

### 15. Межвидовая гибридизация *Raphanus sativus* L. (А.А.Миронов, О.Н.Зубко)

Редис, являясь одной из самых раннеспелых овощных культур имеет высокую популярность как в России, так и по всему миру. Популярность связана с доступностью, неприхотливостью в выращивании, скороспелости редиса. Для поддержания здоровья человеческому организму требуется сбалансированный рацион питания, в котором обязательно должны присутствовать овощи, особенно ранней весной. К положительным свойствам редиса относят: бактерицидное и желчегонное свойство, очищать организм от вредных веществ, в том числе шлаков (Курина, 2018).

Сельхоз товаропроизводители, с развитием конкуренции, выдвигают новые требования к селекционным достижениям редиса (Федорова, 2016; Циунель, 2017; Кочетов, 2019; Сирота, 2021). В корнеплодах содержится большое количество различных витаминов, однако их содержание недостаточно для удовлетворения потребностей человека в суточной дозе. Поэтому стоит задача по повышению питательной ценности овощных культур, которые будут использоваться как пища для человека или корм для животных (Трухачев, 2005). Существуют традиционные генетико-селекционные работы, которые имеют одинаковую последовательность действий при выведении высокопродуктивных сортов растений и пород животных (Злыднев, 2003). Для решения этих задач необходимо использовать новые источники и доноры признаков, которые часто находятся не в сортовом материале данного вида, а у культурных или диких сородичей.

Огромный пласт исследований по межвидовой гибридизации проведен отечественным исследователем И.В. Мичуриным. Им предложены способы преодоления нескрещиваемости растений, возникающие в первую очередь на презиготическом уровне: метод вегетативного сближения, метод посредника, опыление смесью пыльцы и др (Мичурин, 1949). Следующим крупным шагом, продвигающим возможность получения межвидовых гибридов, стали

исследования Г.Д. Карпеченко, показавших всему миру способ получения фертильных растений межвидовых гибридов. Растение, полученное от гибридизации редьки с капустой, были мужски стерильны, но после обработки раствором колхицина удваивали набор хромосом, в результате чего становились фертильными (Карпеченко, 1927).

Межвидовая гибридизация с участием *Raphanus sativus* L. позволяет передать в этот вид ценные признаки, ранее не обнаруженные в нем. Такими признаками, могут быть: цитоплазматическая мужская стерильность, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, устойчивость к перезреванию на корню и др. В случаях, когда разработанные методы отдаленной гибридизации не приводят к получению растений, прибегают к современным методам биотехнологии: эмбриокультура (культура завязей, культура семяпочек), слияние протопластов.

Лайбах Ф. первым продемонстрировал перспективы использования культуры завязей для преодоления нескрещиваемости. Этим методом он получил межвидовые гибриды льна *Linum perenne* x *Linum austriacum*. В настоящее же время данный метод очень широко применяется для решения проблем межвидовой гибридизации различных культур. Технология спасения зародышей (embryo rescue) относительно простая: в стерильных условиях зародыши вычлняют из гибридных семян, помещают их в питательную среду (жидкую или твердую) и при культивировании на свету добиваются регенерации из них растений. В качестве питательных сред используют обычные для культуры клеток среды Ms, B5 и др. Концентрация сахара для зрелых зародышей составляет в среднем 2...3%, тогда как для незрелых зародышей она должна быть выше (до 10%). Чаще используют питательные среды без добавления гормонов, однако в отдельных случаях их добавление является необходимым условием. Для повышения эффективности методики в питательную среду также добавляют дрожжевой экстракт, кокосовое молоко, гидролизат козеина, аминокислоты и витамины. Эффективность регенерации также зависит от размера экспланта и стадии развития зародыша: чем больше

эксплант и чем более зрелый зародыш, тем выше вероятность регенерировать из него растение. Однако довольно часто при отдаленной гибридизации зародыши погибают на самых ранних стадиях, из-за несовместимости с эндоспермом или из-за недоразвитого эндосперма. Для культуры зародышей на ранних стадиях развития используют обогащенные питательные среда, или получают сначала каллус, из которого затем регенерируют растения.

