

На правах рукописи

Мурзина Эльвира Рафаэлевна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЖРОДОВОГО ГИБРИДА
BRASSICORAPHANUS В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ
ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ F1 ГИБРИДОВ РАПСА (*B. NAPUS*)**

Специальность: 4.1.2– Селекция, семеноводство и биотехнология
растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель

Монахос Сократ Григорьевич,

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты:

Карпачев Владимир Владимирович,

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ООО "НПО «Ювента» руководитель отдела селекции рапса

Домблидес Елена Алексеевна

кандидат сельскохозяйственных наук, 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», заведующая лабораторией репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация

ФГБОУ ВО Воронежский государственный аграрный университет имени Императора Петра I

Защита состоится «29» декабря 2025 года в 13-00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08, созданного на базе на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «___»_____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор сельскохозяйственных наук _____ Вертикова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследований

Рапс – масличная культура, имеющая глобальное экономическое значение, с многофункциональным применением: рапсовое масло применяется в пищевой промышленности и косметической отрасли, жмых после переработки используют в птицеводстве и животноводстве; в энергетике перспективно применение масла с высоким содержанием эруковой кислоты для получения биотоплива; выращивание рапса улучшает почвенные показатели и может быть использован в качестве почвоулучшителя в районах с повышенной засоленностью и щёлочностью почвы (Carré et al., 2014; Friedt et al., 2018; Zheng et al., 2022; Zandberg et al., 2022).

Для достижения высоких урожаев и качества продукции необходимо использовать современные методы и технологии селекции, такие как клеточные технологии, маркер-опосредованная селекция, которые позволят создать новые гибриды рапса, сочетающие высокие показатели хозяйственно-ценных признаков: урожайность, продуктивность, масличность и другие с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам (Liu et al., 2017; Hu et al., 2022).

Применение цитоплазматической мужской стерильности в селекции рапса – один из важных факторов при создании F1 гибридов (Ren et al., 2022; Wang et al., 2025). Материнские ЦМС линии обеспечивают не только сокращение расходов на семеноводство, но и 100% гибридность семян без примесей родительских линий (Gautam et al., 2023). У рапса известно более 10 типов стерильной цитоплазмы. Наиболее распространенной является ЦМС типа *Ogura* с известным геном-восстановителем фертильности *Rfo* (Heyn 1979; Primard-Brisset et al. 2007; Feng et al. 2009) и рядом молекулярных маркеров (Hu et al., 2008; Yu et al., 2016).

Для ускорения и повышения конкурентоспособности отечественной селекции рапса необходимы новые генетические источники и доноры экономически ценных признаков, вместе с этим современные клеточные технологии *in vitro*, молекулярная селекция, и др. позволяющие «на конвейере» создать новые конкурентоспособные гибриды рапса, сочетающие высокие показатели хозяйственно-ценных признаков, урожайность, продуктивность, масличность и другие с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам.

Цели и задачи исследования

Цель исследования: расширение генетического разнообразия и усовершенствование растений вида *Brassica napus* L. (геномная формула AACC) при использовании аллотетраплоидного капустно-редечного гибрида (*Brassicoraphanus*, CCRR) в качестве источника генов экономически ценных признаков (восстановление фертильности Ogu-ЦМС, устойчивость к настоящей мучнистой росе, устойчивость к киле) для создания высокопродуктивных F1 гибридов ярового рапса.

Задачи:

Изучение проявления морфологических и цитологических признаков потомств от отдаленной гибридизации ярового рапса (*Brassica napus*) в качестве

материнского компонента и капустно-редечного гибрида (*Brassicoraphanus*) в качестве отцовского компонента, источника гена-восстановителя фертильности *Rfo*, двух доминантных генов устойчивости к киле (возбудитель *Plasmodiophora brassicae*), устойчивости к мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum*).

Апробировать молекулярно-генетическую систему маркеров для дифференциации типов цитоплазмы и анализа генетической коллекции растений *B. napus* по типу ядерно-цитоплазматической мужской стерильности, включая оценку стабильности интрогрессии гена *Rfo* в последующих поколениях с использованием связанных молекулярных маркеров.

Изучить влияние интрогрессии гена *Rfo* при отдаленной гибридизации *Brassica napus* и *Brassicoraphanus* на семенную продуктивность, масличность, содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов в семенах беккроссного потомства. Получить линии удвоенные гаплоиды (восстановители фертильности) и F1-гибриды ярового рапса.

Оценить проявление устойчивости к киле (возбудитель *Plasmodiophora brassicae*) и настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum*) беккроссных потомств межвидовых гибридов и линий ярового рапса от скрещивания *Brassica napus* и *Brassicoraphanus*.

Провести молекулярно-генетический скрининг и поиск доноров аллелей закрепителей стерильности Огу-типа ЦМС в генетической коллекции толерантных к гербицидам группы имидазолинонов образцов ярового рапса (*B. napus*).

Научная новизна

Впервые показаны высокая завязываемость при естественном созревании на материнском растении и высокая жизнеспособность гибридных зародышей при реализации технологии спасения зародышей *in vitro* при гибридизации аллотетраплоидного *Brassica napus* (яровой рапс масличный, геномная формула ААСС, 2n=38) и аллотетраплоидного *Brassicoraphanus* (амфидиплоидный капустно-редечный гибрид, геномная формула CCRR, 2n=36).

Впервые показана возможность использования *Brassicoraphanus*, ранее произведенного от скрещивания *B. oleracea* (F1 Килатон) и *R. sativus* (линия Да8) с последующим удвоением хромосомного набора, в качестве донора аллеля восстановителя фертильности (*Rfo*) для Огу-ЦМС-системы, локализованного на хромосомах генома RR (*R. sativus*), гена устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell) и гена/ов устойчивости к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.) для усовершенствования генетического разнообразия ярового рапса при интрогрессии в геном *B. napus*.

