

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ДЕПАРТАМЕНТ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ  
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

---

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ  
КАФЕДРА СЕЛЕКЦИИ И СМЕНОВОДСТВА ОВОЩНЫХ И  
ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

## ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему: *Создание молекулярных маркеров генов устойчивости к киле (*P.brassicea*) для селекции родительских линий F<sub>1</sub> гибридов пекинской капусты и репы*

**Исполнитель:** студент 507 группы  
плодоовощного факультета  
**Монахос Сократ Григорьевич**

**Руководители:** доцент Соловьев А.А.  
с.н.с. Игнатов А.И.

Москва 2004

<http://yadyra.ru>

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	5
1. Отдаленная гибридизация.....	5
2. Народнохозяйственное значение пекинской капусты....	9
3. Происхождение, систематика, эволюция.....	11
4. Методы создания F <sub>1</sub> гибридов.....	17
5. Селекция на устойчивость к основным патогенам.....	33
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	40
<b>1. СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ С ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ</b> .....	40
1.1 Цель, материалы и методы исследований.....	41
1.2 Результаты исследований.....	42
1.3 Выводы.....	47
<b>2. СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ УСТОЙЧИВЫХ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ</b> .....	48
2.1 Цель, материалы и методы исследований.....	49
2.2 Результаты исследований.....	51
2.3 Выводы.....	55
<b>3. СЕЛЕКЦИЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КИЛЕ КРЕСТОЦВЕТНЫХ. РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ</b> .....	56
3.1 Цель, материалы и методы исследований.....	57
3.2 Результаты исследований.....	61
3.3 Выводы.....	64
<b>ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ</b> .....	65
1. Оценка экономической эффективности возделывания устойчивой к киле пекинской капусты.....	65
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	67
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	69

## **ВВЕДЕНИЕ**

Пекинская капуста (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.) является одной из древнейших овощных культур, полукочанные и кочанные формы которой появились в северных районах Китая в период с XIV по XVII века (С.W. Li, 1981). Долгое время возделывалась преимущественно в Северном Китае, откуда вместе с усовершенствованием агротехники постепенно распространилась в южном и восточном направлении. Уже в начале XIX века пекинская капуста стала одним из важнейших овощей в Корее. К концу XIX века пекинская капуста была интродуцирована на японские острова, стала известна в странах Западной Европы и Североамериканского континента. (L.H. Bailey, 1928).

В настоящее время пекинская капуста является важнейшей культурой в восточноазиатских странах, широко известна в Северной Америке, Западной Европе и Австралии. Она занимает ведущее место в мировом объеме производства салатных овощей. Вместе с ростом популярности культуры наблюдается увеличение объема мирового рынка потребления и расширение площадей возделывания. Это привлекает внимание многих коммерческих селекционных и семеноводческих фирм и стимулирует выведение новых гибридов, удовлетворяющих требованиям интенсивной технологии.

На сегодняшний день первоочередными задачами в усовершенствовании пекинской капусты как промышленной культуры являются: выведение высокоурожайных выровненных гибридов с высокими товарными качествами; разработка и внедрение гибридного семеноводства на ЦМС-основе; выведение устойчивых форм к наиболее вредоносным патогенам.

В данной работе, выполненной под руководством Монахоса Г.Ф., Соловьева А.А. и Игнатова А.Н., частично затронуто решение каждой из проблем, а именно:

создана ЦМС-форма пекинской капусты;

создана форма, устойчивая к сосудистому бактериозу;

создан молекулярный маркер гена устойчивости к киле.

Я выражаю искреннюю благодарность и глубокую признательность за обучение, наставление и помощь в выполнении дипломной работы своим учителям - директору селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева ведущему научному сотруднику к. с.-х. н. Григорию Федоровичу Монахосу, доценту кафедры генетики МСХА к. б. н. Александру Александровичу Соловьеву, старшему научному сотруднику центра «Биоинженерия» РАН к. с.-х. н. Александру Николаевичу Игнатову, а также профессору кафедры защиты растений МСХА Февзи Сеидовичу Джалилову. Своим приятным долгом считаю так же поблагодарить сотрудников селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева, кафедры генетики МСХА, лаборатории «Генома растений» и «Секвенирования микроорганизмов» центра «Биоинженерия» РАН за консультации и помощь в проведении экспериментов, а так же всех, кто прямо или косвенно помогал мне в работе.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. ОТДАЛЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ

Селекция – это динамичный процесс оценки, отбора и испытания представляющих интерес форм из исходного материала. Основным методом создания исходного материала является внутривидовая гибридизация, как более простой и эффективный метод в селекции растений, многие «культурные» признаки которых определяются рецессивными генами. У диких видов преобладает доминантный характер наследования признаков, поэтому привлечение их в скрещивание с культурными снижает «культурные» признаки последних, что усложняет селекционный процесс. Но довольно часто в пределах одного вида не удается обнаружить формы, обладающие нужным признаком. Возникает необходимость в привлечении в скрещивания растений другого вида или рода, носителей необходимого признака. Скрещивания, где в качестве родительских компонентов привлекаются представители различных таксонов, называются отдаленной гибридизацией.

Отдаленная гибридизация играет значительную роль в эволюции органического мира и имеет большое значение в решении теоретических и практических вопросов селекции. Разработка теоретических вопросов отдаленной гибридизации позволяет не только напрямую их использовать в практической селекции, но и позволяет глубже познать филогенетические связи между различными таксонами, вскрыть закономерности эволюционного развития и образования видов. Н.В. Цицин писал: «Используя отдаленную гибридизацию, люди осуществляют преобразование природы, получая организмы с новыми ценными свойствами» (Цицин, 1981). В настоящее время практически нет культур, в селекции которых не использовалась отдаленная гибридизация.

Отдаленная гибридизация неизменно привлекает к себе внимание многих выдающихся ботаников, генетиков и селекционеров уже не менее

трех столетий. Первые письменные свидетельства проведения отдаленных скрещиваний относятся к началу XVIII века. В 1717 году Ф. Чайлд описал гибридизацию разных видов гвоздик. Научным основателем проблемы отдаленной гибридизации считают Йозефа Готлиба Кельрейтера, проводившего отдаленные скрещивания в 1755-1806 годах, используя в скрещиваниях более 50 видов 13 ботанических родов. В 1761 году он опубликовал первые результаты опытов по скрещиванию махорки (*Nicotiana rustica*) с табаком (*N. paniculata*) (Лобашов, 1967). Неоценимый вклад в развитие теории и практики отдаленной гибридизации внесли ученые И.В. Мичурин, Г.Д. Карпеченко, Н.В. Цицин, А. Мюнтцинг, В.А. Рыбин, Г.К. Мейстер, П.М. Жуковский. И.В. Мичурин впервые обосновал основные положения отдаленной гибридизации; разработал множество оригинальных способов преодоления нескрещиваемости; получил путем межвидовой и межродовой гибридизации множество сортов плодово-ягодных культур. Г.Д. Карпеченко (1927, 1935) обосновал теорию отдаленной гибридизации; установил способ преодоления стерильности путем удвоения числа хромосом. Н.В. Цицин (1981) показал возможность замещения хромосом культурных злаков (пшеницы, ржи, ячменя) на хромосомы дикорастущих; получил многолетнюю пшеницу (пшенично-пырейный гибрид) и многолетнюю рожь; показал возможность скрещивания травянистых растений с деревянистыми. А. Мюнтцинг (1967) впервые на примере воссоздания одного из видов пикульника (*Galeopsis tetrahit*) показал возможность ресинтеза видов. В.А. Рыбин (1936) ресинтезировал культурную сливу (*Prunus domestica*). Г.К. Мейстер проводил работы по гибридизации озимой пшеницы с рожью, получил первые в стране пшенично-ржаные амфидиплоиды. П.М. Жуковский (1971) показал роль отдаленной гибридизации в эволюции культурных растений.

Выделяют три основных направления использования отдаленной гибридизации в селекции растений.

I. *Отдаленная гибридизация, как способ интрогрессии определенного комплекса или отдельного признака, недостающего культуре, от одного вида или рода к другому.* В качестве таких признаков, как правило, выступают устойчивость к болезням и вредителям, устойчивость к различным абиотическим стрессорам. Интрогрессия признака осуществляется скрещиванием родительских форм разных таксономических групп с последующим беккроссированием родительским таксоном, в который передается целевой признак, и отбором. Беккроссирование промежуточных гибридов, во-первых, позволяет расширить популяцию переходящих гибридов, увеличивая шансы осуществления гомеологичной рекомбинации; во-вторых, происходит смещение в наследовании признаков в сторону беккроссирующего родителя. Успех отбора и количество беккроссных поколений зависит от частоты рекомбинации участков ДНК, определяющих наследование передаваемого признака, и числа особей беккроссного поколения.

II. *Отдаленная гибридизация с полиплоидией или без нее, как способ создания плодовых промежуточных гибридов, объединяющих в себе различные хозяйственно ценные признаки отдаленно родственных таксонов и служащих донорами комплексного наследования определенных сочетаний признаков.*

III. *Отдаленная гибридизация с полиплоидией, как способ получения нового культурного вида, наделенного комплексом биологических и хозяйственно ценных признаков, выделяющих его из разнообразия существующих культур и определяющих его конкурентоспособность.* В природе существует множество видов растений, образовавшихся в результате спонтанной отдаленной гибридизации. Среди них много культурных видов: *Triticum aestivum* (пшеница мягкая), *Triticum durum* (пшеница твердая), *Avena sativa* (овес), *Prunus domestica* (слива домашняя), *Cerasus vulgaris* (вишня обыкновенная), *Fragaria ananassa* (земляника садовая), *Daucus carota* (морковь), *Brassica juncea* (горчица сарептская), *Brassica napus* (брюква,

рапс), *Gossypium hirsutum* (хлопчатник). Идея искусственного синтеза новых культурных видов популярна среди ученых мира, однако новые синтезированные виды отличаются низким качеством продукции, нестабильностью, пониженной фертильностью и не имеют экономического значения. Исключением является тритикале (Triticale), – гибрид от скрещивания пшеницы с рожью и последующим удвоением числа хромосом, занимающий достаточно обширные посевные площади.

## 2. НАРОДНОХОЗЯЙСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ

Пекинская капуста широко возделывается в Китае, Японии, Корее, США, в Австралии и Западной Европе. По хозяйственному значению в некоторых регионах Восточной Азии капусту пекинскую можно сравнить с капустой белокочанной в европейских странах. В северных провинциях Китая доля потребления пекинской капусты в течение года составляет 25%, в зимние и весенние месяцы достигает 80% от общего потребления овощей (С. W. Li, 1981; G. Vinning, 1995). Суммарная площадь возделывания этой культуры в Китае составляет 700 тыс. га (L. Gao et al., 2001), ежегодно производится около 40 млн. т. В Японии засеивается 25 тыс. га (Lee, 1996; FAO, 1998), производство составляет 1 млн. т. (P. Daly, B. Tomkins, 1995). Посевные площади в Корее составляют 48 тыс. га, порядка 3,5 млн. т. ежегодно производится в защищенном грунте.

Популярность пекинской капусты в России только начинает развиваться. Основное производство сосредоточено в частном секторе. Площади, занятые в промышленном производстве, составляют примерно 100 га (Г.Ф. Монахос, устное сообщение). По состоянию на 27 января 2004 года в государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, включено девять сортов (шесть отечественных) и семь гибридов из них два отечественных. Для сравнения, в Японии зарегистрировано более трехсот гибридов.

По содержанию физиологически ценных для человека веществ пекинская капуста занимает среднее положение среди других культурных видов рода *Brassica*. Среднее содержание веществ в листьях на сухую массу составляет (грамм на 100 г веса сухого вещества): белок – 23,6; жир – 3,6; углеводы – 41,8; клетчатка – 16,4; зола – 30,9. Калорийность – 236 кал. Кальций - 636 мг/100г; фосфор - 709 мг/100г; железо - 9.1 мг/100г. Основные витамины: аскорбиновая кислота (витамин С) - 30-80 мг%; каротин

(провитамин А) - 265 мг%. Необходимо отметить, что содержание веществ сильно варьирует в зависимости от генотипа и условий выращивания (Г. Лизгунова, 1984).

Большое значение она приобретает за свои хозяйственные и биологические качества, такие, как: короткий период вегетации – 2,5-3,5 месяца; высокая урожайность – в зависимости от времени года и сорта 300-600 ц/га; высокие вкусовые и диетические качества. К тому же она является важнейшим поставщиком витамина С в зимние месяцы.

В азиатских странах основная часть продукции используется для соления и квашения в смеси с другими видами капусты (кимчи в Корее), потребляется в свежем (в салатах) или свежеприготовленном (поджаривают на сковороде) виде. В Северной Америке, Австралии и Европе ее потребляют в основном в сыром виде - для приготовления салатов, или вареном (Г. Круг, 2000).

### 3. ПРОИСХОЖДЕНИЕ

*Brassica rapa* L.– один из древнейших видов распространенный по всему миру. Ареал обитания диких форм охватывает Европу, Россию, Центральную Азию и Ближний Восток (Prakash and Hinata, 1980). Выделяют два возможных направления независимого происхождения: западное - Европа, Центральная Азия и Индия (корнеплодные и масличные формы); восточное – Восточная Азия (листовые формы).

Явных предков вида *B. rapa* L. пока установить не удалось, но данные, полученные К. Song и Т. Osborn (1992) в результате анализа митохондриальной и хлоропластной ДНК, свидетельствуют о том, что *B. montana* (n=9) является близким родственником прототипа, который дал начало цитоплазмам *B. rapa* и *B. oleracea*. Данные RFLP анализа повторяющихся последовательностей ДНК, составляющих основную часть геномов растений (К. Song, Т. Osborn, 1990), подтверждают единство происхождения видов *B. rapa* L. и *B. oleracea* L.

Дикие репы были известны человеку уже в эпоху Неолита (8-3 тысячелетия до н.э.). Они засоряли культурные посевы зерновых с самого зарождения сельского хозяйства (J.D. Sauer, 1993).

По С. Gomez-Campo (1999), репа является первым окультуренным видом среди капустных. Точное время и место окультуривания не известно. Индийские санскритские записи 2-1,5 тыс. до н.э. указывают на масличную репу (сурепицу). Такие же записи времен Римской Империи говорят о том, что галлы и другие племена, населявшие Европу, выращивали корнеплодные формы реп. В древних странах Восточной Азии 5 тыс. лет до н.э. выращивали и выращивают по сей день в основном листовые формы *B. rapa*, такие, как пекинская и китайская капусты.

Среди многих разновидностей вида *Brassica rapa* L., пекинская капуста – наиболее важная овощная культура. Первые упоминания в древней китайской литературе о близких к пекинской капусте листовых формах относятся к X веку. По мнению ученых, пекинская капуста возникла в

результате отбора из азиатской репы (*B. campestris* subsp. *rapifera*) или скрещивания с ней китайской капусты пак-чой (*B. campestris* subsp. *chinensis*) (C.W. Li, 1981).

Известно, что центром происхождения пекинской капусты является Китай (C.W. Li, 1981), однако диких предков данной культуры пока не найдено. Записи в древней китайской литературе, описывающие возделываемые формы появились довольно поздно. В Шин-Дзинь (Классические поэмы), написанной в V веке до н.э., отмечены многие растения северного Китая, из культур *Brassica* только репа (*Brassica campestris* ssp. *rapifera*) и горчица (*Brassica juncea*). С тех пор вплоть до VII века н.э. на территории северного Китая выращивали только репу, в то время как на территории южного Китая – только китайскую капусту пак-чой (pak-choi). В X веке н.э. в медицинской книге Бен-Цао-Ту-Дзин (Классика иллюстрированных лечебных растений) было записано, что в Янг-Чу, городе на пересечении северной и южной частей Великого канала, соединяющего северный Китай с южным, имеется растение, называемое «ox-stomach cabbage». Оно отличалось от китайской капусты морщинистыми опушенными листьями большими, как веер, с меньшим жилкованием. Описанные признаки более всего походят на признаки розеточнолиственной формы, первой формы этой культуры. Эта запись стала основой гипотезы происхождения пекинской капусты в результате скрещивания репы северного Китая и китайской капусты южного Китая во время совместного произрастания в районе города Янг-Чу. В 60-х гг. XX века была собрана обширная коллекция реп и пак-чой. В результате различных комбинаций скрещиваний были получены гибридные формы с типичными морфологическими признаками пекинской капусты. Полученные данные гибридизации были закреплены ранее проведенными цитологическими исследованиями (C.W. Li, 1981).

Полной уверенности в правдивости гипотезы о гибридном происхождении пекинской капусты нет, поэтому наряду с ней существует

вторая гипотеза, согласно которой она произошла в результате многовекового отбора из популяций реп.

## СИСТЕМАТИКА

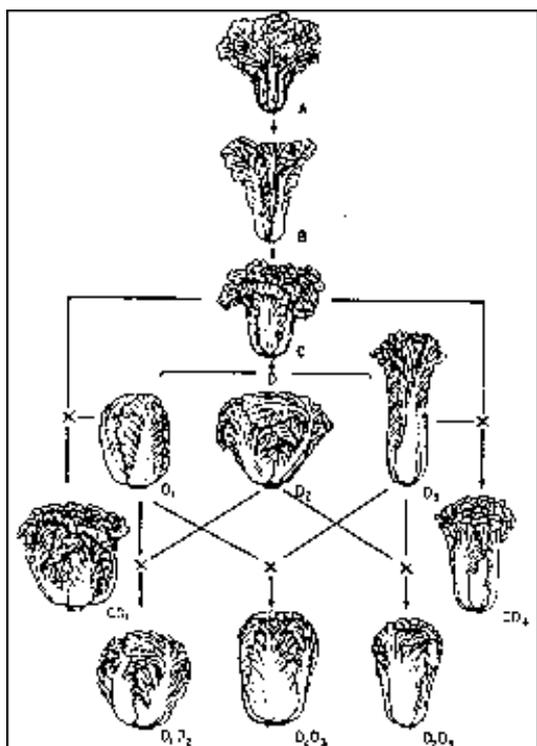
В мире нет единого мнения о систематическом положении пекинской капусты, поэтому в литературе можно встретить множество латинских названий:

*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt,  
*Brassica campestris* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Olsson.,  
*Brassica rapa* L. em. Metzg. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt,  
*Brassica chinensis* L. var. *pekinensis* (Rupr.) Sun,  
*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.,  
*Brassica pe-tsai* L. H. Bailey,  
*Brassica rapa* L. subvar. *pe-tsai* (L.H. Bailey) Kitam,  
*Brassica rapa* L. var. *amplexicaulis* Yoshio Tanaka & Ono,  
*Sinapis pekinensis* Lour.

Однако все же предпочтение отдается первым двум, т.е. пекинскую капусту рассматривают как разновидность вида *Brassica rapa* (синоним *Brassica campestris*). В России признано таксономическое положение, установленное Рупрехтом, и ее выделяют в самостоятельный вид - *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. (Т. Лизгунова, 1984).