Для оценки возможности получения межвидовых растений были выбраны компоненты для скрещиваний. Состав растительной коллекции: *Raphanus sativus* L. (селекционный материал редиса, редьки зимней, дайкона), *Brassica rapa* (селекционный материал репы, пекинской капусты), *Brassica napus* (селекционный материал рапса), *Eruca sativa* L. (сорт Диковина), *Brassica juncea* L. (селекционный материал горчицы), *Brassica oleracea* (сорт кормовой капусты Веха, селекционный материал белокочанной капусты).

Таблица 15.1

**Состав питательной среды Ms, применяемой в культуре семяночек**

Компонент	Химический реагент	Вес на 1 литр среды
Макроэлементы	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33 г
	KNO <sub>3</sub>	38 г
	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	8,8 г
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	7,4 г
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 г
Микроэлементы	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240 мг
	MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	4460 мг
	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1720 мг
	KI	166 мг
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	50 мг
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	5 мг
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	5 мг
Источник железа	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1112 мг
	Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	1492 мг
Органические компоненты	Никотиновая кислота	20 мг
	Тиамин HCl	4 мг
	Пиридоксин HCl	20 мг
	Глицин	80 мг
	Мезоинозит	4 г

Питательные среда Ms (табл. 15.1) с добавлением 30 г/л сахарозы, 300 мг/л гидролизата казеина, рН 5,8 и В5 (табл. 15.2) с добавлением 20 г/л сахарозы, 8 г/л агара, рН 5,8, готовили из маточных растворов, которые хранили при температуре минус 20°C.

Таблица 15.2

**Состав питательной среды В5, применяемой в культуре семян**

Компонент	Химический реагент	Вес на 1 литр среды, мг
Макроэлементы	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2680
	KNO <sub>3</sub>	50000
	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	3000
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	5000
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	3000
Микроэлементы	KJ	75
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3300
	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	1000
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	200
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	25
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	25
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	2,5
Источник железа	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	5560
	Na <sub>2</sub> ЭДТА * 2H <sub>2</sub> O	7460
Органические компоненты	Мезоинозит	10000
	Никотиновая кислота	100
	Пиридоксин-НСl	100
	Тиамин-НСl	1000

Межвидовые скрещивания проводили в условиях обогреваемой теплицы в ранневесенний период. Половую гибридизацию проводили как в цветках, так и в бутонах, с последующим накрыванием тканевым изолятором. Часть опылений оставляли на растении для подсчета завязываемости семян. Часть стручков собирали с растений, на 10, 12, 14, 16 и 18 день после опыления, для проведения технология спасения зародышей (embryo rescue).

Культура семян. Стручки отделяют от материнского растения. Ополаскивают в проточной воде. Поверхностно стерилизуют 2% раствором гипохлорита натрия с добавлением растекателя. Трижды промывают в

стерильной дистиллированной воде. В стерильной камере стручки вскрывают по семенной перегородке и изолируют крупные семяпочки. На семяпочках делают надрез, после чего погружают в жидкую питательную среду Ms. Чашки петри с семяпочками инкубируют на шейкере-инкубаторе при температуре 24 °С, при постоянно покачивании 75 оборотов в минуту, с фотопериодом 16 часов в течении 1...2 недель. Созревшие зародыши пересаживают на среду Гамборга (B5) с добавлением агара для доращивания. Контейнеры инкубируют при температуре 24 °С, с фотопериодом 16 часов в течении 30...45 суток. Растения с 2-3 настоящими листьями и нормально развитой корневой системой вынимают из среды, тщательно отмывают корневую систему и укорачивают, после чего адаптируют к нестерильным условиям. Неокрепшие растения укрывают от прямых солнечных лучей и создают повышенную атмосферную влажность. Через 2 недели растения пересаживают в горшок большего объема.

