

ВОЗНИКНОВЕНИЕ *OGURA*-ПОДОБНОЙ ЦМС В РАСТЕНИЯХ *BRASSICA* ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

О.Н. ЗУБКО¹, С.Г. МОНАХОС¹, Г.Ф. МОНАХОС²

(¹ Кафедра ботаники, селекции и семеноводства садовых растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, ² ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»)

В ранее нами проведенном исследовании в потомстве *BC1* от межвидового скрещивания тетраплоидной фертильной *B. oleracea* с аллотетраплоидной фертильной *B. carinata* было обнаружено одно растение с мужской стерильностью, БКБю3. Мужская стерильность проявлялась в формировании аномально развитых тычинок и отсутствии фертильной пыльцы, остальные части цветка развивались и функционировали нормально. Единообразное проявление мужской стерильности у растений второго беккроссного поколения (*BC2*) от скрещивания растения *BC1* с фертильной линией диплоидной капусты белокочанной указывало на стабильность проявления и цитоплазматический характер ее наследования. Для установления типа спонтанно возникшей цитоплазматической мужской стерильности потомства *BC1* и *BC2* проведен молекулярно-генетический анализ с использованием *orf138*-маркера и установлено, что данная ЦМС является *ogura*-подобной. В результате ПЦР-анализа фертильных линий *B. carinata*, *B. oleracea*, а также фертильных растений *BC2*-потомства и частично фертильного межвидового гибрида (*B. oleracea* × *B. carinata*) выявлено наличие амплифицируемого фрагмента размером около 600 п.н. Присутствие данного фрагмента у фертильных генотипов может свидетельствовать о химерности их митохондриальных геномов и сопряжено с появлением *ogura*-подобной ЦМС в цитоплазме *S* генома *B. oleracea* потомства от межвидовой гибридизации.

Ключевые слова: цитоплазматическая мужская стерильность, ЦМС, *Ogura*, межвидовая гибридизация, *Brassica*, ПЦР-анализ

Введение

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – это более надежная и эффективная, по сравнению с самонесовместимостью, система биологического контроля опыления в производстве F1-гибридов капусты белокочанной. В семействе *Brassicaceae* известны три основных типа цитоплазмы, обуславливающих цитоплазматическую мужскую стерильность – *ogura polima*, и *napus* [6]. Наиболее изученной, стабильной в своем проявлении и широко распространенной в селекции и семеноводстве капустных культур является аллоплазматическая *ogura*-ЦМС. *Ogura*-ЦМС интродуцирована в основные экономически значимые виды *Brassica*, в том числе в капусту белокочанную (*B. oleracea* L.), посредством отдаленной гибридизации и технологии спасения зародышей из дайкона (*Raphanus sativus* L. ssp. *acanthiformis* (Morel) Stankev), в котором она впервые была обнаружена [6]. Молекулярно-генетическое изучение факторов, вызывающих *ogura*-ЦМС, показало, что она сопряжена с наличием химерного митохондриального гена *orf138*, который в настоящее время секвенирован и маркирован [7].

В литературе, кроме работ, описывающих процесс интродукции ЦМС посредством отдаленной гибридизации и совершенствования *ogura*-ЦМС-системы посредством слияния протопластов, встречаются работы, описывающие возникновение *ogura*-подобной ЦМС, выявляемой соответствующими ДНК-маркерами, в потомствах от межвидовой и межродовой гибридизации *Brassica* при использовании

фертильных отцовских и материнских растений, *ogura*-ЦМС которых не выявляется молекулярными маркерами [3, 4].

Нами в ранее проведенных исследованиях был получен частично фертильный (фертильность пыльцы 33,3%) межвидовой гибрид (БК) от скрещивания фертильной тетраплоидной линии Бю-1 капусты белокочанной (*B. oleracea*, $2n = 36$, геномная формула СССС) и фертильной инбредной линии Р1199947 аллотетраплоидной горчицы эфиопской (*B. carinata*, $2n = 34$, геномная формула ВВСС) [1]. В беккроссном потомстве этого гибрида при опылении диплоидной фертильной инбредной линией Бю3 капусты белокочанной (*B. oleracea*, $2n = 18$, геномная формула СС) обнаружено одно растение, обозначенное БКБю3, с мужской стерильностью.

