

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА»
(ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
Монахос Сократ Григорьевич,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор

Москва – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Цель и задачи исследования	8
Теоретическая и практическая значимость	10
Методы и методология исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту	12
Степень достоверности результатов	13
Связь работы с научными проектами и программами.....	13
Апробация результатов работы	13
Личный вклад соискателя	14
Структура диссертации и объем работы	14
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Происхождение, распространение и народно-хозяйственное значение ярового рапса <i>Brassica napus</i> L.	15
1.2. Кила крестоцветных (возбудитель <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.)	20
1.2.1. Систематика и биологические характеристики <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.....	20
1.2.2. Жизненный цикл патогена.....	22
1.2.3. Симптоматика заболевания рапса.....	23
1.2.4. Методы борьбы с килой	24
1.3. Настоящая мучнистая роса крестоцветных (возбудитель – <i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz ex L. Junell)	24
1.3.1. Систематика и биологическая характеристика <i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz ex L. Junell	24
1.3.2. Жизненный цикл патогена.....	25

1.3.3. Симптоматика заболевания	26
1.3.4. Методы борьбы с настоящей мучнистой росой	27
1.4. Генетика и селекция на устойчивость к киле семейства <i>Brassicaceae</i>	27
1.4.1. Селекция на устойчивость к киле <i>Brassica oleracea</i>	27
1.4.2. Селекция на устойчивость к киле <i>Raphanus sativus</i>	28
1.4.3. Селекция на устойчивость к киле <i>Brassica napus</i>	29
1.5. Генетика и селекция на устойчивость к настоящей мучнистой росе семейства <i>Brassicaceae</i>	31
1.5.1. Селекция на устойчивость к настоящей мучнистой росе <i>Brassica napus</i>	32
1.6. Селекция рапса на толерантность к гербицидам группы имидазолиноны.....	33
1.7. Селекция рапса с применением отдаленной гибридизации и <i>in vitro</i> технологии спасения зародышей	35
1.7.1. Отдаленная гибридизация в исследованиях и селекции	35
1.7.2. Скрещиваемость видов внутри семейства <i>Brassicaceae</i>	37
1.7.3. Технология спасения зародышей (эмбриокультура)	38
1.8. Цитоплазматическая мужская стерильность в селекции <i>Brassica napus</i>	40
1.8.1. Системы контроля опыления и их создание на основе видов семейства <i>Brassicaceae</i>	40
1.8.2. Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность у <i>Brassica napus</i>	43
1.8.1. Ген-восстановитель фертильности	45

1.9. Маркер-опосредованный отбор при создании исходного материала	47
1.10. Гетерозис	48
2. Материалы и методы.....	51
2.1. Растительный материал.....	51
2.2. Условия выращивания.....	51
2.3. Погодно-климатические условия проведения полевых испытаний	52
2.4. Методика исследований	55
Гибридизация	55
Спасение зародышей, культура изолированных семязачатков/зародышей	55
Цитологический анализ - подсчет числа хромосом микроскопированием	56
Оценка морфологических признаков.....	58
Оценка фертильности пыльцы.....	58
2.5. Оценка хозяйственно-ценных признаков.....	59
Масличность	59
Содержание протеинов.....	60
Оценка жирно-кислотного состава масла	61
Семенная продуктивность.....	62
Масса 1000 семян	62
Оценка устойчивости к киле (возбудитель – <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.).....	63
Оценка устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель <i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz ex L. Junell)	64

Технология создания удвоенных гаплоидов.....	65
2.6. Молекулярные исследования.....	67
2.7. Статистическая обработка	71
3. Результаты и обсуждения.....	72
3.1. Интрогрессия гена устойчивости к киле и гена-восстановителя фертильности из <i>Brassicoraphanus</i> в <i>Brassica napus</i>	72
3.1.1. Отдаленная гибридизация.....	72
3.2. Мониторинг проявления и отбор на устойчивость к настоящей мучнистой росе (возбудитель – <i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz ex L. Junell)....	84
3.3. Оценка беккроссного потомства на искусственном инфекционном фоне на устойчивость к киле.....	88
3.4. Оценка хозяйственно-ценных признаков линий и гибридов, полученных с их участием	94
Создание и оценка проявления хозяйственно-ценных признаков линий удвоенных гаплоидов	98
3.5. Создание линии-закрепителя стерильности с толерантностью к гербицидам группы имидазолинонов на основе отбора растений с отличной от <i>Ogura</i> типом цитоплазмы	104
Изучение генетики наследования толерантности к гербицидам группы имидазолинонов	107
3.6. Экономическая эффективность возделывания ярового рапса «F1 Айрос» устойчивого к настоящей мучнистой росе и киле.....	110
Выводы.....	112
Библиографический список	115
Приложение	140
Приложение А	140

Приложение Б.....	141
Приложение В	142
Приложение Г	143
Приложение Д	143
Приложение Е.....	145

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

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).

Согласно Доктрине о продовольственной безопасности к 2030 году необходимо обеспечить российских производителей сельскохозяйственной продукции не менее 75% отечественных семян основных сельскохозяйственных культур, в том числе и рапса. В соотношении гибридов/сортов среди посевов рапса за 2010-2020 гг. наблюдается тенденция наблюдается тенденция к увеличению доли гибридов в посевах рапса (Рапсовое наступление. Экспертный анализ рынка рапса [сайт] URL: <https://www.agroinvestor.ru/opinion/> (дата обращения 04.12.2024). Однако стоит заметить, что большинство гибридов ярового рапса, зарегистрированные в Государственном реестре селекционных достижений РФ представлены гибридами иностранной селекции.

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, однако в селекции наибольшее применение нашло лишь несколько из них: *nap*, *polima*, *Ogura*, *Kosena*, *inap*. Наиболее стабильной к температурным перепадам и другим неблагоприятным факторам окружающей среды является цитоплазма типа *Ogura*, ген-восстановитель *Rfo* которой был передан Неун в 1976 году из редьки в геном рапса путем отдаленной гибридизации (Heun 1979; Primard-Brisset et al. 2007; Feng et al. 2009). За это время было разработано ряд молекулярных маркеров на этот ген как для рапса, так и для других видов капустных культур (Hu et al., 2008; Yu et al., 2016)

Основной проблемой селекции F1 гибридов рапса становится создание платформы для трехлинейной схемы получения гибридов: линий-восстановителей фертильности (Xiao et al., 2021; Xing et al., 2024; Wang et al., 2025), материнской линии с ядерно-цитоплазматической стерильностью, а также закрепитель стерильности. Все компоненты скрещивания должны также иметь комплекс хозяйственно-ценных признаков, в сочетании с комплексной устойчивостью к заболеваниям.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: расширение генетического разнообразия и усовершенствование растений вида *Brassica napus* L. (геномная формула ААСС) при использовании аллотетраплоидного капустно-редечного гибрида (*Brassicoraphanus*, CСRR) 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:

1. 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*).

2. 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.

3. 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.

4. 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*.

5. Провести молекулярно-генетический скрининг и поиск доноров аллелей закрепителей стерильности Ogu-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 Ogu-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* (ААСС, $2n=38$) 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 мкМ\г.

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

устойчивостью к киле, настоящей мучнистой росе и комплекс хозяйственно-ценных признаков.

Методы и методология исследования

Теоретическая часть работы выполнена на основе детального анализа источников литературы и аналитического обобщения результатов проведенных ранее исследований, соответствующих цели и задачам диссертации. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием стандартных и частных методов, обобщения полученных в ходе экспериментов данных и их статистического анализа при помощи дисперсионного анализа с использованием пакетов программ IBM SPSS Statistics.

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 результатов

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

Связь работы с научными проектами и программами

Исследование выполнено в рамках комплексного научно-технического проекта «Создание современных высокопродуктивных российских гибридов рапса на базе Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К. А. Тимирязева и Селекционно-семеноводческого центра РУСИД» в рамках подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства масличных культур в Российской Федерации» Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017 – 2030 годы, заказчиком которого выступает ООО «Русид»; а так же в рамках комплексного проекта «Научно-технологические фронтиры» в рамках программы развития университета «Агропрорыв-2030» программы стратегического академического лидерства «Приоритет2030», соглашение №075-15-2021-1196 от 30 сентября 2021 г.

Апробация результатов работы

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, посвященной 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)

Публикация 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 выдачу патента 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 диссертации и объем работы

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Происхождение, распространение и народно-хозяйственное значение ярового рапса *Brassica napus* L.

Рапс является третьей по величине масличной культурой в мире с многофункциональным применением, которое широко используется в качестве пищевого растительного масла, кормовых добавок в животноводстве и птицеводстве, высокоэруковое масло возможно применять в качестве биотоплива, выращивание рапса также способствует улучшению засоленных и щелочных почв (Liu et al., 2020).

Рапс (*Brassica napus oleifera* Metzger) относится к роду *Brassica* L. семейства Brassicaceae Bens (Cruciferae Yuss.) - Капустные (Крестоцветные), к порядку *Capparidales*. Он имеет яровую (*Brassica napus annua* L.), озимую и полуозимую формы. Масличный рапс часто называют «канола» (Canadian Oil Low Acid) – это разновидность рапса, выведенного в Канаде в конце 70-х годов XX в. из сортов рапса *B. napus* и *B. rapa* с 10-кратным уменьшенным содержанием эруковой кислоты (Pederson et al, 2008).

Рапс возник в результате спонтанной гибридизации сурепицы (*Brassica rapa* L., $2n=20$ (AA)) и капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L., $2n=18$ (CC)) около 7500 лет назад, и до сих пор не было обнаружено никаких природных ресурсов диких форм. Геном аллотетраплоида *B. napus* разделен на два субгенома, называемых субгеномами А и С, которые соответствуют геномам его диплоидных предков (Chalhoub et al., 2014). *B. napus* распространялся с течением времени из центра происхождения - Средиземноморья, в Россию, Америку (в основном в Канаду и Соединенных Штаты), Австралию, Азию (главным образом в Японию, Южную Корею и Китай) (Chalhoub et al., 2014; An et al., 2019 ; Zou et al., 2019). Коммерческие посадки рапса описаны в Нидерландах еще в XVI веке. В то время рапсовое масло преимущественно использовалось в качестве лампового масла, позднее оно стало использоваться для смазки паровых двигателей (Zou et al., 2019; Gu et al., 2024).

Рапсовое масло содержит витамин Е и много ненасыщенных жирных кислот: полиненасыщенные кислоты (линолевая кислота – Омега 6, α -линоленовая кислот – Омега 3) и мононенасыщенные кислоты (олеиновая кислота – Омега 9) (Saini and Keum, 2018). Как α -линоленовая кислота, так и линолевая кислота являются незаменимыми жирными кислотами для человека, поскольку они не синтезируются в организме человека из-за отсутствия специфических ферментов и необходимо получать их из продуктов питания (Холдоров и др., 2020, Konuskan et al., 2019). Биоактивные соединения в рапсе представлены фенольными кислотами, фитостеролами, дилицеридами, флавонами и флавонолами (Shen et al., 2023).

Рапс имеет важное значение не только как источник пищевого масла, но и как ценная кормовая и техническая культура. Жмых и шрот, получаемые из семян после экстракции масла, используются как богатый белком корм для животных в натуральном виде и для приготовления комбикормов (Егорова и др., 2015). Важным условием является использованием двунулевых по содержанию глюкозинолатов и эруковой кислоты сортов, гибридов, а также с низким содержанием целлюлозы (желтосемянные сорта) (Бочкарева и др., 2011)

Одна из основных целей при создании сортов пищевого направления - увеличение содержания масла в семенах и повышение его качества, которое, прежде всего, определяется отсутствием в составе эруковой кислоты, которая не полностью разлагается в организме, что может быть причиной отложения жиров в мышцах и поражения миокарда. Эруковая кислота (ЭК) (цис -13-докозеновая кислота, C22:1) — это линейная мононенасыщенная очень длинноцепочечная жирная кислота с 22 атомами углерода и двойной связью в положении цис -13 углеродной цепи (Sanyal et al., 2015).

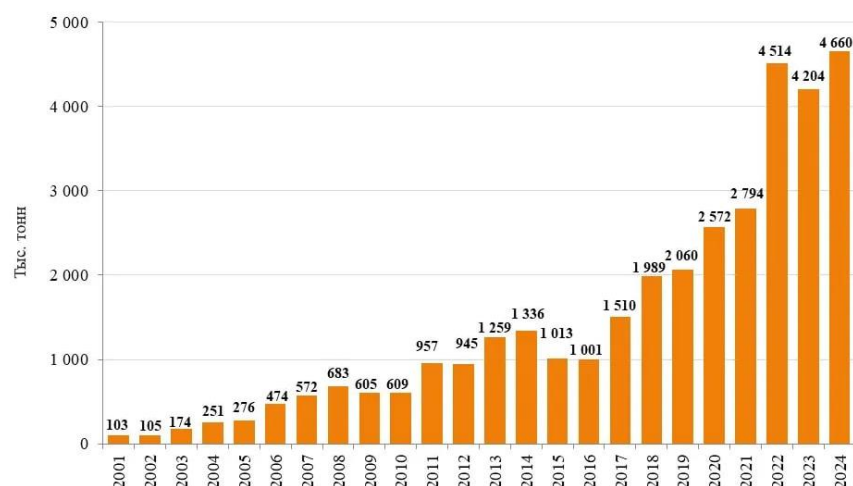
Одна из таких программ по селекции рапса была проведена с использованием спонтанного мутанта с пониженным содержанием ЭК в качестве родительской линии, немецкого сорта кормового рапса Liho (Stefansson et al. 1961; Harvey and Downey, 1964).

По данным ряда исследователей содержание эруковой кислоты контролируется двумя генами (пять аллелей генов e , E^f , E^b , E^c , E^d), действующими аддитивно (Anand and Downed, 1981; Jourden et al., 1996, Alemayehu et al., 2001). Таким образом, содержание ЭК в масле рапса может варьировать в пределах <1% до >60% (Jönsson, 1977; Sanyal et al., 2015).

Также было обнаружено влияние цитоплазмы на содержание эруковой кислоты от ее количества в материнском растении (Li-Beisson et al., 2013; Liu et al., 2022). Более того, несколько исследований показали, что эруковая кислота в семенах рапса контролируется не только основным геном наследования, но также находится под влиянием других генов-модификаторов и окружающей среды (Bechune and Kondra, 1970; Wilmer et al., 1997).

Шрот и жмых, получаемые путем экстрагирования или прессования масла из семян рапса, содержат до 42 % белка, отвечающего нормам FAO по аминокислотному составу. Однако его ценность ограничивается наличием серосодержащих соединений - глюкозинолатов, которые представляют собой гликозиды горчичного масла и являются производными аминокислот, под воздействием фермента мирозиназы они расщепляются в организме животных на ядовитые продукты. На их накопление влияют условия выращивания и место прикрепления стручка к стеблю. Впервые глюкозинолаты были обнаружены у польского сорта Bronowski (Finlayson et al., 1973). Установлено, что особое влияние на характер наследования глюкозинолатов оказывает цитоплазма. Уровень глюкозинолатов возрастает с увеличением массы 1000 семян. Содержание глюкозинолатов и эруковой кислоты наследуется независимо друг от друга.

По данным Росстата, посевные площади под рапсом в 2024 году выросли до 2,7 млн га. За прошедшее десятилетие рапс демонстрирует стабильный рост как посевных площадей, так и урожайности. Валовой сбор семян рапса вырос в три с лишним раза и в 2024 году составил более 4,6 млн т (рис.1)



Источник: Росстат

Рисунок 1 - Валовые сборы рапса (ярового и озимого) в России за период 2001-2024 года гг., тыс.тонн (по данным Росстата).

Культура хорошо приспособлена к умеренному климату, совершенствование технологии возделывания, а также выращивание гибридного материала за последние 20 лет способствовало значительному приросту площадей, занятых рапсом и повышению урожайности. За последнее десятилетие регионы возделывания сместились из Центральной России в Западную Сибирь и Поволжье, и лидерами по посевным площадям рапса в последние годы являются Алтайский и Красноярский край, Омская область, Республика Татарстан, Новосибирская, Кемеровская, Тульская, Рязанская, Липецкая области и Республика Башкортостан (рис.2). Выращивание озимого рапса на юге страны сопряжено с рядом проблем: небольшой снеговой покров, приводящий к вымерзанию, недостаток влаги в весенний период, засушливое лето, совпадение сроков уборки с основными зерновыми культурами, в связи, с чем происходит затягивание уборки и снижение урожайности.

