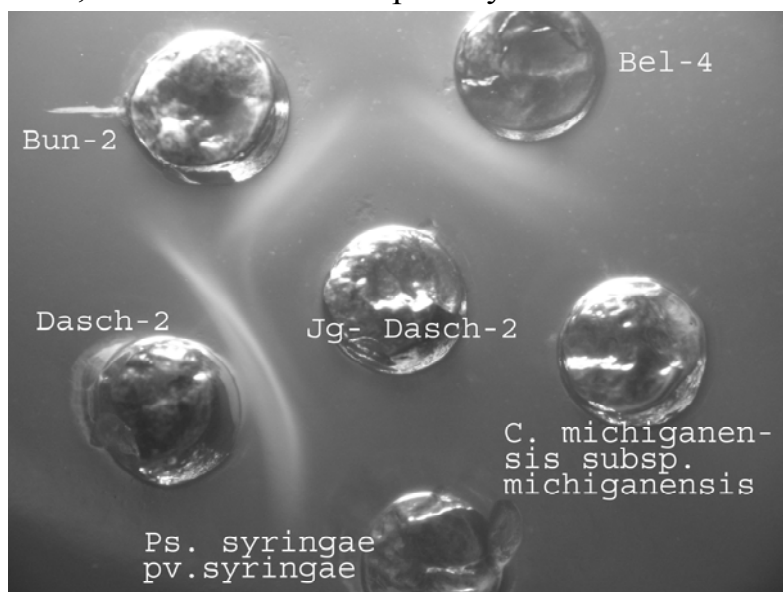


Рис. 2. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре. В центре антисыворотка, полученная к изоляту Dasch-2; В периферических лунках – антигены изолятов *X. campestris pv. campestris*: Dasch-2, Bel-4 и Bun-2 и отрицательные контроли – штамм *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* и штамм *Pseudomonas syringae pv. syringae*

Качественные антигенные различия между штаммами оценивали по характеру дуг преципитации в реакции двойной иммунодиффузии в агаре 38 штаммов и изолятов ксантомонад с тремя антисыворотками.

Кластерный анализ, проведенный методом Уарда (Ward's) для расстояний между реакцией штаммов, определенных методом Сити-блок показал наличие 4-х групп штаммов. Первая группа включала штаммы из Московской области (Vun), Хок, Великобритании (1279a), Германии и США. Вторая группа включала ряд штаммов из Московской области (Vun), Белоруссии и США.

Третья группа включала большинство штаммов из Белоруссии, а также отдельные из США, Японии и Австралии. Четвертая группа объединяла в большинстве штаммы зарубежного происхождения из Германии, США, Японии и два штамма из Московской области (Vun-1 и Vun-3).

Изучение матрицы сходства штаммов по реакции трех антисывороток методом факторного анализа выявило действие двух главных факторов, определявших 47 и 34% общей изменчивости реакции штаммов (вместе 81%). Первый фактор достоверно положительно влиял на реакцию антисыворотки против штамма Vun-2 (коэф. корреляции 0,77), и отрицательно – на реакцию сыворотки против штамма Dasch-2 (-0,87). Вторым фактор достоверно коррелировал с реакцией антисыворотки против штамма Bel-5 (0,96).

Важно, что в целом не наблюдалось достоверной корреляции между серологической и генетической группировкой штаммов, хотя некоторые из них показывали близкие генетические и серологические свойства: 04-29-81 и NCPPB528T, 33436 и Xn-13, и видимо принадлежали к одним и тем же клональным группам.

Молекулярно-генетический анализ (ПЦР-фингерпринтинг) отличался большей информативностью и позволял дифференцировать как различные виды ксантомоад, так и группы внутри одного вида (Alvarez et al., 1994, Tsygankova et al, 2004, Ignatov, et al 2007). Набор фрагментов ДНК, получаемых при ПЦР-фингерпринте, является качественной характеристикой исследуемых бактерий, и состоит из видо-, группоспецифичных и уникальных для каждого штамма фрагментов, которые могут быть секвенированы и переведены в специфичные молекулярные маркеры соответствующего таксономического уровня.

## ГЛАВА IV. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА

### 4.1. Молекулярно-генетические методы диагностики

**Подбор и проверка ПЦР праймеров, специфичных для *X. campestris pv. campestris*.** При конструировании праймеров специфичных для *X. campestris pv. campestris* были использованы следующие мишени в геноме патогена: консервативный протеин XC1533, межгенный регион гена OAR и гена пиррофосфорилазы, рибосомный протеин, регуляторная область гена цитохрома P450 и tonB. При изучении специфичности праймеров, тестировали несколько контрастных генотипов патогена, и в дальнейшем отобранные праймеры тестировали против всей коллекции патогенных для капусты штаммов *X. campestris pv. campestris* и других представителей рода *Xanthomonas* вызывающих заболевания сои, томата, подсолнечника и других культур.