В Китае имеются тысячи местных сортов пекинской капусты. Учитывая их морфологические, экологические и экономически важные признаки, С.W. Li (1981) провел классификацию, выделив четыре разновидности А, В, С, D и три формы D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> (рис.1).

(А) Var. *dissoluta* Li - разновидность листовая. Не формирует кочана, розетка листьев стелющаяся или прямостоячая.



**Рис. 1. Разновидности и формы пекинской капусты по Ли (1981):**  
 А - var. *dissoluta*; В - var. *infarcta*;  
 С - var. *laxa*; D - var. *cephalata*,  
 D<sub>1</sub> - f. *ovata*, D<sub>2</sub> - f. *depressa*,  
 D<sub>3</sub> - f. *cylindrica*, CD<sub>1</sub> - var. *laxa* x f. *ovata*,  
 CD<sub>3</sub> - var. *laxa* x f. *cylindrica*,  
 D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> - f. *ovata* x f. *depressa*,  
 D<sub>1</sub>D<sub>3</sub> - f. *ovata* x f. *cylindrica*,  
 D<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - f. *depressa* x f. *cylindrica*.

(В) Var. *infarcta* Li – разновидность полукочанная. Формирует кочан с пустой сердцевинной, розетка листьев прямостоячая.

(С) Var. *laxa* Tsen et Lee – разновидность кочанная с открытой верхушкой. Кончики листьев, формирующих кочан, не перекрываются, направлены вверх, образуя пушистую верхушку.

(D) Var. *cephalata* Tsen et Lee –

разновидность кочанная. Формирует выполненный кочан с перекрывающимися листьями.

(D<sub>1</sub>) F. *ovata* Li – форма овальная. Кочан овальный, отношение высоты к диаметру равно примерно 1,5.

(D<sub>2</sub>) F. *depressa* Li – форма приплюснутая. Кочан обратноконический, отношение высоты к диаметру – 1.0.

(D<sub>3</sub>) F. *cylindrica* Li – форма цилиндрическая. Кочан длинный цилиндрический, отношение высоты к диаметру – 4.0 и более.

Три разновидности (листовая, полукочанная, кочанная с открытой верхушкой) с тремя формами кочанной разновидности (овальная, приплюснутая, цилиндрическая) являются основными формами пекинской капусты. Гибридное сочетание признаков некоторых из них дало начало пяти другим ценным формам (CD<sub>1</sub>, CD<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>D<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), используемых в мировом производстве.

(CD<sub>1</sub>) Рыхловершинная овальная форма: гибрид var. *laxa* × f. *ovata*, плотный кочан с открытой вершиной.

(CD<sub>3</sub>) Рыхловершинная цилиндрическая форма: гибрид var. *laxa* × f. *cylindrica*, цилиндрический кочан не полностью выполнен.

(D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>) Плоскоовальная форма: гибрид f. *ovata* × f. *depressa*, овальный кочан с плоской вершиной.

(D<sub>1</sub>D<sub>3</sub>) Широкоцилиндрическая форма: гибрид f. *ovata* × f. *cylindrica*, хорошо сформированный кочан, отношение высоты к диаметру – 2.0.

(D<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) Плосковершинная цилиндрическая форма: гибрид f. *depressa* × f. *cylindrica*, кочан с большой плоской вершиной сужающейся к основанию.

В нашей стране наиболее широкое распространение нашли листовые формы (Хибинская) и кочанные – гибриды F<sub>1</sub> Ника, F<sub>1</sub> Кудесница, F<sub>1</sub> Чача. Листовые формы выращивают главным образом в теплицах в качестве уплотнителя, кочанные формы выращивают в открытом грунте.

## ЭВОЛЮЦИЯ

Эволюция пекинской капусты от примитивных диких форм к более совершенным культурным является результатом взаимного действия условий выращивания и направленного отбора. Формирование и отбор полукочанных и кочанных форм происходили в северном Китае в условиях продолжительной умеренной солнечной осени, способствующей накоплению избытка продуктов фотосинтеза и формированию запасных органов. У пекинской капусты излишки фотосинтетических продуктов откладываются в черешках. Сорты первичных форм var. *dissoluta* при интродукции из центрального Китая в северные районы формировали толстые черешки, что отмечено в литературе XII века. Дальнейшее улучшение условий выращивания, преимущественно за счет улучшения минерального питания и водного режима, привело к отбору форм с развитой верхушечной почкой и дополнительными листьями. Таким образом, появилась полукочанная форма

*f. infarcta*. При совершенствовании агротехнических приемов и отборе форм с более выполненным кочаном появилась кочанная форма с открытой верхушкой *f. laxa*. Эта форма была описана в садоводческой книге XIV века Шуе-Пу Ца-Су (Руководство по садоводству). Продолжая отбирать формы с более плотным кочаном на фоне постоянно улучшаемых условий роста, садоводам-огородникам удалось совершенствовать форму *f. laxa* до *f. cephalata*. Первые записи о последней форме отмечены в географической книге династии Чин под названием Шиун-Тиан-Фу-Це (Записи Тиан-Фу-Це) в XVII веке.

Гибридные формы образовались в результате естественного переопыления различных сортов при совместном возделывании на семена. Лучшие гибриды, превосходящие родительские формы, стабилизировались садоводами путем длительного массового отбора с целью получить новые сорта с качествами  $F_1$  растений.

#### 4. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ F<sub>1</sub> ГИБРИДОВ

Основными направлениями селекции культур рода *Brassica* являются: урожайность, однородность и товарность, качество, устойчивость к болезням и вредителям, устойчивость к абиотическим факторам (А. Monteiro, Т. Lunn, 2004).

Одним из проверенных способов повышения урожайности и получения однородной, качественной продукции является использование гибридной силы растений (гетерозиса). Гибридные семена получают скрещиванием специально подобранных родительских линий с высокой общей и специфической комбинационной способностью. Для производства гибридных семян необходима надежная система контроля опыления растений, препятствующая самоопылению и опылению растений внутри линии. Существует три основных механизма контроля опыления: механический, химический и генетический.

*Механический способ* в гибридном семеноводстве может быть использован для раздельнополых однодомных и двудомных растений, т.е. для растений с пространственно разделенными мужскими и женскими генеративными органами, либо на растениях с достаточно крупными цветками, чтобы можно было провести кастрацию. Например, растение кукурузы имеет мужское соцветие - метелку на вершине стебля, а женские соцветия - початки в пазухах листьев на стебле. Перекрестное опыление кукурузы обеспечивается механическим удалением метелок с материнских растений.

Большинство сельскохозяйственных культур имеют гермафродитные цветки. Удаление вручную мужских генеративных органов является трудоемким и дорогостоящим процессом. Производство гибридных семян таким способом оправдано только в случае гарантированной экономической эффективности. Очевидно, что этот метод на растениях с мелкими цветками и при масштабном семеноводстве неприменим.

*Химический способ* основан на применении химических препаратов гаметоцидного действия, которые убивают пыльцу либо блокируют ее развитие. Ряд недостатков современных гаметоцидов резко ограничивает их использование и исключает их из промышленного семеноводства.

Недостатки применения:

- высокое фитотоксичное действие имеющихся препаратов;
- отсутствие гаметоцидов, обеспечивающих 100%-ю мужскую стерильность;
- низкая эффективность на растениях с растянутым периодом цветения;
- экономическая нецелесообразность многократного применения.

В современном коммерческом гибридном семеноводстве преимущественно используют *способы генетического* контроля опыления, основанные на использовании таких явлений, как самонесовместимость и мужская стерильность.

**Самонесовместимость** - явление, при котором растения не способны оплодотворяться своей явно фертильной пыльцой. Эта система генетического контроля опыления, обнаружена у многих видов перекрестноопыляющихся растений. По времени действия генов, определяющих несовместимость, ее делят на две группы: гаметофитная и спорофитная. Гаметофитная самонесовместимость, характерная для большинства видов, в семеноводстве не используется вследствие сложности размножения родительских линий. Спорофитная система, обнаруженная в семействах Крестоцветные, Сложноцветные и Ирисовые, нашла широкое практическое применение в селекции и семеноводстве гетерозисных гибридов различных видов капусты. Большинство выращиваемых в настоящее время гибридов капустных культур созданы на основе спорофитной самонесовместимости. Размножение линий осуществляют гейтеногамным опылением вручную вскрытых бутонов до начала действия биохимического механизма, блокирующего прорастание пыльцы. В некоторых случаях барьер несовместимости преодолевают

нанесением раствора хлорида натрия на рыльце пестика. Трудности поддержания и размножения материнских линий, а также стабильность проявления самонесовместимости являются основными проблемами, усложняющими использование этой системы. Проявление самонесовместимости подвержено влиянию стрессовых климатических условий, это приводит к нарушению или снижению эффективности биохимического барьера и самоопылению.

Наибольший интерес для коммерческого гибридного семеноводства представляет система генетического контроля опыления, основанная на явлении **мужской стерильности**.

Эта система по генетической природе имеет три типа контроля стерильности: а) ядерная МС, контролируемая только генами ядра (ЯМС); б) ядерно-цитоплазматическая МС, определяемая взаимодействием генов ядра и цитоплазмы (ЯЦМС); в) цитоплазматическая МС, определяемая только генами цитоплазмы (ЦМС) (табл. 1).

**Таблица 1**

**Генотипические составляющие различных типов мужской стерильности**

Тип мужской стерильности	Генотипы стерильных растений	Генотипы фертильных растений
Ядерная (рецессивная)	<i>msms</i>	<i>Ms-</i>
Ядерно-цитоплазматическая	<i>S rfrf</i>	<i>S Rf-, N Rf-, N rfrf</i>
Цитоплазматическая	<i>S</i>	<i>N</i>

По М. Kaul (1988), мужская стерильность имеет следующие проявления:

- а. Отсутствие или нарушение развитие мужских органов (тычинки).
- б. Нарушение развития микроспорогенной ткани пыльника.
- в. Аномальный микроспорогенез, приводящий к формированию деформированной или нежизнеспособной пыльцы.

- d. Аномальное созревание пыльцы, неспособной к прорастанию на совместимом рыльце.
- e. Нераскрывающиеся пыльники с жизнеспособной пыльцой.
- f. Наличие барьеров, препятствующих достижению спермием яйцеклетки, отличающихся от несовместимости.

### **Ядерная мужская стерильность (ЯМС)**

Ядерная мужская стерильность в большинстве случаев определяется одним или несколькими рецессивными генами *ms* в гомозиготном состоянии, реже - доминантными *Ms* и проявляется в нарушении микроспорогенеза. Стадия микроспорогенеза, на которой прекращается развитие пыльцы, различается в зависимости от видовой принадлежности растения и от специфичности гена мужской стерильности (Orena et al., 1988).

Впервые ядерная мужская стерильность была показана в 1951 г. японским исследователем Tokumasu на редисе (*Raphanus sativus*) (Tokumasu, 1951). Затем был установлен целый ряд случаев ЯМС на других видах *Brassica*: белокочанная капуста (Nishi and Hiraoka, 1957; Kototani and Yamada, 1958; Rundfeldt, 1960), брокколи (Anstey and Moore, 1954), брюссельская капуста (Johnson, 1950; Nieuwhof, 1961), цветная капуста (Nieuwhof, 1961; Borchers, 1966; Rundfeldt, 1960), рапс (Takagi, 1970; Heyn, 1976), пекинская капуста (автор не известен, 1978).

Использование линий с ЯМС в коммерческом семеноводстве экономически неэффективно. При размножении стерильной линии потомство от скрещивания стерильных растений с фертильным аналогом, несущим гетерозиготу *Msms*, представляет собой популяцию стерильных и фертильных растений в соотношении 1:1. Внешне их можно отличить только при зацветании и фертильные растения вручную удаляют. В итоге дополнительные затраты на возделываемые фертильные растения переносятся на стоимость гибридных семян.

Доминантная стерильность может быть использована в гибридном семеноводстве, только если возможно размножение материнских линий. Рецессивная стерильность может быть использована, если стерильные и фертильные растения легко различимы на ранних стадиях.

Существует возможность использования молекулярных маркеров, сцепленных с геном мужской стерильности. Это позволяет отбирать стерильные растения на ранних стадиях развития, избегая затрат на возделывание фертильных растений (J. Barbeyron, S. Vouy, 1997). Но на сегодняшний день подобные анализы стоят дорого. Пока в производстве гибридных семян участвует половина материнской линии семеноводство не будет экономически эффективным (Orena et al., 1988).

Чтобы увеличить долю мужски-стерильных растений при размножении стерильной линии, M. Nieuwhof (1968) предложил выводить линии с несколькими генами стерильности. Однако осуществление этой идеи требует сложной длительной программы возвратных скрещиваний с привлечением в качестве доноров *ms*-генов различных видов капусты (Bauch, 1980). Кроме того, процесс поддержания таких линий значительно сложнее и не всегда выполним (Г.Ф. Монахос, 2000).

### **Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС)**

Цитоплазматическая мужская стерильность является частным случаем ядерно-цитоплазматической, когда в популяции используемых для скрещивания со стерильной формой нет растений, содержащих специфичный ген-восстановитель фертильности. В большинстве иностранной литературы деления между ЯЦМС и ЦМС нет. Применяется общий термин «CMS – cytoplasmic male sterility», а понятие «ядерно-цитоплазматическая МС (gene-cytoplasmic male sterility)» в чистом виде встречается очень редко.

Цитоплазматическая мужская стерильность – это наследуемый материнской линией, кодируемый митохондриальной ДНК признак, который

приводит к нарушению формирования жизнеспособной пыльцы, при этом фертильность женского гаметофита сохраняется.

Детальный митохондриальный анализ нескольких ЦМС-систем (M. Hanson, 1991; L. Bonen and G. Brown, 1993) показал наличие новых участков митохондриальной ДНК, отсутствующих в мтДНК фертильных растений и тесно связанных с МС. Новые гены, образующиеся в результате частых перестроек митохондриального генома, способны синтезировать необычные белки, нарушающие нормальное функционирование митохондрий и процесс микроспорогенеза.

Принято считать, что ЦМС - это результат митохондриальной дисфункции, вызванной экспрессией новых необычных генов. Так же считают, что ядерные гены-восстановители фертильности ингибируют мт-гены МС.

ЦМС обнаружена у более чем 150 видов растений. Во всех случаях нарушение развития пыльцы связано с экспрессией нового участка мтДНК, содержащего белок кодирующую открытую рамку считывания (ОРС). Использование ЦМС в селекции и семеноводстве F<sub>1</sub>-гибридов является альтернативой системе спорофитной самонесовместимости, как более удобной, надежной и экономически эффективной системы.

Для растений, продуктивным органом которых является вегетативная часть (кочан, корнеплод, лист, черешок), ЦМС-система может быть использована без восстановителей фертильности. А для культур, продуктивным органом которых являются репродуктивные органы (плоды, семена), фертильность гибридных семян должна быть восстановлена специфическими генами-восстановителями фертильности отцовской линии, или андростерильные гибриды должны быть опылены. Опыление гибридных растений без восстановленной фертильности обеспечивается включением в гибридные семена небольшого процента фертильных растений.

В семействе Капустные найдено несколько типов ЦМС, но наиболее распространенными являются три типа, используемые во всем мире. Это

ogura-ЦМС (*ogu*) (Ogura, 1968), napus-ЦМС (*nap*) (K.F. Thompson, 1972; T. Shiga and S. Baba, 1973), polima-ЦМС (*pol*) (T.D. Fu, 1981).

**Ogu-ЦМС.** Найдена в 1968 г. Огурой в японской разновидности редиса (*R. sativus*) (*r1RR*). Путем отдаленной гибридизации редиса с цитоплазмой *r1*, несущей ген стерильности, и видами *Brassica* Bannerot et al. (1974) создал ЦМС-формы *B. oleracea* (*r1CC*) и *B. napus* (*r1AACC*). Heyn (1978) использовал *B. napus* (*r1AACC*) для создания ЦМС *B. campestris* (*r1AA*).

Для интродукции ядерных геномов *Brassica* (CC и AACC) в цитоплазму *Raphanus* (*r1*) (рис. 2) Баннерот (Bannerot) сначала скрещиванием редиса Огуры с капустой и рапсом получил амфигаплоидные гибриды (*r1RC* и *r1RAC*). Затем колхицинированием получил амфидиплоидные аллотетраплоидную (*r1RRCC*) и аллогексаплоидную (*r1RRAACC*) рафанобрассики. Шестикратным беккроссированием капустой и рапсом с применением эмбриокультуры отобрал ЦМС-растения без хромосом редиса (H. Bannerot, 1974).

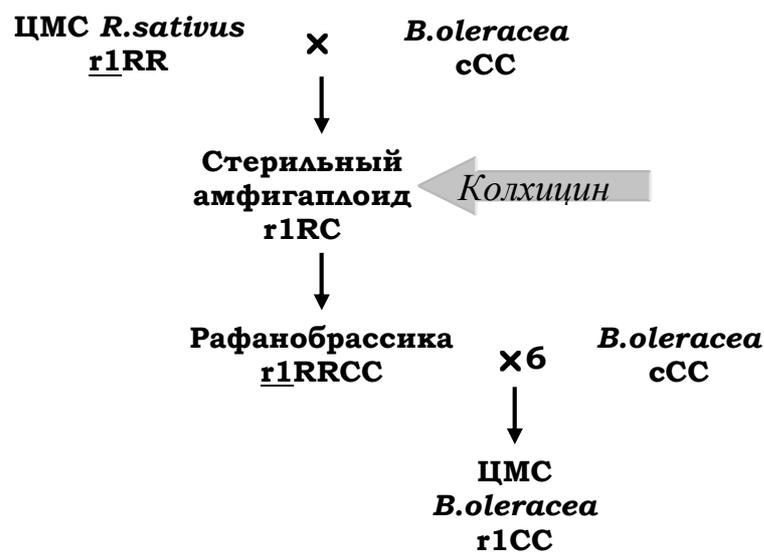


Рис. 2. Схема создания ЦМС растений *Brassica* на цитоплазме *Raphanus*

У отобранных растений с *ogu*-ЦМС при низких температурах проявлялся хлороз и дисфункция нектарников. Недостаток хлорофилла

обуславливал слабый рост и низкую продуктивность растений. Растения без нектара в цветках теряют свою привлекательность для насекомых, что отражается в низкой активности пчел и соответственно низкой завязываемости семян. Эти и некоторые другие аномалии связывают с недостаточной функциональной активностью ядра клеток видов *Brassica* в цитоплазме *Raphanus*.

G. Pelletier с соавторами (1983) слиянием протопластов *ogu*-ЦМС растений рапса (*B. napus*) с растениями рапса, содержащими нормальную цитоплазму, получил несколько цибридов, в цитоплазме которых хлоропласты *Raphanus* были замещены на хлоропласты *Brassica*. Полученные цибриды обладали цитоплазматической мужской стерильностью, названной «*ogu*-INRA улучшенная ЦМС» и были лишены дефектов, сопряженных с прежней *ogu*-ЦМС-системой.