Впервые установлено, что интрогрессия целевых генов в геном ААСС *B. napus* при использовании в качестве донора/источника межродовой аллотетраплоидный капустно-редечный гибрид *Brassicoraphanus*, геном CCRR, во-первых, возможна за три насыщающих скрещивания в сопровождении отбором, во-вторых не приводит морфологическим аномалиям вегетативной и генеративной

сферы, снижению количественных и качественных характеристик продуктивности (масличность, содержание эруковой кислоты, глюкозинолятов).

Молекулярно-генетическим анализом на основе мультиплексного ДНК-маркирования генов *orf138*, *orf222*, *orf224* генетической коллекции толерантных к гербицидам группы имидазолинонов образцов рапса ярового показана генетическая дифференциация по признаку «тип цитоплазмы», что позволяет проводить отбор образцов для использования в селекционных программах на основе разных типов применяемой мужской стерильности.

Теоретическая и практическая значимость

1. За три цикла беккроссирования и отбора в расщепляющихся потомствах от межвидового скрещивания *B. napus* (AACC, 2n=38) и *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) осуществлена *de novo* интрогрессия аллеля восстановителя фертильности (*Rfo*) для Ogu-ЦМС-системы из генома RR (*R. sativus*) в геном *B. napus* (AACC, 2n=38), при этом отобранные растения не обладали морфологическими аномалиями.

2. На основе межвидовой гибридизации *B. napus* (AACC, 2n=38) и *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) создана коллекция линий ярового рапса с групповой генетической устойчивостью к настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell) и киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.).

3. Показано, что линии третьего беккроссного поколения (y3, y17) от скрещивания *B. napus* (AACC, 2n=38) и *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) и линии удвоенных гаплоидов (y3дг1, y3дг2, y17дг1, y17дг2) полученные в культуре изолированных микроспор *in vitro* на их основе, проявляя групповую устойчивость к киле и настоящей мучнистой росе, обладают высокими показателями масличности – 29,9 - 36,5% на уровне лучшего стандарта 38,3% (образец №2), высокого содержания протеина – 23,06 - 28,49% на уровне лучшего стандарта 25,73% (образец №2), с содержанием эруковой кислоты в пределах 0,026 - 0,039% (<2%) и глюкозинолятов 6,1 – 10,3 мкМг.

4. Из генетической коллекции образцов ярового рапса (*B. napus*) толерантных к гербицидам группы имидазолинонов с помощью мультиплексного ДНК-маркирования генов *orf138*, *orf222*, *orf224* выявлен образец РЯ016 - закрепитель стерильности Ogu-типа ЦМС.

5. Впервые в России создан F1 гибрид ярового рапса 00-типа, сочетающий высокую продуктивность, масличность (38,9%) с устойчивостью к киле и настоящей мучнистой росе – F1Айрос, переданный на испытание и зарегистрированный в Государственном реестре сортов и гибридов РФ в 2025 году.

6. В результате межвидовой гибридизации *B. napus* и *Brassicoraphanus*, разработана генетическая платформа для селекции конкурентоспособных F1 гибридов рапса ярового, сочетающих групповую устойчивость к киле, настоящей мучнистой росе и комплекс хозяйственно-ценных признаков.

Методология и методы исследования

Выполнен анализ опубликованных научных результатов по данной теме, сделаны выводы о степени проработанности темы и актуальности дальнейших исследований. В экспериментальной части работы были использованы стандартные и частные методики, полученные данные в ходе исследований статистически обработаны с помощью программы Microsoft Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Аллотетраплоидный межродовой гибрид *Brassicoraphanus* (амфидиплоидный капустно-редечный гибрид, геномная формула CCRR, $2n=36$) - источник генов экономически ценных признаков для расширения генетического разнообразия вида *Brassica napus* L. (геномная формула AACC) и создания конкурентоспособных F1 гибридов ярового рапса.

2. Интрогрессия целевых генов устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell), устойчивости к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.), гена восстановителя фертильности (Rfo) Ogu-ЦМС из генома *Brassicoraphanus* (CCRR) в геном *Brassica napus* (AACC) методом отдаленной гибридизации в сопровождении серией беккроссов и отбора, позволяет усовершенствовать генетическое разнообразие ярового рапса без проявления аномалий признаков генеративной и вегетативной сферы, низким содержанием эруковой кислоты и глюкозинолятов.

3. Линии удвоенных гаплоидов произведенные на основе растений третьего беккроссного поколения (BC3) от скрещивания *B. napus* (AACC) и *Brassicoraphanus* (CCRR) позволяют создать конкурентоспособный F1 гибрид ярового рапса (F1 Айрос).

Степень достоверности

Исследования выполнены согласно принятым методикам, обоснованность научных выводов подкреплена результатами экспериментов и последующей статистической обработкой данных.

Апробация результатов

Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на: 1. Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (г. Москва, 2022). 2. XXII Всероссийской международной конференции молодых учёных, посвящённой памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева (г. Москва, 2022); 3. Международной научной конференции «Проблемы селекции-2022», РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (г. Москва, 2022). 4. Международной научно-практической конференции «Аграрная наука-2023» (AgriScience2023), РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (г. Москва, 2023). 5. Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва, 2025).

Публикации результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 4 в сборниках докладов и тезисов, подана 1 заявка на патент на селекционное достижение.

Личный вклад соискателя

Результаты экспериментальных и теоретических исследований получены автором лично. Соискателю принадлежат проведение основных экспериментов и теоретическое обобщение полученных результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 145 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 30 рисунка, 20 таблиц, выводов, библиографический список, включающий 224 источников, в том числе 194 на иностранном языке, и 6 приложений.

Материалы и методы

Работа выполнена в 2021-2025 годах на кафедре молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства и в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Для интрогрессии генов устойчивости к настоящей мучнистой росе, киле, а также гена восстановителя фертильности *Rfo* в *B. napus* в качестве донора/источника использовали отдаленный гибрид *Brassicoraphanus* ($2n=36$, CR). Гибридизацию проводили в контролируемых условиях защищенного грунта. Спасение зародышей осуществляли в культуре изолированных семязачатков по Монахос, Богданова (2014). Подсчет числа хромосом проводили с помощью метода «Steam Drop» (Kirov et al., 2014) с модификациями. Определение гибридности проводили морфологическим анализом. Фертильность пыльцы определяли с помощью ацетокарминового метода (Пухальский с соавт., 2007).