Таким образом, в результате проведенной оценки специфичности реакции 11 пар праймеров, были отобраны праймеры Rare F1/R1, которые давали положительный результат с 78 штаммами сосудистого бактериоза и не давали положительных реакций с 21 штаммами близкородственных видов.

Полученные результаты позволяют рекомендовать использование данной пары праймеров в ПЦР для точной видовой диагностики возбудителя сосудистого бактериоза.

**Создание мультиплексной диагностики возбудителя сосудистого бактериоза.** В нашей работе была изучена возможность амплификации трех мишеней в геноме *X. campestris pv. campestris*. Первая мишень – специфическая к регуляторной области гена цитохрома P450, амплифицируемая при помощи праймеров Rare F1/ Rare R1 (размер продукта 397 п.о.). Вторая мишень – характерная для широкого круга бактерий последовательность 16S, праймеры rRNA346F/ 765R размером 458 п.о. (<http://bioinformatics.psb.ugent.be>). Третья мишень – специфичная для всех бактерий рода *Xanthomonas* (размер продукта 623 п.о.) межгенного участка Xcc0007-tonB (Tsygankova et al., 2004), амплифицируемая при помощи праймеров Xnth804F/1405R. Специфичность ее была проверена на всех штаммах возбудителя сосудистого бактериоза и других близкородственных видах.

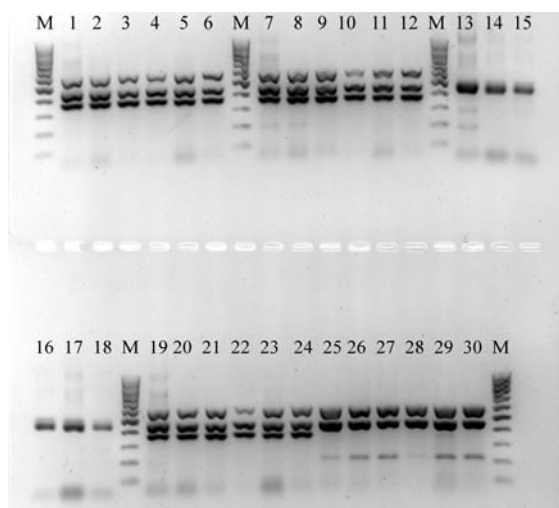


Рис.3. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР ДНК: *X. campestris pv. campestris* штамм Ус-2 (дорожки 1 – 6), *X. campestris pv. campestris* штамм Blu-К (дорожки 7 – 12), *X. campestris pv. campestris* штамм РНW 231 (19 – 24); *X. glycinea* штамм 1-53 (дорожки 25 – 30). Контроль вода – дорожки 13-18. Смесь праймеров rRNA349F/765R+ Xnth804F/1405R + Rare F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> была взята в следующих соотношениях соответственно, pmol/25µl:– 10+10+10 (дорожки 1, 7, 13, 19, 25); 10+10+20 (дорожки 2, 8, 14, 20, 26); 5+10+20 (дорожки 3, 9, 15, 21, 27); 5+5+10 (дорожки 4, 10, 16, 22, 28); 10+20+20 (дорожки 5, 11, 17, 23, 29); 10+15+20 (дорожки 6, 12, 18, 24, 30). М – маркер молекулярных размеров 100 kb.

Комбинация из двух пар праймеров Rare F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> и Xnth804F/1405R может позволить безошибочно диагностировать возбудителя сосудистого бактериоза и отличать его от других даже близкородственных видов рода *Xanthomonas*, которые могут теоретически присутствовать в семенном материале.

Результаты, представленные на рис. 3 свидетельствуют, что амплификация с тремя парами праймеров не сильно зависит от соотношения их концентраций. Поэтому можно предложить использовать вариант 5+5+10 pmol/25µl каждого из праймеров rRNA349F/765R + Xnth804F/1405R + Rare F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> соответственно, что существенно снижает расходы реактивов при постановке ПЦР. ПЦР с ДНК близкородственного вида подтвердила, что этот штамм относится к роду *Xanthomonas*, но не является возбудителем сосудистого бактериоза (отсутствие нижнего фрагмента на дорожках 25-30).

**Оптимизация ПЦР «в реальном времени» при диагностике и количественной оценке возбудителя сосудистого бактериоза.** Задачами данного раздела нашей работы были разработка, проверка и оптимизация протокола ПЦР «в реальном времени». К специфичному участку *X. campestris pv. campestris* амплифицированного парой праймеров Rare F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub>, была подобрана проба (зонд) меченая с 5'-конца красителем FAM, а с 3'-конца гасителем флуоресценции BHQ1. Проба была подобрана к паре праймеров Rare F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub>. Реакционная смесь составляла: 75 мкМ Трис-НСl, рН 8.8; 20 мкМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Твин 20; 200 мкМ каждого dNTP; 10 пМ каждого праймера; 4 мкМ MgCl<sub>2</sub>; 1 единицу Taq ДНК полимеразы и 2 нг целевой ДНК. Количество пробы и температурно-временные параметры амплификации подбирали экспериментальным путем. Окончательный объем смеси составлял 25 мкл.