Гены-восстановители фертильности отсутствуют в видах *B. oleracea* и *B. napus*. Восстановление фертильности у *ogu*-ЦМС редиса определяется несколькими ядерными генами, найденными в европейских сортах редиса (A. Bonnet, 1975) и в природных популяциях дикого японского редиса (H. Yamagishi and T. Terachi, 1996; 1997). Интрогрессия части ядерного генома редиса в мужскистерильный рапс позволила восстановить фертильность (F. Neun, 1976). У цибридов рапса с редисом наблюдается моногенный доминантный характер наследования гена-восстановителя фертильности (G. Pelletier et al., 1987).

Этот локус восстановления фертильности был передан в геном рапса с неизвестным количеством связанной с ним генетической информации редиса, в результате чего полученные линии рапса плохо завязывали семена (R. Pellan-Delourme and M. Renard, 1988). Классическими методами селекции были получены линии-восстановители фертильности с нормальной завязываемостью семян (R. Delourme et al., 1991).

*Молекулярный анализ ogu-ЦМС системы. Сравнение близкородственных митохондриальных геномов мужскистерильных (13S) и*

фертильных (13F) потомств цибрида рапса позволило идентифицировать последовательность, сопряженную с Ogura-ЦМС (Bonhomme et al., 1991). Цибриды были получены слиянием протопластов растений *B. napus* с нормальной цитоплазмой и растений *B. napus*, несущих Ogura-цитоплазму (H. Bannerot et al., 1977; G. Pelletier et al., 1983). При анализе последовательности найденного фрагмента мтДНК, обозначенного Nco2.5, было установлено, что он содержит две открытые рамки считывания: *orfB* и *orf138*. Экспрессия *orf138* коррелирует с Ogura-ЦМС в цибридах рапса (S. Bonhomme et al., 1992).

M. Grelon et al. (1994) показал, что *orf138* у стерильных цибридов транслируется в митохондриальный мембранный белок ORF138 (19 kDa). Фертильный ревертантный цибрид 13F содержит *orf138*-ген на фрагменте Nco2.7/13F, но транскрипты этого гена не накапливаются, и ORF138-белок не обнаруживается (S. Bonhomme et al., 1992; M. Grelon et al., 1994). Третья конфигурация *orf138*-гена – Bam4.8/18S, была найдена в другом стерильном цибриде (18S) (M. Grelon et al., 1994).

Изучение контроля экспрессии трех конфигураций митохондриального гена *orf138* (Nco2.5/13S, Nco2.7/13F, Bam4.8/18S, специфичные 13S (стер.), 13F (ферт.) и 18S (стер.) цибридам соответственно) показало, что они имеют одинаковые 5', но различные 3' участки. Слот-блот гибридизация с *orf138*-зондом показала, что *orf138*-транскриптов Bam4.8/18S в 10 раз больше, чем у Nco2.5/13S, в то время как *orf138*-транскрипты Nco2.7/13F не накапливаются. Однако, измерение транскрипционной активности показало, что ее уровень равнозначен для трех конфигураций. Это указывает на то, что стабильность мРНК *orf138*-локуса определяется посттранскрипционно и скорее всего его 3' участком.

Для установления роли 3' участка была создана *in vitro* система, позволяющая оценить уровень стабильности РНК. В присутствии митохондриального лизата рапса синтетические РНК, соответствующие 3' участку Nco2.7/13F-транскрипта, как и ожидалось, оказались менее

стабильными, чем РНК, соответствующие 3' участкам транскриптов Nco2.5/13S и Bam4.8/18S (M. Bellaoui et al., 1997).

Экспрессия *orf138*-гена тесно связана с МС-фенотипом *Brassica* (S. Vonhomme et al., 1991). Образующийся белковый продукт найден во всех тканях стерильных растений. Уровень накопления ORF138-белка в стерильных цибридах рапса пропорционален накоплению других митохондриальных белков. Это говорит о том, что при отсутствии генов-восстановителей экспрессия *orf138* соответствует основной митохондриальной активности.

*Восстановление фертильности ogi*-ЦМС растений определяется доминантным ядерным геном, обозначенным *Rfo*. Ген *Rfo* действует посттрансляционно, оказывая влияние на стабильность ORF138-белка. Наличие гена *Rfo* в геноме растения снижает количество ORF138-белка в цветковых бутонах.

*Rfo*-ген не влияет на количество *orf138*-транскриптов. Анализ бутонов и пыльников показал, что *orf138*-транскрипты транслируются с одинаковой интенсивностью в стерильных и восстановленных растениях (S. Krishnasamy and C.A. Makaroff, 1994). Основываясь на этих данных, полагают, что продукт *Rfo*-гена влияет на посттрансляционную стабильность ORF138-белка, приводя к снижению накопления этого белка и восстановлению фертильности.

***Pol*-ЦМС.** Найдена в Китае в польском сорте рапса *B. napus* cv Polima (T.D. Fu, 1981). Восстановители фертильности найдены в сортах *B. napus* var. и *B. juncea* var. В основном используется в селекции ярового рапса. Использование данной ЦМС-системы ограничено из-за тенденции *pol*-растений формировать фертильную пыльцу и завязывать семена от самоопыления, особенно в условиях теплого климата. Поэтому гибридные семена содержат значительную часть негибридных, вследствие чего получаемые урожаи ниже, чем при использовании 100% гибридных семян.

*Молекулярный анализ pol-ЦМС системы.* Для идентификации участков митохондриального генома, которые отличали бы растения *pol*-ЦМС от фертильных, был проведен РНК гель-блот-анализ транскриптов 14 митохондриальных генов *cam* (фертильных), *pol*-стерильных и *pol*-растений с восстановленной фертильностью. Транскрипционные различия были установлены только с геном 6-й субъединицы АТФазы (*atp6*). Анализ последовательности *atp6*-гена и прилегающих к нему участков *pol*- и *cam*-митохондриальных ДНК выявил нарушение последовательности в *pol*-мтДНК выше *atp6*-гена. В результате перестройки была образована химерная 224-кодонная открытая рамка считывания, котранскрибируемая с *atp6* и обозначенная *orf224* (M. Singh and G. Brown, 1991) (рис. 3). 58 N-концевых терминальных кодонов *orf224*-гена получены от митохондриального гена с неизвестной функцией, обозначенного *orfB*; остальная часть не соответствует ни одной известной митохондриальной последовательности.

Выделяют две возможные причины *pol*-цитоплазматической мужской стерильности.

Первая причина - нарушение функций митохондрий в результате проявления предполагаемого ORF224-белка в клетках цветков.

Основанием для данного предположения является то, что кодируемый химерным геном *orf224* продукт ORF224 содержит два мембрансвязывающих домена и предположительно является интегральным мембранным белком.

Чтобы оценить возможность ORF224-белка вызывать мужскую стерильность, канадскими учеными была предпринята попытка трансформации фертильных растений *B. napus* cv Westar генной конструкцией, состоящей из последовательности, кодирующей *orf224* и последовательности, кодирующей транзитный пептид, доставляющий белок в митохондрии. У части полученных трансгенных растений была отмечена частичная стерильность пыльцы, а у некоторых - высокая. Наряду с проявлением стерильности у растений наблюдались сильные нарушения в развитии цветков. У растений с нормальной пыльцой и без нарушений

развития цветка не было экспрессии транзитного пептида. Таким образом, их результаты показали, что экспрессия *orf224* способна вызывать мужскую стерильность, при условии взаимодействия с митохондриями (M. Singh and G. Brown, 1991).

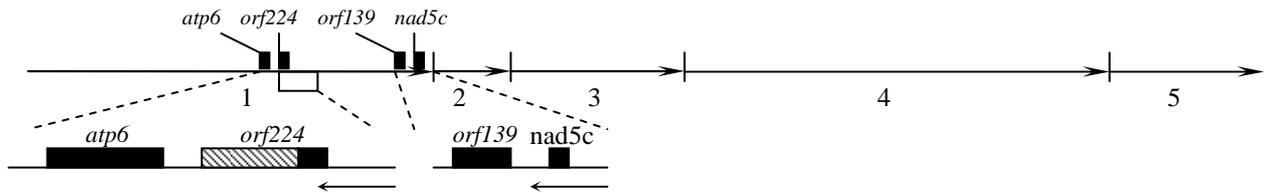
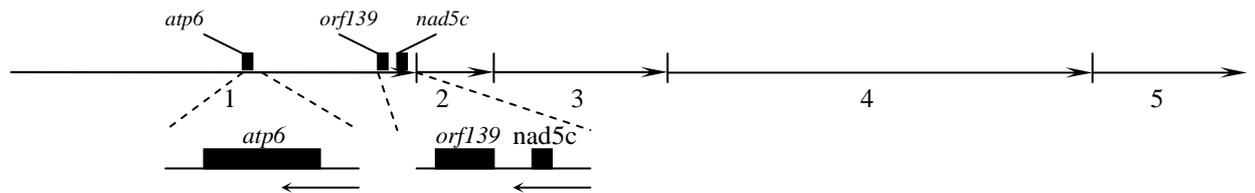
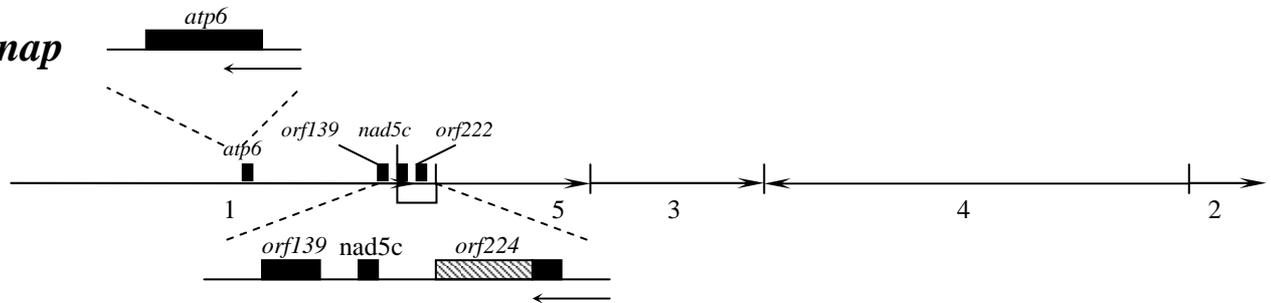
*pol**caml**nar*

Рис. 3. Организация и экспрессия участков мтДНК, связанных с ЦМС.

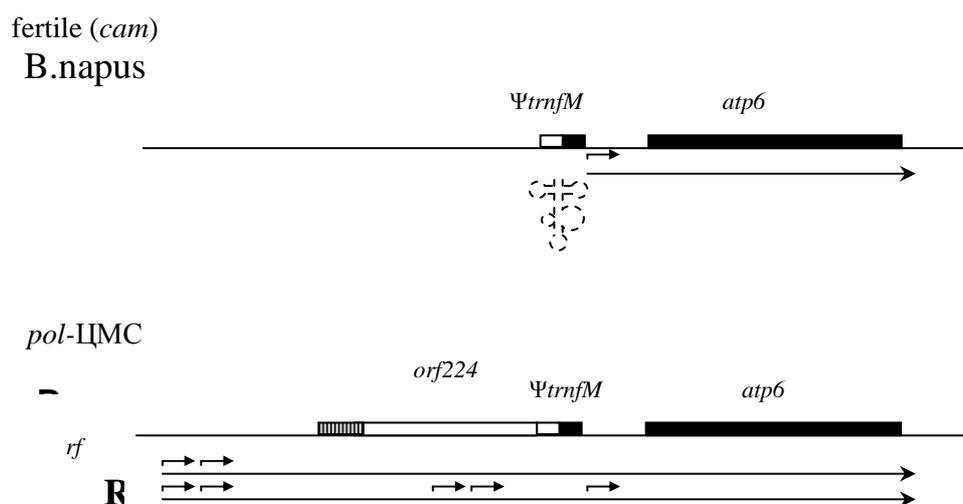
Митохондриальные ДНК *nar* (стер.) и *caml* (ферт.) цитоплазмы изображены в линейной форме по Palmer и Herbon (1988), *pol* (стер.) – по L'Homme и Brown (1993). Цифры под линиями отображают порядок чередования сегментов в кольцевых молекулах различных ЦМС систем; стрелки указывают относительную ориентацию последовательностей в этих участках (Palmer and Herbon, 1988). Белые прямоугольники под *pol*- и *nar*-мтДНК указывают расположение 4,5 kb сегмента, содержащего ЦМС-определяющие ОРС. В расширенных пунктирными линиями сегментах отображены структуры мтДНК участков, связанных с ЦМС. Черные прямоугольники обозначают обычные митохондриальные гены, а заштрихованные – новые участки, найденные в ЦМС-связанных ОРС. Стрелки под расширенными сегментами указывают направление транскрипции.

Вторая возможная причина – недостаток *atp6*-субъединицы из-за ограниченной трансляции. НЛРС анализ АТФазных препаратов показал, что количество 6-й субъединицы по отношению к другим субъединицам на 40% ниже у *pol*-ЦМС, чем у растений с восстановленной фертильностью (M. Singh and G. Brown, 1991). Ограничение трансляции связано с

преимущественным синтезом дицистронных *orf224/atp6*-транскриптов в цветках *pol*-ЦМС растений (M. Singh and G. Brown, 1991).

5' конец *atp6*-мРНК в митохондриях фертильных растений находятся в непосредственной близости от 3' конца *trnfM*-псевдогена. Это дает возможность предположить, что формирование 5' конца *atp6*-мРНК происходит в результате эндонуклеотического отщепления тРНК-подобного элемента. А в *pol*-ЦМС растениях процессинг невозможен вследствие того, что основные компоненты тРНК-подобного элемента замещены последовательностью неизвестного происхождения (рис. 4) (M. Singh and G. Brown, 1991).

Так же нельзя отвергать возможное совместное действие недостатка 6-й субъединицы АТФазы и присутствия aberrантного *orf224*-кодируемого



**Рис. 4. Организация и экспрессия участков мтДНК, содержащих *atp6*-гены, фертильной (*nap*) и стерильной (*pol*) *V. napus*.**

Прямые линии с окрашенными и неокрашенными блоками – мтДНК; линии со стрелками – 5'-3' транскрипты; черные блоки – участки мтДНК с известными последовательностями, соответствующие *atp6*- и *trnfM*-генам; белые блоки – участки мтДНК неизвестного происхождения; блок с вертикальной штриховкой – участок *orf224*, соответствующий участку *orfB*-гена; фигура, изображенная пунктирной линией – предполагаемая неустойчивая вторичная структура тРНК-подобного элемента; rf – мтДНК-транскрипт *pol*-ЦМС растения без гена восстановителя фертильности; Rf – мтДНК-транскрипт растения с *pol*-цитоплазмой и восстановленной фертильностью.

белка на проявление ЦМС (M. Singh and G. Brown, 1991).

*Восстановление фертильности pol-ЦМС* растений определяется доминантным ядерным геном, обозначенным *Rfp*. Ген-восстановитель фертильности действует посттранскрипционно, его экспрессия приводит к изменению *orf224/atp6*-транскриптов в результате чего образуются два дополнительных моноцистронных транскрипта: преимущественно *atp6* и *orf224*.

Если ЦМС напрямую связана с накоплением ORF224-белка, тогда можно предположить, что *Rfp* подавляет экспрессию *orf224*-гена, воздействуя либо на трансляцию, либо на сам белок, так как снижение уровня накопления дицистронных транскриптов *orf224/atp6* не приведет к существенному снижению накопления ORF224-белка.

По мнению канадских ученых, основная функция гена-восстановителя фертильности – повышение количества моноцистронных транскриптов *atp6*, компенсирующее возможный недостаток 6-й субъединицы АТФазы.

5' концы *atp6*-транскриптов *Rfp*-растений не несут ди- и трифосфатные остатки, свойственные 5' концам, формирующимся в результате транскрипционного процесса. Поэтому можно предположить, что *Rfp*-продукт обладает процессинговой активностью (M. Singh and G. Brown, 1996).

***Nap-ЦМС.*** Найдена двумя группами ученых в разных сортовых популяциях рапса (*B. napus*): К.Ф. Thompson (1972) – в потомстве европейского, Т. Shiga and S. Baba (1973) – в потомстве японского. Большинство сортов *B. napus* содержат *nap*-цитоплазму, но они фертильны, так как несут ген-восстановитель для *nap-ЦМС*. *Nap*-цитоплазма обуславливает мужскую стерильность только у некоторых сортов, не содержащих ген-восстановитель, такие как сорт «Bronowski». Проявление мужской стерильности чувствительно к условиям развития растений,

особенно к воздействию температуры. При температуре воздуха  $> 30^{\circ} \text{C}$  и на поздних этапах цветения растения формируют жизнеспособную пыльцу.

*Молекулярный анализ *par*-ЦМС системы.* Идентификация ЦМС-определяющего фрагмента в *par*-митохондриальном геноме оказалась достаточно сложной задачей, так как было обнаружено сразу несколько различий между стерильной *par*- и фертильной *cam*-мтДНК (J. Palmer and L. Herbon, 1988). Большая часть этих различий представлена простыми инверсиями и транслокациями фрагментов и групп сцепления (рис. 3). Однако было показано, что *par*-мтДНК содержит 4.5 kb сегмент, расположенный выше *c*-экзона *nad5*-гена, кодирующего 5-ю субъединицу NADH-дегидрогеназного комплекса, и схожий с 4.5 kb сегментом, выше *atp6*-гена в *pol*-мтДНК (Y. L'Homme et al., 1997). У Капустных так же, как и других культур, экспрессия *nad5*-гена включает транс-сплайсинг центрального *c* экзона с цис-сплайсированными выше- и нижерасположенными экзонами, кодируемыми отдельными участками мтДНК (A. Pereira de Souza et al., 1992). В результате транслокации 4.5 kb участка в *par*-мтДНК *nad5c* котранскрибируется с ОРС, обозначенной *orf222*, образуя *orf222/nad5c/orf139*-транскрипты (рис. 3).

Между экспрессией *orf222/nad5c/orf139*-участка мтДНК и *par*-ЦМС установлена высокая корреляционная связь. Это единственный сегмент, по которому удалось выявить транскрипционные различия у трех испытываемых линий (*par*-ЦМС, *par* с восстановленной фертильностью и фертильных *cam*-растений). Принимая во внимание действие гена-восстановителя, модифицирующего *orf222/nad5c/orf139*-транскрипты (Y. L'Homme et al., 1997), предполагают, что именно этот фрагмент определяет *par* мужскую стерильность (G. Brown et al., 1998).

*Orf222* является химерным геном. Нуклеотидная последовательность примерно на 85% схожа с *pol orf224*. Предполагаемый продукт *orf222*-гена – интегральный мембранный белок (26 kDa) на 79% гомологичный предполагаемому продукту *orf224*-гена (Y. L'Homme et al., 1997).