Масличность семян определяли экстракционным методом (ГОСТ 10857-64) в модификации. Содержания протеина в семенах определяли методом Кьельдаля. Семенную продуктивность определяли взвешиванием массы семян с одного растения. Оценку массы 1000 семян проводили согласно ГОСТ 12042-80 от 2011 года «Семена сельскохозяйственных культур. Оценка устойчивости к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.) проводили на искусственном инфекционном фоне с применением модифицированного пипеточного метода (Voorrips, Visser, 1993; Монахос, Монахос, 2009). Оценку устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell) на инфекционном фоне методом искусственных распространителей (Saharan et al., 2019; Runno-Paurson E. et al., 2021). Производство линий удвоенных гаплоидов по Custers et al. (2003). Тотальную ДНК выделяли СТАВ-методом с модификациями (Rogers S. O., Bendich A. J., 1985). Измерение концентрации нуклеиновых кислот и оценку степени очистки проводили с использованием прибора NanoPhotometr N (Implen). Процедуру амплификации осуществляли в ПЦР-амплификаторе Thermal Cycler C1000 Touch (Bio-Rad). Молекулярно-генетический анализ и

дифференциацию генотипов в расщепляющихся популяциях проводили с использованием следующих молекулярных маркеров: P11, P12, P21, P21, P32 – праймеры мультиплексной ПЦР на тип цитоплазмы (Wei et al., 2005; Zhao et al., 2010), BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R), BnRFO-F1, BnRFO-R1, BnRFO-F2, BnRFO-R2, BnRFO-F3, BnRFO-R3 – маркеры на ген-восстановитель фертильности (Hu et al., 2008; Yu et al., 2016); GC3060 (Ueno et al., 2012), B0902 (Kato et al., 2012), Tau_cBrCR404 (Нгуен и др., 2018) – маркеры на гены устойчивости к киле *Cra*, *Crb*, *CRA05*.

Статистическая обработка. Хранение и систематизацию данных проводили с использованием Microsoft Excel. Оценку существенности различий между изучаемыми F1-гибридными комбинациями проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты

Отдаленная гибридизация

Отдаленный амфидиплоидный гибрид *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) был использован в качестве источника для передачи в геном *Brassica napus* (AACC, 2n=38) комплекса генов: гена-восстановителя фертильности *Rfo* (из генома RR), генов устойчивости к киле и настоящей мучнистой росе (из генома CC). В качестве материнского реципиентного растения использовали Ogu-ЦМС линию ярового рапса (*Brassica napus*, 1mc). В результате применения технологии спасения зародышей были получены 7 растений-регенерантов, остальная часть растений получена из семян, оставленных для естественного созревания.

По данным морфологического анализа (рис.1) отдаленных гибридов *Brassica napus* x *Brassicoraphanus* установлено, что в них сочетаются признаки обоих родительских линий. Следует отметить, что признаки отцовского компонента выражены в большей степени, такие как опушение края листовой пластинки, форма листа, глянецовость листа, белый цвет венчика цветка, антоциановость побега (в прикорневой зоне). Признаки, полученные от рапса: розеточные листья, восковой налет листа, общее строение побега, очередное листорасположение. Все растения имели цветки с белыми лепестками.

Цитологический анализ фертильности пыльцы показал, что из 16 межвидовых гибридов (*B. napus* x *Brassicoraphanus*) один в конце цветения имел стабильное проявление фертильных цветков, у остальных отмечали волнообразное появление фертильной пыльцы, также отмечали наличие одновременно фертильных и стерильных цветков на растении, обусловлено, вероятно, миксоплоидией (рис.2). Наличие фертильной пыльцы у межвидовых гибридов объясняется высокими числовыми наборами конъюгирующих хромосом, позволяющими сформироваться веретену деления и пройти клеточному делению с образованием половых клеток, также это обусловлено действием гена-восстановителя фертильности *Rfo*.



Рисунок 1 - Морфологическая характеристика отдаленного гибрида *B.napus* × *Brassicoraphanus*. а – общий габитус; б – листовая пластинка (слева направо *Brassicoraphanus*, рапса (*B.napus*) и гибрида *B.napus* × *Brassicoraphanus*); в – цветки (слева направо *Brassicoraphanus*, рапса (*B.napus*) и гибрида *B.napus* × *Brassicoraphanus*), г – опушение листа у *Brassicoraphanus*, д - опушение края листа у гибрида *B.napus* × *Brassicoraphanus*, е – антоциановая окраска междоузлий у гибрида *B.napus* × *Brassicoraphanus*

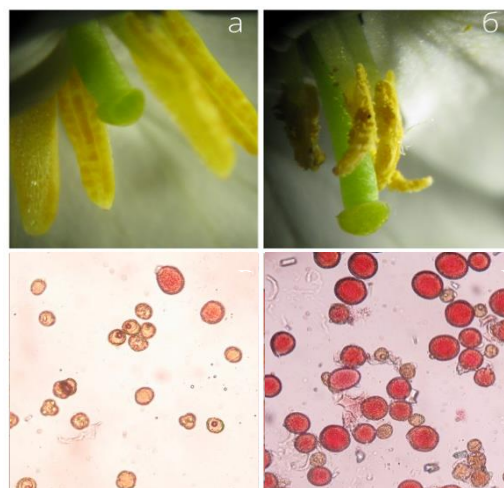


Рисунок 2 – Стерильный (а) и фертильный (б) цветки межвидового гибрида *B.napus* × *BR*, (в)- стерильная (неокрашенная) пыльца, фертильность 2%, (г) – фертильная (жизнеспособная, окрашиваемая) пыльца, фертильность - 75%. Увеличение 400х

В дальнейших беккрассах межвидовой гибрид со стабильным проявлением фертильности использовали в качестве опылителя.