В ходе работы была оптимизирована ПЦР «в реальном времени» со следующими температурно-временными показателями амплификации: предденатурация 95<sup>0</sup>С – 5 мин, 40 циклов денатурация 94<sup>0</sup>С – 15 сек, отжиг праймеров 68<sup>0</sup>С 20сек, элонгация 72<sup>0</sup>С 20сек. Оптимизированный метод ПЦР «в реальном времени» при диагностике возбудителя сосудистого бактериоза позволял определить 2000 КОЕ/мл при тестировании чистой культуры.

**Разработка протокола БИО-ПЦР анализа и сравнение чувствительности БИО-ПЦР и прямого ПЦР анализа.** Первоначально нами было показано, что экстракты некоторых партий капусты были способны ингибировать ПЦР (табл.1).

Таблица 1

Прямая ПЦР ДНК Хсс штамма Тлю-1 с праймерами Rare F1/R1

Вариант	Повторность	Результат ПЦР
Вода	1	-
Вода + ДНК Хсс	1	+
	2	+
	3	+
Семенной экстракт	1	-
	2	-
	3	-
Семенной экстракт + ДНК Хсс	1	-
	2	-
	3	-

Для разработки протокола БИО-ПЦР было испытано 4 среды разного состава, содержащие в качестве селективирующего фактора антибиотик гентамицин в концентрации 8 мг/л. Эксперименты проводили на экстрактах здоровых семян, полученных по оптимизированной нами методике с добавлением известного количества клеток патогена.

По результатам учета оптимальной средой для БИО-ПЦР была отобрана среда КАА (на 1л: крахмал – 15г; дрожжевой экстракт – 5г; глюкоза – 2г; агар-агар – 18г; гентамицин – 8 мг)

При сравнении диагностики прямой и БИО-ПЦР было установлено, что метод БИО-ПЦР был в 10 раз чувствительнее прямой ПЦР. Предварительное нагревание образца 15 мин при +95<sup>0</sup>С позволяло увеличить чувствительность в 100 раз в варианте прямой ПЦР. При использовании среды КАА на 2-е сутки инкубации сапротрофы не обнаруживались, поэтому нагревание образца и время смыва не влияли на чувствительность диагностики. Отсюда можно сделать вывод о том, что селективность среды для БИО-ПЦР имеет большее значение, чем предварительное нагревание образца и время инкубации на среде до смыва.

Минимальный предел чувствительности БИО-ПЦР наблюдался при использовании среды КАА и составлял примерно 4 КОЕ/мл.

**Сравнение чувствительности оптимизированной БИО-ПЦР и оптимизированной ПЦР «в реальном времени».** Зараженные семена добавляли к здоровым в пропорции 1:100; 1:500; 1:1000; 1:10000. В качестве отрицательного контроля использовали здоровые семена капусты. Готовили экстракты из семян и на последнем этапе экстракции сравнивали влияние центрифугирования на чувствительность методов диагностики.

Результаты показали, что БИО-ПЦР оказался в несколько раз достовернее ПЦР «в реальном времени». Особенно эти различия видны при низких уровнях зараженности семян. Так ПЦР «в реальном времени» была способна подтвердить только 23% положительных результатов, полученных при помощи БИО-ПЦР. А чувствительность оптимизированной БИО-ПЦР позволила диагностировать партии семян зараженность 0,01%, т.е. соответствует требованиям (Schaad, Sitterly, Humaydan, 1980) по тестированию сосудистого бактериоза в семенном материале. Чувствительность БИО-ПЦР не сильно зависела от этапа центрифугирования, а значительно возрастала при нагревании образца.

**4.2. Оптимизация использования иммуноферментного анализа для диагностики возбудителя сосудистого бактериоза в семенах капусты.**

Для получения поликлональных антител использовали три изолята: *X. campestris pv. campestris* Bel-5, Dasch-2 и Bun-2, выделенные в 2006 году соответственно в республике Беларусь, Серпуховском и Дмитровском районах Московской области. Для количественной оценки зараженности семян готовили партии семян с преформированной зараженностью – 0%, 10%, 50%, 70%, 100% в 3-х кратной повторности. Семена помещали в колбы с охлажденным стерильным 0,9%-ным раствором NaCl (физраствор) с

добавлением Твин-20 (20 мкл/10 мл) из расчета 10 мл на 1000 семян. Выдерживали 15 мин при 4<sup>0</sup>С, встряхивали на шейкере 15 мин при 210 об/мин. Отбирали 1 мл экстракта и хранили при -20<sup>0</sup>С до постановки ИФА. Для сравнения чувствительности ИФА при диагностике патогена в буфере и семенном экстракте при помощи метода серийных разведений получали экстракты семян с известным содержанием КОЕ патогена. Для сравнения экстракционной способности различных растворов использовали дистиллированную воду, физраствор и фосфатно-солевой буфер (ФСБ) рН 7,2 (Методы бактериологии, 1983). Для изучения влияния ультразвука и центрифугирования на экстракцию бактерий с семян капусты были сформированы два образца семян с зараженностью 10 и 30%, которые помещали в охлажденный ФСБ рН 7,2 и обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 4 мин с интенсивностью ультразвука 35 кГц. Далее экстрагировали 30 мин по описанной выше методике. В качестве контроля использовали экстракты без воздействия ультразвука. Отдельные варианты экстрактов центрифугировали при 14000g в течение 10 мин, отбирали супернатант, а осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера и далее использовали для постановки ИФА. Более высокие значения экстинкции в этом случае указывали на повышение экстрагируемости бактерий из семян.