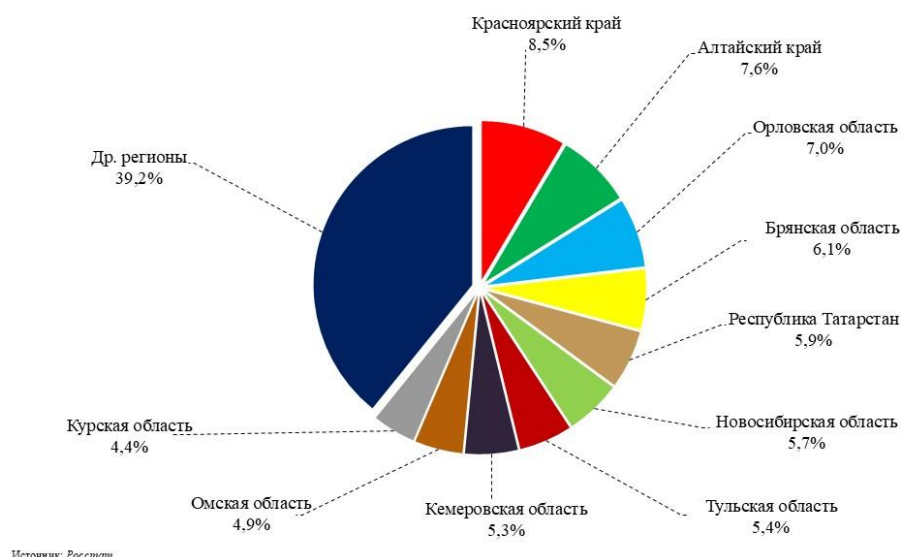


Рисунок 2 - Доля регионов РФ в общем объеме валовых сборов рапса в 2024 году (по данным Росстата на 2024 год).

Рапс обладает не только почвоулучшающими свойствами, являясь идеальным предшественником для зерновых культур, но также обладает экологическими и агротехническими достоинствами (Савенков, 2009, Иванова и др., 2011).

Набирающая популярность в России технология выращивания ClearField® нашла свое применение и при возделывании рапса. Интегрированная производственная система ClearField® - это комбинация гербицидов группы имидазолинонов и высокоурожайных F1 гибридов, имеющих устойчивость к этому гербициду (Гончаров и др., 2018). Благодаря этому значительно сокращаются затраты сельхозпроизводителей на гербицидные обработки, а также поддержать посевы на ранних фазах развития, подавляя рост конкурирующих сорных растений (Schwabe et al., 2021).

Рапс – крайне требовательная культура и требует тщательного соблюдения агротехники: главные вредители, наносящие существенный экономический вред на рапсе, это крестоцветная блошка, рапсовый цветоед и капустная моль. Основные экономически вредоносные заболевания, снижающие урожайность, а также приводящие к полной потере урожая являются кила крестоцветных, настоящая мучнистая роса, альтернариоз и

фузариозное увядание, фомоз (Пивень и др., 2011; Van de Wouw et al. 2016; Hwang et al., 2018; Mikhaylova et al., 2021).

Кила крестоцветных (возбудитель *Plasmodiophora brassicae* Wor.)

1.1.1. Систематика и биологические характеристики *Plasmodiophora brassicae* Wor.

Первые упоминания о заболевании редиса и других видов капустных относятся к четвертому веку нашей эры, греческий автор Паллидус сообщил о развитии губчатых корней на поверхности редиса, репы и рапса, выращенных на удобренной навозом почве (Watson & Baker, 1969; Khalid et al., 2022). Первым описал *Plasmodiophora brassicae* Wor. русский ученый М.С. Воронин в 1875 году, ошибочно рассматривая как класс миксомицетов, которые в то время относили к грибам, из-за схожести хитиновой клеточной стенки покоящихся спор (Muirhead & Pérez-López, 2022). Однако патоген имеет двужгутиковые вторичные зооспоры, многоядерные плазмодии, одноядерные покоящиеся споры и отсутствие нитевидного роста (Bulman et al., 2011 ; Neuhauser et al., 2014).

Plasmodiophora brassicae Wor. облигатный паразитический организм, на основании филогенетического анализа генов малой субъединицы рибосомальной РНК (Bulman et al., 2001; Castlebury and Domier, 1998; Ward and Adams, 1998) и других генов, кодирующих белки (Archibald and Keeling, 2004), относится к классу *Phytomyxea*, в настоящее время считается частью надгруппы протистов *Rhizaria* в составе филума *Cercozoa* и *Endomyxa* (Cavalier-Smith and Chao, 2003; Bass et al. 2009 ; Bass et al. 2005; Neuhauser et al., 2011). Паразит поражает все 300 родов и 3700 видов семейства Крестоцветные и несет серьезную угрозу производству рапса из-за снижения выхода масла, а также падение его качества из-за уменьшения потока питательных веществ, поступающих из корней по причине образования на них галл (Dixon, 2009).

Известно, что кила распространена более чем в 60 странах мира, в России наиболее распространена в северных регионах (Dixon, 2009). Широкое

распространение килы связано, прежде всего, с тем, что районы промышленного выращивания большинства капустных культур находятся в умеренном климате, что приводит к накоплению патогена в почве. В таком случае севооборот не может компенсировать эту проблему. Близкородственные сорняки, такие как, горчица полевая (*Sinapis arvensis*), ярутка полевая (*Thlapsi arvense*), пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris*), неслия метельчатая (*Neslia paniculata*), дескурайния софии (*Descurainia sophia*), желтушник левкойный (*Erysimum cheiranthoides*), индийская горчица (*Coringia orientalis*), клоповник обыкновенный (*Lepidium densifolium*) и др., способствуют распространению патогена.

Кила наиболее распространена в условиях Северо-Запада России, пораженность капусты в очагах заболевания может достигать 50 - 75 % от общего числа растений, при этом урожай снижался на 10 - 60 %, но в некоторых районах идет 100% потеря урожая (Кривченко и др., 1982).

По результатам исследований Honig, показало, что у *P. brassicae* происходит физиологическая специализация штаммов по генотипам хозяев (Honig, 1931).

В течение многих лет широко использовались три системы патотипирования: дифференциал килы Вильямса (Williams, 1966), дифференциал килы европейской (ECD) (Buczacki et al., 1975) и дифференциал килы Come (Somé et al., 1996).

Сегодня принято вместо рас использовать термин «патотип» для различения изолятов *P. brassicae* с дифференциальными профилями вирулентности у видов капусты, поскольку генетика взаимодействия недостаточно хорошо определена, чтобы применять концепцию рас к киле (Somé et al., 1996; Strelkov et al., 2018). В начале 2000-х годов на рынке появились первые сорта, устойчивые к киле, что потребовало корректировки методов дифференциации изолятов *P. brassicae* (Hwang, Strelkov et al., 2012).

Например, первый рапс с устойчивостью к киле (45H29) был представлен в Канаде в 2009 году. С тех пор было разработано множество

сортов с устойчивостью, которые включают гены устойчивости от других культур, таких как брюква и китайская капуста (Liu et al., 2018). На сегодняшний день в Канаде зарегистрировано более 20 сортов устойчивого рапса. Однако высокая интенсивность отбора привела к утрате устойчивости большинства коммерческих сортов из-за появления новых вирулентных патотипов, что вынудило разработать новую систему дифференциации килы, известную как канадский дифференциальный метод (CCD) (Strelkov et al., и др., 2018). С помощью CCD в Канаде было выявлено более 35 патотипов килы, используя 13 различных хозяйств, среди которых впервые оказался *CR Brassica napus* (Strelkov et al., и др., 2018). Самой новой является система дифференциации патотипов килы (SCD), которая теоретически может определить более 250 патотипов среди капустных культур в Китае и Корее (Pang et al., 2022; Javed et al., 2022).

1.1.2. Жизненный цикл патогена

Патоген имеет сложный жизненный цикл, включающий три стадии: выживание в почве в виде покоящихся спор, заражение корневых волосков и, наконец, заражение коры (Ayers 1944; Naiki and Dixon, 1987).

Жизненный цикл патогена состоит из трех основных стадий: первая стадия проходит в почве; вторая с проникновения в корневые волоски растения и третья – это инфицирование главного и придаточных корней. По данным исследователей патоген может находиться в почве долгое время, по разным оценкам, до 30 лет (Kageyama and Asano, 2009). При наступлении благоприятных условий покоящиеся споры прорастают, образуя первичные зооспоры, с которых и начинается вторая стадия заражения. Как правило, для прорастания спор необходима температура +20...25С, влажность 70-85%, также корневой экссудат может провоцировать прорастание спор (Macfarlane, 1970; Friberg et al., 2005; Rashid et al., 2013; Botero-Ramirez et al., 2020).

Первичные плазмодии развиваются в инфицированных корневых волосках, давая начало вторичным зооспорам, которые проникают в кортикальную ткань корня и развиваются во внутриклеточные вторичные

плазмодии, размножаясь. Образуют новое поколение покоящихся спор (Kageyama and Asano, 2009; Botero-Ramirez et al., 2020). По мере разрушения галлов на корнях покоящиеся споры оказываются в почве. Так на восприимчивом рапсе может образовываться до 1×10^{10} спор на 1 г ткани галлов (Hwang et al., 2013; Botero-Ramirez et al., 2020).

1.1.3. Симптоматика заболевания рапса

Главным симптомом килы является образование наростов (галлов) на корнях, пораженных растений. Галлы первоначально появляются на боковых корнях, при более сильном заражении поражается главный корень (Dixon, 2006). Из-за галлов на корнях корневая система не выполняет свою функцию, транспорт воды и питательных веществ в надземную часть практически прекращается.

Симптомы заболевания могут варьировать в зависимости от стадии развития растения, на котором произошло заражение. Раннее заражение на стадии проростков может привести к увяданию, задержке роста, на поздней стадии розетки и ранней стадии стручкования и происходит преждевременное пожелтение и созревание стручков рапса (Struck et al., 2022).

Симптомы килы, такие как увядание, могут быть ошибочно отнесены к тепловому стрессу или водному дефициту. также симптомы схожи с другими заболеваниями, такими как черная ножка или фузариозное увядание (Strelkow et al., 2015).

Заражение, которое происходит на более поздних стадиях, может не проявляться увяданием растения, задержкой роста или пожелтением. Однако зараженные растения будут преждевременно созревать, а семена будут сморщиваться. Таким образом, урожайность и качество (содержание масла) снижаются.

Диагностика посевов включает выкапывание корневой системы растений для проверки образования галлов на корнях.

1.1.4. Методы борьбы с килой

Устойчивость спор *P. brassicae*, находящихся в почве ко всем известным пестицидам (Wallenhammar, 1996) делает борьбу с этим заболеванием крайне затруднительным. Различные методы борьбы, такие как севооборот, биологический контроль, известкование почвы, сдвигание сроков высадки и др., не дали необходимого результата. Таким образом, единственным верным способом является использование гибридов с полигенной устойчивостью (Hwang et al., 2013; Botero-Ramirez et al., 2020).

Диверсификация и внедрение новых источников устойчивости в перспективе снизят риск преодоления устойчивости. Пирамидирование генов из разных семейств с помощью отдаленной гибридизации для создания полигенных по признаку устойчивости гибридов приведет к созданию более устойчивых форм (Parlevliet и Zadoks, 1977; Pink и Puddephat, 1999). Однако для этого необходимо более глубокого понимания генетического контроля (Manzanares-Dauleux et al., 2000).

Настоящая мучнистая роса крестоцветных (возбудитель – *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell)

1.1.5. Систематика и биологическая характеристика *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell

Мучнистая роса – грибковое заболевание, поражающее широкий спектр хозяйственных культур как однодольных, так и двудольных: капуста, пшеница, соя, подсолнечник, горох, Тыквенные, томат, сахарная свекла (Takamatsu et al., 2004, Рахимова и др., 2014).

Существует около 500 видов грибов, вызывающий настоящую мучнистую росу (Takamatsu et al., 2004). Возбудитель болезни у рапса – мучнисторосеяной гриб *Erysiphe communis* f.sp. *brassicae* Hammarl. Фитопатоген относится к типу Сумчатые грибы или Аскомикота (*Ascomycota*), классу Настоящие сумчатые или Плодосумчатые грибы Эуаскомицеты (*Euascomycetes*), порядку Эризифоровые (мучнисторосеяные) (*Erysiphales*),

семейство Мучнисторосые грибы (*Erysiphaceae*) (Takamatsu et al., 2015; Bradshaw et al., 2023).

Источником инфекции являются зимующие в растительных остатках споры, а также зараженные семена (Mikhaylova et al., 2021). Патоген преимущественно распространен в умеренном поясе, гораздо реже встречается на юге (Рахимова и др., 2014).

Мучнистая роса становится серьезной проблемой в современном сельском хозяйстве, поскольку она поражает большинство сельскохозяйственных культур, вызывая тем самым огромный урожай и экономические потери (Neik et al., 2017). В большинстве стран мира ее частота значительно возросла в связи с изменением климата (Alkooranee et al., 2015; Runno-Paurson et al., 2021). В настоящее время для борьбы с мучнистой росой используются фунгициды, однако они имеют множество недостатков, поскольку наносят вред окружающей среде и вызывают появление устойчивых к грибку сортов. Поэтому необходимо найти альтернативы для выведения сортов, устойчивых к мучнистой росе, в рамках устойчивого сельского хозяйства. Поэтому выявление устойчивых сортов и расшифровка их молекулярного механизма устойчивости к болезни в роде *Brassica* позволит получить новые знания для создания устойчивых сортов и гибридов.

1.1.6. Жизненный цикл патогена

Развитие мучнисторосых грибов включает две стадии — конидиальную (анаморфу) и сумчатую (телеоморфу) (Рахимова и др., 2014). На конидиальной стадии гриб развивается на поверхности растения-хозяина в виде белого, паутинистого мицелия, который со временем может исчезать или сохраняться как коричневый налёт. Мицелий состоит из септированных, тонкостенных гиф, образующих инфекционные выросты, проникающие в клетки эпидермы и формирующие гаустории. Эти структуры обеспечивают прикрепление гриба и поглощение питательных веществ. Конидиеносцы развиваются на гифах, где формируются цепочки или одиночные конидии —

основной источник инфекции, придающий поражённым тканям характерный «мучнистый» налёт (Пидопличко, 1977, Рахимова и др., 2014).

На сумчатой стадии (телеоморфе), обычно возникающей к середине или концу вегетационного периода, образуются клейстотеции — шаровидные плодовые тела, которые по мере созревания темнеют. Внутри них веерообразно размещаются аски, содержащие от двух до восьми аскоспор. Аскоспоры, как правило, одноклеточные, эллипсоидальные, с плотной цитоплазмой и значительным запасом липидов. Придатки клейстотеция — мертвые, сильно утолщенные клетки, переплетающиеся с мицелием. Все представители рода являются облигатными паразитами высших растений (Пидопличко, 1977, Раимова и др., 2014).

1.1.7. Симптоматика заболевания

Мучнистая роса крестоцветных привлекает меньше внимания исследователей из-за их озабоченности другими грибными болезнями такими как белая ржавчина, альтернариоз, ложная мучнистая роса, склеротиниевая гниль, корневые гнили, поскольку их появление происходит в начале периода роста крестоцветных и повреждения видны с первого взгляда. Также мучнистая роса появляется на более поздних стадиях роста растений, когда температура колеблется между 20 и 25°C, и ее ущерб можно оценить только после сбора урожая. После заражения хозяина инфекция распространяется очень быстро при благоприятных условиях окружающей среды и очень скоро принимает характер эпифитотии (Saharan et al. 2005, 2014, 2016, 2017; Saharan and Mehta 2008; Meena et al. 2014).