Валидация ДНК-маркеров гена восстановителя фертильности *Rfo* на исследуемых образцах. Для оценки наследования гена *Rfo* помимо цитологических методов применяли молекулярные маркеры (Hu et al., 2008). Пара праймеров BnRF0-F1/BnRF0-DL2R не показывала полиморфизм для данной коллекции. Для дальнейшей работы использовали преимущественно пару праймеров BnRF0-AS2R/AS2F, как наиболее стабильную и демонстрирующую полиморфизм. Также была апробирована усовершенствованная версия маркера BnRF0-AS2R/AS2F (Hu et al., 2008) - BnRFO-AS2F, BnRFO-NEW-R (Yu et al., 2016) (рис.3)..

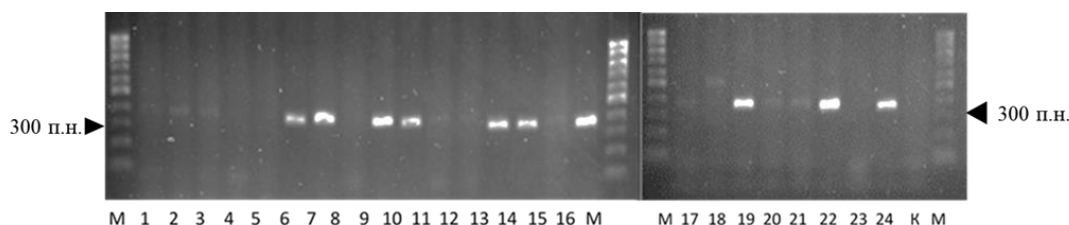


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров BnRF0-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R (Yu et al., 2016), где 1-5 – растения BC2 (8 бц), 6-8 - растения BC2 (8 с.о.), 9 – растения BC2 (8 бц), 10 - растения BC2 (Дж дГМС), 11-16 – растения BC3 (Дж х М)мс, 17 – F1 Килатон, 18 – Да-8, 19 - *Brassicoraphanus*, 20 – 1мс, 21 – M8мс, 22 – F1 Джаз, 23 – *Raphanus sativus*(MS), 24 – положительный контроль(рапс), К - контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

Проведя молекулярно-генетический скрининг растений ВС3– [(Дж х М) МС х (1мс х (1мс х BR))] было выявлено, что все растения имеют маркер гена восстановителя фертильности (рис.4), что подтверждалось фенотипом (фертильность = 97%).

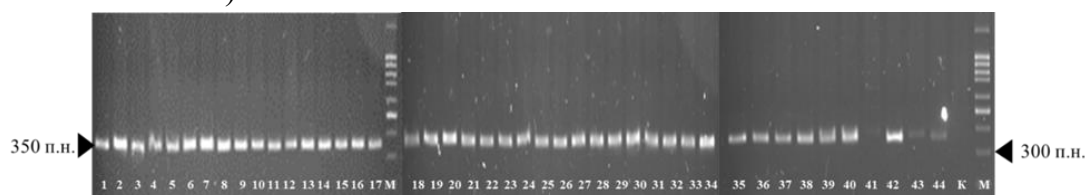


Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R (Yu et al., 2016), где 1-39 – растения ВС3 [(Дж х М)МС х (*B.napus* х (*B.napus* х BR))], 40 – *Brassicoraphanus*, 41 – М8МС, 42 – Джаз F1, 43 – 1ф, 44 – 1мс, К – контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

Мониторинг проявления и отбор на устойчивость к настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell)

Оценку устойчивости к мучнистой росе проводили на отдалённых гибридах рапса и их беккроссном потомстве (BC1, BC2, BC3). В качестве стандарта использовали F1 гибрид Джаз. Все исследованные растения показали незначительное поражение (в среднем 1,5-2,5 балла) (табл. 1). У всех растений наблюдалась реакция гиперчувствительности, проявляющаяся в виде хлорозных пятен, указывающая на активный защитный ответ (рис.5).

Таблица 1 – Средний балл поражения линий и гибридов рапса настоящей мучнистой росой на естественном инфекционном фоне

Генотип	Ср. балл поражения	Восковой налет
Джаз F1	3.0	выражен
<i>B.napus</i> (1мс)	3.0	выражен
<i>Brassicoraphanus</i>	0.0	отсутствует
<i>B. napus</i> х <i>Brassicoraphanus</i>	2.5	сильновыражен
BC1	2.0	выражен
BC2	1.5	слабовыражен
BC3	1.0	слабовыражен



Рисунок 1 – Поражение листовой пластины а) *Brassicoraphanus*, б) *B.napus*, в) Джаз, г) ВС3

Частичная устойчивость отдалённых гибридов и их беккроссного потомства к мучнистой росе, вероятно, обусловлена генетическим вкладом *Brassicoraphanus*, который является источником устойчивости, предположительно рецессивного гена. Реакция гиперчувствительности и замедленное спороношение свидетельствуют об активных защитных механизмах, включая локальную гибель клеток для ограничения распространения патогена, что характерно для устойчивости к биотрофным патогенам, таким как *Erysiphe cruciferarum*.

Оценка беккроссного потомства на искусственном инфекционном фоне на устойчивость к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.)



Рисунок 2 – Сеянцы стерильных и фертильных линий, F1 гибрид, а также сорт-стандарт Форпост через шесть недель после инокуляции

Анализ проявления устойчивости/восприимчивости к киле на инфекционном фоне растений ВСЗ показал полную устойчивость всех растений. Оценка линий-восстановителей фертильности, полученных по технологии удвоенных гаплоидов, на искусственном инфекционном фоне выявил полную устойчивость полученных гибридов, а также линий-восстановителей фертильности (рис.6).

Стерильная линия М8мс также была устойчива, балл поражения – 0, 8 растений из ЦМС линии 1мс имели балл поражения 2, а 22 растения – 3

балла (табл.2) (рис.6).

