

УДК 635.34:631.523:632.4

СИНТЕЗ АЛЛОГЕКСАПЛОИДА С ГЕНОМНОЙ ФОРМУЛОЙ ААВВСС РОДА *BRASSICA* L. КАК ДОНОРА УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ И СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ КРЕСТОЦВЕТНЫХ

Г.Ф. МОНАХОС, А.Н. ИГНАТОВ, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ,
И.Л. ЦВЕТКОВ, Х.М. ВИШНЯКОВА, Д.Б. ДОРОХОВ,
Г.В. ПОЗМОГОВА, А.А. СОЛОВЬЕВ

(Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева,
лаборатория защиты растений, кафедра генетики,
Центр «Биоинженерия» РАН)

В результате гибридизации линии PI 199947 *Brassica capitata* (геномы В и С), источника доминантной моногенной устойчивости к возбудителю сосудистого бактериоза, с растением устойчивого к киле турнепса ECD04 (*B. tara*, геном А) и обработки гибридов F₁ колхицином были получены растения, несущие все три основных генома *Brassica*: А, В и С. В потомстве от самоопыления амфидиплоида были отобраны фертильные растения, сохранившие аллогексаплоидную природу и устойчивость к киле и сосудистому бактериозу. Изучение морфологических, цитологических и генетических признаков этого растения показывает его генетическую стабильность и возможность определения как нового вида, названного *B. x composita*. Вновь синтезированный вид может быть использован в качестве универсального бридж-растения и источника устойчивости к экономически важным болезням крестоцветных.

Капустные (крестоцветные) растения (семейство *Brassicaceae*) поражаются многими фитопатогенными микроорганизмами. Наиболее вредоносными болезнями являются кила (возбудитель *Plasmodi-*

ophora brassicae Wor.) и сосудистый бактериоз (возбудитель *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow. Вследствие того, что химические меры борьбы неэффективны или запрещены

к применению на этих культурах, селекция на устойчивость является главным способом снижения потерь урожая от этих болезней растений. Расово-специфичные гены устойчивости к киле крестоцветных, найденные у растений *B. oleracea* и *B. napus*, легко преодолеваются наиболее вредоносными расами патогенов. Три полимерных доминантных гена, контролирующих устойчивость к киле у линии-дифференциатора ЕСD04 (*B. gara*) [3] до сих пор эффективны против российской популяции патогена [1]. Высокая устойчивость к сосудистому бактериозу, контролируемая одним доминантным геном, была обнаружена у коллекционного образца PI 199947, определенного ранее как *B. napus* [8,9].

Поскольку вид *B. oleracea* L. представляет наиболее важные разновидности капустных культур, неоднократно предпринимались попытки передать в *B. oleracea* гены устойчивости к киле и сосудистому бактериозу из других видов *Brassica* [11, 4]. С помощью соматической гибридизации и возвратного скрещивания ген устойчивости к сосудистому бактериозу Rb был передан от образца PI 199947 в линии листовой капусты и брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), но полученные растения имели несбалансированное число хромо-

сом [10]. В данной работе в результате межвидовой гибридизации была получена аллогексаплоидная амфидиплоидная линия с геномной формулой AABVСС, несущая три доминантных гена устойчивости к киле и один — к сосудистому бактериозу и послужившая посредником для передачи данных генов в растения хозяйственно ценных разновидностей капусты.

Методика

Семена растений образца PI 199947 были получены от проф. М.Х. Диксона (Корнельский Университет, США). Семена других хозяйственно важных видов капустных были получены из Кооператива по генетике крестоцветных (Университет Висконсина, США), Опытного хозяйства «Bearer Lodge» (Канада) и Генбанка Веллесборна (Великобритания). Размножение растений и оценка морфологических признаков, включая скрещиваемость с другими видами капустных, были проведены на селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева МСХА и в Horticulture Research International, Великобритания. Цитологический анализ был проведен в Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева. Изучение изоферментных и молекулярных маркеров было проведено в центре «Биоинженерия» РАН.