Симптомы мучнистой росы проявляются в форме белого мучнистого налета на листьях (в основном с верхней стороны) и черешках. Позднее происходит уплотнение налета в подушечки и образование на них буроватых точек — клейстотеций. Налет приобретает грязно-серый оттенок. Пораженные листья становятся хрупкими и отмирают (Габор и др., 2013). Симптомы проявляются в конце вегетационного периода, что существенно влияет на созревание семян (Mikhaylova et al., 2021)

Мучнистая роса использует эффекторные белки, чтобы подавлять защитные реакции растений и вызывать активность транспорта нитратов для получения питательных веществ из организма хозяина. Распознавание таких эффекторов вызывает иммунный ответ растений, включая клеточное самоубийство (Hacquard, 2014). Мучнистая роса может снижать урожайность и качество семян рапса, вызывая хлороз, некроз и обезвоживание.

1.1.8. Методы борьбы с настоящей мучнистой росой

С помощью соблюдения агротехники, удаления сорной растительности и использования качественного семенного материала повышается устойчивость растения к биотическим атакам. Основным методом борьбы с заболеванием является многократная обработка посевов серосодержащими фунгицидами контактного типа, а также протравливание семян перед посевом.

Самым эффективным и экологичным способом является возделывание устойчивых сортов и гибридов.

Устойчивость к этому патогену у *B. napus* является очень редка, и была достигнута только путем гибридизации с дальними родственными видами (Gong et al., 2020). Устойчивые коммерческие сорта еще не были отобраны.

Генетика и селекция на устойчивость к киле семейства *Brassicaceae*

Генетически обусловленная устойчивость у хозяев *Brassica* является наиболее желательной стратегией защиты растений и может быть интегрирована с другими подходами для высокоэффективной борьбы с фитопатогенами.

1.1.9. Селекция на устойчивость к киле *Brassica oleracea*

У *B. oleracea* устойчивость к киле, по-видимому, определяется количественными генами. Figdore et al. (1993) впервые идентифицировали три QTL, придающие устойчивость к расе *Pb 7* в брокколи. В устойчивой линии капусты C10 Grandclément, C. & Thomas (1996) провели обнаружение QTL с помощью маркеров RAPD, и результаты указали по крайней мере на два типа генетических механизмов. Rocherieux et al. (2004) далее обнаружили от двух до пяти QTL в зависимости от того, какой из пяти патотипов использовался, и

Pb-Bo1 был обнаружен для всех изолятов *Pb*, что составляет 20,7–80,7% фенотипической изменчивости. В другой устойчивой линии капусты K269 Moriguchi et al. (1999) и Nomura et al. (2005) обнаружили два и три локуса соответственно, придающих устойчивость к различным изолятам. В капусте Voorrips (1997) впервые сообщили о двух основных QTL, *pb-3* и *pb-4*. Nagaoka (2010) идентифицировали основной QTL, *pbBo* (Anju)¹, из образца капусты Anju. Lee и др. (2016) использовали генотипирование с помощью техники секвенирования (GBS) и обзор QTL, чтобы выявить два и один основной локус для рас 2 и 9 соответственно. Эти локусы показали позиции, близкие к ранее идентифицированным локусам устойчивости в *B. oleracea*, но в местах, отличных от тех, которые были обнаружены в *B. rapa*, что указывает на расхождение локусов R между геномами *Brassica A* и *C*.

1.1.10. Селекция на устойчивость к киле *Raphanus sativus*

Редис — овощная культура с долгой историей, широко культивируемая во всем мире, которая развила большой и разнообразный спектр ресурсов генетического разнообразия (Zhang X. et al, 2021).

У большинства видов семейства Крестоцветные таких как рапс, капуста, брокколи и китайская капуста, не имеющих внутривидовых источников устойчивости к киле. Наиболее широко используемые гены и локусы устойчивости в этих культурах были получены из репы, которая является моногенной и имеет риск разрушения устойчивости, сталкиваясь с постоянно эволюционирующими расами *P. brassicae* (Zhan Z. et al., 2020, Zhu M. et al, 2022.).

На данный момент практически отсутствуют данные об генах устойчивости к киле у редиса. Исследователи отмечают, что данные гены присутствуют в ряде японских видов редиса (дайкон), китайские и корейские же часто восприимчивые к этому заболеванию. По данным Kamei et al. (2010), было разработано шесть кодоминантных маркеров, BrSTS-30, BN142, BrSTS-72, BrSTS-61, REL24 и BrSTS-33. Все маркеры были обнаружены в регионах с надежными оценками LOD. Среди них четыре (BN142, BrSTS-72, BrSTS-61 и

BrSTS-33) являются общими для региона *Crr3* *B. rapa*. Поэтому предполагается, что геномная область вокруг *Crs1* генома *Raphanus* и вокруг *Crr3* генома *B. rapa* произошли из одной и той же области общего предкового генома. Поэтому гены, картированные у *Brassica* и *Raphanus*, могли произойти из очень ограниченных областей предкового генома (Kamei et al., 2010).

1.1.11. Селекция на устойчивость к киле *Brassica napus*

Brassica napus (AACC, $2n = 38$) – это амфидиплоидный вид с очень небольшим числом внутривидовых вариаций, не имеющий диких предков. Геном вида представлен геномами *C* (*B. oleracea*) и *A* (*B. rapa*), поэтому источником для повышения его генетического разнообразия являются два вида *B. rapa* и *B. oleracea* (Diederichsen E. et al., 2009).

Устойчивые образцы по данным исследований чаще встречались у отдельных видов культур, например, у белокочанной капусты *B. oleracea* или у корнеобразующих видов *B. rapa* и *B. napus* (брюква) (Walker and Larson 1948; Gante 1951; Weisaeth 1961; Lammerink 1964; Tjallingii 1965; Ayers and Lelacheur 1972; Crute and others 1980; Brokenshire 1982; Schoeller 1987; Crisp and others 1989; Monteiro and Williams 1989; Williamson and Bradshaw 1989; Bradshaw and Williamson 1991).

Для *B. napus* было охарактеризовано несколько локусов, передающих устойчивость к различным изолятам. Landry (1992) идентифицировали два QTL, контролирующих устойчивость к расе 2, которые внесли 58% и 15% наблюдаемой фенотипической вариации (Landry et al., 1992). Manzanares-Dauleux (2000) сообщили о картировании R-локусов в Darmor-bzh и идентифицировали один основной ген, *Pb-Bn1*. Используя популяцию ДН, Werner (2008) обнаружили 19 QTL, которые передавали устойчивость к 7 различным изолятам, но ни один из них не мог передавать устойчивость ко всем этим изолятам (Werner et al., 2008). Fredua-Agyeman и Rahman (2016) картировали устойчивость рапса к киле на сегменте ДНК, состоящего из 12 маркеров, связанных с локусом *CRa*, что указывает на его возможное происхождение из генома *A*. Hasan Rahman (2016) использовали популяции

рутабаги для картирования устойчивости и охарактеризовали геномный сегмент на хромосоме A8, придающий устойчивость ко всем пяти тестируемым патотипам.

Тесно связанные маркеры и гены устойчивости широко используются в селекции устойчивости *Brassica* к CR, что позволило создать ряд устойчивых сортов, которые успешно контролируют CR во многих областях. Например, учитывая, что высокая устойчивость встречается в основном у *B. rapa*, исследователи часто применяли межвидовое скрещивание для облегчения передачи генов R в сочетании с MAS и оценкой фенотипа (Hirani et al., 2016; Liu et al., 2018).

По данным (Нгуен, 2015), потери урожая рапса при выращивании на полях, заселенных *P. brassicae* могут составлять 80 - 91 %, в тоже время отмечено снижение качественных и количественных показателей урожая семян – снижение содержания масла на 4,7 - 6,1 % и на 13 - 26 % массы 1000 семян.

По данным ряда исследователей наследование устойчивости у *B. napus* контролируется одним или двумя независимыми доминантными генами, а также выявлены два рецессивных гена с аддитивным эффектом у датской гигантской брюквы (Lammerink, 1967; Johnston, 1970; Ayers, Lelacheur, 1972).

M. Gustafsson и A.S. Falt установили, что существуют четыре расоспецифичных гена устойчивости у дифференциаторов ECD группы *B. napus* (Gustafsson, Falt, 1986). Имеется предположение, что все гены устойчивости к киле у *B. napus*, имеют происхождение из *B. rapa* (Chiang et al., 1977).

Большинство сортов рапса с устойчивостью к киле произведенные в Канаде, вероятно, были выведены с использованием гена устойчивости из гибрида Mendel (Fredua-Agyeman et al. 2018), который стал восприимчивым сразу через 4 года в 2013 году из-за появления нового вирулентного патотипа 5X (Strelkov et al. 2016) .

Таким образом, экспрессия генов устойчивости к киле родительских видов *B. napus* различается и гены *B. oleracea* могут присутствовать в природном *B. napus*, не будучи замеченными. В совокупности гены устойчивости от *B. rapa* следует рассматривать как одни из самых эффективных для применения в селекции рапса, но имеющий существенный недостаток - расоспецифичность (патотипоспецифичность).

Исследования генов устойчивости (локусов) килы прогрессируют и углубляются, но все еще существуют некоторые противоречия. Например, гены *CRA* и *CRb* в *B. rapa* считаются либо аллелями, либо тесно связанными. Затем была проведена физическая карта на основе последовательностей, чтобы доказать, что ген *CRb* не является аллелем гена *CRb Kato* или *CRA*, но что они тесно связаны (Hatakeyama et al., 2017).

Генетика и селекция на устойчивость к настоящей мучнистой росе семейства *Brassicaceae*

Несмотря на наличие фунгицидов для борьбы с мучнистой росой наиболее эффективным и экологичным способом является использование генов устойчивости.

У видов *Brassica* были идентифицированы два отдельных локуса, содержащих гены устойчивости к настоящей мучнистой росе. Один локус содержит три tandemно расположенных гена *HR* как из *B. oleracea*, так и из *B. rapa*, а именно *BoHRA* (AY225587), *BoHRb* (AY225588), *BoHRc* (AY225589), *BrHRA*, *BrHRb* и *BrHRc* (AY225586). Другой локус содержит только один ген *HR*, *BrHRd* (AY225590) из *B. rapa* (Xiao et al., 2004). Все эти гены *Brassica* имеют наибольшее сходство с геном *HR3 Arabidopsis* (Xiao et al., 2004).

В геноме *B. napus* копия *BrHR HRA*, *HRb* и *HRc* из *B. rapa* имеет тенденцию включать вариацию последовательности, в то время как копия из *B. oleracea* является высококонсервативной, несмотря на то, что любая из копий может претерпеть потерю гена в *B. napus* после диплоидизации от гибрида *B. rapa* и *B. oleracea*. Кроме того, наш анализ аллельного полиморфизма в генах *BnHR* предполагает, что множественные

эволюционные события, включая потерю гена, точечную мутацию, вставку, делецию и внутригенную рекомбинацию, способствуют последовательности и возможной диверсификации функций копии *BnHR* из *B. rapa*.

1.1.12. Селекция на устойчивость к настоящей мучнистой росе *Brassica napus*

Мучнистая роса использует эффекторный белок, чтобы подавлять защитные реакции растений и вызывать активность транспорта нитратов для получения питательных веществ из организма хозяина. Распознавание таких эффекторов вызывает иммунный ответ растений, включая клеточное самоубийство (Hacquard, 2014).

У растений семейства Brassicaceae механизм устойчивости к мучнистой росе связан с образованием GSLs (включая *B. napus* и модельное растение *Arabidopsis thaliana*). Конъюгация GSH и GSTs необходима для биосинтеза GSLs, а также для деактивации изотиоцианатов (ITCs), т.е. токсичных производных GSL (Mikhaylova et al., 2021). Производные GSL, синтезируемые при повреждении тканей, обеспечивают защиту от биотического стресса, особенно против грибов. Мучнистая роса индуцирует экспрессию генов монооксигеназы цитохрома, участвующих в биосинтезе алифатических GSL, и накопление биосинтетических ферментов GSL в эпидермальных клетках *A. thaliana* (Weis et al., 2014; Hunziker et al., 2020). Несмотря на защиту от грибов, ИТК действуют как гербициды, вызывая потерю хлорофилла, окислительный стресс и снижение содержания GSH в самом растении (Plaszkó et al., 2021). Гены GST повышаются в ответ на изотиоцианаты, обеспечивая быструю детоксикацию для восстановления после снижения уровня глутатиона (GSH). Устойчивость к мучнистой росе также регулируется генами *Mlo*, связанными с реакцией быстрой гибели клеток. Мутация с потерей функции предотвращает попытки гифов гриба и способствует развитию ответа в виде хлороза, атакованных клетках ячменя. У *Arabidopsis thaliana* этот вид устойчивости, по-видимому, является полигенной (Shirasu et al., 2000; Mikhaylova et al., 2021).

Селекция рапса на толерантность к гербицидам группы имидазолиноны

Селекция рапса (*Brassica napus* L.) на толерантность к гербицидам представляет собой ключевой аспект современной агрономии. Для эффективного контроля сорняков широко применяются гербициды, среди которых группа имидазолинонов (например, имазетапир, имазамокс) занимает особое место благодаря своей селективности и низкой токсичности для окружающей среды. Эти гербициды ингибируют фермент ацетогидроксикислотсинтазу (AHAS, или ALS), нарушая биосинтез разветвленных аминокислот в растениях (Guo et al., 2019).

Технология Clearfield — это не генетически модифицированная (ГМО) система получения устойчивых сортов и гибридов, она основана на отборе мутации в гене *AHAS* методами классической селекции или химическом мутагенезе, которая придает растениям устойчивость к гербицидам группы имидазолинонов (Huang et al., 2020).

В геноме *B. napus* (AACC, $2n=38$) идентифицировано пять гомологов *AHAS*: *BnAHAS1* и *BnAHAS5* (С-геном), *BnAHAS2*, *BnAHAS3* и *BnAHAS4* (А-геном). Основную роль в толерантности играют *BnAHAS1* и *BnAHAS3*, экспрессируемые конститутивно с более чем 98% идентичностью аминокислотных последовательностей (Yu et al., 2014). Мутации в этих генах, часто возникающие спонтанно или индуцированные мутагенезом (например, этилметансульфонатом, EMS, или этилнитрозомочевинной, ENU), приводят к аминокислотным заменам в консервативных доменах фермента, таких как α -домен, формирующий карман связывания. Эти замены вызывают стерические препятствия или нарушение водородных связей, уменьшая связывание гербицида. Наследование толерантности обычно полудоминантное или доминантное, контролируемое одним ядерным геном без цитоплазматического эффекта, с сегрегацией в соотношениях 3:1 в F₂ и 1:1 в BC₁ популяциях (Kozar et al., 2024).

Исследования по резистентности к АНАС-ингибиторам, включая имидазолиноны, демонстрируют ограниченное распространение устойчивых форм среди сорняков, таких как редька (*Raphanus sativus*), в регионах с интенсивным применением гербицидов. В Аргентине отмечено низкое наличие резистентных популяций, что позволяет эффективно использовать эти соединения в системах возделывания рапса (Pandolfo et al., 2013). Это подчеркивает потенциал селекции рапса на толерантность к имидазолинонам для поддержания долгосрочной эффективности гербицидных программ.

Разработка ферментов для усиления толерантности к гербицидам, включая аналоги имидазолинонов, активно изучается в родственных культурах, таких как кукуруза и соя. Эти подходы включают инженерию энзимов, устойчивых к ингибиторам, что может быть адаптировано для рапса, обеспечивая защиту от арилоксифеноксипропионатов и синтетических ауксинов (Lague et al., 2019). Перенос подобных технологий на рапс позволит повысить селективность имидазолинонов, минимизируя фитотоксичность.

Эффективность имидазолинонов, таких как имазамокс, в резистентных сортах рапса подтверждается полевыми испытаниями. В Финляндии на имидазолинон-резистентном весеннем рапсе отмечена высокая эффективность контроля сорняков без значительного снижения урожайности, что подчеркивает преимущества селекции для северных регионов (Haukkaräa et al., 2005). Аналогично, исследования взаимосвязей между урожаем рапса и популяциями сорняков под действием гербицидов показывают, что толерантные сорта позволяют оптимизировать дозы, снижая негативное влияние на культуру (Bijanzadeh et al., 2010).