Таблица 2 – Результаты оценки фертильных и стерильных линий, а также полученных гибридов на искусственном инфекционном фоне

Генотип	Число растений с баллом поражения, шт.			
	R		S	
	0	1	2	3
Родительские линии				
М8мс	32	0	0	0
1мс	0	0	8	22
У17дг1	24	0	0	0
Гибриды				
М8мс×у17дг1	21	0	0	0
1мс×у17дг1	24	0	0	0

Для установления происхождения различных генов устойчивости в исследуемых генотипах был проведен молекулярно-генетический скрининг родительских компонентов: F1 гибридов Килатон и Джаз, линий рапса 1мс, М8мс, линии дайкона Да8, отдаленный гибрид *Brassicoraphanus* (BR).

В результате было установлено, что маркер гена CRA05 (Нгуен и др., 2018) был обнаружен только у линии рапса 1мс. У остальных образцов данный маркер отсутствует.

Амплификация маркера B0902 (Kato et al., 2012) на ген *Crb* обнаружила ожидаемые фрагменты 160 п.н.(R) и 240 п.н. (S) у линии Да-8, *Brassicoraphanus*, 1мс и М8мс. У двух образцов: F1 Килатон и Джаз амплифицировался неспецифичный фрагмент размером 200 п.н.

Амплификация маркера на ген *Cra* с праймерами GC3060 R, F (Ueno et al., 2012) обнаружила ожидаемые фрагменты 300 п.н. (R) у линий Да-8 (гомозигота), 1мс (гетерозигота) и М8МС (гетерозигота). Образцы Килатон, *Brassicoraphanus* и Джаз гомозиготные по восприимчивости. По результатам молекулярного скрининга маркера *Cra* с праймерами GC3060 R, F (Ueno et al., 2012) только у 39 образца данный маркер отсутствует, все остальные генотипы гетерозиготы, что связано с тем, что два родительских компонента (1мс и М8мс) скрещиваний гомозиготы по гену устойчивости.

У маркера B0902 (Kato et al., 2012) на ген *Crb* ожидаемый фрагмент у устойчивых генотипов (R) размером 160 п.н. и 241 п.н. у восприимчивых генотипов (S). По результатам скрининга у всех генотипов обнаружен неспецифичный фрагмент 200 п.н. Также у 1-13, 16, 22, 24, 28-39 идет неспецифичная амплификация, фрагменты размером 300 п.н, что схоже с электрофореграммой образца *Brassicoraphanus*. Также у указанных генотипов присутствует фрагменты ~240 п.н., что соответствует восприимчивому генотипу. Маркер Tau_cBrCR404 на ген *CRA05* (Нгуен и др., 2018) имеет ожидаемый фрагмент размером 400 п.н. (404 п.н.). Амплификация с праймерами Tau_cBrCR429R, 026F обнаружила ожидаемые фрагменты у всего образцов генотипа ВС3.

По результатам оценки можно сделать вывод о доминантном наследовании устойчивости к киле от *Brassicoraphanus*, однако существующие маркеры не позволяют их дифференцировать.

Оценка хозяйственно-ценных признаков линий и гибридов, полученных с их участием

Масличность и качественный состав масла.

Анализ родительских линий ярового рапса, ранее созданной стерильной линии М8мс и фертильных линий у2, у3, у17, у32, у35, отобранных в третьем беккроссном поколении от скрещивания *B. napus* x *Brassicoraphanus* показал содержание масла в пределах 25,01-33,3%. Масличность гибридных комбинаций, полученных в системе топкросс, от скрещивания стерильной М8мс и фертильных линий у2, у3, у17, у32, у35 находится в пределах 28,65-38,90% (рис. 9).

При этом масличность стандартных образцов – лучших зарубежных гибридов в эксперименте составила 34,04 и 36.91 для стандарта 1 и стандарта 2 соответственно.

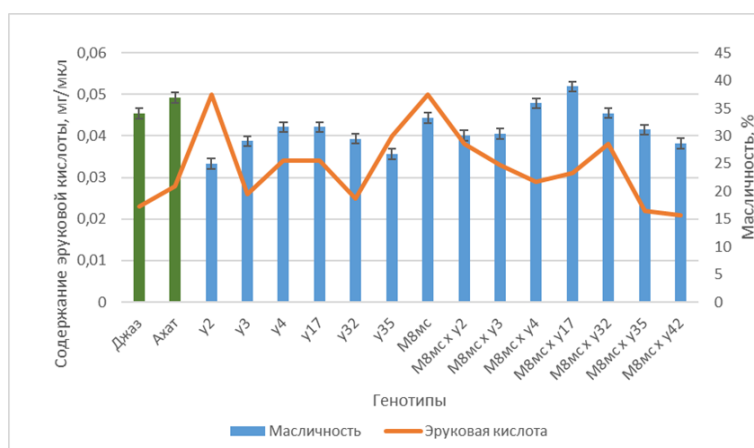


Рисунок 3 - Масличность (%) и содержание эруковой кислоты (мг/мл) стандартов, родительских линий и гибридов, 2023 год.

М8мс х у42

Оценка семенной продуктивности. Результаты полевых испытаний 13 межлинейных гибридов F1 рапса ярового показали, что средняя семенная продуктивность растений в опыте в 2023 г. составила 15,95 г/раст. у гибридов стандартов №1 и №2 – 12,45 и 13,21 г/раст.

В 2023 году 11 гибридов F1 превысили стандарты по семенной продуктивности на 1,6-61,3% стандарт Ахат, 51,8-157,8% стандарт Джаз.

Гибридные комбинации М8мс х у3 и М8мс х у17 показали наибольшую семенную продуктивность, поэтому они рекомендованы для станционного сортоиспытания и передачи в Государственное сортоиспытание.

Создание линий удвоенных гаплоидов

Для ускорения создания чистых линий при селекции F1 гибридов была применена технология удвоенных гаплоидов. Самую высокую частоту эмбриогенеза наблюдали у генотипа у2 и составила 1000 эмбриоида на 100 бутонов. Самая низкая частота эмбриогенеза составила 711 эмбриоида у генотипа у3. У генотипа у17 частота прямого прорастания составила 39,6%, что больше, чем у других генотипов. Самый низкий показатель у генотипа у7 (10,4%) (табл. 3).