Оценка фертильности пыльцы ацетокарминовым методом. Пыльники с распустившихся цветков фиксируют в фиксаторе Карнуа не менее 30 минут. Затем промывают и выкладывают на предметное стекло и раздавливают в капле ацетокармина. Далее накрывают покровным стеклом и подогревают. Готовый препарат просматривают в световой микроскоп с увеличением 600. За фертильные зерна принимают окрашенные в карминово-красный цвет, стерильные - почти не окрашиваются, или окрашиваются неравномерно.

#### Результаты *Brassica rapa var. rapa* x *Raphanus sativus*.

В качестве материнского компонента были выбраны 4 селекционные линии репы, в сумме было опылено 340 цветков. В течение недели после опыления пестики меняли окраску на желтую и отмирали. Только 1 стручок развился до среднего размера, в котором не было обнаружено даже абортированных семян. В результате было установлено, что гибель зародыша происходит на самых ранних этапах онтогенеза семени.

#### Результаты *Brassica rapa var. pekinensis* x *Raphanus sativus*.

В качестве материнского компонента были выбраны стерильные линии пекинской капусты, со стерильностью типа *Ogura*, а в качестве опылителя - линия восстановитель фертильности. От опыления 334 цветков завязалось 298 семян. Завязываемость плодов от половой гибридизация была в пределах 5...40% (в зависимости от материнской линии). Со всеми линиями были получены нормально развитые семена, внешне идентичные виду *Brassica rapa*. Межвидовые гибриды были выращено по рассадной технологии и доведены до этапа цветения (табл. 15.3).

Таблица 15.3

**Характеристика межвидового гибрида *Brassica rapa var. pekinensis* x *Raphanus sativus***

Признак	<i>Brassica rapa var. pekinensis</i>	<i>Brassica rapa var. pekinensis</i> x <i>Raphanus sativus</i>	<i>Raphanus sativus</i>
Лист	Удлиненно-обратнояцевидный	Лировидный	Лировидный
Окраска венчика цветка	Желтый	Белый	Бело-розовая
Тычинки	Изогнутые	Изогнуты	Прямые
Стебель	Без опушения	Без опушения	Без опушения
Окраска черешка	Без антоциана	Без антоциана	Антоциановая
Высота растения	120±20 см	180±34 см	140±17 см

У межвидового гибрида было отмечено гибридное происхождение, подтвержденное морфологически: высота растения превосходит обоих родителей, тип листа сохранил наследование по отцовской линии, окраска венчика цветка – промежуточная белая. Было отмечено довольно редкое явление – отсутствие проявления антоциановой окраски черешка у потомства при наличии у одного из родителей. Все растения были с фертильной пылью.

Результаты *Brassica napus* x *Raphanus sativus*.

В качестве материнского растения была выбрана одна линия рапса ярового с мужской стерильностью. Анализ молекулярными маркерами на тип цитоплазмы *Ogura* (Giancola S., 2007) не показал наличие бенда. Половой гибридизацией было опылено 187 цветков, из которых завязался 41 стручок. Часть стручков была оставлена для традиционного развития семян, но вскрытия плодов были обнаружены очень мелкие, светло коричневые семена, которые были неспособны к прорастанию. В разных стадиях развития семян плоды были отделены от растения и введены в культуру спасения зародышей (табл. 4)

Таблица 15.4

**Эффективность технологии спасения зародышей при гибридизации**  
*Brassica napus x Raphanus sativus*

Дней после опыления	Введено в культуру зародышей, шт	Выжило на жидкой Ms, шт	Пересажено на твердую В5, шт	Эффективность спасения зародышей, %	Адаптировано к нестерильным условиям, шт
10	6	0	0	0	0
12	66	7	1	1,5	0
14	84	9	2	2,4	0
16	76	12	8	10,5	4
18	62	3	1	1,6	0

Из данных, представленных в таблице 4 видно, что 10 дневные семена не отзывчивы для данной технологии, тогда как уже с 12 по 18 дней возможно спасение межвидового растения. Самая высокая эффективность технологии спасения зародышей отмечена для варианта 16 дней после опыления (эффективность технологии 10,5%).