Ранние оценки гербицидов для контроля сорняков в рапсе закладывают основу для селекции, фокусируясь на селективности и остаточном действии. В частности, изучение различных соединений, включая потенциальные аналоги имидазолинонов, подтверждает их роль в интегрированной защите растений (Bagherani & Shimi, 2001).

В целом, литература указывает на прогресс в селекции рапса на толерантность к имидазолинонам, но подчеркивает необходимость баланса между эффективностью и экологической безопасностью. Дальнейшие исследования должны учитывать региональные вариации и молекулярные механизмы резистентности для устойчивого развития.

Селекция рапса с применением отдаленной гибридизации и *in vitro* технологии спасения зародышей

1.1.13. Отдаленная гибридизация в исследованиях и селекции

Отдаленная гибридизация вносит существенный вклад в видообразование покрытосеменных растений, обеспечивая перенос генов между видами и расширяя их потенциал к адаптации. Она не только способствует образованию новых видов, но и обеспечивает перенос генов между видами (Anderson et al., 1954; Rieseberg, Wendel; 1993; Першина, 2016).

Существенный вклад в теоретическое обоснование отдаленной гибридизации как селекционного метода внес Николай Иванович Вавилов и его ученик, Георгий Дмитриевич Карпеченко, доказавший возможность получения фертильного потомства от отдаленной гибридизации путем спонтанного удвоения хромосом (Карпеченко, 1935; Карпеченко, 1937).

Главным объектом исследований самого Карпеченко Г.Д. был редечно-капустный гибрид (*Raphanobrassica*), полученный в результате скрещивания растений разных родов семейства крестоцветных (*Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L.) (Карпеченко, 1935; Карпеченко, 1937).

При этом в качестве отцовской формы использовались образцы из четырех групп разновидностей – капуста белокочанная (*B. oleracea* convar. *capitata* (L.) Alef. var. *capitata* L. f. *alba* DC), капуста савойская (*B. oleracea* convar. *capitata* (L.) Alef. var. *sabauda* L.), капуста брюссельская (*B. oleracea* convar. *oleracea* var. *gemmifera* DC) и капуста кольраби (*B. oleracea* convar. *acephala* (DC.) Alef. var. *gongylodes* L.).

Результаты, полученные в области селекции, подтверждают идеи Вавилова Н.И. о важности отдаленной гибридизации в расширение

генетического разнообразия культурных видов. Он рассматривал отдаленную гибридизацию как способ передачи устойчивости к абиотическим и биотическим факторам и отмечал важность цитологических исследований в этом направлении (Вавилов, 1966; Ригин, 2007).

Согласно закону гомологических рядов наследственной изменчивости Вавилова: «Виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть нахождение параллельных форм у других видов и родов», (Вавилов, 1987). Также согласно этому закону вероятно нахождение устойчивого вида в ареале распространения патогена, и использования его в качестве источника устойчивости для культурного вида.

Синтез фертильных амфидиплоидных видов (линий) посредством отдаленной гибридизации с последующим удвоением хромосомного набора амфигаплоидного потомства является одним из способов создания исходного материала, используемого в качестве источника генов или «бридж растений» для передачи желаемых признаков в третий вид (Монахос, 2015).

Путем межвидовой гибридизации были успешно переданы доминантные гены устойчивости к киле в капусту белокочанную (*B. oleracea*): половой гибридизацией брюквы (*B. napus*) «Wilhelmsburger» с тетраплоидной капустой (Chiang et al., 1977) и применением метода спасения зародышей в скрещивании капусты пекинской (*B. rapa*) F1 «Parkin» с брокколи (Diederichsen et al., 2009).

Культурой семязачатков/зародышей отдаленных гибридов между капустой белокочанной (*B. oleracea*, $2n = 18$, CC) и японской редькой (*R. sativus*, $2n = 18$, RR) с последующим удвоением хромосомного состава получены фертильные высокоустойчивые к киле капустно-редечные гибриды *Brassicoraphanus* на базе «Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева» (Монахос, 2015).

1.1.14. Скрещиваемость видов внутри семейства *Brassicaceae*

Семейство *Brassicaceae* включает более 330 родов и 3800 видов, распространенными по всему миру (Bailey et al., 2006, Huang et al., 2016).

С экономической точки зрения наиболее важными являются шесть основных видов семейства *Brassicaceae*. По результатам экспериментов по искусственной межвидовой гибридизации была предложена модель «треугольник U» для визуализации генетических связей между главными шестью видами рода *Brassica* (рис.3) (Nagaharu, 1935). Исходными видами по данным исследований были *Brassica rapa* (геном AA), *Brassica nigra* (геном BB) и *Brassica oleracea* (геном CC) и благодаря гибридизации между ними были получены другие виды семейства Крестоцветные (Xue et al., 2020).

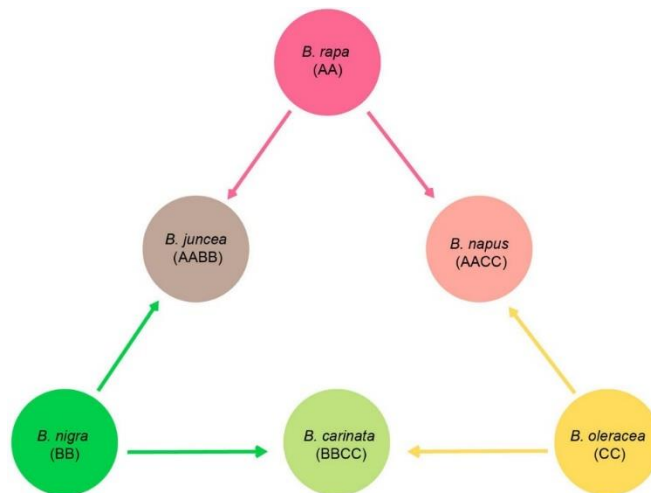


Рисунок 3 - Схема треугольника U, показывающая генетические связи между шестью культивируемыми видами *Brassica* (Nagaharu, 1935).

Происхождение *B. napus* (амфидиплоид с хромосомным набором $n=19$) до конца неясно, но изначально предполагалось, что оно связано с естественной межвидовой гибридизацией между двумя диплоидными видами *B. oleracea* (капуста) ($n=9$) и *B. rapa* (син. *Campestris*) ($n=10$) (Xue et al., 2020). Результаты исследований также указывают на то, что *B. napus* имеет множественное происхождение и что большинство культурных форм *B. napus* были получены в результате скрещивания, в котором близкородственные предковые виды *B. rapa* и *B. oleracea* были материнскими донорами (Kaneko et al., 2014).

Потенциально все виды рода *Brassica* способны к гибридизации между собой, так и с другими видами этого семейства. Межвидовые гибриды, несущие новые гены или локусы, могут способствовать развитию новизн и превосходящих признаков, значительно повышать производительность и создавать новые виды посредством геномных мостов и межвидовых скрещиваний U-образного треугольника (Chen et al., 2011; Zhanget al., 2016).

1.1.15. Технология спасения зародышей (эмбриокультура)

Главной причиной медленного развития использования отдаленной гибридизации является нескрещиваемость разных видов. Она может проявляться в презиготической и постзиготической фазах полового размножения.

По классификации Карпеченко Г.Д. (1935) различают две группы скрещиваний: конгруэнтные, когда родительские формы, несмотря на различие в геномах, могут скрещиваться без понижения жизнеспособности, и инконгруэнтные скрещивания, когда родительские формы имеют негомологичные хромосомы или разное число хромосом, или несоответствие в плазме, в результате чего гибриды первого поколения оказываются частично или полностью стерильными (Карпеченко, 1935).

Трудности, связанные с нарушениями процесса оплодотворения (непрорастанием пыльца, прекращением роста пыльцевой трубки и проникновением ее в завязь) решаются с помощью хирургических, химических и физических методов (Ларькина, 2013).

Технология спасения зародышей («*embryo rescue*») нашло широкое использование в селекции в случае отдаленных скрещиваниях, когда получение семян на растение невозможно. Из-за нарушений развития семени и зародыша, абортруемости его, данная технология позволяет получать гибридные растения (Srewart, 1981).

Разработка и применение технологии эмбриокультуры начиналась в начале XX века, Hanning (1904) культивировал зародыши капустных растений *Raphanus* ssp. и *Chochlearia damica*. Возможность культивирования

извлеченных зародышей на питательной среде и получение жизнеспособных растений послужило основой для развития эмбриологии и смежных дисциплин. Позже было открыто, что у зародышей, полученных *in vitro* отсутствует период покоя, этот фактор позволил ускорить селекционный процесс у некоторых плодовых деревьев (Монахос и др., 2014).

Дальнейшие исследования в этой области дали представление о стадиях гетеротрофного и автотрофного питания в развитии зародыша (Raghavan, 1976), что в дальнейшем позволило улучшить условия культивирования.

Наиболее часто используемые среды в исследованиях по эмбриокультуре – базовые среды MS (Murasige and Skoog, 1962) и B5 (Gamborg et al., 1968). В качестве добавочных органических веществ к минеральным солям используют сахарозу, гидролизат казеина (Ziebur, Brink, 1951), солодовый экстракт (Blakeslee, Satina, 1944), неавтоклавированное кокосовое молоко (Van Overbeek, 1942) и др.

Сахароза – это наиболее часто используемый сахар, служащий источником углерода и осмотического стабилизатора. В основном сахарозу используют для культивирования недозревших зародышей, причем важным является концентрация сахарозы, влияющая на осмос среды (Tukey, 1938; Lammerts, 1942; Ziebur, Brink, 1951).

Актуальность и значение эмбриокультуры при отдаленной гибридизации было отмечено еще при разработке и апробации технологии (Laibach, 1925). Успешное получение отдаленных гибридов с помощью технологии эмбриокультуры было подтверждено рядом исследователей на различных культурах (Raghavan et al., 2003).

Технология спасения зародышей проста в применении и несет огромное значение в сохранении получаемых при отдаленной гибридизации зародышей, погибающих в обычных условиях. Доступность обширного числа исследований по данной тематике свидетельствует о наличии базовой информации, необходимой для реализации возможностей данного направления биотехнологии. Однако остаются частные вопросы, связанные с

особенностями развития гибридного зародыша в конкретных условиях (Монахос, Богданова, 2014).

Цитоплазматическая мужская стерильность в селекции *Brassica napus*

1.1.16. Системы контроля опыления и их создание на основе видов семейства *Brassicaceae*

В селекции F1 гибридов используют генетически обусловленные системы: самонесовместимость (SI, CH), ядерную мужскую стерильность (NMS, ЯМС), иначе называемую генной (правильнее ядерной) мужской стерильностью (GMS, ГМС), и цитоплазматическую мужскую стерильность (CMS, ЦМС) (Анисимова и др., 2020).

Самонесовместимость (CH) предотвращает оплодотворение от самоопыления за счет генетически обусловленного распознавания собственной пыльцы. Основной недостаток этой системы — трудоемкость размножения родительских линий, требующая ручного опыления вскрытых бутонов (Анисимова и др., 2020). Кроме того, CH нестабильна в условиях высоких температур, повышенного содержания CO₂ или солей (NaCl), что ограничивает ее применение в селекции рапса (Singh et al., 2019), по факту самонесовместимость не проявляется у аллотетраплоидного рапса в силу комплексного взаимодействия генов и подавления проявления механизма самонесовместимости.

Ядерная мужская стерильность (ЯМС), также известная как генная мужская стерильность, обусловлена мутациями в ядерных генах, блокирующих развитие пыльцы. ЯМС позволяет контролировать опыление, но требует поддержания стерильных линий с помощью закрепителей фертильности, что усложняет селекционный процесс (Анисимова и др., 2020).

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) — наследуемое по материнской линии явление, вызванное экспрессией митохондриальных открытых рамок считывания (*orf*). ЦМС приводит к неспособности растений продуцировать жизнеспособную пыльцу из-за нарушений в экспрессии

митохондриальных генов (Hanson & Bentolila, 2004). Фертильность может быть восстановлена ядерными генами-восстановителями (*Rf*), что делает ЦМС особенно ценной для создания F1-гибридов (Chen & Liu, 2014). В русскоязычной литературе принято различать ЦМС и яЦМС, во второй восстановление фертильности происходит под действием ядерных генов (*Rf*), тогда как в первом случае стерильность и фертильность зависит только от митохондриальных генов. В англоязычных источниках разделения нет и под термином ЦМС подразумеваются оба типа (Hu et al. 2014; Priyadarshan 2019; Анисимова и др., 2020).

При ЦМС и яЦМС растение не способно продуцировать жизнеспособную пыльцу из-за нарушения экспрессии митохондриальных генов. Этот механизм описан у различных видов растений (Hanson & Bentolila, 2004; Ivanov, Dymshits, 2007). ЦМС возникает в популяциях спонтанно (гомоплазматическая или аутоплазматическая ЦМС) либо при отдаленной (межвидовой, межродовой) половой или соматической гибридизации (аллоплазматическая ЦМС) (Li et al., 2019; Sang et al., 2019).

Классификация типов ЦМС по Kaul (1988) строится на основе их фенотипических различий и механизмов развития.

1. Структурная характеризуется отсутствием пыльников или нарушения их развития, а также структурные аномалии, в частности превращения в стигмоидные, петалоидные (*hau* ЦМС у горчицы сарептской) или карпелоидные (у моркови) структуры, нарушения развития и дифференциации андрогенеза (Yamagishi et al., 2014, Hanson et al., 2004).

2. При спорогенной ЦМС пыльники недоразвиты, пыльца в них отсутствует либо стерильна. У двудольных растений спорогенная ЦМС встречается значительно чаще, чем у однодольных. В ряде случаев (например, у картофеля) на фоне стерильной цитоплазмы наблюдается функциональная стерильность, при которой образуется не способная к прорастанию пыльца (Sanetomo et al., 2015).

3. Функциональная мужская стерильность (ФМС) характеризуется наличием нормально развитого андроея и фертильной пыльцы, которая, однако, не способна к прорастанию или эффективному опылению из-за физиологических или морфологических барьеров. В отличие от структурной и спорогенной CMS, функциональная стерильность связана с нарушением процессов, обеспечивающих высвобождение или функционирование пыльцы, таких как растрескивание пыльников или несоответствие морфологии цветка (Kaul, 1988).

У растений наиболее распространена (в 60% случаев) спорогенная ЦМС. У двудольных растений спорогенная ЦМС встречается значительно чаще, чем у однодольных. В ряде случаев (например, у картофеля) на фоне стерильной цитоплазмы наблюдается функциональная стерильность, при которой образуется не способная к прорастанию пыльца (Sanetomo et al., 2015).

ЦМС может возникать спонтанно (гомоплазматическая CMS) или в результате межвидовой/межродовой гибридизации (аллоплазматическая CMS) (Li et al., 2019; Sang et al., 2019). У рапса известно более 10 систем CMS, включая аллоплазматические (*ogu*, *tour*, *hau*, *Nsa*) и гомоплазматические (*pol*, *nap*). Наиболее широко применяемые системы — *ogu*, *pol*, *nap* и *MSL* (Multi-Seed Line), благодаря их стабильности и наличию генов-восстановителей (Анисимова, 2020) (таб.1).