Таблица 3 - Частота эмбриогенеза и прямого прорастания эмбриоидов ярового рапса

Генотип	Кол-во бутонов, шт.	Кол-во эмбриоидов, шт.	Эмбр -в /100 бут.	Кол-во высаженных эмбриодов, шт.	Кол-во растений-регенерантов, шт.	Частота прямого прорастания, %
у2	4	40	1000	40	10	25
у3	9	64	711	64	24	37,5
у7	8	48	600	48	5	10,4
у17	13	96	738	96	38	39,6

Фертильные линии у2, у3, у17, у32, у35 ярового рапса показали низкий уровень эруковой кислоты (0,02-0,05%) и отвечают показанию ГОСТ 10583-76 (рис.7). Самое высокое содержание эруковой кислоты (С22:1) обнаружено в родительской линии у2 (0,05%). В двух полученных гибридах содержание эруковой кислоты было ниже, чем в скрещиваемых родительских линиях – 0,02% в М8мс х у35,

Больше всего растений успешно прошли адаптацию к внешним условиям генотипов у3 и у17 (24 и 38 соответственно). В результате было отобрано 4 растения, по два каждого генотипа – у3 и у17, в дальнейшем получившие названия у3дг1, у3дг2, у17дг1, у17дг2.

Оценка хозяйственно ценных признаков гибридных комбинаций, полученных с участием линий удвоенных гаплоидов

Содержание масла варьировалось от 30,90 % (1мсху17дг1) до 34,60 % (М8мсху3дг2) при среднем значении 32,63 % (табл. 4). Все гибриды превысили порог в 30%, что указывает на пригодность для производства масла. М8мс х у3дг2 (34,60%) приблизился к показателю стандарт №1 (36,50%), но был ниже стандарта №2 (38,30%) (табл.4). Среднемноголетнее значение масличности для ярового рапса, выращенного в условиях Москвы, а именно на территории РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева составляет 33,3%.

Таблица 4 – Показатели содержания масла, протеина, эруковой кислоты и глюкозинолятов

№	Образец	Масличность, %	Протеин, %	Эруковая кислота, %	Глюкозиноляты, мкМ/г
1	М8мс	29,80	24,08	0,033	8,7
2	1мс	41,30	20,92	0,025	10,1
3	у3дг1	30,40	27,68	0,026	10,3
4	у3дг2	36,50	23,26	0,026	-
5	у17дг1	29,90	28,49	0,039	6,1
6	у17дг2	36,10	23,06	0,026	-
7	М8мсху3дг2	34,60	22,15	-	-
8	1мс х у3дг1	33,30	24,37	0,021	3,2
9	1мс х у17дг1	30,90	22,92	0,022	8,2
10	1мс х у17дг2	31,70	21,52	-	-
11	№1	36,50	23,17	-	-
12	№2	38,30	25,73	-	-

Примечание: «-» - измерения не были получены из-за ограничений измерительного прибора

Содержание белка колебалось от 21,52% (1мс х у17дг2) до 24,37% (1мсху3дг1), в среднем 22,74%. 1мс х у3дг1 был сопоставим с стандартом №1 (23,17%) и приближался к стандарту №2 (25,73%), тогда как другие гибриды (М8мс х у3дг2: 22,15%, 1мс х у17дг1: 22,92%, 1мс х у17дг2: 21,52%) имели меньшее значение. Гибриды в целом имели более низкое содержание белка, чем родительские линии (у17дг1: 28,49%, у3дг1: 27,68%) (табл.6). Была установлена низкая отрицательная корреляция (-0,4) между содержанием белка и масличностью, таким образом, ведение селекции на оба этих признака не является рентабельно (табл.4).

Значения эруковой кислоты, а также содержание глюкозинолятов удовлетворяют требованиям ГОСТ 8988-2008 Масло рапсовое. Технические

условия, ГОСТ 10583-76 Рапс для промышленной переработки, а именно содержание эруковой кислоты менее 2% для масла I категории, а глюкозинолятов менее 3%.

По результатам полевого опыта 2024 года было проведено испытание 8 гибридных комбинаций, 6 родительских компонентов, в том числе 2 ЦМС линий 1мс и М8мс, четыре линии восстановители фертильности (у3дг1, у3дг2, у17дг1, у17дг2) и двух стандартов Джаз и Ахат F1 (табл. 4). Наибольшую продуктивность среди исследуемых гибридов продемонстрировал гибрид М8мс х у3дг2 (6,29 г/раст.). Наименьшие показатели отмечены у фертильной линии у3дг1 (2,04 г/раст.) Наибольшую семенную продуктивность имела фертильная линия у3дг2 – 5,68 г/раст.

По результатам испытания в 2025 году в Государственный реестр селекционных достижений был передан **F1 гибрид Айрос** – первый в России гибрид ярового рапса 00-типа (безэруковый, низкоглюкозинолятный), с устойчивостью к киле и толерантностью к настоящей мучнистой росе (регистрационный номер Ф 7452434). Регионы допуска - 7,10,11. Оригинаторы – ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева» и РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Высота растений – 110-115 см. Устойчив к полеганию. Группа спелости – среднеспелый. Вегетационный период – 110-115 дней. Гибрид выровненный, дружно созревает, не растрескивается. Ветви расположены по стеблю равномерно, высота прикрепления нижних ветвей 20-23 см, число ветвей первого порядка – 5-7 шт. Семена черные, округлые, в стручке 22-26 шт. семян. Масса 1000 семян – 4,2 г. Масличность – 38,9% в условиях Московского региона. Гибрид пищевого направления. Содержание глюкозинолятов - 6,56 мкМ/г, жирнокислотный состав масла: олеиновая кислота 60,21%, линолевая – 21,27%, эруковая – следы, 0,03%.

Создание линии-закрепителя стерильности с толерантностью к гербицидам группы имидазолинонов на основе отбора растений с отличной от *Ogura*-ЦМС типом цитоплазмы

Создание закрепителя стерильности предполагает поиск образцов с нормальной цитоплазмой и отсутствием гена-восстановителя фертильности. Для изучения различных типов цитоплазмы из коллекции Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева был проведен скрининг образцов рапса с устойчивостью к имидазолинонам с помощью мультиплексной ПЦР на три гена: *orf138*, *orf222*, *orf224* (Zhao et al., 2010) (рис.8).