От данного скрещивания после технологии спасения зародышей удалось получить 4 жизнеспособных растения, адаптированных к нестерильным условиям. Полученное гибридное растение морфологически было легко отличимо от родительских компонентов скрещивания (рис.15.1). Листья имели существенно больший размер чем родительские формы, однако по структуре больше схожи с видом *Raphanus sativus*. Четким морфологическим признаком,

подтверждающим гибридное происхождение, также являлось наличие слабо развитого корнеплода, фиолетового цвета, тогда как в качестве отцовского компонента выступала линия редиса с ярко-красным цветом товарного органа. Цвет лепестков также оказался отличным от обоих родителей, белая окраска у гибрида, желтая у материнской формы и розовая у отцовской.



Рисунок 15.1. - Морфология отдельных частей родительских форм и гибрида *Brassica napus* x *Raphanus sativus* (в центре обоих рисунков)

Анализ биометрических показателей родительских форм и полученного от скрещивания между ними гибрида (табл. 15.5), также подтверждает гибридность полученного межвидового гибрида. Так, по большинству признаков наблюдается гетерозисный эффект, а именно по высоте и ширине цветка, диаметру стебля. Тогда как родительская форма *Raphanus sativus* превосходит гибрид по длине и ширине цветка, а также превосходит материнскую форму *Brassica napus*.

Межвидовой гибрид обладал выполненными пыльниками с крупной, хорошо развитой пыльцой, однако анализ фертильности пыльцы показал на ее частичный характер, а именно 60 % (рис. 15.2).

Таблица 15.5

**Биометрические показатели родительских форм и межвидового гибрида *Brassica napus* x *Raphanus sativus***

Признак	<i>B.napus</i>	<i>B.napus</i> x <i>R.sativus</i>	<i>R.sativus</i>
Лист ширина, см	5,4±2,8	7,6±2,2	8,8±2,4
Длина листа, см	15,3±4,5	17,6±3,4	22,1±7,4
Высота цветка, см	1,4±0,4	1,9±0,5	1,7±0,2
Ширина цветка, см	1,0±0,2	1,3±0,4	1,1±0,3
Диаметр стебля, см	0,5±0,3	0,8±0,4	0,5±0,2
Корнеплод	Отсутствует	Слабо развит	Имеется

Несмотря на это при самоопылении, или при перекрестном опылении четырех межвидовых растений не завязалось ни одного плода, что свидетельствует о невозможности получения потомства от самоопыления, что в данной случае можно назвать явлением мужской стерильности.

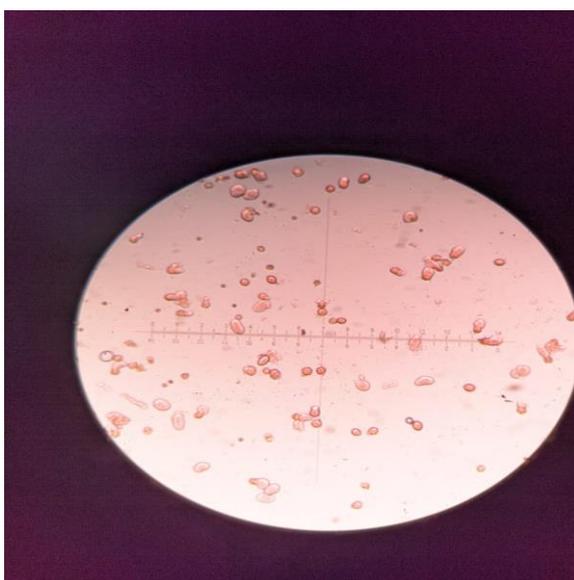


Рисунок 15.2. - Анализ фертильности пыльцы межвидового гибрида  
*Brassica napus* x *Raphanus sativus*

Результаты *Eruca vesticaria* subsp. *Sativa* x *Raphanus sativus*. (таблица 15.6).