Таблица 1. Классификация систем ЦМС и ассоциированные митохондриальные гены *orf* в селекции рапса

Тип стерильной цитоплазмы	Ген <i>orf</i>	Вид/источник	Особенности	Источник
<i>pol</i>	<i>Orf224</i>	<i>Brassica napus</i>	Температурная чувствительность, ограниченное использование.	Fu 1981, Tanaka 1998, Singh & Brown, 1991.
<i>Ogu</i> (<i>Ogura</i>)	<i>Orf138</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Высокая стабильность, широко используется в	Ogura 1968, Bonhomme et al.,

Тип стерильной цитоплазмы	Ген orf	Вид/источник	Особенности	Источник
		(японская редька)	гибридизации. В некоторых линиях отмечаются хлороз.	1992; Uyttewaal et al., 2008.
<i>nap</i>	<i>Orf222</i>	<i>Brassica napus</i>	Температурная чувствительность, ограниченное использование.	Shiga и Baba 1971, 1973, Thompson 1972, L'Homme et al., 1997; Liu et al., 2017.
<i>tour</i>	<i>Orf139</i>	<i>Brassica tournefortii</i>	Ограниченное применение, изучение рекомбинаций.	Dieterich et al., 2003.
<i>Mori</i>	<i>ORfo108</i>	<i>Moricandia arvensis</i>	Аллоплазматическая, хлороз, перспективна для селекции.	Ashutosh et al., 2008; Kumar et al., 2012; Prakash et al., 1998
<i>Nsa</i>	Гены кандидаты - <i>orf224</i> , <i>orf309</i> , <i>orf346</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	Новая система, требует изучения.	Hu et al. 2003, Wu et al., 2019
<i>hau</i>	<i>Orf288</i>	<i>Brassica juncea</i>	Хлороз, ограниченное применение, исследовательский интерес.	Wan et al. 2006, 2008, Jing et al., 2012; Wang et al., 2021
<i>inap</i>	Не определен	<i>Isatis indigotica</i>	Перспективна, но требует исследований.	Kang et al., 2017.

1.1.17. Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность у *Brassica napus*

Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность (ЯЦМС) — подтип CMS, обусловленный взаимодействием мутаций в митохондриальной ДНК (например, *orf138*) и ядерных генов *rfrf*, приводящих к полной или частичной стерильности андроцея. Фертильность восстанавливается при наличии

доминантного аллеля гена-восстановителя *Rf* (Chen & Liu, 2014). ЯЦМС широко используется в селекции рапса для контролируемой гибридизации, обеспечивая 100% гибридность семян за счет исключения самоопыления (Анисимова и др., 2020; Hu et al., 2014).

ЯЦМС поддерживается скрещиванием стерильных растений (генотип *S rfrf*) с закрепителями стерильности (генотип *N rfrf*), имеющими нормальную цитоплазму и рецессивные гены *rfrf*. Для минимизации риска появления фертильных растений (*N Rfrf* или *N RfRf*) используются закрепители с альтернативной цитоплазмой, не содержащей генов *Rf*, что гарантирует стерильность потомства (Анисимова и др., 2020).

Природная ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность, обнаруженная в японской редьке (*R. sativus* L.) (Ogura, 1968), межродовой гибридизацией с последующим беккроссированием передана в растения *B. oleracea* и *B. napus* (Rousselle et al., 1982; Heath et al., 1996), а затем из *B. napus* в *B. campestris* (Heyn, 1979; Williams, Heyn, 1981). Гибриды *Ogura* ЦМС приобрели популярность благодаря высокой чистоте семян и широко используются для производства семян капустных культур (Yu et al. 2016).

Последовательности митохондриального генома форм с ЦМС *ogu*-типа, в том числе митохондриального гена *orf138* - уникальны и, по-видимому, возникли в результате множественных перестроек последовательностей генома дикого типа (Tanaka et al., 2012). Идентифицировано 9 вариантов митохондриального гена *orf138*, обозначенных от А (происходит от растений редиса дикого типа) до I. Разновидность этого типа стерильности: *ogu-NWSUAF* - характеризуется наличием в митохондриальной ДНК одновременно двух маркерных генов, *orf138* и *orf222*. Данный тип цитоплазмы часто встречается в российских и европейских селекционных программах рапса. Стерильность *ogu-NWSUAF* отличается стабильным проявлением признака, отсутствием хлороза и хорошей завязываемостью семян (Zhao et al., 2010). Данный тип восстанавливается тем же геном-восстановителем фертильности, что и тип *Ogura - Rf_o*.

Широкое использование различных типов ЦМС в селекции ограничено нестабильностью проявления признака стерильности в зависимости условий среды, трудностями получения надежных источников генов восстановления фертильности, а в ряде случаев и негативными эффектами стерильной цитоплазмы на хозяйственно ценные признаки. Поэтому в практической селекции применение нашли лишь некоторые из них.

1.1.1. Ген-восстановитель фертильности

Гены-восстановители фертильности (*Rf*) играют ключевую роль в преодолении цитоплазматической мужской стерильности (CMS) в селекции *Brassica napus*, обеспечивая восстановление фертильности пыльцы в гибридах F₁. Эти ядерные гены подавляют действие митохондриальных генов, вызывающих стерильность, таких как *orf138* в системе *Ogura CMS*. В данном разделе рассматриваются молекулярные механизмы действия *Rf*-генов, их идентификация, перенос в виды *Brassica* и применение в селекции.

Большинство идентифицированных *Rf*-генов, за исключением редких случаев (например, *rf2* у кукурузы, кодирующий альдегиддегидрогеназу), кодируют PPR-белки (Pentatricopeptide Repeat), содержащие повторяющиеся мотивы из 35 аминокислотных остатков. Эти белки относятся к подсемейству Restoration of Fertility Like (RFL-PPR), которое характеризуется эволюционной консервативностью и способностью регулировать митохондриальные транскрипты (Fujii et al., 2011). *Rf*-гены восстанавливают фертильность на различных уровнях, включая геномный, посттранскрипционный, трансляционный или посттрансляционный, а также метаболический (Chen & Liu, 2014). Например, в системе *Ogura CMS* ген *Rfo* изменяет трансляционную экспрессию митохондриального гена *orf138*, предотвращая его негативное влияние на развитие пыльцы (Bellaoui et al., 1999; Brown et al., 2003).

Естественные гены-восстановители для *Ogura CMS* отсутствуют в *B. napus*, *B. oleracea* и *B. rapa* (Desloire et al., 2003). Ген *Rfo*, изначально идентифицированный в редьке (*Raphanus sativus*), был успешно перенесен в эти виды путем межвидовой гибридизации и слияния протопластов (Heun,

1976; Heath et al., 1994; Kirti et al., 1995). В *R. sativus* описано 12 *Rf*-генов (например, *Rfo*, *Rfk*, *RF1*, *RF2*, *RsRf3-1/RsRf3-2*, *Rft*), но в *B. napus* наиболее изучены *Rfo*, *Rfob* и *Rft* (Delourme et al., 1994; Feng et al., 2009; Hu et al., 2012). Ген *Rfo* локализован на хромосоме С3 (группа сцепления N19) генома *B. napus* и представлен тремя гомологичными копиями: PPR-A, PPR-B и PPR-C. Только PPR-B эффективно восстанавливает фертильность, подавляя экспрессию *orf138*, тогда как PPR-A и PPR-C не влияют на стерильность (Uyttewaal et al., 2009; Brown et al., 2003).

Для идентификации линий-восстановителей в селекции *B. napus* разработаны молекулярные маркеры, связанные с геном *Rfo*. Традиционные ПЦР-маркеры, основанные на полиморфизмах ДНК, применяются для маркер-опосредованной селекции (MAS), что значительно упрощает отбор линий (Delourme et al., 1994; Hu et al., 2008; Yu et al., 2016). Однако эти маркеры имеют ограничения, включая склонность к ложноположительным или ложноотрицательным результатам из-за их доминантной природы. Современные методы, такие как секвенирование нового поколения (NGS), позволяют повысить точность идентификации *Rfo* и других *Rf*-генов, минимизируя ошибки (Wang et al., 2020). Перспективным направлением является использование CRISPR-Cas9 для редактирования *Rf*-генов, что может улучшить их функциональность и устранить нежелательные побочные эффекты, такие как хлороз (Zhang et al., 2024).

Перенос *Rfo* в *Brassica napus* сделал *Ogura* CMS одной из наиболее широко используемых систем для производства гибридов, обеспечивая высокую степень гибридности и урожайности. *Rf*-гены для других CMS-систем, таких как *Polima* (*Rfp*) и *Nap* (*Rfn*), также локализованы и используются в селекции, хотя их применение ограничено из-за нестабильности в различных условиях (Liu et al., 2017). Интрогрессия *Rf*-генов из *R. sativus* и других видов *Brassicaceae* расширяет генетическое разнообразие и улучшает устойчивость гибридов к биотическим и абиотическим факторам (Wan et al., 2020).

Маркер-опосредованный отбор при создании исходного материала

Одной из главных проблем в селекции растений остается совершенствование методов отбора: как более эффективно и действенно проводить селекцию и ускорять прогресс селекции, чтобы удовлетворять требованиям меняющихся климатических условий и требований рынка для сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Маркер-опосредованная селекция (marker assisted selection, MAS), применение молекулярных маркеров в практической селекции и отборе, является новой стратегией для улучшения растений. Она имеет значительные преимущества по сравнению с традиционными методами селекции. С 1990-х годов MAS привлекает все большее внимание и широко используется в различных видах сельскохозяйственных культур. В маркер-опосредованной селекции различают несколько типов применения маркеров в селекционном процессе, включая маркерную селекцию (MAS), маркерное беккроссирование (MABC), пирамидирование генов (MAGP), рекомбинантную селекцию (MARS) и полногеномную селекцию (GWS).

В селекции рапса молекулярные маркеры применяются на всех этапах селекционного процесса.

Селекция современных F1 гибридов строится на использовании цитоплазматической мужской стерильности и соответствующего ей генов-восстановителей фертильности. Разработано ряд молекулярных маркеров, определяющих различный тип цитоплазмы: **Ogura** (*Orf138R1*, *Orf138F1* (Giancola et al., 2007); *Orf138RB*, *Orf138F1* (Giancola et al., 2007); *orf138-5'*, *orf138-3'* (Motegi et al., 2003); *Og-1*, *Og-2* (Карлов, 2010); *P11*, *P12* (Zhao et al., 2010); *orfBF*, *orfBR* (Yamagishi, Glimelius, 2003); **nap** – *nap3-5* (Motegi et al., 2003); *P21*, *P22* (Zhao et al., 2010); **polima** – *P21*, *P32* (Zhao et al., 2010); *orf224R-F* (Wang et al., 2006), *pol3'-5'* (Motegi et al., 2003).

Разработаны молекулярные маркеры для идентификации генов-восстановителей фертильности для каждого типа цитоплазмы для упрощения отбора линий восстановителей фертильности. В том числе Hu et al (2008) для

типа *Ogura* был создан маркерная система *BnRfo*, включающая три пары праймера, которая позже была уточнена и улучшена Yu et al. (2016).

Молекулярные маркеры применяют и для некоторых качественных характеристик семян рапса, например, Karim et al. (2016) разработали маркеры на гены *BnFAE1.1* и *BnFAE1.2*, отвечающие за пониженное содержание эруковой кислоты (Karim et al., 2016). Молекулярный маркер позволяет более точно оценивать коллекции по этому признаку, не прибегая к лабораторной оценке и может быть применен в отдаленной гибридизации для отбора гибридов с пониженным содержанием эруковой кислоты. Помимо содержания эруковой кислоты возможно контролирование таких признаков масла как, содержание глюкозинолятов, линолевой кислоты, олеиновой кислоты (Das et al. 2002; Hu et al. 1995, 1999).

В настоящее время ведётся работа по созданию и усовершенствованию молекулярных маркеров, нацеленных на различные группы признаков – устойчивость к абиотическим факторам (раннее цветение, зимостойкость и холодостойкость, высота растений и др.) (Kole et al. 2002), устойчивость к биотическим факторам (болезни и вредители рапса), а также к ряд других факторов (цвет семян (желтосемянность), цвет лепестков и др.) (Ferreira et al, 1995; Snowdown et al., 2004).

Гетерозис

Гетерозис, или гибридная сила, проявляется в улучшении хозяйственно ценных признаков у потомства от скрещивания двух генетически различных родительских линий. В селекции рапса (*Brassica napus*) гетерозис используется для повышения урожайности, устойчивости к болезням и адаптивности.

Гетерозис обусловлен физиологической сбалансированностью процессов обмена веществ, которая достигается за счет гетерозиготности аллелей в гибридах F1. Основные гипотезы, объясняющие гетерозис, включают:

Гипотеза доминирования: Гетерозис возникает из-за комплементарного действия доминантных аллелей от двух родительских линий, маскирующих рецессивные неблагоприятные аллели (Shull, 1914; Jones, 1917).

Гипотеза сверхдоминирования: Некоторые локусы в гетерозиготном состоянии обеспечивают более высокую фитнес, чем гомозиготные состояния (East, 1936; Labroo et al., 2021).

Гипотеза генетического баланса: Гетерозис связан с оптимальным взаимодействием множества генов, регулирующих метаболические пути (Labroo et al., 2021).

В *Brassica napus* гетерозис проявляется в увеличении урожайности семян (до 30–50%), массы семян, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам и улучшении качества масла (Radoev et al., 2008).

Уровень гетерозиса зависит от множества факторов, включая генетическое разнообразие (ГР), репродуктивные характеристики родительских линий, адаптивность, изучаемые признаки и условия окружающей среды (Singh et al., 2019). *Brassica napus*, как частично перекрестноопыляемый вид, демонстрирует значительный гетеротический потенциал по сравнению с самоопыляемыми культурами, такими как пшеница или рис. Однако генетическое разнообразие само по себе не всегда гарантирует высокий уровень гетерозиса, так как ключевую роль играют специфические комбинации аллелей, обеспечивающие комплементарность (Каерплер, 2012). CMS-системы, такие как *Ogura* и *Moricandia*, усиливают гетерозис за счет исключения самоопыления и использования генов-восстановителей фертильности (*Rf*) для создания продуктивных гибридов (Chen & Liu, 2014).

Скрещивание полуозимых и яровых типов рапса продемонстрировало значительный гетерозис по урожайности семян (Qian et al., 2007).

Комбинация зимних и полуозимых типов также показала улучшение урожайных характеристик (Qian et al., 2009).

Скрещивание озимых и ресинтезированных линий (*B. napus*, полученных путем искусственного скрещивания *B. rapa* и *B. oleracea* для увеличения генетического разнообразия) выявило гетерозис на уровне 30% по урожайности семян и 0,7% по массе семян (Radoev et al., 2008).

Интрогрессия геномных компонентов *B. oleracea* в *B. napus* усилила гетеротический потенциал, что подтверждено положительными корреляциями между интрогрессированными генами и урожайностью (Li et al., 2014).

Ресинтезированные линии, созданные для введения новых аллелей, повышают генетическое разнообразие и способствуют гетерозису за счет включения ценных признаков, таких как устойчивость к болезням или повышенная масличность (Girke et al., 2012).

2. Материалы и методы

Растительный материал

Для интрогрессии генов устойчивости к киле, а также гена восстановителя фертильности *Rfo* в *B. napus* в качестве донора/источника использовали отдаленный гибрид *Brassicoraphanus* ($2n=18(36)$, CR), полученный в результате гибридизации капусты белокочанной F1 Килатон ($2n=18$, CC) – с цитоплазмой типа *Ogura*, источник генов устойчивости к киле и настоящей мучнистой росе и инбредной линии дайкона Да8 ($2n=18$, RR) – донор гена-восстановителя фертильности *Rfo* и гена устойчивости к киле.

ЦМС линии – М8мс, 1мс, (Дж х М) ки1мс, ИНВ300мс, Дждг1мс – с низким содержанием эруковой кислоты и глюкозинолятов.

Источник гена-восстановителя фертильности – *Brassicoraphanus*.

Источники генов устойчивости к киле – *Brassicoraphanus*, 1мс.

Коллекция рапса с устойчивостью к имидазолинонам - инбредные линии и гибриды - Кл F1, ЭМ F1, РО021, РО023, РЯ045, РЯ008, РЯ009, РЯ015, РЯ036, РЯ023, РЯ006, РЯ016, РЯ018, РО030, РЯ025, РЯ010, РО026.

В качестве материнских компонентов гибридизации и беккрасса использовали стерильные растения 1мс, Дждг1мс, (Дж х М) мс1 с типом цитоплазмы *Ogura*; линии с толерантностью гербицидам группы к имидазолинонам: ИНВ300, РЯ016.

Образцы были предоставлены ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева».