С целью изучения типа цитоплазматической мужской стерильности, обнаруженной у потомств от отдаленной гибридизации капусты белокочанной (*B. oleracea*) и горчицы эфиопской (*B. carinata*), нами проведен молекулярно-генетический анализ растений этих потомств с использованием ДНК-маркера *ogura*-цитоплазмы *orf138*.

Материалы и методы

Растительный материал: фертильные инбредные линии Цв9, Пр3 и Тен капусты белокочанной (*B. oleracea*); фертильная инбредная линия Р1199947 горчицы эфиопской (*B. carinata*); частично фертильный (33%) межвидовой гибрид БК от скрещивания *B. oleracea* (учетверенногаплоидной, $2n = 4x$, линии Бю-1, произведенной в культуре изолированных микроспор) и *B. carinata* (аллотетраплоидная, $2n = 4x$, инбредная линия Р1199947); фертильные растения ВС1 БюБК1, БКБю9, БКЗм10; линии капусты белокочанной с *ogura*-ЦМС Зму7мс и Гэс2мс (*ogura*-ЦМС передана из коммерческих гибридов капусты белокочанной французского происхождения); ВС1-растение БКБю3 со спонтанно возникшей мужской стерильностью, обнаруженное в первом беккроссном потомстве межвидового гибрида БК; 4 растения ВС2-потомства (БКБю3)×Цв9 (1–4), унаследовавших спонтанно возникшую в ВС1 мужскую стерильность.

Общую ДНК выделяли из молодых листьев каждого растения СТАВ-методом [5]. Митохондриальный ген *orf138* амплифицировали с использованием праймеров *orf138*–5' 5'-GTCGTTATCGACCTCGCAAC-3' и *orf138*–3' 5'-СААТТGGGТТСА-СААAGСАТ-3' [4]. Реакционную смесь для ПЦР готовили как описано в [2], амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация – 94°C в течение 4 минут, далее 30 циклов: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг праймеров – 60°C, 1 мин; элонгация – 72°C, 1 мин; и завершающая элонгация – 72°C, 5 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле. Визуализировали в проходящем УФ-свете трансиллюминатора при окрашивании ДНК флуоресцирующим красителем GelRed.

Результаты

В беккроссном потомстве ВС1 при опылении межвидового гибрида БК (*B. oleracea* × *B. carinata*) диплоидной фертильной инбредной линией Бю3 капусты белокочанной (*B. oleracea*) наблюдали широкое разнообразие по морфологическим признакам и числу хромосом, которое варьировало от 18 до 26 (рис. 1).

При этом было обнаружено одно растение, обозначенное БКБю3, с мужской стерильностью. Стерильность проявлялась в виде редукции и некротизации пыльников, отсутствия фертильной пыльцы, при этом морфология и функциональность остальных элементов цветка, включая выработку нектара и завязываемость семян при перекрестном опылении, соответствовали цветкам фертильных растений (рис. 2).

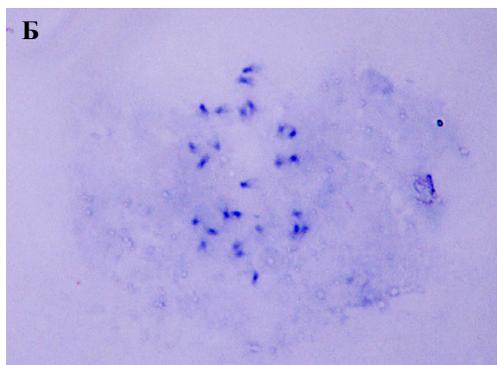
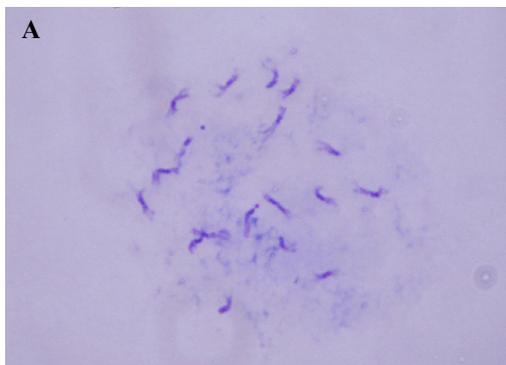