*Восстановление фертильности nar-ЦМС растений определяется доминантным ядерным геном, обозначенным Rfn. Rfn изменяет транскрипт nar-локуса orf222/nad5c/orf139, кроме того влияет на транскрипт псевдогена ccl1-1 (M. Singh et al., 1996; R. Menassa et al., 1997) и транскрипт nad4-гена (M. Singh et al., 1996). Rfn и Rfp являются аллелями одного ядерного гена.*

## СЕЛЕКЦИЯ ПЕКИНСКОЙ КАПУСТЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСНОВНЫМ ПАТОГЕНАМ

### *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson

Возбудитель сосудистого бактериоза *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson является одной из самых вредоносных бактерий во всем мире (Р.Н. Williams, 1980). В настоящее время известно более 160 штаммов рода *Xanthomonas*, имеющих широкую филогенетическую специализацию. Они вызывают заболевания по меньшей мере на 124 однодольных и 268 двудольных видах растений, включая все основные с/х культуры (F. Leyns, 1984). В зависимости от степени развития болезни потери урожая могут достигать 100 процентов (Н.С. Сухорукова, 1987). Наряду с прямыми потерями значительно снижается качество продукции (Ф.С. Гордиенко, 1940; Н.С. Сухорукова, 1987).

К главным путям проникновения патогена в растение относят гидатоды, устьица (при условии длительного увлажнения листьев) и механические травмы на листьях и корнях (А.А. Cook et al., 1952). Основной процент заражения приходится на гидатоды. Возбудитель попадает в гуттационные капли в условиях высокой влажности, а затем при снижении влажности эти капли втягиваются в лист. Бактерии, преодолев несколько слоев паренхимных клеток, получают доступ в сосудистую систему, где активно питаются и размножаются.

Поражение капусты наблюдается на всех этапах развития. Типичные симптомы сосудистого бактериоза проявляются на листьях в виде V-образных хлорозов с темными некротизированными жилками пораженной области.

Приоритет в системе мероприятий интегрированной защиты растений от поражения фитопатогеном отдается селекции на устойчивость и возделыванию устойчивых сортов и гибридов.

Устойчивость капустных растений к патогену проявляется в двух местах: в мезофилле (листовая устойчивость), окружающем гидатоды (Sutton and Williams, 1969) и в сосудах ксилемы (стеблевая устойчивость) (Bain, 1955).

Листовая устойчивость определяется несколькими специфическими генами и проявляется в виде ответной реакции сверхчувствительности растений на проникновение фитопатогена в мезофилл листа.

Известно несколько доноров листовой устойчивости, на основе которых в 1992 году Kamoun в соответствии с реакцией трех растений *B. rapa* и одного *B. juncea* сгруппировал изоляты *X.c. pv. campestris* в 5 рас (S. Kamoun et al., 1992). А в 1997 году, по предложению А.Н. Игнатова, состав дифференциаторов был расширен, и выделена еще одна, дополнительная раса (табл. 2) (A.N. Ignatov et al., 1997).

Таблица 2

**Система дифференциации рас *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* по S. Kamoun (1992) в модификации А. Игнатова (1997)**

Дифференциаторы	R гены	Расы					
		0	1	2	3	4	5
Wirosa F <sub>1</sub> ( <i>B. oleracea</i> )	---	+	+	+	+	+	+
Just Right Hybrid Turnip ( <i>B. rapa</i> )	<i>R4</i>	+	+	+	-	-	+
Tokyo Cross Hybrid Turnip ( <i>B. rapa</i> )	<i>R4</i>	+	+	+	-	-	+
Seven Top Turnip ( <i>B. rapa</i> )		+	+	-	+	-	+
Florida Broad Leaf Mustard ( <i>B. juncea</i> )	<b>R2</b>	+	-	+	-	-	-
Badger Inbred 16 ( <i>B. oleracea</i> )	<i>Rb</i>	+	-	+	+	+	-
Gigant English ( <i>B. napus</i> )	<i>R1r5</i>	+	+	+	-	+	+
Pi 436606 ( <i>B. oleracea</i> )	<i>R3</i>	+	+	+	+	+	-
Pi 199947 ( <i>B. carinata</i> )		+	-	+	-	-	-
	<i>r5</i>						
	<i>Rb</i>						

+ - восприимчивый, - - устойчивый

Как видно из таблицы №, в числе доноров генов устойчивости к сосудистому бактериозу имеются растения вида *B. rapa*, которые легко могут быть использованы в скрещиваниях с пекинской капустой. Но они несут гены, определяющие устойчивость лишь к двум расам патогена. Для

обеспечения устойчивости к остальным расам необходимо привлечение других видов, посредством более сложной отдаленной гибридизации.

Помимо расоспецифичной листовой устойчивости в популяциях *B. oleracea* var. из Юго-восточной Азии обнаружены образцы, обладающие стеблевой устойчивостью. При данном типе устойчивости распространение бактерий полностью блокируется в сосудах стебля, несмотря на восприимчивость листьев. Стеблевая устойчивость определяется одним или двумя неспецифичными доминантными генами (*Rs*), независимыми от расово-специфичной листовой устойчивости (A.N. Ignatov et al., 1999).

Известно, что патогенность бактерий определяется относительно небольшой частью генома, включающей кластер генов сверхчувствительности (*hrp*) и гены патогенности/авирулентности (*pth/avr*). Единичные мутации этих генов способны привести к изменению специализации фитопатогена или симптомов болезни, т.е. практически к образованию новой расы (D.W. Gabriel et al., 1993; J. Chen et al., 1994). Наглядным примером является опыт выделения нулевой расы сосудистого бактериоза, поражающей абсолютно все капусты, из расы, против которой имеется ген устойчивости (А.Н. Игнатов, Г.Ф. Монахос, Ф.С. Джалилов, 2000). Появление новых высоко агрессивных форм патогена может служить одной из главных причин эпифитотий сосудистого бактериоза.

Поэтому при выведении устойчивых к сосудистому бактериозу форм рекомендуется использовать неспецифическую стеблевую устойчивость в сочетании с несколькими типами расоспецифичной, что позволит снизить риск появления и распространения новых вирулентных рас фитопатогена (A.N. Ignatov et al., 1999).

### ***Plasmodiophora brassicae* Wor.**

Кила, вызываемая почвенным грибом *Plasmodiophora brassicae* Wor., - вредоносное заболевание всех видов семейства Крестоцветные и некоторых – семейства Сложноцветные, включая дикорастущие. Патоген поражает

корневую систему растений, вызывая разрастание паренхимной ткани корней и образование «желваков». Пораженные корни не справляются с поглощением воды и питательных веществ из почвы, что приводит к увяданию и задержке роста растения. В «желваки» легко проникают почвенные фитопатогенные бактерии (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.), развиваются мокрые гнили корня и стебля, растения гибнут.

Возбудитель килы распространен повсеместно, где возделываются крестоцветные культуры. По данным Crête на 1981 год, в северо-западной Европе, Японии, Северной Америке и Австралии кила была распространена на 10% территорий, занятых культурами *Brassica* (R. Crête, 1981). В связи с увеличением числа используемых видов сем. Крестоцветные и интенсификацией сельскохозяйственного производства возбудитель заболевания распространяется на все большие территории. Распространение спор *P. brassicae* происходит как в процессе мероприятий по обработке почв, так и с поверхностным и внутрипочвенным током вод и в небольшой степени ветром (P. Mattusch, 1978). Проникая в почву на глубину до 25-30 см, споры патогена сохраняют способность к инфекции до 15 лет (P. Mattusch, 1978).

Агротехнические приемы: внесение в почву кальция, бора, и известкование, способствующие увеличению рН, снижают заболеваемость, но их все равно не достаточно для получения здорового полноценного урожая. Борьба с килкой с помощью многопольных севооборотов не эффективна из-за длительного существования в почве спор, а также увеличения их числа благодаря крестоцветным сорнякам. Применение пестицидов ограничено из-за отсутствия экономически доступного и экологически безвредного фунгицида для внесения в почву. Наиболее целесообразным способом борьбы с килкой крестоцветных является выведение и возделывание устойчивых сортов и гибридов.

При выведении устойчивых к киле сортов и гибридов пекинской капусты в качестве источника устойчивости используют европейскую кормовую репу (M. Ashikawa et al., 1980; Kuginuki et al., 1994). Устойчивость

европейских форм реп имеет доминантный характер наследования, и контролируется тремя независимыми генами. К настоящему моменту в России в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию, зарегистрировано два  $F_1$  гибрида пекинской капусты (*B. pekinensis*) с генетической устойчивостью к киле -  $F_1$  Ника и  $F_1$  Кудесница. Оба гибрида созданы на селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева (МСХА).

Выведение устойчивых к киле сортов капусты *B. oleracea* ssp. сопряжено с рядом трудностей. Основной причиной неудач является малое число источников устойчивости, рецессивное и зачастую полигенное наследование этого признака, а также генетическая изменчивость патогена.

Любая полевая популяция *P. brassicae* представлена различающимися по патогенности расами. Для ведения селекции на резистентность необходима их характеристика. С целью классификации рас патогена создано несколько систем дифференциации. Чтобы прийти к однозначной дифференциации рас, европейскими группами исследователей принята единая европейская система дифференциаторов (ЕСД) (S. Buczacki et al., 1975). ЕСД система состоит из 15 генотипов трех видов крестоцветных: *B. campestris*, *B. napus* и *B. oleracea* – по пять образцов каждого вида (табл. 3).

Растения-дифференциаторы 01-04 - линии турнепса, созданные голландскими учеными (Н. Тохореус, А. Янссен, 1975). Их устойчивость контролируется тремя независимыми доминантными генами. Дифференциатор 05 – сорт пекинской капусты “Granaat”, восприимчивый ко всем расам возбудителя, служит контролем восприимчивости.

Растения-дифференциаторы 06-09 представлены сортами и линиями рапса “Nevin”, “Commercial Giant”, “Clubroot Resistant” и отбором из сорта “Commercial Giant”. Растение-хозяин 10 – сорт брюквы “Wilhelmsburger”.

Генотипы 11-15 принадлежат виду *B. oleracea* и представлены сортами белокочанной “Badger Shipper”, “Jersei Queen”, “Bindsachsener”, “Septa” и листовой “Verheul” капусты.

**Таблица 3**

**Европейская система дифференциации возбудителя килы  
(S. Buczacki et al., 1975)**

№	Сорт – дифференциатор	Двоичный индекс образца	Десятичный индекс образца
	20 - хромосомная группа		
01	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия aaBBCC	2 <sup>0</sup>	1
02	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия AaаввСС	2 <sup>1</sup>	2
03	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия AАВВсс	2 <sup>2</sup>	4
04	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия ААВВСС	2 <sup>3</sup>	8
05	<i>B. pekinensis</i> (Lour.) Rupr. cv. Granaat	2 <sup>4</sup>	16
	38 – хромосомная группа		
06	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Nevin Дс 101	2 <sup>0</sup>	1
07	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Commercial giant Дс 119	2 <sup>1</sup>	2
08	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Commercial giant Дс 128	2 <sup>2</sup>	4
09	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, New Zealand Clubroot Resistant ДС 129	2 <sup>3</sup>	8
10	<i>B. napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> (L.) Rchb. Wilhelmsburger Дс 130	2 <sup>4</sup>	16
	18 - хромосомная группа		
11	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Badger Shipper	2 <sup>0</sup>	1
12	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Bindsachsener	2 <sup>1</sup>	2
13	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Jersey Queen	2 <sup>2</sup>	4
14	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Septa	2 <sup>3</sup>	8
15	<i>B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>viridis</i> Thell. cv. Verheul	2 <sup>4</sup>	16

Номенклатура идентифицированных рас осуществляется с помощью ЕСД-кода, получаемого при сложении цифровых значений пораженных генотипов в каждой хромосомной группе (S. Buczacki et al., 1975).

Генетическая изменчивость патогена позволяет оценить полевые изоляты с помощью системы дифференциаторов только для инокулюмов, использованных в анализе. Популяции патогена, выделяемые из других желваков особенно после дальнейшего размножения, могут значительно отличаться патогенностью от исходных (R. Voorrips, 1996).

Характер наследования найденной устойчивости изучен лишь частично. У разных видов он сильно различается. Устойчивость европейских форм *B. campestris* к *P. brassicae* имеет доминантный характер наследования (Т. Johnston, 1970) и контролируется тремя независимыми генами, где каждый ген отвечает за резистентность против разных патотипов (Н. Тохореус, А. Janssen, 1975). Азиатские формы в большинстве своем являются восприимчивыми.

Диапазон уровней устойчивости *B. napus* характеризуется широким спектром от восприимчивых до резистентных (М. Ashikawa et al., 1973). Брюква показывает полную резистентность, в то время как рапс предрасположен к поражению (М. Ashikawa et al., 1980).

Сведения о высокой степени устойчивости к *P. brassicae* у вида *B. oleracea* отсутствуют. Устойчивость *B. oleracea* полигенная и наследуется рецессивно (М. Chiang, R. Crete, 1970, W. Seaman et al., 1963, К. Proudfoot, 1976, Н. Тохореус, 1978a). Н. Тохореус с соавторами (1978b) показал, что устойчивость *B. oleracea* определяется 6-ю рецессивными генами. Найденная резистентность проявляется независимо от рас (S. Buczacki et al., 1983) и не действует против высоких концентраций инокулюма. Монахос Г., Ушанов А. (1998) установили, что устойчивость у некоторых линий кормовой капусты контролируется одним рецессивным либо дубликатным действием двух рецессивных генов.

В роде *Raphanus* устойчивость к киле выше, чем у *B. campestris*, *B. napus* и *B. oleracea*. При этом редьки американского происхождения менее резистентны, чем редьки европейского и азиатского происхождения (R. Rowe, 1980). Сообщение о наследовании устойчивости к *P. brassicae* Wor. в

роде *Raphanus* в литературе указывают на моногенно доминантный тип (М. Ashikawa et al., 1980; Г. Монахос, И. Зубик, 2000).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дипломная работа состоит из трех отдельно выполненных работ, представленных в виде самостоятельных статей. Каждая статья содержит описание цели, материалов и методов исследований, результаты исследований и выводы.

### 1. СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ С ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ

Достаточно продолжительное время во всех развитых странах мира проводятся работы, направленные на повышение урожая посредством использования гетерозисного эффекта гибридов первого поколения  $F_1$ . Этот принцип повышения урожая так же используется в селекции пекинской капусты (*B. pekinensis*). Как известно, до настоящего времени гибридные растения получали путем использования явления самонесовместимости. На ее основе предложены различные генетические схемы получения гибридных семян (D.H. Pearson, 1932; А.В. Крючков, 1977). Однако такой способ является очень трудоемким, требующим больших экономических затрат, что в конечном итоге отражается на стоимости гибридных семян. Более удобной биологической основой для получения гибридных семян  $F_1$  является мужская стерильность, благодаря которой создание инбредных линий для производства  $F_1$ -гибридов может быть упрощено, а стоимость семеноводства значительно уменьшится (P.H. Williams and F.W. Heyn, 1981).

Проблему создания ЦМС-линий пекинской капусты решали различными путями. Вильямс и Хейн (1981) использовали рапс *B. napus* с *ogi*-ЦМС, полученный путём отдалённой гибридизации *R. sativus* с *B. napus* (H. Bannerot, Y. Bouldard and J. Temp, 1974). В Китае использовали *pol*-ЦМС (Zhang Lu-Gang, 2000), однако под действием биотических и абиотических факторов возникают различные аномалии, такие как хлороз, низкая фертильность женского гаметофита, низкая функциональная способность нектарников, которые мешают использованию ЦМС-форм в практической

селекции (Р.Н. Williams and F.W. Heyn, 1981). В России до сих пор не известно публикаций отечественных ученых, посвященных теме передачи цитоплазматической мужской стерильности пекинской капусте (*B. pekinensis*).

### 1.1 Цель, материалы и методы исследований

**Цель работы** – изучить возможность передачи цитоплазматической мужской стерильности от рапса (*B. napus*) в пекинскую (*B. pekinensis*) и белокочанную (*B. oleracea*) капусты и выявить ее проявление в сочетании с новым ядерным материалом.

#### Материалы и методы

Работа выполнена на селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева МСХА и на кафедре генетики МСХА в 1999 - 2004 гг.

В опыте использовали растения ярового рапса (*B. napus*), F<sub>1</sub> Посейдон, - источник ЦМС; коллекцию инбредных линий пекинской капусты (*B. pekinensis*) с генетической устойчивостью к киле крестоцветных (*P. brassicae* Wor.); растения линий белокочанной капусты (*B. oleracea*).

Получение межвидовых гибридов и их беккроссирование проводили по схеме, приведенной на рисунке 1.1. Гибридизацию проводили вручную.

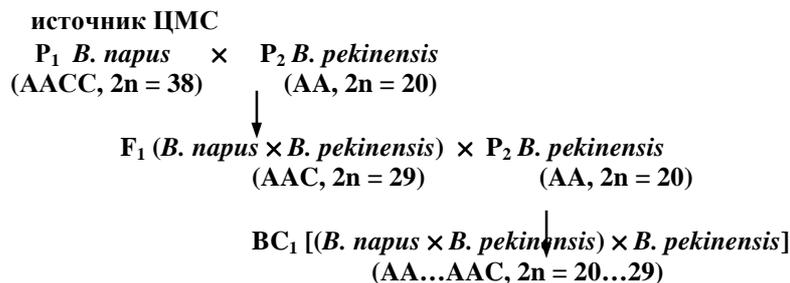


Рис. 1.1.Схема скрещивания

Выявление самосовместимых линий и линий с пониженной самонесовместимостью проводили автогамным опылением 10 цветков 10 растений каждой линии. После опыления соцветия помещали под изоляторы

из пергаменты для защиты от случайного переопыления. Степень самосовместимости оценивали подсчетом среднего числа завязавшихся семян на 1 стручок со всех растений каждой линии.

Изогенные пары (фертильная линия – ЦМС-аналог) создавали беккроссированием ЦМС-формы фертильными самосовместимыми линиями в ряде поколений и отбором по морфологическим признакам и биологическим свойствам. Отбор проводили до тех пор, пока фертильные линии и их андростерильные аналоги не становились идентичными.

## **1.2 Результаты исследований**

Растение рапса (*B. napus*) с ЦМС подвергали принудительному опылению в бутонах пыльцой линий пекинской капусты (*B. pekinensis*), в результате из 140 опылённых бутонов завязалось 120 стручков. Скрещивание проходило довольно легко – в среднем на один стручок завязалось 15 - 20 семян (табл. 1.1).