Исследования проведены в условиях открытого, защищенного грунта и в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Условия выращивания

Выращивание растений осуществляли рассадным способом, ручной посев - в рассадные кассеты (64 ячейки, размер одной ячейки 50х50х60 мм) с торфяным субстратом (Агробалт С: N-150 мг/л, P-150 мг/л, K-250 мг/л + микроэлементы, pH 5,5 - 6,5), подкормки проводили минеральным удобрением

«Акварин 14-14-14» и аммиачной селитрой. Орошение ювенильных растений проводили по мере необходимости.

Высадку рассады в открытый грунт проводили при появлении третьего-четвертого настоящего листа, с отрастанием корневой системы из дна кассеты. Уход за растениями в открытом грунте был следующим: подкормки азофоской, полив.

Для проведения гибридизации в зимне-весенние периоды растения выращивали через рассаду в 64-ячеистые кассетах с торфяным субстратом (Агробалт С: N-150 мг/л, P-150 мг/л, K-250 мг/л + микроэлементы, pH 5,5 - 6,5), далее пересаживали в горшки 0,5 л и по мере роста в горшки 3-4 л с тем же торфяным субстратом. Высадку растений для проведения гибридизации в защищенный грунт осуществляли по схеме 70+15+15 см. Растения выращивали в условиях теплицы при 22 ± 5 °C при естественном освещении и своевременными поливами.

Уборку проводили ручным способом при достижении полной зрелости нижних стручков в соцветии. Семенники дозаривали в условиях пленочной теплицы три дня. Обмолот семян проводили вручную.

Погодно-климатические условия проведения полевых испытаний

Почвы опытного участка представлены высококультурными дерново-подзолистыми тяжелыми суглинками с растянутым содержанием гумуса и низким залеганием подзолистого слоя, отличаются повышенным содержанием фосфора (P_2O_5 – 540 мг/кг) и калия (K_2O – 390 мг/кг почвы), и низким содержанием азота (N – 140 мг/ кг).

В период проведения стационарного испытания F1-гибридных комбинаций, согласно данным метеорологической обсерватории имени В.А. Михельсона РГАУ-МСХА, среднесуточная температура воздуха в весенне-летний период 2023 г. в среднем была на 3 °C выше средне многолетней, а в 2024 году превышение было на 4°C по сравнению с средне многолетней (рис. 4).

В ночное время суток наблюдалось существенное понижение температуры воздуха. Так в 2023 году средняя температура воздуха в период I декады июня по третью декаду в ночное время составляла 14,6°C, а в 2024 году, в этот же период, была 14,2°C. Средние максимальные перепады температур в 2023 году составили 10°C, а в 2024 году – 10,5°C (рис.4).

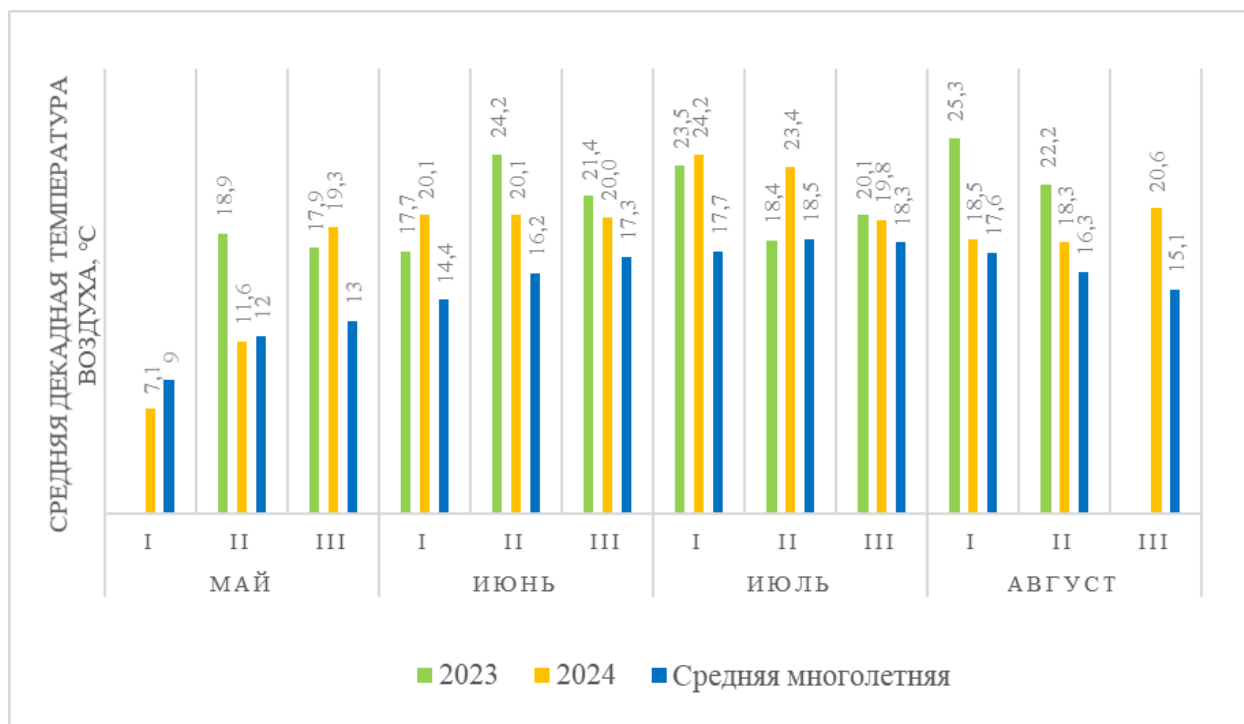


Рисунок 4 - Средняя декадная температура воздуха за период вегетации 2023-2024 гг., °C (по данным метеостанции имени В.А. Михельсона, Москва)

Максимальная температура за весенне-летний период в 2023 году отмечались в первой декаде августа – 31,9°C, также в июле было 10 дней с температурой выше 25°C. В 2024 году максимальное количество дней с температурой выше 25°C в июле было 24, самая высокая температура за период вегетации отпечаталась в августе -33,2°C.

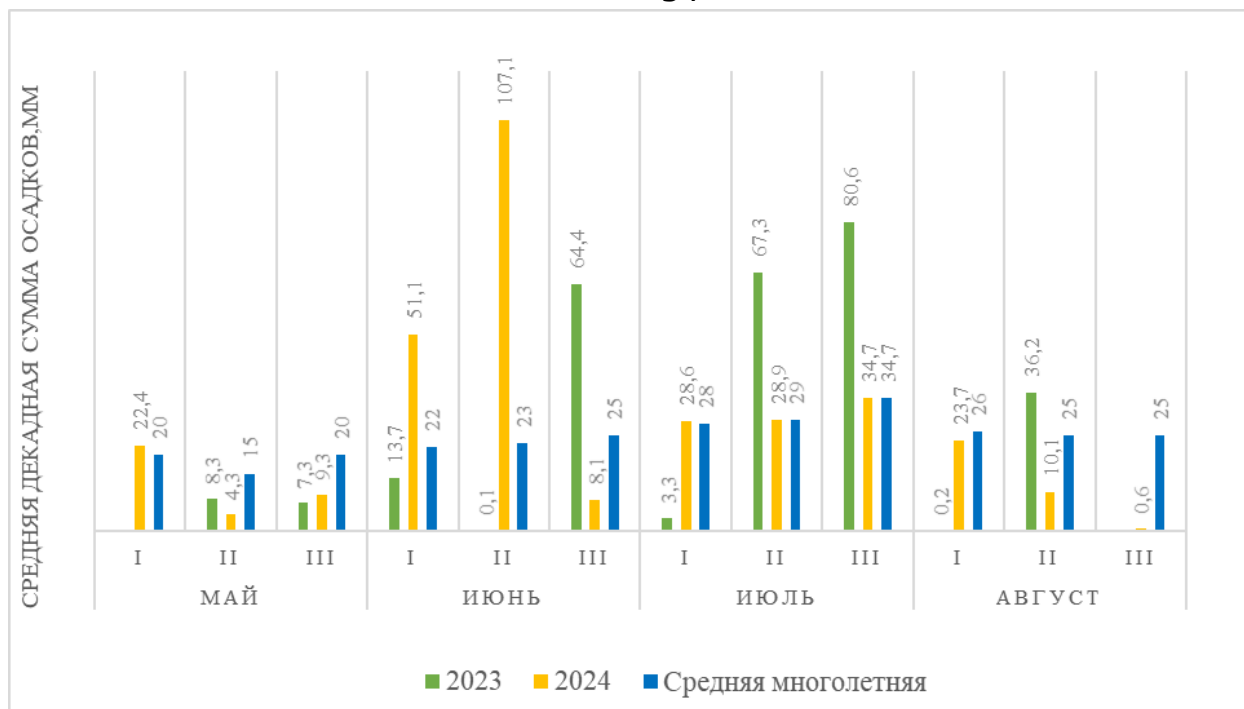


Рисунок 5– Сумма осадков по декадам за период вегетации 2023-2024 гг., мм (по данным метеостанции имени В.А. Михельсона, Москва)

Количество осадков в период I декады июня по I сентября в 2023 году составило 281,4 мм, а в 2024 году – 328,3 мм (рис. 5). Количество осадков в конце августа – начале сентября было существенно ниже по сравнению с средними многолетними данными. ГТК по Селянинову в 2023 и 2024 годах года был равен 1,4, что характеризует регион как зону избыточного увлажнения. Но следует отметить, что в осадки распределись по месяцам не равномерно (рис.5), часто с избыточным увлажнением в первые декады июня и засухой в июле и августе, что приводило к недостаточному набору вегетативной массы в июне и раннему осыпанию нижних стручков в соцветии.

Методика исследований

Гибридизация

Гибридизацию проводили в условиях защищенного грунта в рассадной стеллажной теплице или в неотапливаемой грунтовой теплице.

Гибридизацию всегда проводили с ЦМС линией для контроля наследования гена-восстановителя фертильности. Опыление проводили в утренние часы (с 8.00 до 12.00) в цветках. Пыльцу отцовского растения переносили на рыльце материнского растения либо с помощью кисточки, либо непосредственно срывая цветок и удаляя лепестки. Каждую комбинацию скрещивания отмечали навешиванием этикетки, соцветия оставляли на растении до полного созревания или через необходимое число дней после опыления (ДПО) для технологии спасения зародышей. Семена собирали при достижении полной зрелости (сухой стручок, желтоватого цвета) примерно через 50-60 ДПО. Семена фасовали в индивидуальные бумажные пакеты с отметкой о комбинации скрещивания.

Спасение зародышей, культура изолированных семязачатков/зародышей

Спасение зародышей осуществляли в культуре изолированных семязачатков по Монахос, Богданова (2014).

Технологию спасения зародышей применяли при межродовой гибридизации *Brassica napus* x *Brassicoraphanus*. Материнские растения выращивали в условиях защищенного грунта. Опыление проводили с изоляцией с помощью бумажных пакетов. Опыление проводилось в цветках свежесобранной пылью *Brassicoraphanus*. Часть соцветий оставляли на растении в качестве контроля.

От материнского растения на 10-20 день после опыления (ДПО) отделяли соцветия с стручками. Отделение стручков проводили в лаборатории. Для стерилизации помещали стручки в 2 % раствор гипохлорита натрия (NaOCl) с 2 каплями Tween 20 и стерилизовали их в течение 10 мин. Далее их три раза промывали в стерильной дистиллированной воде с

экспозицией 1, 5 и 10 мин. Стручки вскрывали острым скальпелем и извлекали семязачатки. Предварительно сделав надрез на семязачатках, их помещали в жидкую питательную среду MS (Murashige and Skoog, 1962), содержащую 80 г/л сахарозы и 400 мг/л гидролизата казеина (приложение А).

Чашки Петри инкубировали на шейкере (Excella E24) при постоянном покачивании 75 об/мин. и 25 °С. После появления зародышей их доращивали в тех же условиях (по необходимости пересаживали на свежую питательную среду) до семядольной стадии. Дороженные зародыши пересаживали на твердую питательную среду B5 (Gamborg et al., 1968) содержащую 20 г/л сахарозы и 8 г/л агара (приложение 1). Инкубировали зародыши при 25 °С с 16 час. фотопериодом в климакамере до укоренения и развития 2-3 настоящих листьев.

Растения извлекали из контейнеров, корни тщательно отмывали от питательной среды, укорачивали на 2/3 длины, далее их высаживали в торфяной субстрат на адаптацию и укоренение. Адаптацию растений проводили в теплице, в течение первой недели культивирования их накрывали пластиковыми контейнерами для поддержания высокой влажности. Через 3 дня культивирования контейнеры приподнимали и через 7 дней от высадки их полностью удаляли. Далее адаптированные и укорененные растения культивировали в обычных условиях.

Цитологический анализ - подсчет числа хромосом микроскопированием

Подсчет числа хромосом для определения гибридного происхождения потомства, а также наблюдение за выравниваем числа хромосом при последующих беккроссах проводили с помощью метода «Steam Drop» (Kirov et al., 2014) с модификациями.

Пробоподготовка

Для анализа отбирали молодые корешки и бутоны размером от 2,5 мм до 4 мм. Материал фиксировали с помощью свежеприготовленного фиксатора Карнуа 3:1 (3 части 96% этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) в

пробирках на 1,5 мл. Отобранный материал хранили при +4°C в холодильнике не менее 8 часов перед приготовлением препаратов или 2 часа при комнатной температуре. Фиксатор заменяли по мере необходимости до достижения полной прозрачности раствора и обесцвечивания материала.

Приготовление препаратов из меристематических клеток корней

Зафиксированный материал промывали в проточной воде в течение 15 мин или 30 мин в 100 мл воды в стеклянном стакане.

Отделяли апикальную меристему и помещали ее в пробирки типа Eppendorf, содержащие 30 мкл раствора смеси ферментов (13,5 Е/мл пектиназы и 80 Е/мл целлюлазы) в цитратном буфере (21,01 г/л лимонная кислота, 29,41 г/л цитрат натрия и дистиллированная вода в пропорции 23:27:50) (Пухальский с соавт., 2007). Пробирки инкубировали при 37 °С в течение 100-120 мин. на водяной бане WB-4MS (Biosan). После термической обработки ткани мацерировали встряхиванием пробирок на вортексе.

Приготовление препаратов микроспор из пыльников

Материал отмывали аналогично. Далее предварительно отбирали бутоны, определяя стадию развития делящихся клеток пыльников ацетокарминовым способом.

Измеряли бутоны с помощью штангенциркуля и располагали бутоны ранжировано на предметном стекле в капле воды или цитратного буфера для предотвращения высыхания. Далее извлекали по 1 пыльнику из каждого бутона, раскладывали их на новом предметном стекле согласно положению бутонов, на первом, добавляли каплю 1 % раствора ацетокармина, накрывали покровным стеклом и микроскопировали при увеличении 100 - 200× (Zeiss Axioskop 40). Пыльники, содержащие делящиеся клетки на стадиях метафазы и анафазы извлекали из соответствующих бутонов. Помещали их в пробирки, содержащие 30 мкл раствора смеси ферментов, и инкубировали 15 минут. Далее препаровальной иглой измельчали пыльники и инкубировали дополнительно 30-60 мин.

Приготовление суспензии клеток из меристематических тканей корней и из пыльников проводили единообразно. Мацерированный ферментами материал встряхивали на Vortex, добавляли 600 мкл дистиллированной воды и центрифугировали 45 сек при 10000 rpm (Eppendorf minispin). Сливали супернатант, к осадку добавляли 600 мкл 96% этанола, перемешивали и центрифугировали 30 сек при 11000 rpm. Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 30 мкл 96% этанола. Смесь хранили в холодильнике при +4°C до двух недель, далее перекладывали на хранение в морозильную камеру на -20°C.

Из суспензии клеток готовили постоянные препараты. На предварительно обезжиренное 70% этанолом предметное стекло помещали 10 мкл суспензии клеток. При появлении обнажившихся клеток в подсохшую каплю добавляли 20 мкл свежеприготовленного фиксатора 3:1. Спустя 15 сек стекла стороной с зафиксированной суспензией клеток выдерживали над паром водяной бани разогретой до 55 °C в течение 5 сек. Готовые препараты подсушивали и окрашивали в течение 20 мин в 4% водном растворе Гимза. После окрашивания препараты ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали и микроскопировали при увеличении 630× (Zeiss Axioskop 40) с масляной иммерсией.