Морфологические признаки образца PI 199947 и представителей *B. oleracea* L. — линий CrGC3 и PI 436606, *B. napus* L. — линий «Cobra 1», «White Flowered» (WF) и CrGC5, *B. rapa* L. — линий Rbr и ECD04, *B. juncea* (L.) Czern. — сортов «Florida Broad Leaf» и «Chothma», *B. carinata* Braun. — сортов «Addis Aceb» и «Patu» и *B. nigra* Braun. — образца k148 описывали в соответствии с ключом «Флора СССР» (табл. 1) [2].

Типичное растение PI 199947, выращенное в тепличных условиях при температуре 24/18°C и 16-часовом световом дне до цветения, скрещивали с представителями других видов в прямой и обратной комбинациях. Все скрещивания проводили принудительным нанесением пыльцы на кастрированные бутоны за 3—4 дня до распускания цветков. После опыления соцветия помещали под изоляторы из пергамента для защиты от случайного переопыления. Полученные при гибридизации образца PI 199947 растения выращивали до цветения и оценивали по фертильности пыльцы. В связи с тем, что аллотриплоидные амфигаплоидные растения (геномная формула ABC) формировали цветки без пыльников (с мужской стерильностью), растения в стадии семядолей были обработаны 0,1% раст-вором колхи-

цина. Обработанные растения по морфологическим признакам не отличались от аллотриплоидов, но имели нормальные пыльники и фертильную пыльцу. При принудительном гейтеногамном опылении вскрытых бутонов было получено по 4—6 семян на стручок. Аллогексаплоидные растения (AABBCC) выращивали на инфекционном фоне килы (раса 16/15/31) и после оценки устойчивости к сосудистому бактериозу отбирали по признаку высокой завязываемости семян при свободном переопылении на изолированном участке.

Цитологический анализ и подсчет числа хромосом осуществляли в клетках меристематических тканей кончиков корешков по оригинальной методике. Для приготовления препаратов митотических хромосом семяна проращивали в термостате при 24—26°C в течение суток, затем переносили в холодильник на 2 суток и обратно в термостат на сутки при 24—26°C. Проростки с корешками длиной около 1 см помещали в насыщенный раствор α -Br-нафталина на 4 ч при комнатной температуре, после чего тщательно промывали проточной водой в течение 15 мин и фиксировали уксусным алкоголем (этанол : уксусная кислота — 3:1). Перед приготовлением препаратов фиксированный материал тщательно промывали проточ-

ной водой. Отделяли меристему (кончик корешка длиной 1,5–2 мм) и помещали в 0,6% раствор ферментов — пектиназы, целлюлазы и мацерозина в цитратном буфере (рН 4,8) при температуре 37°C на 45–60 мин. Препарат готовили методом распластывания клеток. В капле 60% уксусной кислоты с помощью препаровальных игл меристему измельчали и в полученную суспензию добавляли свежеприготовленный уксусный алкоголь. Полученный препарат ополаскивали в этаноле и высушивали на воздухе. Высушенные препараты окрашивали 2% раствором Гимза в фосфатном буфере (рН 6,9–7,0) в течение 20–25 мин, после чего ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Axiolab (Carl Zeiss).

Для анализа молекулярных RAPD-маркеров ДНК изолировали из молодых листьев взрослых растений по методу Эдвардса с соавторами [6]. Методика RAPD-анализа описана ранее [19]. Качественный состав изоферментов определяли методом энзим-электрофореза в полиакриламидном геле с щелочной буферной системой по Девису [5] и последующим окрашиванием зон активности изоферментов. Полученные RAPD-спектры и энзимогаммы кислых фосфатаз и

эстераз использовали для идентификации видов и статистической группировки (кластерный анализ) всех исследованных образцов капустных культур. Степень сходства (генетическое расстояние) для каждой пары образцов вычисляли по доле совпадающих полос от общего числа полиморфных полос у всех исследованных растений.

Результаты

В тепличных и полевых условиях образец PI 199947 имел морфологические признаки, характерные для растений *B. carinata* (табл. 1). Число хромосом было равным 34 в диплоидном наборе, т.е. характерным для *B. carinata* и отличающимся от *B. napus* и других амфидиплоидных видов рода *Brassica* (рис. 1). Хотя образец PI 199947 скрещивался с некоторыми другими видами (табл. 2), гибридные растения были стерильными или частично фертильными, а доля гибридных семян была невысокой. В то же время при опылении растений PI 199947 чужеродной пылью наблюдалось большое количество апомиктических семян, выявленных по морфологии и обладавших RAPD-спектром, идентичным материнскому растению (данные не показаны).