Результаты постановки ИФА с экстрактами семян с различной степенью зараженности показали, что при росте зараженности семян в интервале 0-32% наблюдался экспоненциальный рост оптической плотности продукта ферментативной реакции ИФА. При зараженности свыше 32% такой зависимости не наблюдалось. В связи с этим оптимизацию методики подготовки проб в дальнейшем проводили на партиях семян с зараженностью в указанном выше интервале.

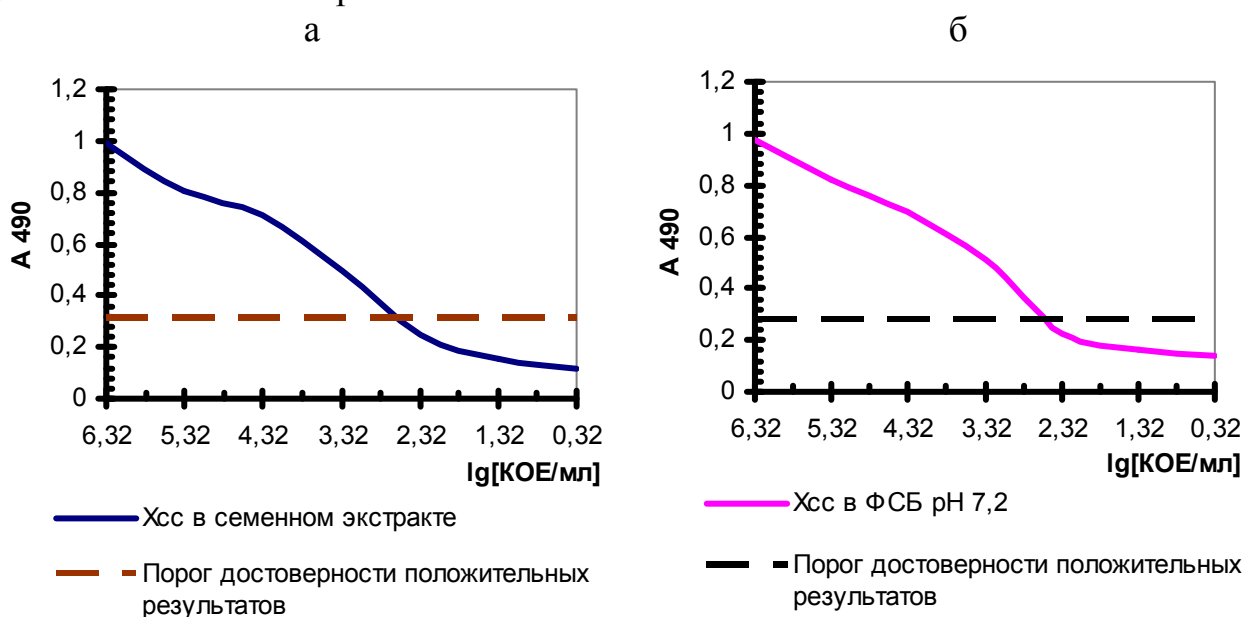


Рис.4. Чувствительность ИФА при диагностике возбудителя сосудистого бактериоза в семенном экстракте (а) и ФСБ рН 7,2 (б)

Сравнение кривых зависимости оптической плотности продукта ИФА от содержания числа КОЕ патогена в буфере ФСБ рН 7,2 и семенном экстракте показало их значительную схожесть (рис.4). Пороги достоверности результатов в этих двух средах оказались практически одинаковы. Метод позволял обнаружить  $3,7 \times 10^2$  КОЕ/мл. Полученные результаты позволяют сделать вывод о высокой специфичности полученных нами иммуноглобулинов, т.е. не наблюдалось повышение «фона» реакции за счет взаимодействия отдельных иммуноглобулинов и антигенов сапротрофной микробиоты семенного экстракта. Не было также обнаружено ингибирующего действия семенного экстракта на результаты ИФА.

При изучении экстрагирующей способности разных растворов (табл. 2) было установлено достоверное влияние обоих изучаемых факторов: времени экстракции и экстрагирующего раствора на оптическую плотность продукта ИФА. Наилучшая экстракция обеспечивалась при использовании 30 минутной продолжительности встряхивания в ФСБ рН 7,2. Экстракционная способность дистиллированной воды и физраствора были достоверно хуже. Так через 30 мин экстракции были получены следующие значения экстинкции при  $A_{490}$ : ФСБ рН 7.2 – 0,475; физраствор – 0,328, дистиллированная вода – 0,429.