Таблица 15.6

**Эффективность технологии спасения зародышей при гибридизации**  
*Eruca vesticaria* subsp. *Sativa* x *Raphanus sativus*

Дней после опыления	Введено в культуру зародышей, шт	Выжило на жидкой Ms, шт	Пересажено на твердую B5, шт	Эффективность спасения зародышей, %	Адаптировано к нестерильным условиям, шт
8	6	0	0	0	0
9	66	0	0	0	0
10	84	0	0	0	0

В опыте было несколько повторений, материнские растения выращивали как в грунтовой культуре, так и в горшечной. В сумме было опылено 457 цветков, из которых был отмечен рост стручка только у 16. Однако после 11...13 дня все развивающиеся стручки желтели, а затем отмирали.

Стручки, которые показывали рост были взяты для выделения из них зародышей и спасения через технологию embryo rescue. Однако после введения в культуру не было выявлено ни одного развивающегося зародыша, ни посаженных на жидкую питательную среду завязей, ни от семян.

Результаты *Brassica juncea* x *Raphanus sativus*

Для повышения уровня завязываемости семян в качестве отцовской формы была взята тетраплоидная форма редьки масличной Тамбовчанка. Ею было опылено 121 цветок горчицы, однако ни одного нормально развитого стручка получено не было.

В то время, как от опыления диплоидной формой редиса наблюдался рост отдельных плодов. От опыления диплоидной отцовской формой 171 цветка

завязалось 65 стручков. Часть из них были оставлены на материнском растении. В результате было получено 1 внешне развитое семя, которое при проращивании не дало всходов.

Часть недоразвитых плодов была собрана с растения и с ними проведена технология embryo rescue (табл. 15.7).

Таблица 15.7

**Эффективность технологии спасения зародышей при гибридизации  
*Brassica juncea x Raphanus sativus***

ДПО	Введено в культуру зародышей, шт	Выжило на жидкой Ms, шт	Пересажено на твердую В5, шт	Эффективность спасения зародышей, %	Адаптировано к нестерильным условиям, шт
12	124	0	0	0	0
14	127	5	2	0,6	2
16	131	1	0	0	0
18	125	2	0	0	0

В результате спасения зародышей наибольшей отзывчивостью к данной технологии показали зародыши от межродового скрещивания, введенные в культуру на 14 день после опыления, эффективность технологии составила 0,6%. Из двух растений, пересаженных на твердую питательную среду, продолжало нормальное развитие и было адаптированы к нестерильным условиям только одно (рис.15.3).



Рисунок 15.3. - Растение межродового гибрида *Brassica juncea* x *Raphanus sativus*

Полученное растение имело промежуточное наследование признаков. Большинство признаков растения было идентично отцовской форме (тип листа, форма плода, опушенность стебля). Из изученных признаков только окраска венчика цветка существенно отличалась от родительских форм (табл. 15.8).

Таблица 15.8

**Морфометрические показатели родительских форм и межродового гибрида *Brassica juncea* x *Raphanus sativus***

Признак	<i>B. juncea</i>	<i>B. juncea</i> x <i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>
Лист	Лировидно-перисто-надрезанный	Лировидный	Лировидный
Окраска венчика	Желтый	Белый	Розово-белый
Плод	С тонким шиловидным носиком	С толстым носиком	С толстым носиком
Стебель	Без опушения	Без опушения	Без опушения
Окраска черешка	Без антоциана	Без антоциана	Антоциановый

Помимо морфологического описания межродовой характер был подтвержден цитологическим анализом – подсчетом числа хромосом. У материнской формы диплоидный набор хромосом равен 36, а у отцовской - 18. У полученного гибрида при подсчете числа хромосом в митотических клетках корневых меристем, межродовой гибрид имел набор хромосом равный 27 (рис. 15.4).