RAPD-анализ растений каждого из представителей видов с праймерами UBC180 (5"ggg cca cgc t3'), Al-1 (5"ggg

Морфологические признаки основных видов *Brassica* и гибрида PI 199947 × ECD04
в соответствии с ключом «Флора СССР» [2]

Признак	<i>B. nigra</i>	<i>B. oleracea</i>	<i>B. para</i>	<i>B. juncea</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. napus</i>	PI 199947 × ECD04 <i>B. x composita</i>
Геномная формула	ВВ	СС	АА	ААВВ	ВВСС	ААСС	ААВВСС
Число хромосом	8	9	10	18	17	19	27
Стебель	Прямой, голый	Олиственный	Прямой ветвистый	Ветвистый голый	Ветвистый голый	Прямой олиственный	Ветвистый голый
Нижние листья	Лировидно-лопастные ясно-черешковые	Лировидные перисто-рассеченные	Лировидные перисто-надрезанные	Лировидные перисто-надрезанные	Лировидно-лопастные ясно-черешковые	Лировидные перисто-надрезанные	Лировидные перисто-надрезанные
Соцветие	Редкая кисть	Многоцветковая кисть	Щитковидная кисть	Щитковидная кисть	Редкая кисть	Щитковидная кисть	Редкая кисть

Стручок	4-гранные бугорчатые створки со средней жилкой	Длинные гладкие слабоугорчатые	Длинные гладкие слабоугорчатые	4-гранные бугорчатые створки со средней жилкой	Длинные гладкие слабоугорчатые	4-гранные бугорчатые створки со средней жилкой
Носик стручка	Резкий тонкий короткий	Туповатый толстый	Удлиненный конический с тонким концом	Резкий тонкий короткий	Конический тонкоотнутый	Резкий тонкий короткий
Цветок	Светло-желтый	Желтый	Ярко-желтый	Светло-желтый	Ярко-желтый	Ярко-желтый
Антоциановое пятно в пазухе листьев	Есть	Нет	Нет	Есть	Нет	Есть

Скрещиваемость PI 19947 и аллогексаплоида (AABVCC) с представителями основных видов *Brassica* (число семян, полученных от принудительного переопыления 50 бутонов)

Родители	Потомство					<i>B. carinata</i>		<i>B. napus</i>	
		<i>B. nigra</i> K148	<i>B. oleracea</i> A1	<i>B. rapa</i> ECD04	<i>B. juncea</i> FBLM	Patu	Addis Aced	Cobra	WF
		BB	CC	AA	AABB	VBCC	VBCC	AACC	AACC
♀ PI19947	F ₁	15	2	30	0	470	372	0	12
	F ₂	0	—	0	—	396	491	—	22
♂ PI19947	F ₁	13	0	22	0	468	387	0	12
	F ₂	0	—	0	—	455	490	—	6
♀ Алло-гексаплоид	F ₁	—	8	12	—	76	75	5	12
	F ₂	—	—	4	—	4	4	—	—
♂ Алло-гексаплоид	F ₁	—	12	10	13	79	90	3	14
	F ₂	—	4	2	—	2	2	—	—

сса ggc t3'), WE22 (5'gga atg gaa ccg3'), WE49 (5'cac gtt atc gca3'), RA12-75 (5'cat tat gcg ggc3') дал 45 полиморфных ДНК-маркеров и показал присутствие в каждом из изученных растений видоспецифичных маркеров, наследуемых амфидиплоидами в соответствии с их происхождением (рис. 2).

Образец PI 19947 имел маркеры, связанные с геномами В и С, как и другие образцы *B. carinata*. Изоферментный спектр эстераз и кислых фосфатаз образца PI 19947 был идентичен спектру растений *B. carinata* (данные не показаны). Аллогексаплоид PI

19947 x ECD04 с предполагаемой геномной формулой AABVCC имел 54 хромосомы и RAPD-маркеры, характерные для всех трех диплоидных геномов (табл. 3, рис. 2). Кластерный анализ, проведенный методом UPGMA по 45 RAPD-фрагментам, показал, что PI 19947 и аллогексаплоид группируются вместе с другими образцами *B. carinata*, хотя генетическое расстояние между *B. carinata* и гибридом PI 19947 x ECD04 сходно с расстояниями между диплоидными и амфидиплоидными видами (рис. 3).