Таблица 2

Экстракционная способность ФСБ рН 7.2, физраствора и дистиллированной воды

Варианты растворов (фактор А)	Время экстракции, мин (фактор Б)						Средние по фактору А $НСР_{05} = 0,030$
	1	5	15	30	45	60	
дист. вода	0,325	0,406	0,420	0,429	0,334	0,321	0,372
физраствор	0,279	0,315	0,305	0,328	0,333	0,321	0,313
ФСБ рН=7,2	0,386	0,388	0,432	0,475	0,430	0,375	0,414
Средние по фактору Б $НСР_{05} = 0,023$	0,330	0,362	0,385	0,410	0,365	0,339	-

$НСР_{05}$  для частных различий = 0,035

Обработка ультразвуком и центрифугирование семенного экстракта при двух уровнях зараженности семян 10 и 30% показали, что оба испытанных приема достоверно увеличивали экстракцию бактерий по сравнению с контролем. В случае анализа партии семян с 30%-ной зараженностью, обработка ультразвуком давала лучшие результаты по сравнению с центрифугированием. При 10%-ной зараженности семян, между этими двумя методами не было существенных различий. Использование одновременно ультразвуковой обработки и центрифугирования не давало аддитивного эффекта, по сравнению с одной ультразвуковой обработкой при обоих уровнях зараженности семян. Поэтому возможно использование или центрифугирования или ультразвука.

Исходя из полученных результатов, оптимальным вариантом подготовки пробы является экстракция семян в фосфатно-солевом буфере рН 7.2 с



предварительной обработкой ультразвуком (можно заменить центрифугированием).

Оценка чувствительности оптимизированного метода диагностики возбудителя сосудистого бактериоза в семенах при помощи ИФА показала возможность обнаруживать партии при зараженности более 2%.

## ГЛАВА V. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИЕМОВ ЗАЩИТЫ ОТ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КАПУСТЫ

**5.1. Обработка семян.** Сравнение эффективности препаратов Гамаир, Ж и Фитолавин-300 для предпосевного протравливания семян капусты проводили путем замачивания. Изучение биологической эффективности биопрепаратов проводили на семенах капусты F<sub>1</sub> гибрида Старт и сорта Доброводская, предварительно инокулированных возбудителем сосудистого бактериоза. Инокулированные семена замачивали в рабочем растворе препаратов на 2 часа, используя следующие варианты – Гамаир, 1%, Гамаир, 2%, Фитолавин-300, 0,2%. В качестве положительного контроля зараженные семена замачивали в воде. Для отрицательного контроля в воде замачивали семена свободные от инфекции. После обработки семена подсушивали на фильтровальной бумаге и раскладывали на среду КАА. Повторность опыта 4-х кратная по 50 семян в каждой повторности. Учет проводили на 2-е сутки, визуально определяя гидролиз крахмала вокруг каждого семени типичный для роста возбудителя сосудистого бактериоза.

Таблица 3

Эффективность протравливания семян капусты методом предпосевного замачивания

Варианты	F <sub>1</sub> Старт		сорт Доброводская	
	Зараженность семян, %	Биологическая эффективность, %	Зараженность семян, %	Биологическая эффективность, %
Контроль здоровые семена	0	-	0	-
Контроль зараженные семена	24,0	-	26,8	-
Гамаир, 1%	<b>7,0*</b>	70,8	<b>7,0*</b>	73,9
Гамаир, 2%	<b>2,5*</b>	89,5	<b>8,5*</b>	68,2
Фитолавин-300, 0,2%	<b>2,0*</b>	91,6	<b>4,5*</b>	83,2
НСР <sub>05</sub>	2,5	-	5,6	-

\* - значения, статистически достоверно отличающиеся от контроля

Как видно из табл. 3 зараженность семян по сравнению с контролем после обработки семян F<sub>1</sub> гибрида Старт снижалась в 3 раза при замачивании в 1%-ном растворе Гамаир и почти в 10 раз при замачивании 2%-ном растворе Гамаира. Биологическая эффективность протравливания в препарате

Фитолавин-300 была более высокая и составляла 91%. Аналогичную картину наблюдали при обработке семян сорта Доброводская. Обработка препаратами 2% Гамаир, 2% и Фиталавин-300, 0,2% показали несколько меньшую эффективность.

Таким образом, все испытываемые препараты показали высокую биологическую эффективность при обработке зараженных семян, но не обеспечивали полного уничтожения возбудителя сосудистого бактериоза.