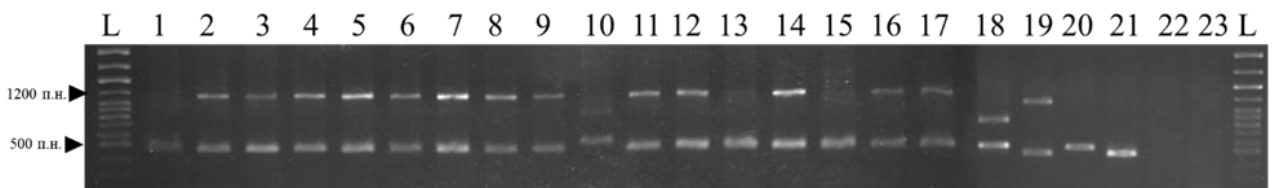


Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов амплификации праймеров маркеров на гены *orf138*, *orf224*, *orf222*, где 1-РО021, 2-РО023, 3-РЯ045, 4-РЯ008, 5-РЯ009, 6-РЯ015, 7-РЯ036, 8-РЯ023, 9-РЯ006, 10-РЯ016, 11-РЯ018, 12-РО030, 13 – РЯ025, 14-РЯ010, 15-РО026, 16 – Джаз F1, 17 – Маджонг F1, 18 – 1ф, 19 – 1мс, 20 –

Brassicoraphanus, 21 – Rs Ms, 22-23 – контроль с водой, L – маркер молекулярных длин, Step100 Long (Biolabmix)

По результатам ПЦР-анализа выявлено, что образцы с нормальной цитоплазмой отсутствуют и только у образца РЯ016 отличный от Oguга тип цитоплазмы (*cam*) (рис.8). Достоверность молекулярных маркеров подтверждается результатом гибридологического анализа потомства от скрещивания стерильной линии с типом цитоплазмы *Ogu* – М8мс (табл.5).

Таблица 4 - Результаты расщепления по стерильности/фертильности в гибридном потомстве 2024 г., Москва

Комбинация скрещивания	Всего растений, шт	Количество стерильных растений, шт.	Количество фертильных растений, шт.	Теоретически ожидаемое расщепление 1:1		χ^2 расч.
				S	F	
М8мс x РЯ006	20	11	9	10	10	0,20
М8мс x РЯ036	24	13	11	12	12	0,17
М8мс x РЯ009	28	12	16	14	14	0,57
М8мс x РЯ016	27	27	0	13,5	13,5	27
М8мс x РЯ015	30	15	15	15	15	0
М8мс x РЯ018	22	9	13	11	11	0,73

Примечание: χ^2 табл. на 5% уровне значимости=3,84, $df=1$.

В комбинации М8мс x РЯ016 все растения потомства были стерильными, что указывает на отсутствие гена-восстановителя Rf_o у РЯ016 (обладающего цитоплазмой *cam*) и он может быть использован в качестве закрепителя стерильности. После двух беккроссов на базе этого образца создан его стерильный аналог РЯ016, который проходит оценку на комбинационную способность.

Изучение генетики наследования толерантности к гербицидам группы имидазолинонов

Анализируемая коллекция была изучена на провокационном фоне на устойчивость к гербицидам, группы имидазолинонов, путем обработки семян гербицидом НОПАСАРАН. Оценка проводилась на растениях через 14 дней после обработки гербицидом. В качестве стандартов восприимчивости использовали F1 гибриды Джаз и Маджонг (рис.9а).

Все семь испытываемых F1 гибридов после обработки гербицидом нормально развивались, отсутствовали ожоги на листьях (рис.9а). Полученное от самоопыления F2 не имело расщепления, все растения продолжили рост и развитие после обработки, отсутствовали следы поражения от гербицида (рис.9б). Гибридное потомство от анализирующего скрещивания с восприимчивой линией М8мс не имело расщепления, однако было отмечено ингибирование роста и развития, а у некоторых растений также гибель верхушечной почки (рис.9с).



Рисунок 5 – Реакция сеянцев образцов рапса гербицидом Нопасаран через 14 дней. а. Кассета со стандартами (слева-направо): РЯ036 кл, Джаз, Маджонг (каждого по 4 ряда), б. (слева направо, каждого образца по 4 ряда) РЯ023, М8мс x РЯ015, РЯ009, с. (слева направо, каждого образца по 2 ряда) РЯ008-1, РЯ011-1, РЯ001-1, РЯ005-1, РЯ008 -2, РЯ028-1.

По результатам анализирующего скрещивания с восприимчивой линией М8мс, а также F2 было установлено, что признак устойчивости к гербицидам наследуется моногенно по типу неполного доминирования. Таким образом, для создания толерантных F1 гибридов, необходимо создавать доминантные гомозиготы у всех трех компонентов: стерильной линии, закрепители стерильности и линии-восстановителя фертильности).

Заключение

1. Гибридизацией аллотетраплоидного *Brassica napus* (яровой рапс масличный, геномная формула ААСС, $2n=38$) и аллотетраплоидного *Brassicoraphanus* (амфидиплоидный капустно-редечный гибрид, геномная формула ССRR, $2n=36$) при опылении 200 цветков получено 39 растений межвидового гибридного потомства, показана высокая частота завязываемости семян, развития гибридных зародышей (1 ед. на 5 опыленных цветков) как при использовании технологии спасения зародышей в культуре изолированных семязачатков/зародышей *in vitro*, так и при естественном созревании семян в стручках на материнском растении.

2. Отдаленной гибридизацией мужски-стерильной линии *B. napus* (ААСС, $2n=38$) и фертильной линии *Brassicoraphanus* (ССРР, $2n=36$) с последующей серией беккроссирования при использовании в качестве материнского компонента скрещивания линии *B. napus* в третьем беккроссном поколении (BC3) созданы и выявлены растения с морфологическими признаками и числом хромосом характерными для ярового рапса (*B. napus*, $2n=38$).