Аллогексаплоид сохранял высокую устойчивость к со-

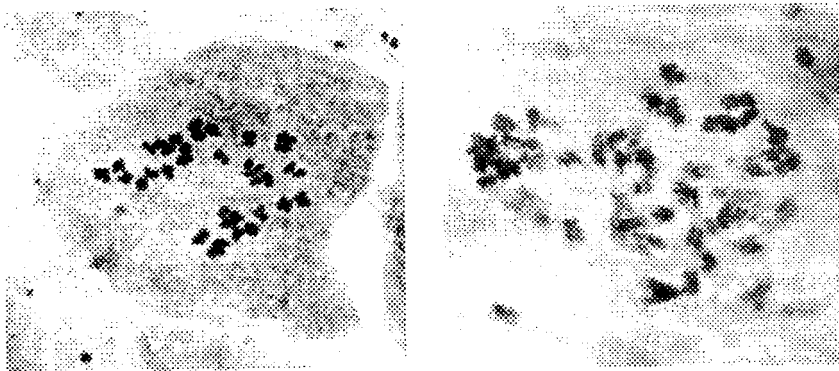


Рис. 1. Хромосомный набор образца PI 199947 ($2n=34$) (слева) и аллогексаплоидного гибрида PI 199947 x ECD04 ($2n=54$) (справа).

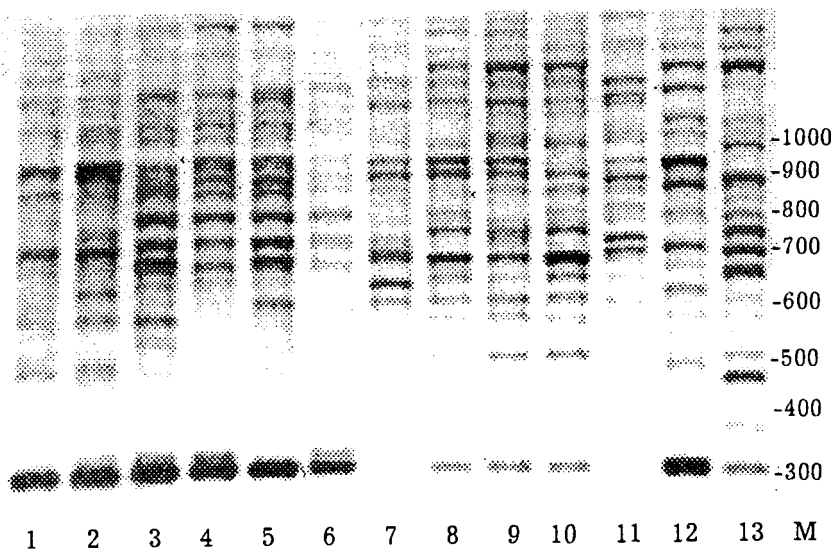


Рис. 2. RAPD-спектр (негативное изображение) образцов *Brassica* sp., полученный с праймером A1-1 (5'-GGGCCAGGCT-3'). 1 и 2. *B. juncea* сорта «Florida Broad Leaf» и «Chothma»; 3 и 4. *B. carinata* Braun. сорта «Addis Aceb» и «Patu»; 5. аллогексаплоид PI 199947 x ECD04; 6. PI 199947; 7. *B. oleracea* L. линия CrGC3; 8. *B. napus* L. линия «Cobra 1»; 9. «Cobra 2»; 10. линия CrGC5; 11. *B. oleracea* L. линия PI 436606; 12. *B. nigra* Braun. образец k148; 13. *B. rapa* L. линия Rbr; M, 100bp Ladder.