Эффективность ГТО (гидротермической обработки) сравнивали с обработкой сухим жаром в термостате. Были выбраны следующие варианты обработок: 1. ГТО 52<sup>0</sup>С в течение 20 мин; 2. 40<sup>0</sup>С – 1 сут. + 75<sup>0</sup>С – 5 суток; 3. 52<sup>0</sup>С – 3 сут. + 78<sup>0</sup>С-1 сут.; 4. 52<sup>0</sup>С – 3 сут. + 78<sup>0</sup>С-1 сут.; 5. 78<sup>0</sup>С-1 сут. ГТО проводили в водяной бане с последующим охлаждением семян в холодной воде. Семена высушивали на фильтровальной бумаге до состояния полной сыпучести. Обработку сухим жаром проводили в термостате (Binder, Германия). Часть семян отбирали для оценки посевных качеств. Семена раскладывали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. Посевные качества определяли по ГОСТу 12038-84.

Оценку зараженности семян проводили путем ИФА с предварительно раскладкой семян на чашки Петри со средой КАА (глава IV пункт 4.1.). Через двое суток вокруг семени вырастали колонии бактерий, которые отбирали стерильными зубочистками и суспензировали в 200 мкл стерильного физраствора. Далее 10 мкл суспензии использовали в ИФА (методика описана в главе II).

Таблица 4

Эффективность режимов обработки сухим жаром семян капусты против сосудистого бактериоза и влияние их на посевные качества.

№ п/п	Варианты	Посевные качества, %		Эффективность обработки, %	
		Энергия прорастания	Лабораторная всхожесть	Зараженность семян	Биологическая эффективность**
1	Контроль	79,0	86,3	52,9	-
2	ГТО 52 <sup>0</sup> С 20мин	<b>41,3*</b>	<b>64,3*</b>	<b>2,35*</b>	95,5
3	40 <sup>0</sup> С – 1 сут. + 75 <sup>0</sup> С – 5сут.	<b>63,8*</b>	<b>79,8*</b>	42,2	-
4	52 <sup>0</sup> С – 3 сут + 78 <sup>0</sup> С-1 сут.	<b>73,5*</b>	83,2	58,9	-
5	78 <sup>0</sup> С-1 сут.	<b>70,2*</b>	82,8	49,4	-
	НСР <sub>05</sub>	4,64	3,89	10,8	-

\* - значения, статистически достоверно отличающиеся от контроля

\*\* - рассчитывали только для вариантов, статистически достоверно отличающихся от контроля

Как видно из табл. 4, гидротермическая обработка семян существенно снижала зараженность сосудистым бактериозом (биологическая эффективность – 95,5%). Обработка семян капусты сухим жаром не влияла на посевные качества в вариантах обработок 52<sup>0</sup>С – 3 сут. + 78<sup>0</sup>С – 1 сут. и 78<sup>0</sup>С – 1 сут., но

при этом не оказывала достоверного снижения зараженности семян сосудистым бактериозом.

**5.2. Обработка вегетирующих растений.** Сравнение эффективности различных препаратов проводили в вегетационных и полевых экспериментах. В вегетационном опыте июня 2008 г растения F<sub>1</sub> гибрида Трансфер выращивали в 0,5 л вазонах с верховым торфом в зимней остекленной теплице. В фазу 3-4 настоящих листьев проводили опрыскивание препаратами Нарцисс С 0,5%, Лариксин 0,015%, Бион 0,01% за 4 суток до инокуляции, а препаратом Гамаир 1%, 2% через 8 часов после инокуляции. В контрольном варианте растения опрыскивали водой. Инокуляцию проводили суточной культурой патогена в концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл методом укола препаравальной иглой в жилку листа. Учеты проводили через 14 суток после инокуляции. Учитывали длину некроза сосудов, число успешных заражений и надземную массу растений. Схема эксперимента включала 6 вариантов в 6-ти кратной повторности по 5 растений в каждой.

Эксперимент повторяли в июле-августе 2008 г. По аналогичной методике. Опыт включал 5 вариантов в пятикратной повторности по 8 растений в каждой.

Полевой опыт закладывали, используя килоустойчивый F<sub>1</sub> гибрид Текила. В середине июля проводили обработку препаратами Лариксин 0,015%, Бион 0,01%, *B. subtilis* изолят G8, 2% (коллекция лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА) за 4 суток до инокуляции, а препаратом Гамаир Ж, 2% через 8 часов после инокуляции. Последующие 3 обработки проводили с интервалом 10 суток. Инокуляцию проводили суточной культурой патогена в концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл методом укола препаравальной иглой с жилку листа. Учеты проводили в конце сентября. Учитывали балл поражения по шкале Студенцова (1971). После рассчитывали развитие болезни, массу кочанов при уборке. Далее закладывали урожай на хранение и через 2 месяца учитывали естественную убыль и абсолютный отход (Широков, 1985).

Для доказательства отсутствия прямого ингибирования самого возбудителя болезни проводили эксперимент в условиях *in vitro*. Для этого в питательную среду YDC добавляли выше указанные препараты, в таком количестве, чтобы их конечная концентрация в среде была равна рабочей концентрации при опрыскивании. Контрольный вариант – среда без добавления препаратов. После разливали в чашки Петри и прикладывали к поверхности агара петлю суточной культуры. На 5 сутки измеряли диаметр выросшей колонии в месте прикосновения петлей. Опыт проводили в 5-ти кратной повторности по 2 чашки в каждой.