Рис. 1. Метафазные пластинки клеток корневых меристем растений первого беккроссного потомства (BC1) (*B. oleracea*, CCCC × *B. carinata*, BVCC) × *B. oleracea*, CC: А) БКБю3 (2n = 18), Б) БКБю2 (2n = 26)

Растение имело фенотип капусты белокочанной и обладало характерным для данного вида числом хромосом, 2n = 18.

Наследование мужской стерильности всеми растениями второго беккроссного поколения (BC2) от скрещивания растения BC1 БКБю3 с инбредной линией Цв9 диплоидной капусты белокочанной указывало на стабильность проявления и цитоплазматический характер ее наследования. Хромосомные aberrации как возможная причина проявления стерильности потомства при отдаленной гибридизации у 3-х выборочно проанализированных растений BC2 отсутствовали. В связи с известными фактами обнаружения мужской стерильности в потомствах от отдаленной гибридизации фертильных представителей *Brassica* других исследователей данная спонтанная мужская стерильность в беккроссном потомстве межвидового гибрида (*B. oleracea*, CCCC × *B. carinata*, BVCC) была принята нами за новый тип стерильности.

Скрининг стерильного BC1-растения БКБю3 со спонтанно возникшей мужской стерильностью и четырех растений BC2-потомства (БКБю3)×Цв9 (1–4), унаследовавших данную мужскую стерильность, частично фертильного гибрида БК (*B. oleracea* × *B. carinata*), его родительской линии Р1199947 (*B. carinata*), а также коллекции фертильных инбредных линий и мужкистерильных линий капусты белокочанной с известным *ogura*-типом цитоплазмы с использованием праймер-комбинации (*orf138-5'*, *orf138-3'*) на участок мтДНК, содержащий ген *orf138* [4], дал следующие результаты: амплификация ожидаемого фрагмента (~500 пар нуклеотидов) у образцов с *ogura*-цитоплазмой Зму7мс и Гэс2мс (№ 3 и 4 на рис. 3) и его отсутствие у фертильных линий капусты Цв9, Пр3 и Ген (№ 1, 2 и 15 на рис. 3) свидетельствовали об адекватности используемой маркерной системы для дифференциации стерильных и фертильных образцов капусты.

BC1-растение БКБю3 (№ 10 на рис. 3) со спонтанно возникшей мужской стерильностью и четыре проанализированных растения BC2-потомства (БКБю3) × Цв9 (№ 11–14 на рис. 3) содержали амплифицированный фрагмент, свидетельствующий



Рис. 2. Редуцированные, некротизированные пыльники растения второго беккроссного поколения (BC2) БКБю3Цв9 ((*B. oleracea*, CCCC × *B. carinata*, BVCC) × *B. oleracea*, CC) × *B. oleracea*, CC с мужской стерильностью

о наличии в них митохондриальной ДНК химерного гена *ogura*-ЦМС *orf138*. На основании данных результатов можно сделать заключение о том, что данные стерильные растения ВС1 и ВС2-потомства содержат *ogura*-подобную ЦМС. В то же время ПЦР-анализ фертильных растений потомства ВС1 БюБК1, БКБю9, БКЗм10 (№ 7, 8 и 9 на рис. 3), частично фертильного межвидового гибрида БК (№ 6 на рис. 3) и его отцовской родительской линии Р1199947 (№ 5 на рис. 3) выявил слабо проявляющийся на электрофореграмме фрагмент размером около 600 п.н., при ожидаемом отсутствии маркера *ogura*-ЦМС. Какую нуклеотидную последовательность содержит в себе этот фрагмент, может показать только его секвенирование. Но вопрос о том, каким образом и на каком этапе сформировался выявляемый используемым маркером ген *orf138* в мтДНК потомств межвидовых гибридов, остается открытым. Неотчетливо проявляющийся на электрофореграмме фрагмент ~600 п.н. у фертильных растений межвидового гибрида БК (*B. oleracea* × *B. carinata*), отцовской родительской линии Р1199947 (*B. carinata*), потомства ВС1 (БюБК1, БКБю9, БКЗм10) и в том числе у инбредной линии капусты белокочанной Цв9 может свидетельствовать о наличии у вышеперечисленных образцов в незначительном количестве мтДНК с геном *orf138* или вариантом этого гена, т.е. о химерности цитоплазмы проанализированных растений. Соответственно, появление растений с мужской стерильностью в потомстве от межвидовой гибридизации в условиях нарушений нормального хода митотического деления клеток спорофита и мейотического деления при формировании мегаспор возможно в результате случайного расхищивания цитоплазмы и формирования растений-потомков, у которых преобладают митохондрии, содержащие мтДНК с геном *orf138*.