3. Использование линии *Brassicoraphanus* (ССРР, $2n=36$) в качестве донора аллеля восстановителя фертильности (*Rfo*) для Ogu-ЦМС-системы, локализованного на хромосомах генома RR (от *R.sativus*), позволило за три цикла беккроссирования и отбора в расщепляющихся потомствах осуществить *de novo* интрогрессию аллеля восстановителя фертильности (*Rfo*) в геном *B.napus* (ААСС, $2n=38$), при этом отмечено отсутствие морфологических аномалий полученных линий ярового рапса по признакам как генеративной (цветки, пыльники, лепестки), так и вегетативной (цвет, форма, размер листа) сферы.

4. Изучение устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell) показало высокую устойчивость линии *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36). Использование линии *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) в качестве источника устойчивости в межвидовой гибридизации с *B. napus* (AACC, 2n=38) позволило создать линии ярового рапса устойчивые к настоящей мучнистой росе. Отмечено, что проявление устойчивости к настоящей мучнистой росе межвидового гибрида *B. napus* × *Brassicoraphanus*, расщепляющихся поколений BC1-BC3, стандарта восприимчивости, зарубежного гибрида, ассоциировано с наличием и степенью выраженности воскового налета на листьях: чем сильнее выражен восковой налет, тем выше поражение растений настоящей мучнистой росой.

5. Оценкой на искусственном инфекционном фоне устойчивости к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.) потомства третьего беккроссного поколения (BC3) от межвидовой гибридизации донора аллелей восприимчивости *B. napus* (AACC, 2n=38), и донора аллелей устойчивости *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) (источник 2-х генов устойчивости к киле: ген устойчивости в геноме CC от *B. oleracea*, F1 Килатон, и ген устойчивости в геноме RR, от *R. sativus*, линия Да8) выявлено проявление устойчивости всех 39 растений BC3.

6. Изучением качественных и количественных характеристик масла семян растений третьего беккроссного поколения (BC3) от межвидовой гибридизации *B. napus* (AACC, 2n=38) и *Brassicoraphanus* (CCRR, 2n=36) и выявлением показана возможность использования линии *Brassicoraphanus* в качестве источника/донора целевых признаков для межвидовой интрогрессии в рапс масличный.

7. Оценкой проявления хозяйственно-ценных признаков линий удвоенных гаплоидов у3дг1, у3дг2, у17дг1, у17дг2, произведенных в культуре изолированных микроспор *in vitro* из предотобранных растений у3, у17 третьего беккроссного поколения BC3, от межвидовой гибридизации *B. napus* и *Brassicoraphanus*, выявлена высокая масличность – 29,9 - 36,5% на уровне лучшего стандарта 38,3% (образец №2), высокое содержание протеина – 23,06 - 28,49% на уровне лучшего стандарта 25,73% (образец №2), с содержанием эруковой кислоты в пределах 0,026 - 0,039% (<2%) и глюкозинолятов 6,1 – 10,3 мкг, что удовлетворяет требованиям рапса 00-типа.

8. В результате молекулярно-генетического скрининга генетической коллекции толерантных к гербицидам группы имидазолинонов образцов ярового рапса (*B. napus*) с использованием мультиплексного ДНК-маркирования генов *orf138*, *orf222*, *orf224* выявлен образец РЯ016 - закрепитель стерильности Ogu-типа ЦМС, закрепляющая способность которого подтверждена гибридологическим анализом при скрещивании с Ogu-ЦМС линией М8мс.

9. В результате скрещивания Ogu-ЦМС линий ярового рапса (М8мс и 1мс) и полученных в результате межвидовой гибридизации *B. napus* и *Brassicoraphanus* линий удвоенных гаплоидов (у3дг1, у3дг2, у17дг1, у17дг2) восстановителей фертильности Ogu-типа ЦМС, созданы гибридные комбинации, из которых

выявлена устойчивая к киле и настоящей мучнистой росе, с высокими качественными и количественными характеристиками семян (масличность, содержание протеина, 00-тип содержание эруковой кислоты (<2%) и глюкозинолятов (<15 мкг)) М8мс×у17дг2 с названием F1 Айрос, зарегистрированным в Государственном реестре сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, допущенных к использованию.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

Работы в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. Мурзина Э.Р., Монахос С.Г., Монахос Г.Ф. Маркер-опосредованный отбор при создании линий закрепителей стерильности рапса // Картофель и овощи. 2025 №7. С. 29-33
2. Мурзина Э.Р., Кастерова Е.А., Монахос С.Г. Селекционный потенциал межлинейных гибридов рапса: характеристика масличности и жирнокислотного профиля // Масличные культуры. 2025 Вып. 3 (203). С. –9-13

Работы в прочих изданиях:

3. Мурзина, Э. Р. Создание исходного материала для селекции рапса с устойчивости к киле / Э. Р. Мурзина, С. Г. Монахос, Г. Ф. Монахос // Проблемы селекции - 2022 : Тезисы докладов международной научной конференции, Москва, 12–15 октября 2022 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – С. 52. – EDN ZRWJYP.
4. Мурзина, Э. Р. Интрогрессия гена-восстановителя фертильности из *Raphanus sativus* L. в *Brassica napus* L. Путем отдаленной гибридизации / Э. Р. Мурзина, С. Г. Монахос // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов XXII Всероссийской международной конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 07–09 декабря 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2022. – С. 46-47. – DOI 10.48397/ARRIAB.2022.22.XXII.021. – EDN XQWTRA.
5. Мурзина, Э. Р. Молекулярный скрининг коллекции ярового рапса на устойчивость к киле крестоцветных / Э. Р. Мурзина // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева : Сборник статей, Москва, 05–07 июня 2023 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2023. – С. 84-87. – EDN RCFBNX.
6. Мурзина, Э. Р. Молекулярный скрининг коллекции ярового рапса на устойчивость к киле крестоцветных / Э. Р. Мурзина // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 160-летию Тимирязевской академии: Сборник статей, Москва, 03–05 июня 2025 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – С. 248-250.