Оценка морфологических признаков

Для определения гибридного происхождения проводили оценку с учетом следующих морфологических признаков: форма, рассеченность, наличие/отсутствие опушения, цвет и наличие/отсутствие воскового налета листовой пластинки, форма, цвет и размер лепестков цветка, наличие/отсутствие антоциановой окраски в узлах, в зоне гипокотилия и венчика цветка, фертильность пыльцы.

Оценка фертильности пыльцы

Фертильность пыльцы определяли наглядно по наличию или отсутствию видимой пыльцы, а также с помощью ацетокарминового метода (Пухальский с соавт., 2007). Из бутонов за 1-2 дня до распускания извлекали

пыльники, раздавливали в капле воды и добавляли 20 мкл 1% раствора ацетокармина (1 г кармина и 45 мл ледяной уксусной кислоты на 100 мл раствора), накрывали покровным стеклом. Для лучшего проникновения ацетокармина нагревали препараты при 45°C до момента тайного кипения. Препараты рассматривали с помощью микроскопа Zeiss Axioskop 40 при увеличении 400х. Подсчет пыльцевых зерен осуществляли в 3-х полях зрения микроскопа. Долю фертильных пыльцевых зерен определяли, как отношение пыльцевых зерен с яркоокрашенной цитоплазмой к общему числу видимых зерен. Фотографии препаратов выполняли с помощью камеры Axio 208 и системы прижизненного наблюдения Celena X и программного обеспечения ImageView.

Оценка хозяйственно-ценных признаков

Масличность

Масличность семян определяли в центре коллективного пользования РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Для определения содержания сырого жира использовали экстракционный метод (ГОСТ 10857-64) в модификации авторов. Методика анализа была адаптирована под меньший объем семян, в частности для проведения анализа вместо 40 грамм семян использовали навеску 0,6 грамм. Анализ проводили в двух повторностях. Навеску семян переносили в фарфоровую чашку и подсушивали в сушильном шкафу при температуре 100-105 °C 1 час. После чего семена тщательно измельчали в гомогенизаторе (Tissue Lyser II), трехкратно экстрагировали 3 мл гексана, последовательно гомогенизируя и центрифугируя пробу. Полученные экстракты переносили в чистую круглодонную колбу, предварительно высушенную в сушильном шкафу в течение 1 часа при 100-105 °C и взвешенную после охлаждения. Из полученного экстракта на роторном испарителе (Hei-VAP Ultimate Control ML/G3B XL) отгоняли гексан и сушили колбу с оставшимся маслом в сушильном шкафу при температуре 100-105 °C до постоянной массы.

Содержание жира в освобожденных от сора и подсушенных семенах в процентах вычисляли по формуле (1):

$$x = \frac{((m_1 - m_2) * 100)}{m_2}, \quad (1)$$

где m - масса колбы с маслом, г; m_1 - масса пустой колбы, г; m_2 - навеска подсушенных семян, г.

Содержание протеинов

Определение содержания протеина в масле рапса проводили по классическому методу Кьельдаля, который основан на последовательном выполнении трех ключевых стадий: минерализации образца, дистилляции аммиака и его последующего титрования. Метод позволяет количественно определить содержание азота в пробе с последующим пересчетом на белок с использованием стандартного коэффициента 6,25 для растительных материалов.

Для проведения анализа применяли автоматизированный анализатор азота Напоп K1100F, оснащенный дигестором НУР-308, что обеспечивает высокую точность и воспроизводимость результатов. В качестве вспомогательного оборудования используют аналитические весы с точностью взвешивания $\pm 0,0001$ г, вытяжной шкаф для работы с агрессивными реактивами, а также стандартный набор лабораторной посуды - термостойкие пробирки, мерные колбы и конические колбы.

Пробоподготовку начинали с точного взвешивания навески исследуемого образца массой до 0,5 г. В каждую пробирку добавляют каталитическую смесь на основе сульфата меди и сульфата калия, что обеспечивает эффективное окисление органического материала при последующей минерализации. Обязательным условием является проведение холостой пробы для контроля чистоты используемых реактивов и оборудования.

Процесс минерализации осуществляли в два температурных этапа: сначала при 280°C в течение 20 минут, затем при 420°C в течение 40 минут. Такие условия обеспечивают полное разложение органического вещества и

перевод азота в форму сульфата аммония. После завершения минерализации пробы охлаждают до комнатной температуры.

На этапе дистилляции и титрования используют автоматизированную систему анализатора, которая последовательно выполняет все необходимые операции: разбавление пробы, добавление щелочи для высвобождения аммиака, его отгонку с паром и последующее титрование стандартным раствором серной кислоты. Концентрацию титранта устанавливали равной 0,1 моль/л, что является оптимальным для данного типа анализа.

Расчет содержания азота проводили по разнице объемов титранта, пошедшего на анализ пробы и холостого опыта. Полученное значение пересчитывают на содержание протеина с использованием стандартного коэффициента 6,25. Для пересчета результатов на абсолютно сухое вещество учитывают содержание влаги в исходном образце.

Оценка жирно-кислотного состава масла

Определение качественного состава масла проводили в соответствии с методикой, описанной в ГОСТ 30418-96, в модификации авторов. Анализ проводили в двух повторностях. Методика анализа была адаптирована под меньший объем образцов, для проведения анализа использовали навеску семян 50 мг. Навеску переносили в пробирку на 1,5 мл, измельчали в гомогенизаторе (Tissue Lyser II) с помощью металлических шариков. После чего в пробирку вносили 1 мл гексана и 150 мкл метилата натрия, последовательно гомогенизируя и центрифугируя пробу. Образующуюся надосадочную часть фильтровали в пробирку через бумажный фильтр, обмывают бумажный фильтр 2 мл гексана. Полученную пробу снимали на газовом хроматографе Shimadzu Nexis GC-2030AF с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Колонка: Omegawax 250, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм, температура испарителя 250 °С, с делением потока, коэффициент деления 50:1, газ-носитель: азот, температура колонки: 60 °С, далее градиент 20 °С в минуту до 170 °С и далее градиент 2 °С в минуту до 260 °С. Температура ПИД: 260 °С, водород. Объем пробы: 1 мкл, время анализа: 45

минут. Идентификацию сигналов на хроматограммах осуществляли сопоставлением времен удерживания компонентов экстрактов и стандартных образцов (CRM47885, Supelco).

Семенная продуктивность

Семена обмолачивали в общую тару с одной повторности. Для оценки семенной продуктивности была измерена масса семян, обмолоченных с одной повторности и делили на количество растений в повторности. После этого вычисления проводились по формуле (2):

$$\text{СП(г/раст)} = \frac{m}{i}, \quad (2)$$

где СП – семенная продуктивность, г/раст.

m – масса всех семян, г

i – число растений в повторности, шт.

Масса 1000 семян

Масса 1000 семян (МТС) — показатель крупности и выполненности воздушно-сухих семян, выраженный в граммах, важный сельскохозяйственный показатель. Масса тысячи семян различна для разных культур, в пределах одной культуры также может сильно варьировать по генотипам.

Измерения проводили согласно ГОСТ 12042-80 от 2011 года «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян». Семена основной культуры тщательно перемешивают, отсчитывают без выбора две пробы по 500 шт. и взвешивают их до сотой доли грамма. Если для отсчета проб не хватает семян из одной навески, используют вторую навеску, а при необходимости отбирают третью навеску и выделяют из нее семена основной культуры. Массу 1000 семян рапса определяют по обмолоченным семенам.

Оценка устойчивости к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.)

Для оценки устойчивости к киле проводили испытания на искусственном инфекционном фоне с применением модифицированного пипеточного метода (Voorrips, Visser, 1993; Монахос, Монахос, 2009). Галлы с нескольких восприимчивых растений, хранившиеся в холодильной камере при температуре – 18 °С, измельчали до гомогенного состояния и разводили массу в воде для получения клеточной суспензии спор, далее ее фильтровали через четырехслойную марлю и определяли концентрацию спор с использованием камеры Горяева. Суспензию разводили в чистой водопроводной воде до рабочей концентрации 10^6 спор/мл. В ячейки кассет с 4 - 5 дневными сеянцами добавляли 5 мл рабочей суспензии инокулюма в торфяную смесь.



Рисунок 6 – Шкала симптомов поражения килей по Buckzacki et al., 1975: 0 баллов – нет поражения, 1 – балл – некрупные галлы на боковых корнях, 2 балла – сильное поражение боковых корней и слабое главного корня, 3 балла – сильное поражение главного и боковых корней (фото автора).

Индекс расового состава использованной полевой популяции патогена в соответствии с реакцией европейских сортов-дифференциаторов – 16/11/31 (по данным Монахос С.Г. 2015). Через 40 дней после заражения отмывали в воде корневую систему каждого растения и проводили оценку реакции

устойчивости/восприимчивости по четырехбалльной шкале (Buczacki et al., 1975) (рис.6).

Растения с 0 - 1 баллом оценивали, как устойчивые, растения с 2 - 3 баллами - восприимчивые. Статистическую обработку данных генетического анализа проводили с использованием критерия χ^2 .

Оценка устойчивости к настоящей мучнистой росе (возбудитель *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell)

Исследование проводилось в контролируемых тепличных условиях с использованием искусственного инфекционного фона для обеспечения равномерного заражения патогеном *Erysiphe cruciferarum*. Для создания инфекционного фона применяли метод искусственных распространителей: в центре опытных делянок размещали восприимчивые растения гибрида Джаз с активным спороношением на поверхности растения. Температура в теплице поддерживалась на уровне 20–25°C, а относительная влажность — 60–70%, что соответствует оптимальным условиям для развития мучнистой росы (Saharan et al., 2019; Runno-Paurson E. et al., 2021). Циркуляция воздуха, обеспечиваемая вентиляционной системой, способствовала равномерному распределению конидий гриба между исследуемыми образцами, что является стандартной практикой для исследований биотических стрессов у крестоцветных (Meena et al., 2010).

Степень поражения оценивалась с использованием балльной шкалы, адаптированной на основе методик, описанных в литературе (Sharma et al., 2018):

0 баллов: отсутствие симптомов или поражение менее 25% площади листовой поверхности;

1 балл: поражение 25–50% площади листа;

2 балла: поражение 50–75% площади листа;

3 балла: поражение 75–100% площади листа (полное поражение листовой пластины).

Оценка проводилась на нижних (старых) листьях в фазу стеблевания–цветения, что соответствует периоду максимальной восприимчивости рапса к *Erysiphe cruciferarum* (Meena et al., 2010). При интенсивном развитии болезни дополнительно фиксировались следующие параметры:

- поражение побегов и стручков;
- наличие спороношения (интенсивность образования конидий);
- реакция гиперчувствительности (РГ) у устойчивых форм, проявляющаяся в виде локального хлороза или некроза в местах проникновения гиф гриба, что указывает на активацию защитных механизмов (Kliebenstein et al., 2006).

Для повышения точности визуальной оценки использовались стереомикроскопы (увеличение 10–40×), что позволяло дифференцировать ранние стадии заражения от вторичных симптомов.

Для сравнительного анализа использовали следующие контрольные образцы:

Устойчивый стандарт: межродовой гибрид *Brassicoraphanus*, идентифицированный как источник генов устойчивости к *Erysiphe cruciferarum*.

Восприимчивый гибрид рапса Джаз' характеризующиеся высокой чувствительностью к мучнистой росе, что подтверждено в полевых испытаниях.

Технология создания удвоенных гаплоидов

Посев и выращивание второго беккроссного потомства весной 2023 года для получения линий удвоенных гаплоидов проводили по общепринятой методике. Растения выращивали в рассадной теплице, рассаду в 64-ячеистых кассетах, далее пересаживали в 3- и 5-литровые горшки. Грунт – Агробалт (С: N-150 мг/л, P-150 мг/л, K-250 мг/л + микроэлементы, pH 5,5 - 6,5). Полив проводили по мере необходимости. Средняя температура в теплице в период выращивания растений поддерживалась около 10-15°C. Отбор бутонов проводили с растений, начинающий цвести, минимум один раскрытый бутон

на соцветии. Бутоны отбирали от 2 до 6 мм или целым соцветием, отдельно по каждому генотипу. Для сохранения тургора и для большей сохранности бутонов использовали хладогены, завернутые в бумажные полотенца.

Для отбора бутонов, содержащих микроспоры в поздней одноядерной стадии развития, проводили цитологический анализ каждого индивидуального растения. У отобранных бутонов измеряли их длину штангенциркулем, ранжированно по размеру раскладывали на предметном стекле. Из каждого бутона извлекали по одному пыльнику. На чистом предметном стекле в 10 мкл дистиллированной воды препаровальной иглой надавливанием извлекали микроспоры/пыльцу, удаляли ткани пыльника. Добавляли 10 мкл красителя DAPI (1,5 мг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндол растворяли в воде, разбавляли до 2,5 мкг/мл буфером (10 mM Трис-HCl, 10 mM спермин-тетрагидрохлорид, 10 mM NaCl и 200 mM гексилеугликоль), 1 % тритон X100, смесь разбавляли 1:1 глицерином) и накрывали покровным стеклом. Препараты анализировали через 10 мин на микроскопе с флуоресценцией (Zeiss Axio Lab A1).

В теплице с растений-доноров отбирали бутоны установленного для каждого генотипа размера и транспортировали их при 4 °C в лабораторию. Изолировали и культивировали микроспоры по Custers et al. (2003). Бутоны помещали в 2 % охлажденный раствор гипохлорита натрия (NaOCl) с 2 каплями Tween 20 и стерилизовали в течение 10 мин их в ламинарном боксе. Далее материал три раза промывали в охлажденной стерильной дистиллированной воде с экспозицией 1, 4 и 10 мин. Материал помещали в контейнеры и гомогенизировали поршнем в 2 мл охлажденной питательной среды B5 (приложение 1), содержащей 130 г/л сахарозы и 50 г/л маннитола. Суспензию фильтровали через двуслойный нейлоновый фильтр с диаметром ячейки 41 мкм в 15 мл центрифужные пробирки и доводили той же питательной средой до 10 мл. Центрифугировали отфильтрованную суспензию в центрифуге (Eppendorf centrifuge 5702 R) при 4 °C в течение 4 мин при 800 rpm. Сливали супернатант, к осадку добавляли 10 мл свежей питательной среды и центрифугировали как раньше. Процедуру отмывки

повторяли еще один раз. После 3-го центрифугирования осадок разбавляли в 2 мл питательной среды NLN-13 (Lichter, 1982) (приложение Б). Концентрацию суспензии микроспор определяли путем микроскопирования в камере Фукса-Розенталя. Доводили исходную суспензию средой NLN-13 до плотности 4×10^4 клеток/мл. Разливали ее по 10 мл в чашки Петри Ø 90 мм, добавляли 200 мкл 1 % водной суспензии активированного угля и инкубировали в темноте при 32 °C в течение 48 часов. Далее материал извлекали из термостата и культивировали в темноте при 25 °C до появления эмбриоидов. После появления эмбриоидов их культивировали на шейкере при 50 об. /мин и 25 °C на свету до семядольной стадии. Для проращивания эмбриоидов культивировали их на твердой питательной среде В5, содержащей 25 г/л сахарозы и 11 г/л агара при 25 °C с 16 часовым фотопериодом. Укоренившиеся растения в фазе 2-3 настоящих листьев адаптировали в защищенном грунте.