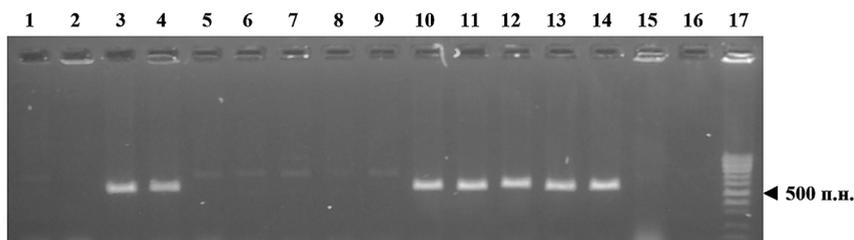


Рис. 3. ПЦР-анализ наличия/отсутствия специфичного для *ogura*-ЦМС *orf138*-гена с использованием пары праймеров *orf138*-5' и *orf138*-3': линия 1 – Цв9, 2 – Пр3, 3 – Зму7мс, 4 – Гэс2мс, 5 – Р1199947, 6 – БК, 7 – БюБК1, 8 – БКБю9, 9 – БКЗм10, 10 – БКБю3, 11–14 (БКБю3×Цв9) (1–4 растения), 15 – Тен, 16 – контроль H₂O, 17 – маркер размера ДНК-фрагментов «100 bp», п.н. – пар нуклеотидов

Заключение

Обнаруженная нами у беккроссного потомства (ВС1) межвидового гибрида (*B. oleracea* × *B. carinata*) *ogura*-подобная ЦМС не передавалась из известных доноров, но возникла спонтанно. Эту *ogura*-подобную ЦМС рекомендуем использовать в селекционных программах по созданию F1-гибридов капусты.

Библиографический список

1. Зубко О.Н., Монахос С.Г. Отдаленная гибридизация для передачи устойчивости к сосудистому бактериозу // Картофель и овощи, 2016, № 11. С. 39–40.
2. Нгуен М.Л., Монахос Г.Ф., Комахин Р.А., Монахос С.Г. Новый локус устойчивости к киле в хромосоме А05 капусты пекинской (*Brassica rapa* L.) // Генетика, 2018, т. 54, № 3. С. 306–315.

3. Hirata Y, Motegi T, Takeda Y, Moriwaki K. Induction of sterility in the seed progeny derived from artificially synthesized interspecific chimera in Brassica // Euphytica, 2001, № 117. P. 143–149.

4. Motegi T., Nou I., Zhou J., Kanno J., Kameya A., Hirata Y. Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile) // Euphytica, 2003, № 129. P. 319–323.

5. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research, 1980, № 19. P. 4321–4325.

6. Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops // Breeding Science, 2014, № 64. P. 38–47.

7. Yamagishi H., Terachi T. Molecular and biological studies on male sterile cytoplasm in the Cruciferae. III. Distribution of Ogura-cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars // Theor Appl Genet, 1996, № 93. P. 325–332.

INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION AS AN INDUCING FACTOR OF OGURA-TYPE CMS IN BRASSICA PLANTS

O.N. ZUBKO¹, S.G. MONAKHOS¹, G.F. MONAKHOS²

(¹ Department of Botany, Breeding and Seed Production of Horticultural Crops,
Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
² LLC “Breeding station after N.N. Timofeev“)

Abstract. In our recent study the one male sterile plant BKBu3 has been found in BC1-progeny from interspecific crossing of tetraploid fertile *B. oleracea* and allotetraploid fertile *B. carinata* lines. The flowers of male sterile plant had reduced, necrotic anthers, and no fertile pollen was observed. However, other organs of flowers were phenotypically and functionally normal. No segregation in sterility/fertility morphology of the BC2 progeny plants indicated a cytoplasmic mode of male sterility inheritance. To determine the type of the found cytoplasmic male sterility (CMS), the authors conducted a molecular-genetic analysis using *orf138*-specific primers. The PCR analysis indicated that the found cytoplasmic male sterility is of an Ogura-type. Screening the fertile lines of *B. carinata*, diploid *B. oleracea*, and fertile plants of BC2 progeny of interspecific cross and a partially fertile *B. oleracea-carinata* hybrid revealed ~600 bp amplicons that are not matched to the *orf138*-marker fragment. It was suggested that the presence of ~600 bp amplicons could be an outcome of chimeric cytoplasm of male fertile plants, and it could also be a reason why CMS plants are formed in a progeny of interspecific hybrids.

Key words: cytoplasmic male sterility, CMS, Ogura, interspecific hybridization, Brassica, PCR-analysis

References

1. Zubko O.N., Monakhos S.G. Otdalennaya gibridizatsiya dlya peredachi ustoychivosti k sosudistomu bakteriozu [Remote hybridization for the transfer of black rot resistance] // Kartofel' i ovoshchi, 2016, No. 11. Pp. 39–40.

2. Nguyen M.L., Monakhos G.F., Komakhin R.A., Monakhos S.G. Novyy lokus ustoychivosti k kile v khromosome A05 kapusty pekinskoy (*Brassica rapa* L.) [New locus of carina resistance in chromosome A05 of Peking cabbage (*Brassica rapa* L.)] // Genetika, 2018, vol.54, No. 3. Pp. 306–315.

3. Hirata Y, Motegi T, Takeda Y, Moriwaki K. Induction of sterility in the seed progeny derived from artificially synthesized interspecific chimera in Brassica // Euphytica, 2001, No. 117. Pp. 143–149.

4. *Motegi T., Nou I., Zhou J., Kanno J., Kameya A., Hirata Y.* Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile) // *Euphytica*, 2003, no. 129. Pp. 319–323.

5. *Murray M.G., Thompson W.F.* Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*, 1980, No. 19. Pp. 4321–4325.

6. *Yamagishi H., Bhat S.R.* Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops // *Breeding Science*, 2014, no. 64. Pp. 38–47.

7. *Yamagishi H., Terachi T.* Molecular and biological studies on male sterile cytoplasm in the Cruciferae. III. Distribution of Ogura-cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars // *Theor Appl Genet*, 1996, no. 93. Pp. 325–332.

Зубко Ольга Николаевна – аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева», 127550, Российская Федерация, Москва, Тимирязевская, 49. e-mail: Zubkoolga21@mail.ru, тел.: +7 (968) 354-33-58.

Монахос Сократ Григорьевич – д.с.-х.н., заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева», 127550, Российская Федерация, Москва, Тимирязевская, 49. e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru, тел.: +7 (499) 976-41-71.

Монахос Григорий Федорович – к.с.-х.н., генеральный директор ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». 127550, Российская Федерация, Москва, Пасечная, д. 5, стр.2, к.11. e-mail: breedst@mail.ru, тел.: +7 (499) 977-11-74.

Olga N. Zubko– PhD student, the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Horticultural Crops, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; phone.: +7 (968) 354-33-58; e-mail: Zubkoolga21@mail.ru.

Sokrat G. Monakhos – DSc (Ag), Head of the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Horticultural Crops, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; phone.: +7 (499) 976-41-71; e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru.

Grigoriy F. Monakhos – PhD (Ag), General Manager, Limited company “Breeding station named after N.N. Timofeyev”; phone.: +7 (499) 977-11-74; e-mail: breedst@mail.ru