**RAPD-маркеры, специфичные для геномов А, В и С,
присутствующие у аллогексаплоидного вида *B. x composita*
(серым цветом выделены ячейки с плюс-аллелями)**

Праймер Маркер	Геном, с кото- рым связан маркер	<i>B. jun-</i>	<i>B. ca-</i>	<i>B. na-</i>	<i>B.</i>	<i>B.</i>	<i>B. ole-</i>	<i>B. x</i>
		<i>cea</i>	<i>rina-</i> <i>ta</i>	<i>pus</i>	<i>rara</i>	<i>nigra</i>	<i>racea</i>	<i>compo-</i> <i>sita</i>
		AABB	BBCC	AACC	AA	BB	CC	AABBCC
AL-1_9	A	1	0	1	1	0	0	1
WE22_6	A	1	0	1	1	0	0	1
UBC180_6	A	1	0	1	1	0	0	1
UBC180_11	A	1	0	1	1	0	0	1
UBC180_8	B	1	1	0	0	1	0	1
WE49_6	B	1	1	0	0	1	0	1
AL-1_11	B	1	1	0	0	1	0	1
WE22_14	C	0	1	1	0	0	1	1
UBC180_5	C	0	1	1	0	0	1	1
UBC180_7	C	0	1	1	0	0	1	1
UBC180_12	C	0	1	1	0	0	1	1
AL-1_7	C	0	1	1	0	0	1	1
WE49_4	C	0	1	1	0	0	1	1

судистому бактериозу и киле-капустных, свойственную её родительским формам (табл. 4, 5), и скрещивался с другими видами *Brassica*. Фертильность полученных гибридных растений была достоверно выше, чем при скрещивании с теми же видами родительского образца PI 199947, однако семян завязывалось очень мало (см. табл. 2).

Обсуждение

Гуе с соавторами [9] определили образец PI 199947 как *B. napus*. В представленной работе были исследованы

морфологические, цитологические и молекулярно-генетические признаки этого растения и сделан вывод о принадлежности его к виду *B. carinata*. Межвидовой гибрид PI 199947 x ECD04, сочетая морфологические признаки *B. carinata* и *B. rara*, имеет 54 хромосомы, несет молекулярные маркеры, подтверждающие его аллогексаплоидную природу с присутствием всех трёх геномов А, В и С, и дает полуфертильное потомство при скрещивании с большинством диплоидных и амфидиплоидных видов

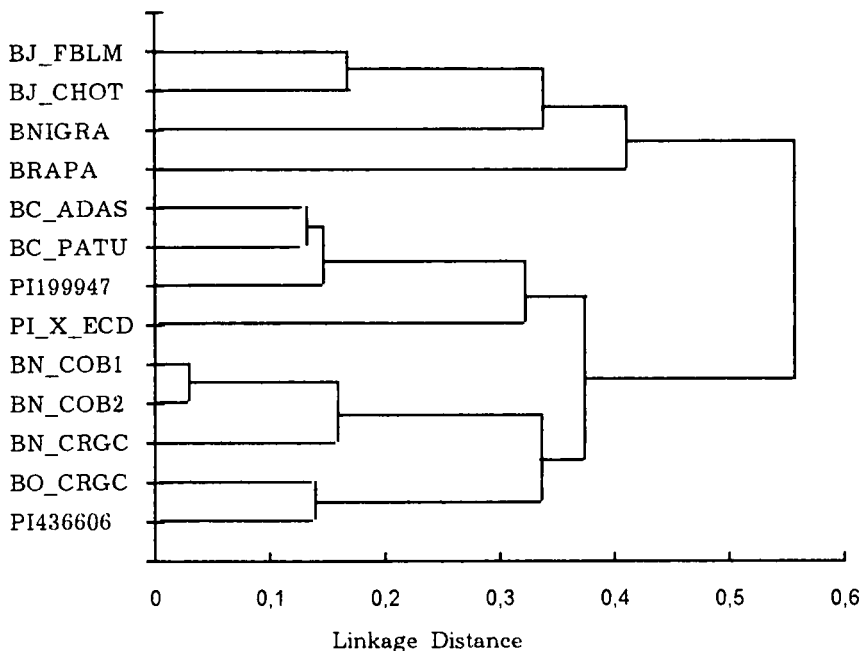


Рис. 3. Дендрограмма родственных связей изученных видов по 45 полиморфным RAPD-фрагментам методом UPGMA

(BJ_FBLM, BJ_CHOT — *B. juncea*, BNIGR — *B. nigra*, BRAPA — *B. rapa*, BC_ADAS, BC_PATU, PI 199947 — *B. carinata*, BN_COB1, BN_COB2, BNCRGC — *B. napus*, BO_CRGC, PI436606 — *B. oleracea*, PI_x_ECD — *B. × composita*)

Brassica. Он может считаться представителем нового вида, созданного в результате гибридизации *B. carinata* с *B. rapa*.