Несмотря на нечетный набор хромосом растение образовывало частично жизнеспособную пыльцу. Ацетокарминовый метод анализа жизнеспособности пыльцы показал, что 21% пыльцевых зерен были фертильными. Однако, от самоопыления не было получено ни одного плода.

43

Продолжение таблицы 8

Стебель	Без опушения	Без опушения	Без опушения
Окраска черешка	Без антоциана	Антоциановый	Без антоциана

Фенотипически полученный гибрид отличается схож с отцовским растением (*Raphanus sativus*) лировидным листом, белой окраской венчика. С материнским растением (*Brassica oleracea* subsp. *pekinensis*) схож отсутствием антоциановой окраски черешка и отогнутым положением тычинок. С обеими родительскими формами схож отсутствием опушения стебля.

В ходе подсчета было определено, что полученный гибрид (*Brassica juncea* × *Raphanus sativus*) в диплоидном наборе имеет 27 хромосом.



Рисунок 4. Препарат хромосом межродового гибрида (*Brassica juncea* × *Raphanus sativus*)

Рисунок 15.4. – Препарат хромосом межродового гибрида *Brassica juncea* × *Raphanus sativus*

Для повышения эффективности получения первого беккроссного поколения межродовой гибрид был высажен в открытый грунт, где с помощью медоносных пчел был опылен линейным материалом редиса (рис. 15.5). Данный способ широко используется в мире, и показал хорошие результаты. Однако в нашем опыте от опыления с помощью насекомых опылителей не удалось получить ни одного развитого плода.

Результаты *Brassica oleracea* × *Raphanus sativus*

В опыте было опылено 780 цветков разных представителей вида, в том числе селекционный материал белокочанной и краснокочанной капусты, цветной, брокколи. Однако материнские растения не завязывали семян от традиционного опыления.



Рисунок 15.5. – Межродовой гибрид *Brassica juncea* x *Raphanus sativus* в открытом грунте

При использовании технологии embryo rescue при опылении белокочанной капусты линией редьки, на 14 день после опыления было получено 14 нормально развитых растения, пересаженных на твердую питательную среду. Из которых выжило после адаптации 3.



Рисунок 15.6. – Межродовой гибрид *Brassica oleracea* x *Raphanus sativus*

Анализ морфологических признаков показало на промежуточное наследование признаков тип листовой пластинки. Признаками, отсутствующими у обоих родительских форма являлось: белая окраска венчика цветка, отсутствие формирования товарного органа. Межродовое растение не формировало пыльники, тычинки были недоразвиты, что характерно для мужской стерильности у капустных культур.

При половой гибридизации и использовании в качестве отцовского компонента растения вида *Raphanus sativus* завязываемость плодов находилась на уровне 43% при опылении с пекинской капустой (*Brassica rapa*).

Эффективность технологии спасения зародышей (embryo rescue), при использовании в качестве отцовского компонента растения вида *Raphanus*

*sativus* находится в пределах от 0% (с представителями коллекции вида *ErUCA vesticaria*) до 10,5 % (с представителями коллекции вида *Brassica napus*).

Межвидовые растения *Brassica juncea* x *Raphanus sativus* и *Brassica napus* x *Raphanus sativus* образовывали частично фертильную пыльцу (от 21 до 60%). Тогда как гибрид *Brassica oleracea* x *Raphanus sativus* обладал редуцированными пыльниками без пыльцы.

Введение в эмбриокультуру зародышей, полученных от гибридизации между *Brassica juncea* x *Raphanus sativus* и *Brassica napus* x *Raphanus sativus* оптимальной на 14 и 16 день после опыления.