Результаты сравнительного испытания препаратов в первом вегетационном опыте показали, что наиболее эффективным из них оказался препарат Бион, который снижал проникновение патогена по сосудам в 1,5 раза по сравнению с контролем. Число успешных заражений достоверно снижалось при опрыскивании Гамаиром (2% рабочий раствор) и Бионом. Наиболее эффективным препаратом оказался Бион, который снижал число успешных заражений патогена в 2 раза по сравнению с контролем. Снижение массы

растений при этом не наблюдалось. Опрыскивание препаратом Бион привело к достоверному увеличению надземной массы по сравнению с контролем. Результаты второго эксперимента, который проходил в условиях более благоприятных для развития сосудистого бактериоза показали, что препараты Нарцисс С и Лариксин в условиях высокого инфекционного фона были не эффективны. Препарат Бион, также как и в первом опыте, показал достоверное снижение длины некроза сосудов в 1,8 раза по сравнению с контролем, однако не влиял на первичное заражение патогеном.

Результаты эксперимента по изучению механизма действия индукторов устойчивости на патогена представлены в таблице 5. Из данных таблицы видно, что прямого ингибирующего действия на Хсс они не оказывают. Их эффективность, очевидно, связана с индуцированием устойчивости растения к патогену.

Таблица 5  
Рост *X. campestris pv. campestris* в чашке Петри на среде YDC на 5 сутки, содержащей препараты в концентрации, рекомендованной для опрыскивания

Варианты	Диаметр колоний Хсс, мм
YDC без препаратов	15,2
YDC +Бион	15,7
YDC +Нарцисс К	14,9
YDC +Лариксин	15,0
НСР <sub>05</sub>	$F_{\phi} < F_{теор.}$

Таблица 6  
Урожайность, лежкость и пораженность сосудистым бактериозом капусты F<sub>1</sub> гибрида Текила, 2008 г

Варианты	Развитие в поле, %	Масса при уборке, г	Естественная убыль, г	Абсолютный отход, %
Контроль	92,7	2342	277,8	31,9
Бион 0,01%	<b>48,3*</b>	<b>2757*</b>	268,1	<b>17,8*</b>
Гамаир, Ж 2%	<b>70,0*</b>	<b>3020*</b>	<b>566,7*</b>	35,7
<i>B. subtilis</i> изолят G8, 2%	83,3	2307	306,9	32,2
Лариксин, 0,015%	<b>65,8*</b>	2381	281,4	36,8
НСР <sub>05</sub>	13,9	362	288,9	8,44

\* - значения, статистически достоверно отличающиеся от контроля

Результаты полевых испытаний представлены в таблице 6, из которой видно, что в полевых условиях достоверную биологическую эффективность показали препараты Бион – 51%, Гамаир – 24,5% и Лариксин – 29%. При этом только препараты Бион и Гамаир увеличивали массу кочанов на 17% и 28,9% соответственно. Учет лежкости, проведенный после 2 месяцев хранения показал высокую статистически достоверную естественную убыль в варианте с опрыскиванием препаратом Гамаир. В варианте с обработкой препаратом Бион наблюдалось снижение абсолютного отхода при хранении в 1,8 раза, а

естественная убыль статистически не отличалась от контроля. Можно предположить, что меньшее развитие сосудистого бактериоза на кочанах после опрыскивания Бионом, привело к снижению развития при хранении сопряженных болезней (таких как серая гниль и слизистый бактериоз), что и показало уменьшение абсолютного отхода. Отсюда можно сделать вывод о том, что обработка Бионом в поле обеспечила достоверную прибавку урожая и позволила снизить потери при хранении. Опрыскивание бактериальной суспензией изолята *B. subtilis* G8 и препаратом Лариксин не влияли на потери капусты при хранении.

Таким образом, обработка препаратом БИОН в концентрации 0,01% в двух вегетационных экспериментах позволяла снизить проникновение патогена по сосудам в 1,5 –1,8 раза. В полевом эксперименте 2008 г 4-х кратная обработка Бионом 0,01% в период вегетации показала биологическую эффективность 51%, достоверно повысила массу кочана на 17% и позволила снизить абсолютный отход при хранении в 1,8 раза по сравнению с контролем. В полевом опыте 2009 г. 4-х кратная обработка Бионом 0,01% в период вегетации позволила на 30% снизить балл поражения и повысить массу кочана на 14%.

Полученные данные позволяют рекомендовать проведение регистрационных испытаний Биона на капусте против сосудистого бактериоза.