Как предполагает Куэрос [14], все диплоидные виды *Brassica* возникли как амфидиплоиды близкородственных родителей с небольшим числом хромосом ($n=4$ или 5). Растения *B. nigra* (геном В) отделились от предка, общего для *B. oleracea* и *B. rapa*, на раннем этапе эволюции и послужили родителями для

двух из трех амфидиплоидных форм рода *Brassica* - *B. juncea* (AABB) и *B. carinata* (BVCC) [18] (рис. 4). Результаты молекулярного картирования геномов растений этих видов показывают: высокий уровень гомологии хромосом диплоидных видов, наличие дублированных и триплицированных (до 30%) локусов и групп сцепления у диплоидных видов, высокую стабильность родительских хромосом в геномах амфидиплоидов [13] и значительную

Т а б л и ц а 4

Реакция сортов-дифференциаторов ECD, *B. juncea*,
B. carinata и аллогексаплоида *B. x composita* на расу
 возбудителя килы *P. brassicae* 16/15/31

Дифференциатор	Пораженные растения, %	Индекс поражения	Дифференциатор	Пораженные растения, %	Индекс поражения
20-хромосомная группа:			18-хромосомная группа:		
01 <i>B. rapa</i>	0	0	11 <i>B. oleracea</i>	100	1
02	0	0	12	100	1
03	0	0	13	100	1
04	0	0	14	100	1
05 <i>B. pekinensis</i>	100	1	15	100	1
38-хромосомная группа:			Тест-сорты:		
06 <i>B. napus</i>	28	0,2	<i>B. juncea</i> FBLM	100	1
07	98	0,9	<i>B. carinata</i> "Patu"	100	1
08	40	0,4	"Addis Aceb"	100	1
09	60	0,8	PI 199947	100	1
10	0	0	<i>B. x composita</i>	0	0

Т а б л и ц а 5

Реакция сортов-дифференциаторов и аллогексаплоида
B. x composita на расы 1, 4 и 0 возбудителя сосудистого
 бактериоза *X. campestris* pv. *campestris*

Дифференциатор	Ген устойчивости	Раса 1 (NCPB528T) avrR1, Rb	Раса 4 (HR11279a) avrR4, R2, Rb	Раса 0 (Ex528.1)
<i>B. rapa</i> (AA) "Just Right"	R4	+	—	+
"Tokyo Cross"	R4	+	—	+
"Seven Top Green"	R2	+	—	+
ECD04	—	+	+	+
<i>B. napus</i> (AACC)	R3	+	—	+
"Giant English"				
<i>B. oleracea</i> (CC)				
PI436606	r5	+	+	+
Badger Inbred 16	R1	—	+	+
<i>B. juncea</i> (AABB)				
"Florida Broad Leaf"	Rb	—	—	+
<i>B. carinata</i> (BBCC)				
PI 199947	Rb	—	—	+
<i>B. x composita</i> (AABBCC)	Rb	—	—	+

перестройку генома, следующую за гибридизацией родительских растений амфидиплоидных видов [16].

Очевидно, что растения трех амфидиплоидных видов *Brassica* sp. периодически скрещиваются с диплоидными родителями в естественных условиях. Поскольку амфидиплоидные виды являются преимущественно самоопылителями, гибридизация с растением другого вида может послужить толчком к глубокой реорганизации генома и образованию нового вида в течение относительно небольшого числа поколений. При гибридизации и последующем беккроссировании видов *Brassica* с разным числом хромосом или гаплоидных наборов, например *B. oleracea* x (*B. carinata* x *B. oleracea*) [20] и *B. jun-*

cea x (*B. juncea* x *B. napus*) [7], происходит последовательное уменьшение числа хромосом до числа, собственного 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.