**Таблица 1.1**

**Скрещиваемость ЦМС-рапса (*B. napus*) с линиями пекинской капусты (*B. pekinensis*)**

Комбинации скрещивания	Опылено бутонов, шт.	Завязалось стручков, шт.	Завязалось семян, шт.	Завязалось семян на 1 стручке, шт.
ЦМС × 4-1221	9	9	171	19
ЦМС × 38-14	16	16	316	20
ЦМС × 72-11	14	14	295	21
ЦМС × Чи 1-31	15	15	330	22
ЦМС × Чи 1-41	10	10	208	20
ЦМС × Чи 1-11	10	5	92	18
ЦМС × 21-1т112	10	10	193	19
ЦМС × 21-1т111	10	8	82	10
ЦМС × 21-3113	10	8	182	23
ЦМС × 21-3114	21	21	328	15
Всего	125	116	2197	×

Параллельно таким же образом скрещивали рапс (*B. napus*) с белокочанной капустой (*B. oleracea*), но семян от этого скрещивания получить не удалось (табл. 1.2).

**Таблица 1.2.**

**Результаты гибридизации ЦМС-рапса (*B. napus*)  
с линиями белокочанной капусты (*B. oleracea*)**

Комбинации скрещивания	Опылено бутонов, шт.	Завязалось стручков, шт.	Завязалось семян, шт.
ЦМС × 1	261	232	0
ЦМС × 2	260	172	0
ЦМС × 3	45	23	0

Таким образом, выявились большие различия в совместимости амфидиплоидного генома ААСС с диплоидными АА и СС: гибридизация растений генома ААСС с растениями, обладающими

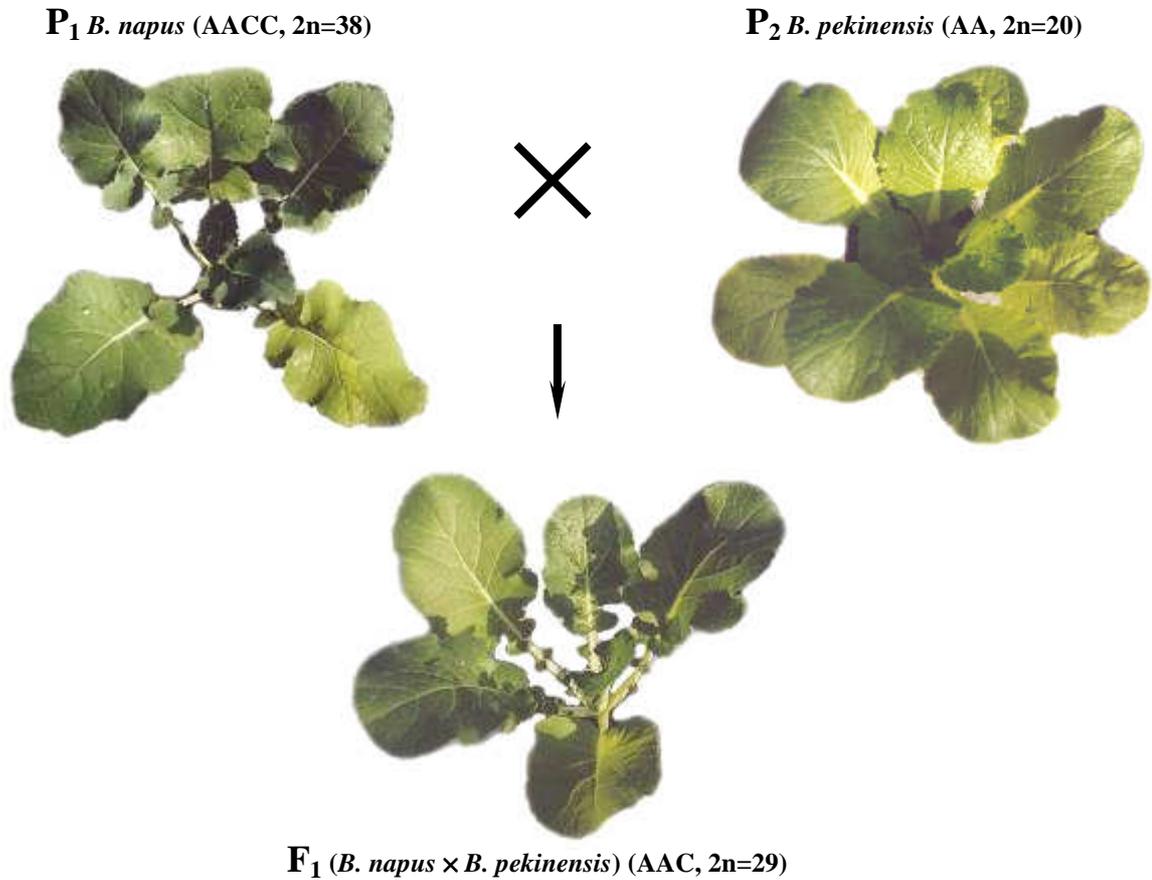


Рис. 1.2. Родительские формы  $P_1$  *B. napus*,  $P_2$  *B. pekinensis* и межвидовой гибрид  $F_1$  (*B. napus* × *B. pekinensis*)

геномом АА, проходит легко, а с видами, имеющими геном СС, очень трудно. Это, по-видимому, контролируется генетически.

Семена межвидовых гибридов (*B. napus* × *B. pekinensis*) (ААС,  $n = 29$ )

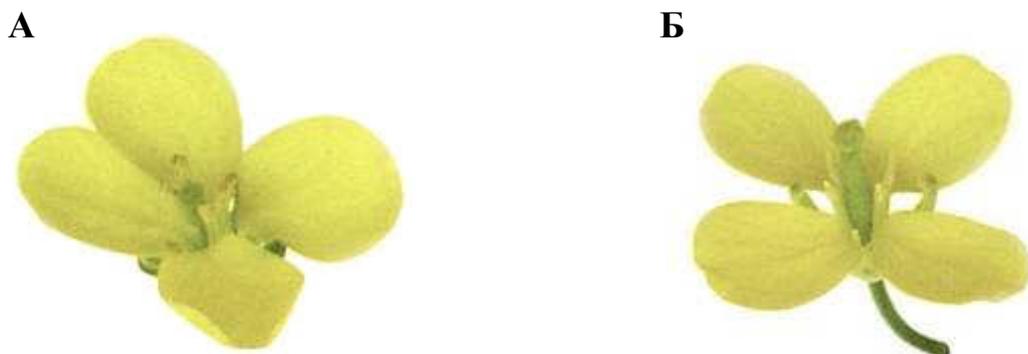


Рис. 1.3. Морфологическое различие тычинок фертильного (А) и стерильного (Б) цветков

высевали в кассеты, затем рассаду высаживали в открытый грунт. Всего было высажено 250 растений, которые подвергали морфологическому анализу в течение лета 2000 года. У F<sub>1</sub> гибридов в целом наблюдалось доминирование признаков родителя с большим числом хромосом, т.е. рапса (рис. 1.2). Они имели длинный ветвистый стебель, рассечённый лист на длинном черешке, тёмную окраску листьев. При этом все 250 растений были стерильны (рис.1.3), имели функционально активные нектарники, охотно посещались пчёлами.

Несколько растений с морфологическими признаками промежуточного типа были отобраны для проведения беккросса. Следует отметить, что и в беккроссе скрещивание проходило легко. В среднем на опылённый бутон завязалось 3 - 6 семян (табл. 1.3).

Таблица 1.3

### Беккросс растений межвидового гибрида (*B. napus* × *B. pekinensis*)

Комбинации скрещиваний	Опылено бутонов, шт.	Завязалось стручков, шт.	Завязалось семян, шт.	Завязалось семян на 1 стручок, шт.
(ЦМС × Sg72) × Чи1-21	34	34	148	4
(ЦМС × Sg72) × 20-2cc1	105	96	565	6
(ЦМС × Sg3818) × 20-2cc1	12	10	29	3

### пыльцой *B. pekinensis*

В полученных популяциях BC<sub>1</sub> наблюдали более широкий полиморфизм растений по вегетативным признакам, чем гибридов F<sub>1</sub> (форма и цвет листа, ширина черешка, длина и ветвистость стебля). В результате

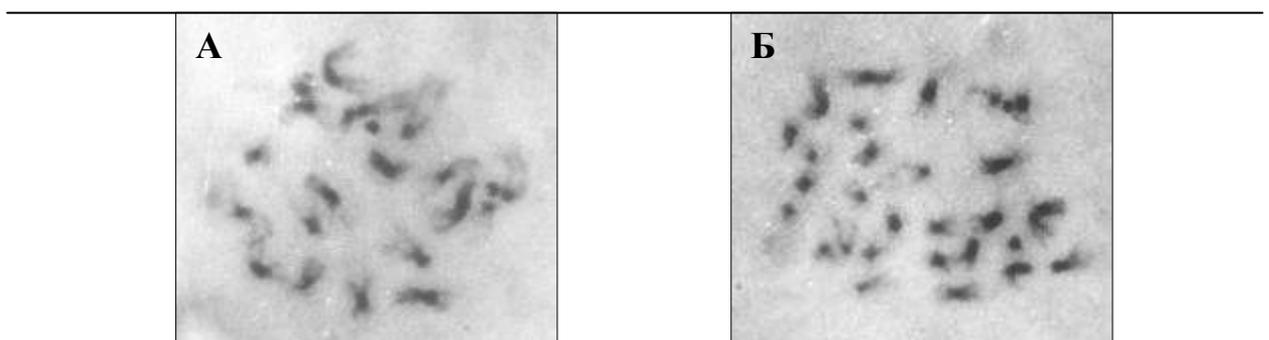


Рис. 1.4. Метафазные пластинки митотических клеток растений BC<sub>1</sub> с числом хромосом 2n = 21 (А) и 2n = 29 (Б).

цитологического анализа некоторых растений было установлено, что число хромосом у этих гибридов варьирует от  $2n = 21$  до  $2n = 29$  (рис. 1.4).

Из всего многообразия выращенных растений (250 шт.) удалось выделить 15 форм, по своим морфологическим признакам приближающихся к пекинской капусте. Причём одно растение полностью соответствовало отцовской форме (рис. 1.5). Цитологический анализ пыльников молодых бутонов этого растения показал, что микроспорогенез проходит до образования тетрады микроспор нормально, а анализ пыльников в фазу начала раскрытия цветка показал, что в них образуются мелкие деформированные стерильные пыльцевые зерна. Это свидетельствует о том,



**P<sub>2</sub>** *B. pekinensis* (AA,  $2n=20$ )



**BC<sub>1</sub>** [*B. napus* × *B. pekinensis*] × *B. pekinensis*  
(AA...AAC,  $2n=21$ )

Рис. 1.5. Морфологическое сходство родительской формы (P<sub>2</sub>) и растения из популяции первого беккроссного поколения (BC<sub>1</sub>)

что абортация пыльцы происходит в процессе микрогаметогенеза.

Растение с  $2n = 21$  использовано нами для проведения следующего цикла беккроссов растениями линий пекинской капусты, в результате которого были получены стабильные 20-хромосомные растения типичной пекинской капусты с цитоплазматической мужской стерильностью.

Следующий этап селекционной работы состоял в создании андростерильных аналогов фертильных линий с пониженной

самонесовместимостью или полностью самосовместимых, обладающих высокой комбинационной способностью.

В результате обследования коллекции линий пекинской капусты на самосовместимость были выявлены две линии Чи1к4-34 и 21ок4-54, обладающие пониженной самонесовместимостью и завязывающие от самоопыления 6-7 семян на стручок (табл. 1.4).

**Таблица 1.4**

**Результат автогамного опыления цветков коллекции линий**

№ п/п	Селекционный номер линии	Завязываемость семян при автогамном опылении цветков, шт/стручок
1	Чи1-11	0,0
2	<b>Чи1к4-34</b>	<b>6,2</b>
3	20-3Се2-12	0,2
4	T52-18	0,1
5	НСК 1-55	0,0
6	21-3Се1-84	0,0
7	22ч4-23	1,2
8	20-2ССН-37	0,0
9	<b>21ок4-54</b>	<b>7,4</b>
10	Кн70-63	0,1
11	№ 72-16	0,0

Эти линии были использованы в беккроссировании ЦМС-формы с последующим отбором для создания андростерильных аналогов. К настоящему моменту проведено два цикла беккросса полученной стабильной 20-и хромосомной ЦМС-формы пекинской капусты. Во втором беккроссном поколении наблюдалось расщепление по морфологическим признакам.

### 1.3 Выводы

1. Межвидовая гибридизация амфидиплоида (*B. napus*) ААСС легче проходит с видами, имеющими геном АА (*B. pekinensis*), чем с растениями с геномом СС (*B. oleracea*).
2. У гибридов F<sub>1</sub>, полученных от скрещивания рапса и пекинской капусты, доминировали признаки родителя с большим числом хромосом, т.е. рапса. При этом все растения имели стерильную пыльцу, фертильный женский гаметофит, функционально активные нектарники и не поражались килой.

3. В популяции  $BC_1$  наблюдается широкий полиморфизм растений по вегетативным признакам. Число хромосом у этих гибридов варьировало от  $2n = 21$  до  $2n = 29$ .
4. В популяции  $BC_1$  удалось выделить растение, полностью соответствующее отцовской форме. Это указывает на возможность передачи хозяйственно ценных признаков из амфидиплоидного вида в диплоидный за предельно малое число возвратных сокращений.
5. Микроспорогенез гибрида до стадии тетрад проходит нормально, стерилизация пыльцы происходит в процессе микрогаметогенеза.
6. Выявлены две линии Чи1к4-34 и 21ок4-54 с пониженной самонесовместимостью.

## 2. СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ УСТОЙЧИВЫХ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ

Пекинская капуста (*B. pekinensis*,  $2n=20$ ) является важной овощной культурой Восточно-азиатских стран. Недостатком пекинской капусты является восприимчивость к множеству грибных, бактериальных и вирусных заболеваний. Одной из наиболее вредоносных болезней является сосудистый бактериоз (black rot) (возбудитель *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow.). Вследствие того, что химические меры борьбы неэффективны или запрещены к применению на этой культуре, селекция на устойчивость является главным способом снижения потерь урожая от этой болезни (Г.Ф. Монахос и др., 2001).

Устойчивость к ксантомонадам является одним из важнейших признаков в селекции капустных. Известно несколько доноров устойчивости, на основе которых в 1992 году была создана (S. Kamoun et al., 1992), а в 1997 модифицирована (A.N. Ignatov et al., 1997) система дифференциации рас патогена.

При создании устойчивых форм пекинской капусты в селекционных программах в качестве донора устойчивости к сосудистому бактериозу можно использовать репы (*B. rapa*,  $2n=20$ ) Just Right F1, Tokyo Cross, Seven Top Turnip, имеющие один доминантный ген *R4*, определяющий устойчивость к расе 4 (одной из пяти наиболее распространенных рас). Однако возделывание полученных в результате простого внутривидового скрещивания форм с генетической устойчивостью к одной расе, будет неэффективным, т.к. растения будут поражаться другими известными расами. Для создания наиболее устойчивых растений необходимо осуществление межвидовой гибридизации с привлечением сортов амфидиплоидных видов *B. juncea* ( $2n=36$ ), *B. carinata* ( $2n=34$ ). Эти виды обладают высокой устойчивостью к основным распространенным расам (1, 3, 4 и 5) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, определяемой одним

доминантным геном *Rb* из генома ВВ (Н. Guo, М.Н. Dickson, J.E. Hunter, 1991).

При гибридизации и последующем беккроссировании видов *Brassica* с разным числом хромосом, например *B. oleracea* × (*B. carinata* × *B. oleracea*) (Н. Yamagishi et al., 1989) и *B. juncea* × (*B. juncea* × *B. napus*) (S. Frello, et al., 1995), происходит последовательное уменьшение числа хромосом до числа, свойственного беккроссирующему родителю, сопровождающееся обменом части генетического материала за счет рекомбинации и замены целых хромосом. Этот факт показывает возможность передачи полезных признаков из амфидиплоидного вида в диплоидные за ограниченное число возвратных скрещиваний.

## **2.1 Цель, материалы и методы исследований**

**Цель работы** – изучить возможность передачи доминантной моногенной устойчивости из *B. carinata* в *B. pekinensis* и создать линии пекинской капусты с групповой устойчивостью к киле и четырем расам сосудистого бактериоза.

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева, на кафедре генетики МСХА и в лаборатории станции защиты растений МСХА в 2001-2004 гг.

В опытах использовали абиссинскую капусту (*B. carinata*), линию PI 199947 - источник устойчивости к сосудистому бактериозу (расам 1, 3, 4, 5); устойчивую к киле пекинскую капусту (*B. pekinensis*), линию №2.

Изоляты возбудителя сосудистого бактериоза, 1-ю, 4-ю и 5-ю расы, любезно предоставил с. н. с. Центра «Биоинженерия» РАН А.Н. Игнатов, расы 0 и 3 – профессор кафедры фитопатологии Ф.С. Джалилов.

Растения заражали путем прокалывания жилок по краю листовой пластинки (20-30 уколов на один лист) стерильной препаровальной иглой,



ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Axiolab (Carl Zeiss).

Растения пекинской капусты с групповой устойчивостью к киле и четырем расам сосудистого бактериоза получали путем принудительного опыления растений пекинской капусты пыльцой абиссинской с последующим отбором и беккроссированием пекинской капустой по схеме, представленной на рисунке 2.1.

Яровизацию растений проводили на стадии проростков. Чашки Петри с наклюнувшимися семенами помещали в холодильную камеру и выдерживали 10-15 дней при +4°C. Яровизированные растения распикировывали в кассеты и затем высаживали в горшки.

## 2.2 Результаты исследований

Перед гибридизацией родительских линий №2 и PI 199947 провели их оценку на устойчивость к пяти расам сосудистого бактериоза (табл. 2.1). Первое скрещивание *B. pekinensis* с *B. carinata* проходило довольно легко, несмотря на принадлежность растений к разным видам. Полученные от скрещивания растения яровизировали и выращивали по описанной методике. На стадии 4-5 настоящих листьев растения инокулировали пятью типовыми расами ксантомонад (расы 0, 1, 3, 4, 5) (табл. 2.1).

**Таблица 2.1**  
**Реакция родительских линий и гибрида F<sub>1</sub> на инокуляцию 5-ю расами *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris***

Растения BC <sub>1</sub>	Расы (по Kamoun et al., 1992)				
	0	1	3	4	5
<i>B. pekinensis</i> линия №2	+	+	+	+	+
F <sub>1</sub> ( <i>B. pekinensis</i> × <i>B. carinata</i> )	+	-	-	-	-
<i>B. carinata</i> линия PI 199947	+	-	-	-	-

+ - восприимчивый, - - устойчивый

Из устойчивых растений  $F_1$  отобрали одно, на котором проводили беккросс линией пекинской капусты №2. Беккроссировать это растение оказалось непросто, так как вследствие несоответствия геномов, несбалансированности хромосомного набора и, соответственно, нарушений в мейозе, оно было стерильным. Гибридизацию проводили вручную в течение всего лета. В итоге со всего растения было получено лишь 5 жизнеспособных семян. Выращенные из них после яровизации растения инокулировали по описанному выше методу. Результат заражения представлен в таблице 2.2.