## ВЫВОДЫ

1. При тестировании 78 штаммов и изолятов возбудителя сосудистого бактериоза и 21 штамма близкородственных видов ксантомонад с использованием 11-ти пар праймеров была разработана мультиплексная БИО-ПЦР и ПЦР «в реальном времени», способная достоверно отличать ложноположительные результаты с близкими для *X. campestris pv. campestris* патоварами.
2. Предложенная среда КАА для БИО-ПЦР, содержащая в качестве селективирующего фактора гентамицин в дозе 8 мг/л, позволила в 10 раз повысить чувствительность ПЦР за счет снятия ингибирующего действия семенного экстракта.
3. Оптимизированный метод БИО-ПЦР диагностики позволял определять партии семян капусты с зараженностью 0,01% и обнаруживать возбудителя сосудистого бактериоза в семенном экстракте в концентрации более 4 КОЕ/мл, а праймеры на внутренний контроль позволяли выявлять ложноотрицательные результаты ПЦР обусловленные действием ингибиторов, присутствующих в семенном экстракте.
4. Количественная оценка при помощи ИФА возбудителя сосудистого бактериоза экстрагируемого с зараженных партий семян, показала, что оптимальным вариантом подготовки проб при анализе семенной инфекции является встряхивание семян 30 мин в фосфатно-солевом буфере рН 7,2 с предварительной ультразвуковой обработкой (35 кГц, 4 мин). Усовершенствованный метод ИФА диагностики позволял выявлять партии семян с зараженностью свыше 2 %.

5. Показано несовершенство существующей системы дифференциации рас патогена. Предложены новые растения-дифференциаторы. В качестве источников устойчивости для селекции рекомендованы *B. juncea* L. сорт Florida Broad Leaf Mustard и линию абиссинской капусты (*B. carinata*) PI 199947.
6. Изучение генетического и серологического разнообразия возбудителя сосудистого бактериоза показало наличие нескольких кластерных групп штаммов и изолятов. С помощью ДНК-фингепринтинга были получены полиморфные фрагменты ДНК, которые могут быть переведены в специфичные молекулярные маркеры соответствующего таксономического уровня.
7. Обработка 0,01%-ным Биомом в вегетационных экспериментах позволяла снизить проникновение патогена по сосудам в 1,5 - 1,8 раза. В полевых экспериментах 4-х кратная обработка 0,01%-ным Биомом в период вегетации показала биологическую эффективность 51%, позволила на 30% снизить балл поражения, увеличить массу кочана на 14 – 17% и снизить абсолютный отход при хранении в 1,8 раза по сравнению с контролем.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для диагностики зараженности семян капусты сосудистым бактериозом рекомендуется использовать усовершенствованные методики БИО-ПЦР и ИФА.
2. Выращивание гибридов капусты с расоспецифическим типом устойчивости к сосудистому бактериозу в конкретном регионе следует проводить с учетом расового состава патогена.
3. Опрыскивание капусты 0,01% Биомом, 50% ВДГ против сосудистого бактериоза рекомендуется включить в программу регистрационных испытаний.

### СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Джалилов Ф.С., Мазурин Е.С., Игнатов А.Н. Усовершенствование методики диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза // Сборник трудов международной научно-практической конференции «Агротехнологии XXI века». Москва, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. – 2007. – С. 73-75.
2. Джалилов Ф.С., Мазурин Е.С., Игнатов А.Н. Разработка высокочувствительного метода диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза на основе ПЦР // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. I международная научно-практическая конференция. ВНИИССОК. – 2008. – Том 1. С. 221-224.
3. Зотов В.С., Корнев К.П., Пунина Н.В., Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Матвеева Е.В., Игнатов А.Н. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ PFGE и sAFLP

ДЛЯ ВИДОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕННЫХ И ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ КСАНТОМОНАД // VIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва. – 2008. – С.31-32.

4. Игнатов А.Н., **Мазурин Е.С.**, Джалилов Ф.С. Расы *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. I международная научно-практическая конференция. ВНИИССОК. – 2008. – Том 1. С. 262-267.
5. **Мазурин Е.С.**, Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Варицев Ю.А. Усовершенствование диагностики зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом иммуноферментного анализа // Известия ТСХА. М.: РГАУ-МСХА. – 2009. – Вып. 1. С. 66-72.
6. **Мазурин Е.С.**, Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Варицев Ю.А. Диагностика зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом ИФА // Доклады ТСХА. – 2009. – Вып.281. С.24-26.
7. Ignatov A.N., Kornev K.P., **Mazurin E.S.**, Djalilov F.S., Matveeva E.V., Schaad N.W. Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* and related pathovars on brassicas in Russian Federation (Идентификация и характеристика *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* и родственных патоваров на капустных в Российской Федерации). // Abstracts of the 59th International Symposium on Crop Protection, Ghent, Belgium. – 2007. – P.304.
8. Ignatov A., **Mazurin E.**, Dzhalilov F., Matveeva E., Schaad N.W. An improved model for races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Улучшенная модель для рас *Xanthomonas campestris* pv.*campestris*) // 5th International Symposium on Brassicas and the 16th Crucifer Genetics Workshop, Abstract book, Lillehammer, Norway. – 2008. – P. 112.