Аллогексаплоид с геномной формулой AABVCC, описанный выше, является ценным источником генов устойчивости для селекции новых сортов капустных культур разных видов, и по сути — это новый вид, названный нами *Brassica* x *composita*. Семена этого аллогексаплоидного вида были

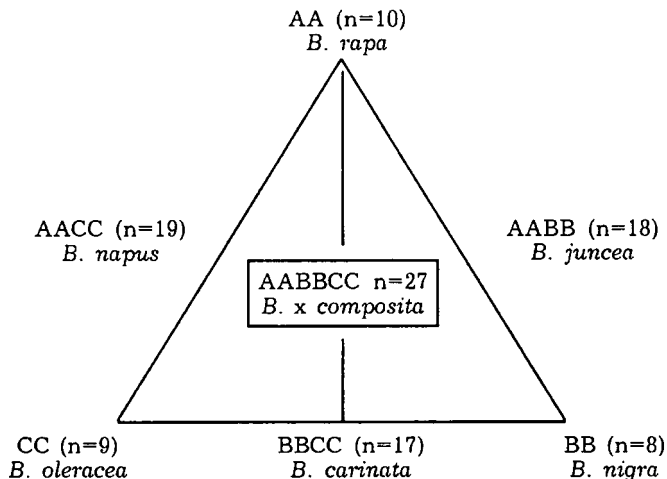


Рис. 4. Треугольник U [18], представляющий взаимосвязь геномов диплоидных и амфидиплоидных видов рода *Brassica* и положение нового вида *B. x composita*.

депонированы в коллекцию ВИР каталог № 4, партия № 35770.

Аллогексаплоид амфидиплоид *Brassica* × *composita* представляет собой однолетнее растение с корневой системой стержневого типа. Листья сидячие, лировидно-перистонадрезанные, по форме ближе к *B. rapa*, а по структуре покровных тканей, толщине мезофилла, жилкованию и окраске — ближе к *B. carinata*. Стебель гладкий, прямостоячий, ветвистый, без опушения, с антоциановым пятном в пазухах листьев. Цветки крупные, ярко-желтой окраски. Стручок короткий, с коротким тонким носиком, часто с антоциановой окраской. В стручке формируется от 6 до 10 семян.

ЛИТЕРАТУРА

1. Монахов Г.Ф., Джалилов Ф.С., Артемьева Е.А. Тр. 3-го Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Пуццоно, 1999. С. 369–371. — 2. Флора СССР. Ред. Комарова. — Л.: Наука, 1935. — 3. *Buczaki S.T. et al.* Tr. British Mycol. Soc. 1975. V.65. P. 91–104. — 4. *Chiang M.S., Chiang B.Y., Grant W.F.* Euphytica. 1977. V. 26. P. 319–336. — 5. *Davis B.* isc-electrophoresis. Ann. New York Acad. Sci. 1964.

V. 121 N. 3 P. 404–427. — 6. *Edwards K., Johnstone C., Tompson C.* Nucleid Acids Res. 1991. V. 19. P. 1349. — 7. *Frello S., Hanse K., Jensen J., Jorgensen R.B.* Theor. Appl. Genet. 1995. V.91. P.236—241. — 8. *Guo Z.H., Dickson M.H., Hunter J.E.* Cruciferae Newsletter, 1991. N. 4. P. 154–155. — 9. *Guo H., Dickson M.H., Hunter J.E.* Hort Science. 1991. V.26, NI2, P. 1545–1547. — 10. *Hansen L.N., Earle E.D.* Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1293–1300. — 11. *Honma S., Summers W.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1976. V. 101, N. 3. P. 299–302. — 12. *Iwasa S. J.* Fac. Agr. Kyushu Univ. 1964. V.13. P. 309–318. — 13. *Lager-crantz U., Lydiate D.* Genetics. 1996. V. 144. P. 1903–1910. — 14. *Quiros C.F., Ochoa O., Douches D.S.* J. Heredit. 1988. V.79. P. 351–358. — 15. *Quiros C. F.* J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1988. V. 67. N. 3. P. 1180–1185. — 16. *Song K., Lu P., Tang K., Osborn T.C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7719–7723. — 17. *Truco M.J., Hu J., Sadowski J, Quiros C.F.* Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 1225–1233. — 18. *U. N. Jpn. J. Genet.* 1935. V.7. P. 389–452. — 19. *Williams J.G.K., Kubelik A.R. a. o.*— Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535. — 20. *Yamagishi H., Hirai M. a. o.*— Japan J. Breeding. 1989. V.39.P. 229–233.

Статья поступила
5 июля 2001 г.