Таблица 2.2

**Реакция растений  $BC_1$  на инокуляцию 5-ю расами  
*Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Растения $BC_1$	Расы (по Kamoun et al., 1992)				
	0	1	3	4	5
№1	+	-	-	-	-
№2	+	-	-	-	-
№3	+	-	-	-	-
№4	+	+	+	+	+

+ - восприимчивый, - - устойчивый

Три из четырех выживших растений обладали устойчивостью к 1, 3, 4 и 5-й расам, что свидетельствует о присутствии в беккроссных растениях хромосомы из генома ВВ, содержащей ген *Rb*.

Цитологический анализ числа хромосом в корневых меристемах двух из четырех растений показал, что число хромосом растений  $BC_1$   $2n = 28 - 29$  (рис. 2.2), т.е. закономерного уменьшения числа хромосом до числа, свойственного беккроссирующему родителю, не произошло.

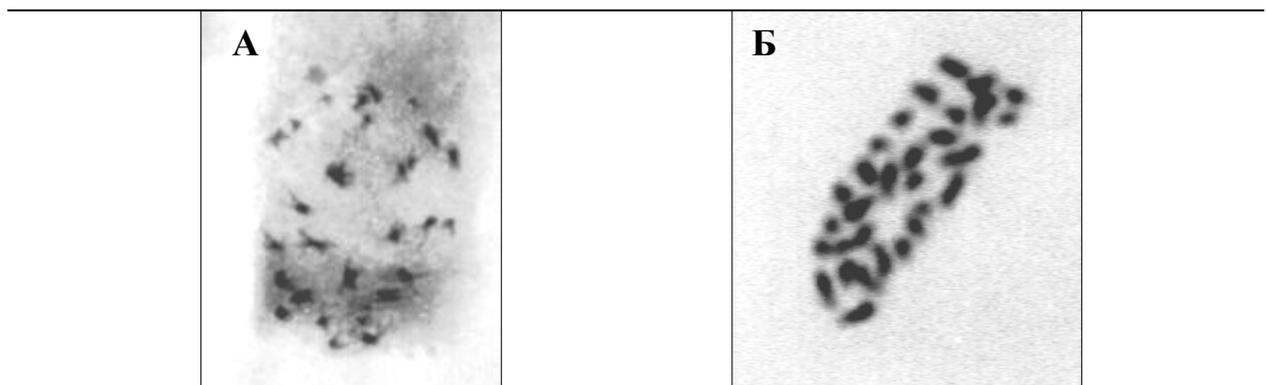


Рис. 2.2. Метафазные пластинки митотических клеток корневых меристем растений  $BC_1$ : А)  $2n=28$ , Б)  $2n=29$

Устойчивые растения использовали для беккроссов пекинской капусты. В результате скрещивания было получено около 60 растений ВС<sub>2</sub>, половина из которых на стадии 4-5 настоящих листьев обладала устойчивостью к четырем расам сосудистого бактериоза. При повторной инокуляции на стадии 6-7 настоящих листьев тремя расами ксантомонад (1, 3 и 4-й) оказалось, что все, за исключением пяти растений, утратили устойчивость к первой расе (табл. 2.3).

Таблица 2.3

**Реакция растений ВС<sub>2</sub> на инокуляцию 5-ю расами  
*Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Растения ВС <sub>2</sub>	Расы (по Kamoun, 1992)				
	0	1	3	4	5
Стадия 4-5 настоящих листьев: 30 растений	+	-	-	-	-
30 растений	+	+	+	+	+
Стадия 6-7 настоящих листьев: 5 растений	+	-	-	-	-
25 растений	+	+	-	-	-
30 растений	+	+	+	+	+

+ - восприимчивость, - - устойчивость

Одно из пяти устойчивых к четырем расам *X.c.* pv. *campestris* (1, 3, 4 и

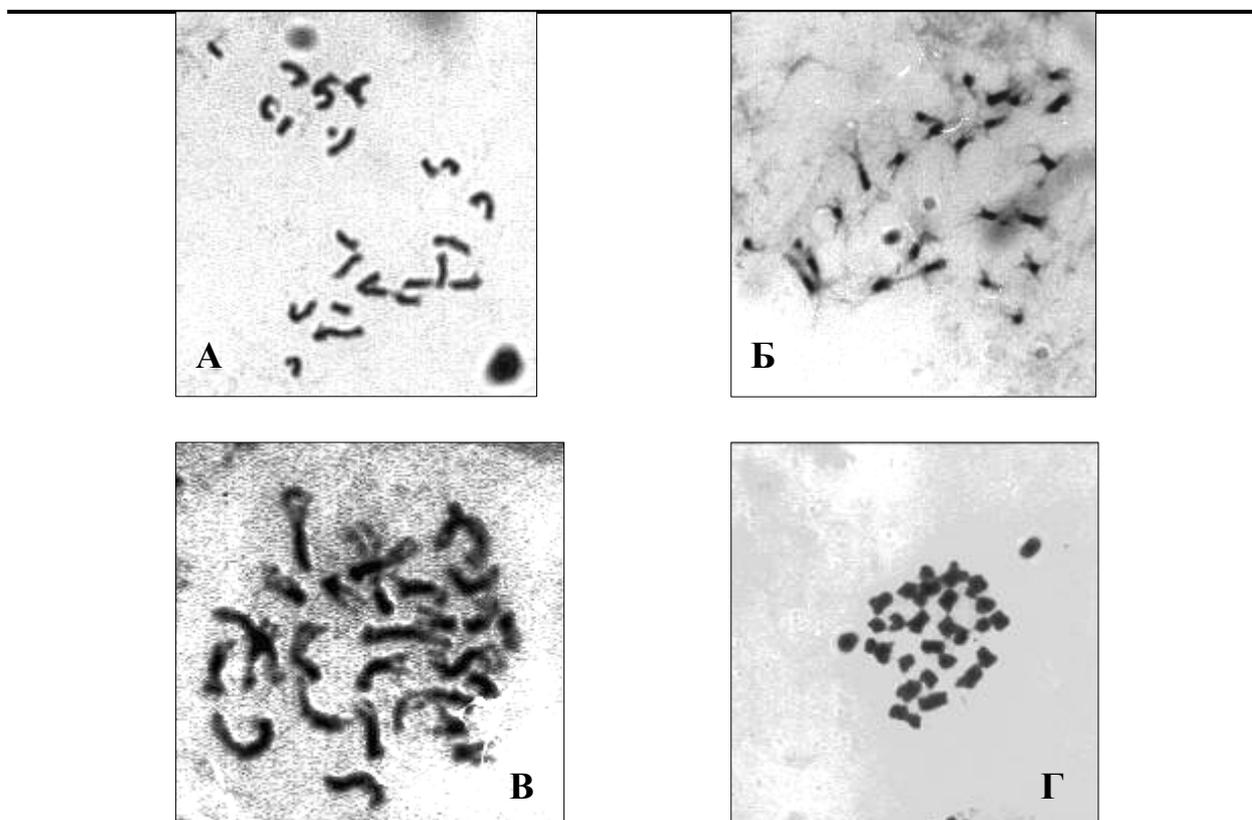
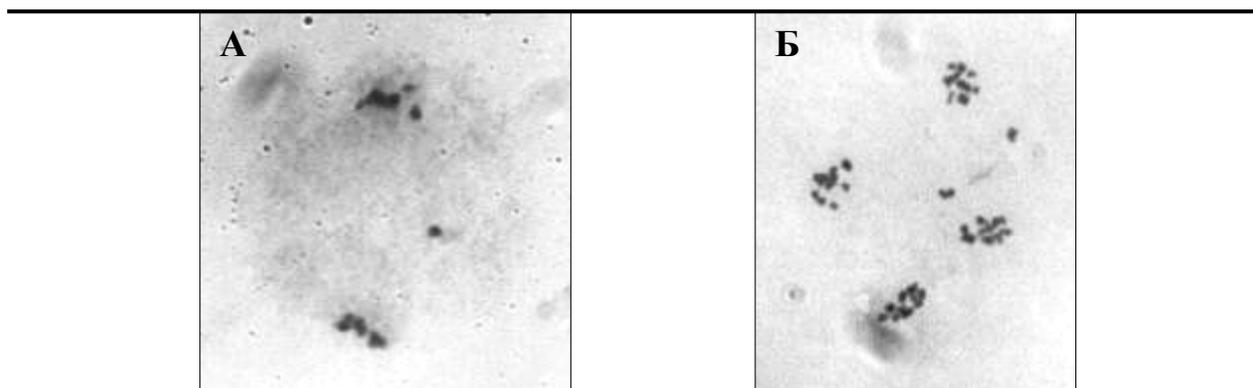


Рис. 2.3. Метафазные пластинки митотических клеток корневых меристем растений ВС<sub>2</sub>: А) 2n=24, Б) 2n=25, В) 2n=25, Г) 2n=29

5-й) (обозначенное №1) имело большое морфологическое сходство с пекинской капустой. Цитологический анализ корневых меристем устойчивых и восприимчивых растений второго беккроссного поколения показал высокое варьирование числа хромосом  $2n = 23 - 29$  (рис. 2.3).

Также были выявлены химерные растения с числом хромосом в корневых меристемах  $2n = 23, 24, 25$ . Интересно отметить, что растение №1, проявляющее наибольшее сходство с пекинской капустой, в корневых меристемах имело 23 хромосомы, тогда как в мейотических клетках пыльников на стадии метафаза I оно содержало  $2n = 21$ . При последующих делениях в анафазе I или анафазе II происходила утрата еще одной хромосомы (рис. 2.4). Таким образом, образовывались гаплоидные клетки микроспор, имеющие по  $n = 10$  хромосом. Из них формировались жизнеспособные пыльцевые зерна.



**Рис. 2.4.** Мейотическое деление в клетках пыльников растения  $BC_2$ : А) анафаза I, отставание 21-й хромосомы, Б) анафаза II, неправильное расхождение отставшей хромосомы

Растение №1 беккроссировали килоустойчивой линией пекинской капусты. Скрещивание проходило без затруднений. В среднем на 1 стручок завязалось 9-12 семян. Выращенные растения  $BC_3$  заражали расами *X.c. pv. campestris*. Расщепление по устойчивости не соответствовало менделевскому, что объясняется нарушением нормального хода мейоза из-за лишней хромосомы.

### 2.3 Выводы

1. При гибридизации абиссинской капусты (*B. carinata*) с пекинской капустой (*B. pekinensis*) получены гибриды F<sub>1</sub> с доминированием признаков абиссинской капусты.
2. Все гибридные растения были мужски стерильны и плохо скрещивались с пекинской капустой, что существенно затруднило получение потомства BC<sub>1</sub>.
3. Признак устойчивости к 1-й, 3-й, 4-й и 5-й расам наследуется доминантно.
4. В потомстве BC<sub>1</sub> обнаружено растение близкое по морфологическим признакам к пекинской капусте и при этом устойчивое к четырем расам сосудистого бактериоза.
5. У большинства растений BC<sub>2</sub> произошла утрата устойчивости к 1-й расе сосудистого бактериоза и к киле.

### **3. СЕЛЕКЦИЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КИЛЕ КРЕСТОЦВЕТНЫХ. РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Основным методом традиционной селекции растений на устойчивость к болезням является создание гибридных популяций с последующим отбором в ряде поколений. Этот путь может быть значительно ускорен за счет применения молекулярных маркеров. Маркерная селекция исключает необходимость использования возбудителя, т. е. инфекционного фона; исключает проблему разработки эффективной методики инокуляции растений. Кроме того, маркерная селекция не зависит от условий роста и возраста растений и позволяет делать оценку на любой стадии их развития.

При выведении устойчивых к киле сортов пекинской капусты в качестве источника устойчивости используют европейскую кормовую репу. Устойчивость европейских форм реп имеет доминантный характер наследования, и контролируется тремя независимыми генами (Тохорейс, Janssen, 1975; Монахос, Теренина, 1998). Для обеспечения надежной защиты растений необходимо объединение всех трех генов в одном генотипе, что существенно может быть упрощено при использовании молекулярных маркеров генов устойчивости.

Японские исследователи Y. Kuginuki с соавторами (1997), изучая полиморфизм ДНК устойчивых и восприимчивых к киле растений, нашли RAPD маркер, RA12-75a, тесно сцепленный с одним из локусов устойчивости к киле. В России, в Центре «Биоинженерия» РАН совместно с Тимирязевской академией, было проведено исследование европейского сорта-дифференциатора ECD04, носителя трех доминантных генов устойчивости к киле, с целью поиска двух других, немаркированных генов. В результате проведенной работы было выявлено три RAPD маркера: один из них - RA12-75<sub>650</sub>, впервые найденный японскими исследователями, и два новых, ранее неизвестных - RA12-75<sub>680</sub> и RA12-75<sub>1400</sub>. Все маркеры амплифицируются одним праймером.

Известно, что RAPD маркерная система наряду с достоинствами - простота, скорость, дешевизна имеет два значительных недостатка - низкую стабильность и воспроизводимость. Очевидно, возникает необходимость в создании более надежной стабильной системы. Таковой является SCAR технология маркирования, обладающая достоинствами RAPD системы и исключающая ее недостатки.

### **3.1 Цель, материалы и методы исследований**

**Цель работы** - изучить возможность создания SCAR маркеров доминантных генов устойчивости к киле на основе двух известных RAPD маркеров и оценить их эффективность на различных популяциях пекинской капусты и репы.

Задачи работы:

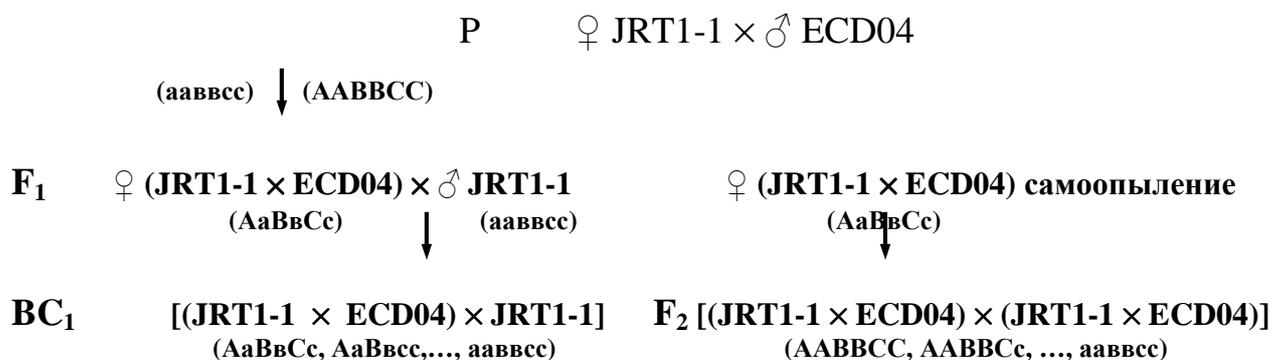
- 1) выделить фрагменты RA12-75<sub>650</sub>, RA12-75<sub>1400</sub>;
- 2) провести клонирование выделенных фрагментов;
- 3) провести секвенирование фрагментов;
- 4) изучить их последовательности;
- 5) подобрать праймеры;
- 6) подобрать оптимальные условия амплификации;
- 7) проверить эффективность маркеров в сегрегирующей популяции растений.

### **Материалы и методы**

Размножение растений и оценка устойчивости к киле были проведены на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева МСХА, молекулярный анализ – в центре «Биоинженерия» РАН в 2002-2004 гг.

В качестве донора генов устойчивости к киле использовали растения линии ECD04-1. В качестве донора аллелей восприимчивости – линию азиатской репы JRT1-1 и линию пекинской капусты Се-3.

Растения линии ECD04-1 опыляли в бутонах пыльцой восприимчивых к киле линий азиатской репы JRT1-1 и пекинской капусты Се-3. По одному из растений F<sub>1</sub> самоопыляли в бутонах для получения F<sub>2</sub> и скрещивали с восприимчивым родителем для получения BC<sub>1</sub> (рис. 3.1). Схемы получения



популяций F<sub>2</sub> и BC<sub>1</sub> с использованием линий азиатской репы JRT1-1 и пекинской капусты Се-3 одинаковые.

Оценку устойчивости к киле проводили на искусственном инфекционном фоне. Желваки сильно пораженного растения, хранившиеся до необходимости в холодильной камере при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ , измельчали на терке. Гомогенную массу разводили в воде и фильтровали через четырехслойную марлю. Для заражения использовали суспензию спор с концентрацией  $10^7$  спор/мл. Расовый состав полевой популяции патогена в соответствии с реакцией европейских сортов-дифференциаторов (ЕСД) (S. Buczacki et al., 1975) имеет следующий индекс - 16/11/31. Заражение растений проводили перед высадкой рассады в открытый грунт, тщательно проливая торфяные кубики кассет суспензией покоящихся спор *P. brassicae*. Учет устойчивости растений проводили через семь недель. За устойчивое принималось растение без малейших признаков поражения килой.

Выделение геномной ДНК проводили из молодых тканей по методике К. Edwards et al. (1991) в модификации Д. Дорохова и Э. Клоке (1997). Высечку листа площадью около  $1 \text{ см}^2$  (или массой 10-12 мг) помещали в пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл с 400 мкл экстракционного буфера

(200 мМ трис-НСl рН 7,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ ЭДТА; 0,5% ДСН) и интенсивно ее гомогенизировали тefлоновым пестиком в течение 30-40 с. В гомогенную массу добавляли 50 мкл СТАВ и тщательно перемешивали встряхиванием на Vortex в течение 5с. Пробирки с полученной смесью 15 мин инкубировали в термостате при +65°C, периодически перемешивая содержимое мягким покачиванием. После экстракции охлаждали до +20°C, добавляли 200 мкл хлороформа и тщательно перемешали. Пробу центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин в настольной центрифуге типа Eppendorf. В чистую пробирку отбирали 400 мкл супернатанта и добавляли изопропанол в пропорции 1:1. Покачиванием перемешивали содержимое и снова центрифугировали при 14 000 об/мин 10 мин. Осторожно выливали смесь, оставляя осадок ДНК на стенке пробирки, промывали его 70 % этанолом. Так же осторожно сливали этанол, подсушивали осадок, открыв крышки пробирок, и растворяли его в 100 мкл бидистиллированной и деионизованной воды.

Амплификацию геномной ДНК проводили на амплификаторе ABS-2000 (Applied Biosystems) в 15 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (67 мМ трис-НСl рН-8,8; 166 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Tween-20), по 200 мМ каждого dNTP, 10 мМ/мл каждого праймера, 25 мкг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы. RAPD амплификацию проводили по следующей программе: 3 мин при +94°C; 35 циклов: +94°C – 30 с, +36°C – 30 с, +72°C – 1,0 мин; +72°C – 10,0 мин. SCAR амплификацию - 3 мин при +94°C; 35 циклов: +94°C – 15 с, +64°C – 15 с, +72°C – 1,0 мин; +72°C – 5,0 мин. Праймер RA12-75 – 5' - CATTATGCGGGC -3'.

**Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, и стандартном Трис-ацетат-ЭДТА электрофорезном буфере (RAPD при напряжении 4 Вт/см в течение 120 мин; SCAR при напряжении 6 Вт/см в течение 30 мин). Электрофореграмму визуализировали в проходящем УФ свете трансиллюминатора, документировали**

**фотоаппаратом «Зенит» с оранжевым светофильтром на фотопленку «Микрат-500».**

Для выделения RAPD-маркера гена устойчивости его предварительно реамплифицировали. Реамплифицированный фрагмент элюировали из геля легкоплавкой агарозы по следующей методике. В проходящем УФ свете трансиллюминатора, соблюдая все меры предосторожности, вырезали необходимый фрагмент и помещали его в 1,5 мл пробирку “Eppendorf”. В термостате при температуре 65-67°C расплавляли гель. Затем пробирку с содержимым охлаждали до 37°C, добавляли уравновешенный TE буфером фенол (1:1) и встряхивали ее. Смесь центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин в настольной центрифуге типа Eppendorf. Переносили водную фазу в новую пробирку и добавляли хлороформ 1:1, встряхивали. Снова центрифугировали 5 мин при 14 000 об/мин. Водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 1:9 5М КАс (ацетат калия). Охлаждали смесь до 0°C и добавляли 2:1 96% этанол, охлаждали при -20°C в течение 30 мин. Центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом, подсушивали ДНК, открыв крышку пробирки. Растворили осадок в 50 мкл воды.

Клонирование фрагмента проводили с помощью набора pGEM\_T Vector System 1 (“Promega”, USA) согласно инструкции фирмы производителя.

Полученными препаратами плазмидной ДНК провели трансформацию компетентных клеток *E. coli*. Рекомбинантные клоны отбирали методом бело-голубой селекции. Отобранные клоны размножали с последующим выделением плазмидной ДНК.

После ПЦР и рестрикционного анализа плазмид на наличие вставки фрагменты секвенировали с помощью автоматического секвенатора. Полученные последовательности фрагментов ДНК были проверены на сходство с известными последовательностями в базе данных Генбанка на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) с использованием

программ BLAST и S-SEARCH. Подбор специфичных праймеров проводили при помощи специальной программы OLIGO.

### 3.2 Результаты исследований

Клонирование фрагмента RA12-75<sub>1400</sub> было сопряжено с большими трудностями. Были опробованы несколько векторов и сайтов вставки, а также модификация праймеров с введением сайтов рестрикции по концам. Однако клонировать его так и не удалось. Успешно клонировать и секвенировать удалось только ДНК-маркер - RA12-75<sub>650</sub> (рис. 3.2).

```

GGATCCATTA TGCGGGCAGT TAGAACTTTG AATAACCGTT TCTTTAGAAC
TAGTTAAATG GCTCTGCGGT TGTAATTGAC AGAAAATTA GAGCTTGATC
TGCTGCCATC GGTAAAAGA TTAGATATTG ATAGTCTCCT TTTATTTATG
CGATAGCTTT GTGCATTTTT GATTTAGCTG CTGGATGTTG GGATTTATTA
AATTCATGTC CAACTCTATA TTATCCGATT AGTACGATAT TGTCTACTTT
GGGCCTAATT GGCTGGCTCG CATGAATTTA CTTTTGGTCT CATTCCTAAA
AGGCTTGAC TAATTAGAGT TGGACATCTT CTTATATATT AGACACTCAT
TGTCTAATTC TCCAATGTGG TACTTAGTTT GATATCCCAA ATTCTCCCC
TCAAACSTAAG GATCATATTC ATCGCGTGTC CCACAACSTA CTTTGAGGAT
STTCTGACTT GATCTCTACC ACATACCTCC CAATCCTAAC TCGATGGGTC
ACGTTCCSTAC TCGAAAGGTA TTTTGGTCTT CTTGCAGATT TCTCGTCAAC
CTGGCTCTGA TACCAATTGT TGGGATTAAT TAAATCCATG TCCAACSTTA
TATTATCTGA TTAGTACGAT ATTGTCCACT TTGGGCCTAA TTGGCTGGCC

```

Рис. 3.2. 5'-3' последовательность >RA-1275-650bp

Последовательность RA12-75<sub>650</sub> была представлена с 5'-конца фрагментом, гомологичным участку клона T24I21 хромосомы 2 *Arabidopsis thaliana*, и двумя вырожденными повторами сходными с фрагментом клона AJ\_245480 *Brassica napus*, кодирующим S-аденозил метионин салициловой кислоты карбоксил метионил трансферазу и ген гликопротеина S-локуса, фланкированными с 3'-конца участком LTR ретротранспозона (рис. 3.3А).

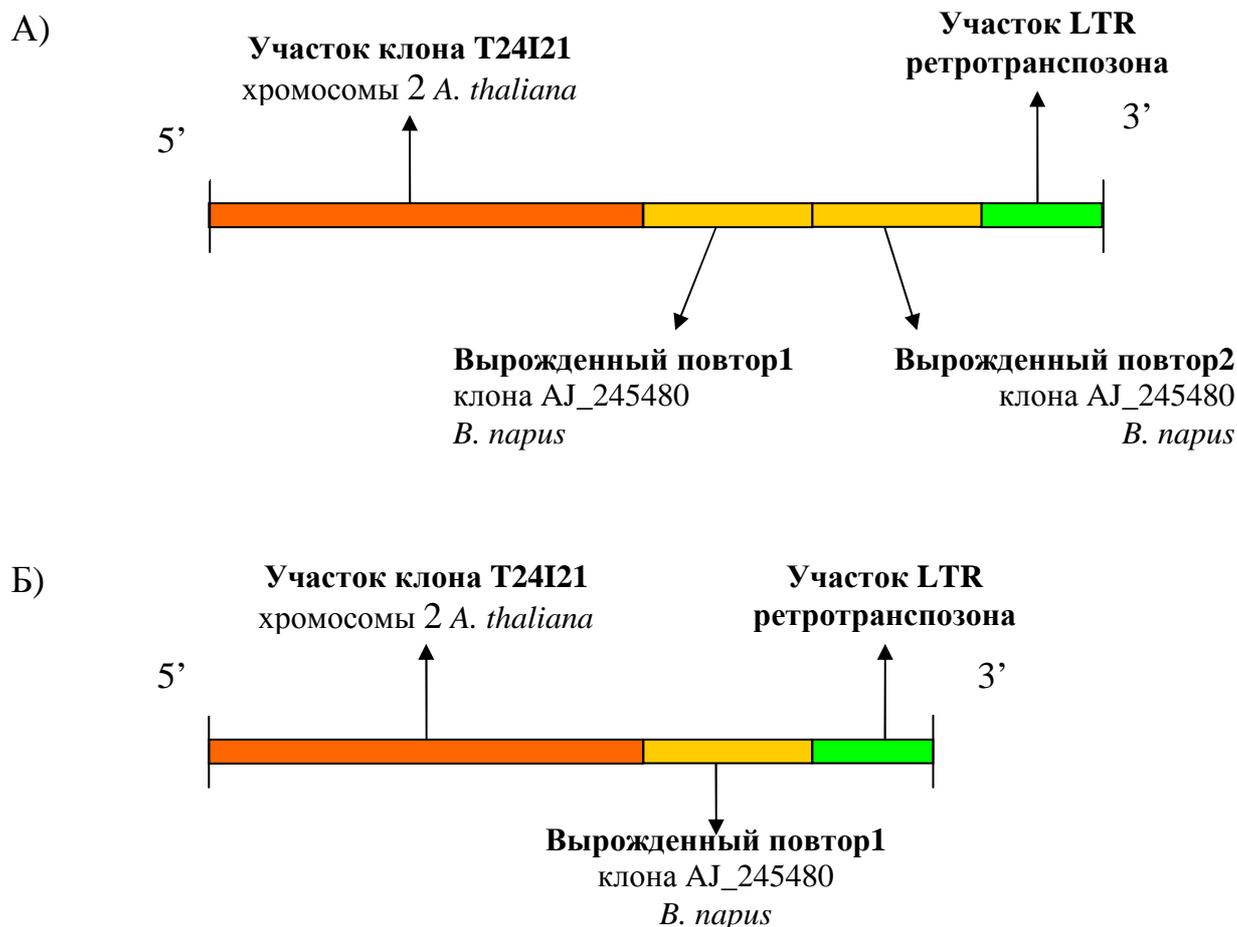


Рис. 3.3. Строение маркерного локуса RA 12-75<sub>650</sub> устойчивого генотипа (А) и предполагаемое строение данного локуса у восприимчивого генотипа (Б)

Три пары специфичных SCAR-праймеров (табл. 3.4), синтезированных для ПЦР-амплификации данного участка генома, показали различную эффективность при различении восприимчивых и устойчивых генотипов.

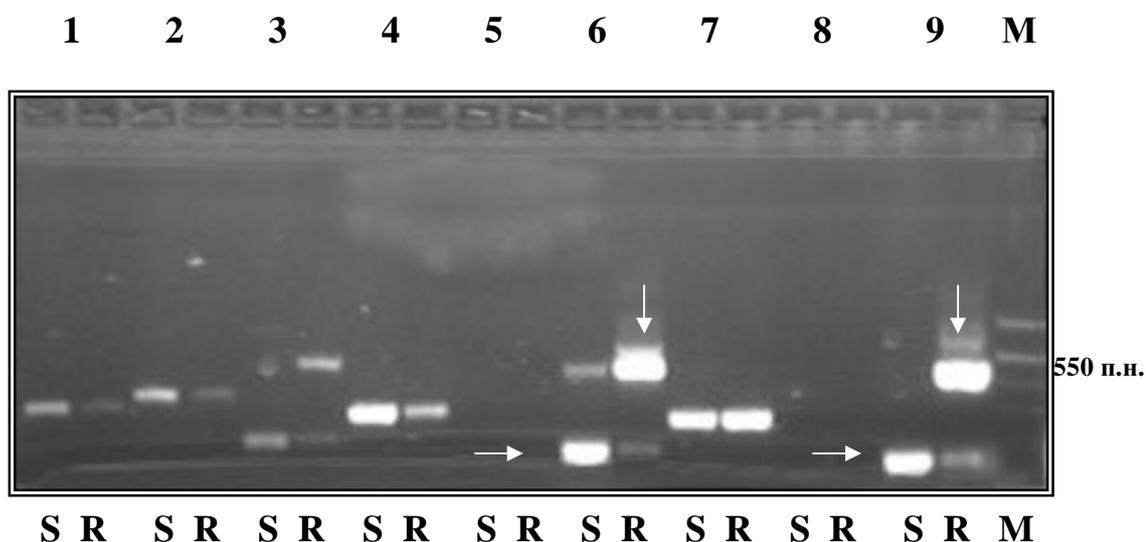
Таблица 3.4

#### Разработанные SCAR-праймеры

Праймер	5'-3' последовательность
>SCARp1F	GGA TCC ATT ATG CGG GCA GTT AG
>SCARp50F	CTA GTT AAA TGG CTC TGC GGT TG
>SCARp91F	GAG CTT GAT CTG CTG CCA TCG G
>SCARp406R	CAC GCG ATG AAT ATG ATC CTT AG
>SCARp463R	GGA TTG GGA GGT ATG TGG TAG AG
>SCARp636R	ATG CGG GCC AGC CAA TTA GGC

Возможные комбинации синтезированных SCAR-праймеров для известной последовательности RAPD-маркера RA12-75<sub>650</sub> показали различную эффективность при идентификации восприимчивых и устойчивых

генотипов (рис. 3.5). Две пары специфичных праймеров SCARp91F - SCARp636R и SCARp50F - SCARp636R при оптимизированных условиях ПЦР дали кодоминантные фрагменты, выявляющие как восприимчивый, так и устойчивый генотипы (рис. 3.5). Очевидно, что восприимчивый аллель маркерного локуса имеет лишь один повтор фрагмента клона AJ\_245480

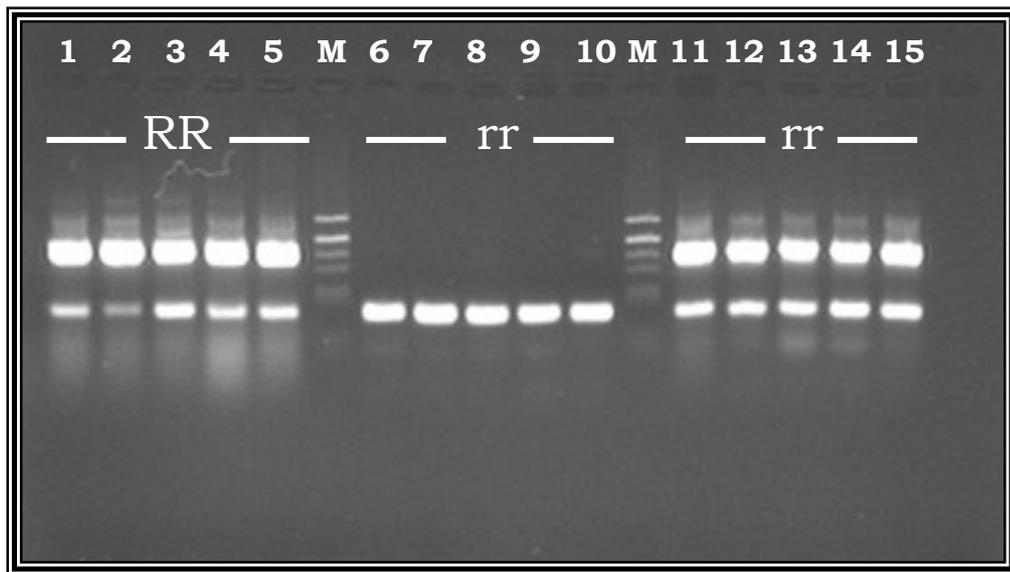


**Рис. 3.5.** SCAR-фрагменты, полученные в результате амплификации S – восприимчивых и R - устойчивых образцов с различными комбинациями праймеров. 1-9 различные комбинации праймеров: 1- SCARp1f-SCARp406r, 2- SCARp1f-SCARp463r, 3- SCARp1f-SCARp636r, 4- SCARp50f-SCARp406r, 5- SCARp50f-SCARp463r, 6- SCARp50f- SCARp636r, 7- SCARp91f-SCARp406r, 8- SCARp91f-SCARp463r, 9- SCARp91f-SCARp636r; 6 и 9 – комбинации, давшие кодоминантные фрагменты, выявляющие устойчивые (вертикальные стрелки) и восприимчивые (горизонтальные стрелки) генотипы.

(рис. 3.3Б).

Предварительные испытания показали, что один из маркеров (комбинация SCARp91f-SCARp636r) позволяет четко различать генотипы устойчивых образцов европейской репы ECD04 от генотипов восприимчивых образцов пекинской капусты Се-3, но является неэффективным при анализе устойчивости в популяциях азиатской репы JRT (рис. 3.6).

Полученные SCAR-праймеры проходят испытания на различных



**Рис. 3.6.** Эффективность комбинации SCARp91F-SCARp636R при различении устойчивых и восприимчивых генотипов: 1-5 - образцы устойчивой линии ECD04; 6-10- образцы восприимчивой линии Се-03; 11-15 - образцы восприимчивой линии JRT

популяциях пекинской капусты и реп.

### 3.3 Выводы

1. В результате проведенной работы создан кодоминантный SCAR-маркер одного из генов устойчивости к киле эффективный при идентификации устойчивого и восприимчивого генотипов в популяции пекинской капусты;
2. Выявлена его неэффективность при анализе устойчивости в популяциях азиатской репы JRT.

## ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1. ОЦЕНКА ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ УСТОЙЧИВОЙ К КИЛЕ ПЕКИНСКОЙ КАПУСТЫ

Бактериальные, грибные и вирусные заболевания культурных растений наносят большой экономический ущерб. Кила, вызываемая почвенным грибом *P. brassicae* Wor., поражает все крестоцветные культуры, включая пекинскую капусту. Эффективным методом борьбы с данным заболеванием является выведение и возделывание устойчивых форм.

Целью экономической оценки является определение дополнительной прибыли при производстве устойчивого к киле гибрида F<sub>1</sub>.

Оценка экономической эффективности возделывания устойчивых к киле форм пекинской капусты проведена на примере устойчивого к киле гибрида Ника F<sub>1</sub> и восприимчивого гибрида Маноко F<sub>1</sub> при соблюдении одинаковой технологии возделывания.

Капуста пекинская F<sub>1</sub> Ника (оригинатор: Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева). Гибрид позднеспелый. От высадки рассады в открытый грунт до технической спелости 60-75 дней. Обладает генетической устойчивостью к киле и цветущности. Кочан крупный, овальный, закрытый, массой 2-3 кг, плотный, внутренняя кочерыга короткая. Окраска листьев в кочане желтая.

Капуста пекинская F<sub>1</sub> Маноко (оригинатор: Bejo Zaden B.V.). Гибрид раннеспелый. От высадки рассады в открытый грунт до технической спелости 40-45 дней. Не обладает устойчивостью к киле. Кочан среднего размера, вытянутый, среднеплотный, на разрезе светло-желтый, внутренняя кочерыга короткая. Масса кочана 1,0-1,5 кг.

**Таблица 1.1****Учет развития килы**

<b>Гибрид</b>	<b>Индекс поражения</b>	<b>Интенсивность поражения, средний балл</b>
F <sub>1</sub> Ника	0	0
F <sub>1</sub> Маноко	0,8	2,1

Учет развития килы проведен по стандартной методике на естественном инфекционном фоне (табл. 1.1). Урожайность гибридов получена экспериментальным методом. Средняя цена реализации единицы продукции соответствует средней цене 2003 года. Расчет экономической эффективности представлен в таблице 1.2.

**Таблица 1.2****Расчет экономической эффективности**

<b>Гибрид</b>	<b>F<sub>1</sub> Ника</b>	<b>F<sub>1</sub> Маноко</b>
Урожайность товарной продукции, т/га	53,1	22,7
Полные затраты на продукцию, тыс. руб.	141,0	114,5
Полная коммерческая себестоимость 1т продукции, руб.	2655,5	5045,4
Средняя цена реализации, тыс. руб./т	10,0	10,0
Стоимость товарной продукции, тыс. руб.	531,0	227,0
Прибыль, тыс. руб.	390,0	112,5
Дополнительная прибыль, тыс. руб.	277,5	-

Из таблицы 1.2 видно, что прибыль от реализации продукции устойчивого к киле гибрида Ника F<sub>1</sub> значительно превосходит прибыль от реализации полученной продукции восприимчивого гибрида Маноко F<sub>1</sub>. Таким образом, выведение и возделывание устойчивых форм пекинской капусты имеют прямой экономический эффект.

## ВЫВОДЫ

1. Межвидовая гибридизация амфидиплоида *B. napus* (геном ААСС) легче проходит с видами, имеющими геном АА (*B. pekinensis*), чем с растениями с геномом СС (*B. oleracea*). Беккроссирование гибрида первого поколения (*B. napus* × *B. pekinensis*, геном ААС) видом *B. pekinensis* (геном АА) проходит без затруднений.

2. Скрещивание диплоида *B. pekinensis* (геном АА) с амфидиплоидом *B. carinata* (геном ВВСС) легко проходит только при использовании *B. pekinensis* в качестве материнской формы. Гибридные растения вследствие нарушений в мейозе стерильны. Беккроссирование гибридов (*B. pekinensis* × *B. carinata*, геном АВС) видом *B. pekinensis* (геном АА) очень затруднено.

3. При гибридизации диплоидного вида - пекинской капусты (*B. pekinensis*,  $2n=20$ ) с амфидиплоидными - рапсом (*B. napus*,  $2n=38$ ) и абиссинской капустой (*B. carinata*,  $2n=34$ ) у гибридов  $F_1$  доминируют признаки амфидиплоидных видов, т.е. родительских форм с большим числом хромосом.

4. В потомстве  $BC_1$  межвидового скрещивания (*B. napus* × *B. pekinensis*) × *B. pekinensis* обнаружено растение близкое по морфологическим признакам к *B. pekinensis*. Это указывает на возможность передачи хозяйственно ценных признаков из амфидиплоидного вида в диплоидный за предельно малое число возвратных сокращений.

5. В популяции  $BC_1$  при условии достаточно большой выборки наблюдается широкий полиморфизм растений, как по морфологическим признакам, так и по числу хромосом.

6. У анеуплоидных растений беккроссных поколений происходит редукция хромосом в процессе митотического и мейотического клеточного деления. Это подтверждается выявлением химерного растения с числом хромосом в корневых меристемах  $2n = 23, 24, 25$ , а также растения, в корневых меристемах которого было 23 хромосомы, тогда как в

мейотических клетках пыльников на стадии метафаза I – 21 хромосома. В анафазе I или анафазе II мейотического деления наблюдается утрата хромосом в результате неправильного расхождения и отставания.

7. Создана ЦМС-форма пекинской капусты. У растений с цитоплазматической мужской стерильностью микроспорогенез до стадии тетрад проходит нормально, стерилизация пыльцы происходит в процессе микрогаметогенеза.

8. Создана форма пекинской капусты, устойчивая к сосудистому бактериозу. Признак устойчивости к 1-й, 3-й, 4-й и 5-й расам, определяемый геном *Rb* генома ВВ, имеет доминантный характер наследования.

9. Создан кодоминантный SCAR-маркер одного из генов устойчивости к киле эффективный при идентификации устойчивого и восприимчивого генотипов в популяции пекинской капусты, но неэффективный при анализе устойчивости в популяциях азиатской репы JRT.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Гордиенко Ф.И. Природа и пути инфекции главнейших бактериозов капусты и обоснование способов борьбы с ними. - Харьков: НИИСоцземледелия, 1940. – 50 с.
2. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов.//Молекулярная генетика. 1997. Т. 33. №4. С. 443-450.
3. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. 3-е изд., перераб. и доп. Л. 1971.
4. 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.
5. Карпеченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. – Труды по прикладной ботанике, генетики и селекции., 1927, т. 17. вып. 3.
6. Круг Г. Овощеводство/Пер. с нем. В.И. Леунова. - М.: Колос, 2000. – 576 с.
7. Крючков А.В. Схема выведения четырехлинейных гибридов капусты на основе самонесовместимости. - Изв.ТСХА, 1977, вып.1. - С.124-131.
8. Лизгунова Т. Культурная флора СССР, том XI. Капуста. – Л.: Колос, 1984. - 328 с.
9. Монахос Г.Ф., Теренина Н.С. Генетические источники устойчивости к киле крестоцветных (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) при селекции пекинской капусты./Известия ТСХА, М., 1998.- С. 87-93.
10. Монахос Г.Ф., Ушанов А.А. Наследование устойчивости к киле (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) у линий листовой капусты (*Brassica oleracea* ssp. *acephala*). - Известия ТСХА.- М.: ТСХА, 1998, №2 - с.106-115.

11. Монахос Г. Ф. Отчёт о научно-исследовательской работе по теме “Разработать и испытать новые методы семеноводства гибридов позднеспелой белокочанной капусты, получаемых на основе мужскостерильных родительских линий”, М.: ТСХА, 2000. – 39 с.
12. Монахос, Г.Ф., Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С., Цветков И.Л., Вишнякова Х.М., Дорохов Д.Б., Позмогова Г.В., Соловьев А.А. Вновь синтезированный аллогексаплоидный вид *Brassica* с геномом ААВВСС как источник устойчивости к киле и сосудистому бактериозу крестоцветных. Известия ТСХА. 2001, № 2 С. 51-57.
13. Мюнтцинг А. Генетика. Общая и прикладная. М., 1967.
14. Рыбин В.Л. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. ВНИИ растениеводства, 1936, №10. С. 1-46.
15. Сухорукова Н.С. Методика оценки и селекционного отбора белокочанной капусты на устойчивость к сосудистому бактериозу//Автореф. дисс...канд. с.-х. наук. М., 1987. 16 с.
16. Цицин Н.В. Теория и практика отдаленной гибридизации. М., Наука, 1981. – 160 с.
17. Ashikawa M., Yoshikawa H., Hida K., Kameno T., Morita I. and Takatuka M. Studies on breeding of clubroot resistance in cole crops. Screening of cole crops for clubroot resistance// Bull. of the Veg. and Orn. Crop Res. St. 1973. P. 1-25.
18. Ashikawa M., Yoshikawa H., Hida K. Studies on breeding of clubroot-resistance in cole crops. Screening of cole crops for clubroot resistance// Bull. of the Veg. and Orn. Crop Res. St. 1980. P. 35-73.
19. Bailey L.H. 1928. Brassica. The standard cyclopedia of horticulture. Vol. 1. New York: MacMillan. pp.541-544. from Zhang Mei, 1995 Chinese cabbage varietal Trial. ARC Training, China. P. 4
20. Bain D. C. Reaction of brassica seedlings to blackrot. Phytopathology, 1952, 42: P. 316-319.

21. Bannerot H., Bouldard Y. and Temp J. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*.//Proc. EUCARPIA Meeting Cruciferae. Dundee. 1974. P. 52-54.
22. Bannerot H., Bouldard L., Chupeau Y. Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. Eucarpia Cruciferae Newsl. 1977. 2: 16 pp.
23. Barbeyron J., Boury S. Marker assisted selection in cauliflower. Molecular mapping of a nuclear recessive male sterility gene.- Rennes, France, Acta Horticulturae, 459, 1997, P.149-155.
24. Bellaoui M., Pelletier G., Budar F. The steady-state level of mRNA from the Ogura cytoplasmic male sterility locus in *Brassica* cybrids is determined post-transcriptionally by its 3' region. EMBO J. 1997. 16: P. 5057-5068.
25. Bonen L. and Brown G.G., 1993. Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organization and expression in plant mitochondria. Can. J. Bot. 71: P. 645-660.
26. Bonnet A., 1975. Introduction et utilisation d'une stérilité mâle cytoplasmique dans des variétés précoces européennes de radis *Raphanus sativus* L. Ann. Amélior. Plantes 25: 381-397.
27. Bonhomme S., Budar F., Ferault M., Pelletier G., 1991. A NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids. Curr. Genet. 19: P. 121-127.
28. Bonhomme S., Budar F., Lancelin D., Small I., Defrance M.F., Pelletier G., 1992. Sequence and analysis of Nco2,5 Ogura-specific fragment correlated with male sterility in *Brassica* cybrids. Mol. Gen. Genet. 235: P. 240-248.
29. Brown G.G. et al. Molecular analysis of *Brassica* CMS its application to hybrid seed production.- Rennes, France, Acta Horticultural, 459, 1997, P.149-155.
30. Brown G.G. et al. Molecular analysis of *Brassica* CMS and its application to hybrid seed production. Int. Symp. on Brassicas. 1998. 459: P. 265-274.

31. Buczacki S., Toxopeus H., Mattusch P., Johnston T., Dixon G. & Hobolth L. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach// Trans. Br. mycol. Soc. 1975. P. 295-303.
32. Buczacki S. *Plasmodiophora* – an interrelationship between biological and practical problems. In Buczacki S. (eds.): Zoosporic plant pathogens – a modern perspective// Academic Press London. 1983. P. 161-191.
33. Chen J., Roberts P., and Gabriel D.W. Effects of a virulence locus from *Xanthomonas campestris* 528T on pathovar status and ability to elicit blight symptoms on crucifers. *Phytopathology*, 1994, V.84 P.1458-1464.
34. Chiang M., Crete R. Inheritance of clubroot resistance in cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*)// Can. J. Genet. Cytol. 1970. P. 253-256.
35. Cook A.A. Studies on the disease cycle of crucifers// *Phytopathology*. 1952. V. 42. P. 162-167.
36. Crête R. Worldwide importance of clubroot// *Clubroot Newsl.* 1981. P. 6-7.
37. Daly P. and Tomkins B. Production and Postharvest Handling of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). RIRDC Publication No. 97/1. 1995. P. 39.
38. Delourme R. Eber F. and Renard M. 1991. Radish cytoplasmic male sterility in rapeseed: breeding restorer lines with a good female fertility. In: 8<sup>th</sup> International Rapeseed Conference (Saskatoon, Saskatchewan, Canada), Vol. 5, p. 1056.
39. Duke J. A., Ayensu E. S. Medicinal Plants of China Reference Publications, Inc. 1985. ISBN 0-917256-20-4. In: Plants for a future (URL: <http://www.scs.leeds.ac.uk/pfaf/idex.html>).
40. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of the plant genomic DNA for the PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19, 1349.
41. FAO. FAOSTAT statistics database (URL: <http://apps.fao.org/default.htm>). 1998.

42. Frello S., Hanse K., Jensen J., Jorgensen R.B. Theor. Appl. Genet. 1995. V.91. P.236-241.
43. Fu T.D. production and research of rapeseed in the People's Republic of China.//Eucarpia Cruciferae Newsletter. 1981. P. 6-7.
44. Gabriel D.W., Kingsley, M.T, Yanget Y, Chen J., and Roberts P. Host-specific virulence genes of *Xanthomonas*. in: Molecular mechanisms of bacterial virulence. Ed. C.I Kado, J.Crosa. Kluwer Ac. Pubkl., Dordrecht, 1993, P.141-158.
45. Gao L., Zheng S., Li W., Wu P. Storage of Chinese cabbage. In: Postharvest Handling of Fresh Vegetables. O'Hare T. et al. ACIAR Proceedings, 105. 2001. P. 111-112.
46. Gomez-Campo C. Biology of *Brassica* Coenospecies. Developments in plant genetics and breeding, 4. 1999.
47. Grelon M., Budar F., Bonhomme S., Pelletier G. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids. Mol. Gen. Genet. 1994. 243. P. 540-547.
48. Guo H., Dickson M.H., Hunter J.E. *Brassica napus* sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance//HortScience. – 1991. P. 1545-1547.
49. Hanson M.R., 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. Ann. Rev. Genet. 25: 461-486.
50. Heyn F., 1976. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. Eucarpia Cruciferae Newsl. 1: 15-16.
51. Heyn F., 1978. Cytoplasmic genetic male sterility in *Brassica napus*. Eucarpia Cruciferae Newsl. 3: 34-35.
52. Hinata K. and Kanno N. Cytoplasmic male sterile strain of Yukina (*Brassica campestris* L.) produced by nucleus substitution. 1976. P. 127-128.
53. Ignatov A., Vicente J.G., Conway J., Roberts S.J., Taylor J.D. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and sources of

- resistance/ISHS Symposium on Brassicas. 10th Crucifer Genetics Workshop. - 1997, p.215.
54. Ignatov A., Kuginuki Y. and Hida K. Vascular stem resistance to black rot in *Brassica oleracea*. Canadian Journal of Botany. 1999, 77(3): 442-446.
55. Johnston. T. A new factor of resistance to clubroot in *Brassica napus* L.// Plant pathology. 1970. P. 156-158.
56. Kamoun S., Kamdar H.V., Tola E., Kado C. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the hrpX locus//Mol. Plant-microbe interact. 1992. P. 22-23.
57. Kaul M.L.H. Male sterility in higher plants. (Monographs on theoretical and applied genetics, vol. 10) Springer-Verlag. Berlin. 1988. 1005 pp.
58. Krishnasamy S. and Makaroff C.A., 1994. Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. Plant. Mol. Biol. 32: 879-890.
59. Kuginuki Y., Yoshikawa H. and Hida K. Breeding of Chinese cabbage with clubroot resistance in Japan// In: ISHS Symposium on Brassicas, Abstracts of 9th Crucifers genetics workshop, Lisbon. 1994. P. 15.
60. Kuginuki Y., Ajisaka H., Yui M., Yoshikawa H., Hida K. & Hirai M. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L.// Euphytica. 1997. P. 149-154.
61. Leyns F., Cleene M., Swings, J.-G., and Ley J. D. The host range of the genus *Xanthomonas*.: Botanical review, 1984, V.50. P. 308-356.
62. L'Homme Y. and Brown G.G., 1993. Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genome are confined to a single transposed locus. Nucleic Acids Res. 21: 1903-1909.
63. L'Homme Y., Stahl R., Li X.-Q., Hameed A., Brown G., 1997. *Brassica napus* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol-associated orf224 gene. Curr. Genet. 31: 325-335.

64. Li C. W. The origin, evolution, taxonomy and hybridization of Chinese cabbage/Chinese cabbage, Proc. of the first international symposium. Shanhua, Tainan, Taiwan, China, 1981. P. 3-10.
65. Mattusch P. Epidemiology of clubroot of crucifers caused by *Plasmiodiophora brassicae*// In: Buczacki S.T. & Williams P.H. (Eds.): Woronin + 100 international conference on clubroot, Madison, Wisconsin. 1978. P. 24-28.
66. Menassa R., El-Rhouby N., Brown G., 1997. An open reading frame for a protein involved in cytochrome c biogenesis is split into two parts in *Brassica* mitochondria. *Curr. Genet.* 31: 70-79.
67. Monteiro A. & Lunn T. Trends and perspectives of vegetable brassica breeding world-wide. 2004. In: Tropical-seeds.com (URL; <http://www.tropical-seeds.com/pubs.html>).
68. Nieuwhof M. Identity test of Ms-genes of Brussels sprout and cauliflower. - *Euphytica*, 1968, v.17, 2, P. 202-206.
69. Ogura H. Studies on the new male sterility in the Japanese radish with special reference to utilization of this sterility toward the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* – 1968, v. 6, P. 39 – 78.
70. Palmer J.D. and Herbon L.A., 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *J. Mol. Evol.* 28: 87-97.
71. Pearson D.H. Incompatibility in broccoli and production of seed under cages. 1932. P. 468-472.
72. Pellan-Delourme R. and Renard M., 1988. Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.): female fertility of restored rapeseed with “Ogura” and cybrid cytoplasm. *Genom* 30: 234-238.
73. Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle P., Renard M., 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 244-250.

74. Pereira de Souza A., Jubier M.-F., Lejeune B., 1992. The higher plant nad5 gene: a conserved discontinuous transcription pattern. *Curr. Genet.* 22: 75-82.
75. Prakash and Hinata K. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review// *Opera Bot.* 55. P. 1-57.
76. Proudfoot K. Breeding crucifers for clubroot resistance// *Proc. Can. Phytopath. Soc.* 43. 1976. P. 37-38.
77. Rowe R. Evaluation of radish cultivars for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) race 6 for Midwestern United States// *Plant disease*, 64. 1980. P. 462-464.
78. Sauer J.D. Historical geography of crop plants - a select roster// CRC Press, Boca Raton, Florida. 1993.
79. Seaman W., Walker J., Larson R. A new race of *Plasmodiophora brassicae* affecting "Badger Shipper"// *Phytopathology*, 53. 1963. P. 1426-1429.
80. Shiga T. and Baba S. Cytoplasmic male sterility in rape plant (*Brassica napus* L.). 1971. P. 16-17.
81. Shiga T. and Baba S.. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape *Brassica napus* L. and its utilization to breeding. *Jpn. J. Breed.* 1973. 23: P. 187-197.
82. Singh M. and Brown G.G., 1991. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* 3: 1349-1362.
83. Singh M., Hamel N., Menassa R., Li X.-Q., Young B., Jean M., Landry B., Brown G.G., 1996. Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143: 505-516.
84. Song K., Osborn T., Williams P. P. brassicae taxonomy based in nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLP). Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa*// *Theor. Appl. Genetics.* 1990. V. 79. № 4. P. 497-506.

85. Song K. and Osborn T. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses// *Genom.*, 35. 1992. P. 992-1001.
86. Sutton, J. C. and Williams, P. H. Relation of xylem plugging to black rot lesions development in cabbage. *Can. J. Botany*, 1969, 48: 391-401.
87. Tompson K.F. Cytoplasmic male sterility on oilseed rape. *Heredity*. 1972. P. 253-257.
88. Toxopeus H., Janssen A. Clubroot resistance in turnip, II. The “slurry” screening method and clubroot races in the Netherlands/ *Euphytica*, 24. 1975. P. 751-755.
89. Toxopeus H. Outlines of breeding programs for clubroot resistance in Brassica crops/ In Buczacki S., Williams P. (eds.): *Woronin + 100 international conference on clubroot*, Madison, Wisconsin. 1978a. P. 124-126.
90. Toxopeus H. Clubroot control – the breeding and genetics of resistance/ In Buczacki S., Williams P. (eds.): *Woronin + 100 international conference on clubroot*, Madison, Wisconsin. 1978b. P. 29-35.
91. Voorrips R. Clubroot in the cole crops: the interaction between *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica oleracea*// Thesis Wageningen. 1996. 118 pp.
92. Vinning G. Market compendium of Asian vegetables. RIRDC Research Paper No. 95/12. Canberra, Rural Industries Research and Development Corporation. 1995. 386 pp.
93. Williams P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers // *Plant disease*. 1980. V. 64(8), P. 736-742.
94. Williams P.H. and Heyn F.W. The origins and development of cytoplasmic male sterile Chinese cabbage. 1981. P. 293-300.
95. Yamagishi H., Hirai M., Yoshikawa H., Yui S. *Japan J. Breeding*. 1989. V.39.P. 229-233.

96. Yamagishi H. and Terachi T., 1996. Molekular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 325-332.
97. Yamagishi H. and Terachi T., 1997. Molekular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant. Breed.* 116: 323-329.
98. Zhang Lu-Gang. Breeding new cms line of heading Chinese cabbage. // Brassica 2000, International Symposium on Brassicas, Poster presentation. P. 17.