Молекулярные исследования

Выделение ДНК. Общую ДНК выделяли из молодых листьев каждого растения методом СТАВ (Murray and Thompson, 1980) с небольшими модификациями. В 1,5 мл пробирки типа Eppendorf помещали ≈ 10 мкг ткани молодых листьев. Пробирки замораживали посредством жидкого азота и гомогенизировали с помощью стальных шариков в Qiagen TissueLyser II 10 сек. Далее шарики удаляли и добавляли 700 мкл 2% СТАВ буфера, содержащего дополнительно 100 мг РVP. В пробирку с гомогенизированным материалом инкубировали при 65 °C в течение 60 мин на термостате «Термит», встряхивая пробирки с интервалом 15 мин. Пробирки после термической обработки вскрывали и в вытяжном шкафу добавляли в них по 700 мкл хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1, встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали 10 мин 13400 rpm (Eppendorf minispin). После центрифугирования отбирали 500 мкл супернатанта в чистые пробирки, добавляли по 500 мкл изопропанола, встряхивали и центрифугировали как раньше. После центрифугирования удаляли супернатант, добавляли по 500

мкл 80 % этанола и центрифугировали 5 мин. Процедуру отмывки спиртом проводили еще раз. Открытые пробирки помещали в вакуумную установку (Eppendorf Concentration plus) для подсушивания ДНК на 15 мин при 30 °С. После испарения спирта в каждую пробирку добавляли по 100-200 мкл стерильной бидистиллированной воды и хранили при 4 °С в течение 24-48 часов перед измерением концентрации. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре (Nano Photometer P330, Implen) и доводили до 20-100 нг/мкл.

Амплификация. ЦМС

Для идентификации типа цитоплазмы (Ogura, Ogura-NWUASF, Pol, Nap) использовали мультиплексную ПЦР реакцию с пятью праймерами на три гена *orf138*, *orf222*, *orf224* (таб. 2).

Таблица 2 – Последовательность и информация о праймерах на тип цитоплазмы рапса

№	Название праймера	Последовательность 5'-3'	Целевой ген	Источник
1	P11	GAAACGGGAAGTGACAAT	orf138	Wei et al., 2005
	P12	GCATTATTTTCTCGGTCCAT		
2	P21	AGCTGTCTGGAGGGAATC	orf222	
	P22	GCGGTCTCACGCACTAATC		
3	P21	AGCTGTCTGGAGGGAATC	orf224	
	P32	ACGACATCAAGGAGGAAC		

Состав реакционной смеси для ПЦР на один образец: 50 нг тотальной ДНК, 0,5 μ M каждого праймеров, 150 μ M dNTP и 0,25 ед. Taq DNA полимеразы, общий объем смеси 10 мкл. ПЦР проводили с начальной денатурацией при 94°C в течение 2 минут, затем 35 циклов из 94°C в течение 1 мин, 54°C в течение 1 мин и 72°C в течение 2 мин и финальной элонгации при 72°C в течение 10 мин.

Ген-восстановитель фертильности. ПЦР-амплификацию молекулярного маркера на ген восстановитель фертильности *Rfo* (праймеры BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R) (Yu et al., 2016) проводили с ДНК,

выделенной СТАВ методом (Thompson and Murray, 1980). Концентрация ДНК измеряли NanoPhotometr p330 (IMPLEN, München, Германия) и доводили до рабочей концентрации 50-200 нг/мкл.

Реакционную смесь готовили по рекомендациям авторов статьи (Yu et al., 2016): 1 × ThermoPol Reaction buffer (с содержанием Mg²⁺), 200 µM dNTPs, 0.2 µM прямого праймера, 0.2 µM обратного праймера, 0.5 U of Taq DNA полимеразы, 200 нг ДНК матрицы и доводили объём водой, свободной от нуклеаз, до 10 мкл.

Амплификацию проводили по следующей программе: денатурация 95 °C 3 минуты, далее 35 циклов 95 °C -30 сек, отжиг 55 °C 30 сек, и элонгация 72 °C 45 сек; финальную элонгацию проводили при 72 °C 5 мин. ПЦР продукты разделяли с помощью агарозного геля 1,2% в 0.5 x TBE буфере и визуализировали с помощью УФ света в ChemiDoc XRS+ (BioRad, USA), фотографировали с помощью программного обеспечения Image Lab Software (BioRad).

Таблица 3 – Маркеры на ген-восстановитель фертильности Rfo

Праймеры	Последовательность	Источник
BnRFO-F1	TGGCTAGGGTTTGTGGATTCAA	Hu et al., 2008
BnRFO-R1	AGGCTTCAGAAACCCTATCTTCC	
BnRFO-F2	GTGCAATCATTTGATAGCCTTTG	
BnRFO-R2	ATCCTGTTTCAGTCATCTCATGG	
BnRFO-F3	TTCACGGGTTCTATCTGGTGG	
BnRFO-R3	AAAGCTCCAGCCCATCATCAAC	
BnRFO-AS2F	CATGCTTCGATCTCGTCCTTTA	
BnRFO-NEW-R	TACGACATTGGGCCTACATGTC	Yu et al., 2016

Устойчивость к киле

ПЦР-амплификацию молекулярных маркеров на три гена устойчивости к киле: *Cra* (праймеры GC3060R, F (Ueno et al., 2012)); *Crb* (праймеры B0902R, F (Kato et al., 2012)); *CRA_05* (праймеры Tau_cBrCR404 (Нгуен и др., 2018)) (таб. 3) проводили с ДНК, выделенной СТАВ методом (Thompson and Murray, 1980). Концентрация ДНК измеряли NanoPhotometr p330 (IMPLEN, München, Германия) и доводили до рабочей концентрации 100-200 нг/мкл.

Таблица 4 – Последовательность и информация о праймерах на гены устойчивости к киле

№	Название	Последовательность	Ген	Источник
1	GC3060	R: TTTGGGTTTCCACAAAACAGATTACTTTA F: TGCGGTGATTAAAATACAATCTATATTTTC	Cra	Ueno et al., 2012
2	B0902	R: GTTTGGAATCCGACAAATACATCCAT F: AGCCTTGCGTAAAAGCAACTAC	Crb	Kato et al., 2012
3	Tau_cBrCR404	R: TCATCGATCCAATCCGTAA F: CACGCAGTTAGAGTATCAAAGG	CRA_05	Нгуен и др., 2018

Реакционную смесь готовили по рекомендациям авторов статей: 1 × ThermoPol Reaction buffer (с содержанием Mg^{2+}), 200 μM dNTPs, 0.2 μM прямого праймера, 0.2 μM обратного праймера, 0.5 U of Taq DNA полимеразы, 200 нг ДНК матрицы и доводили объём водой, свободной от нуклеаз, до 10 мкл.

Аmplification всех маркеров проводили по одной программе: денатурация 94 °C 4 минуты, далее 30 циклов 94 °C -30 сек, отжиг 60 °C 30 сек, и элонгация 72 °C 30 сек; финальную элонгацию проводили при 72 °C 5 мин.

Визуализация продуктов амплификации

К 5 мкл амплификата добавляли 3 мкл стерильной дистиллированной воды и 2 мкл буфера с красителем Gelred (Biotium) перемешивали и осаждали (Centrifuge and vortex CM-70M-07, ELMi). Анализируемую смесь помещали в ячейку 1,5% геля агарозы в ×0,5 (TBE) буфере и проводили электрофорез (Источник питания, Эльф-8, ДНК-Технология) при 50 мА, 6 на 1 см геля, 50 Вт в течение 30-40 мин в электрофорезной камере (Helicon). Размер амплифицированных фрагментов определяли сравнением с маркером размера фрагментов ДНК «100 bp» (SibEnzyme). ПЦР продукты визуализировали с помощью УФ света в ChemiDoc XRS+ (BioRad, USA), фотографировали с помощью программного обеспечения Image Lab Software (BioRad).

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 по признакам «семенная продуктивность», «масса 1000 семян».

3. Результаты и обсуждения

Интрогрессия гена устойчивости к киле и гена-восстановителя фертильности из *Brassicoraphanus* в *Brassica napus*

3.1.1. Отдаленная гибридизация

Отдаленный амфидиплоидный гибрид *Brassicoraphanus* (CCRR, $2n=36$) был использован в качестве посредника 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 росы (из генома *CC*).

В качестве материнского реципиентного растения использовали Ogu-ЦМС линию ярового рапса (*Brassica napus*, 1мс) (приложение В (1)) (рис.7).



Рисунок 7 Внешний габитус родительских линий: *Brassica napus*, *Brassicoraphanus*, *B. napus* x *Brassicoraphanus* (слева направо)

При отдаленной гибридизации *Brassica napus* x *Brassicoraphanus* было опылено 200 ед. цветков, из них сформировалось 57 ед. завязей/стручков. 30 завязей использовали для сопровождения технологией спасения зародышей, остальные 27 оставляли для естественного созревания семян на растении (таб.5).

Таблица 5 – Результаты отдаленной гибридизации

Опыленных цветков, шт.	Завязавшихся стручков, шт.	Выполненных семян, шт.	Число отобранных стручков для эмбриокультур, шт.	Получено растений регенерантов, шт.
200	57	60	30	-

Из 30 завязей, использованных для культуры семязачатков/зародышей, с интервалом в 5 дней на 10, 15, 20 и 25 день после опыления (ДПО) всего было изолировано и инокулировано в жидкую питательную среду 177 семязачатков (таб. 6).

Таблица 6 – Сроки изолирования зародышей и зависимость выхода растений-регенерантов из семязачатков разного количества дней после опыления (ДПО)

Число семязачатков, инокулированных в жидкую питательную среду, шт.				Число спасенных зародышей, шт.
10 ДПО	15 ДПО	20 ДПО	25 ДПО	
38	111	22	15	7
Всего:		177		7

Примечание: ДПО – дней после опыления

В ходе культивирования наибольший выход зародышей наблюдался у завязей, отобранных на 15 ДПО. На 25 ДПО после опыления все зародыши в семязачатках оказывались погибшими (рис.8).

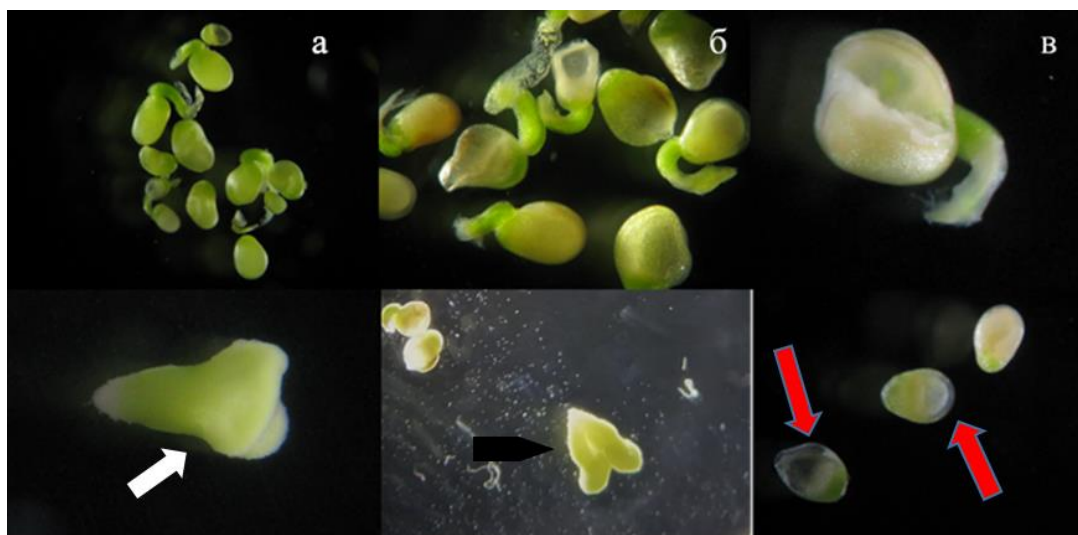


Рисунок 8 – Изолированные зародыши и семязачатки отдалённого гибрида *Brassica napus* x *Brassicoraphanus*, выделенные на а)10, б)15 и в)20 сутки после опыления. Белой стрелкой указан зародыш торпедовидной формы, черной – аномально развивающийся зародыш на 25 день культивирования, красная – пустые семязачатки.

В результате применения технологии спасения зародышей были получены 7 растений-регенерантов.



Рисунок 9 – Стручки, оставленные на материнском растении *Brassica napus* x *Brassicoraphanus*

В результате отдаленной гибридизации *Brassica napus* x *Brassicoraphanus* при естественном созревании было получено более 3-х десятков семян, из которых 16 были высеяны для оценки проявления признаков и подтверждения гибридного происхождения семенного потомства (рис.9).

Морфологический анализ выявил промежуточное проявление признаков скрещенных родительских форм *B. napus* и *Brassicoraphanus* (рис. 7), свидетельствующем о гибридном происхождении произведенного потомства.

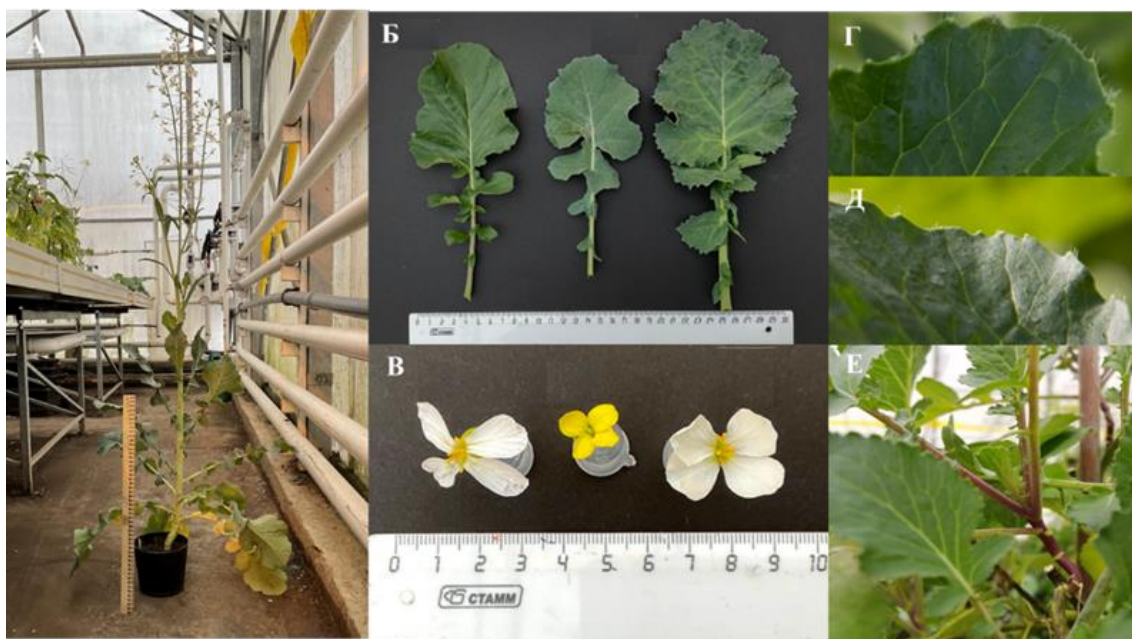


Рисунок 10 - Морфологическая характеристика отдаленного гибрида *B.napus*×*Brassicoraphanus*. а – общий габитус; б – листовая пластинка (слева направо *Brassicoraphanus*, рапса (*B.napus*) и гибрида *B.napus*×*Brassicoraphanus*); в – цветки (слева направо *Brassicoraphanus*, рапса (*B.napus*) и гибрида *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*

К наиболее примечательным относится передача белой окраски лепестков от капустно-редечного гибрида, а также передача средней интенсивности восковой налет от рапса. Стебель ортотропный, в поперечном сечении стебель – многогранный. По внешнему строению габитуса гибриды

имеют большее сходство с линией рапса, черешковые листья располагаются очередно, на цветоносном побеге листья сидячие (рис.10а). Лист простой. Форма листовой пластинки – лировидная перисто-надрезная. Форма верхушки листа – выемчатая, основания – сердцевидное. Край листовой пластинки прерывисто-бугорчатый, покрыт щетинистыми волосками. Жилкование перистое (рис.10б).

Листья верхней части побега, расположенные на цветоносе, сидячие, удлинённой формы. Листья покрыты восковым налетом. Поверхность листа бугорчатая, лист по морфологии ближе к капустному (рис.10б). Гибриды имели характерную для рапса черту: образование длинных черешковых розеточных листьев (до 35 см). Линейные размеры последующих листьев на побеге в момент перехода растения в фазу цветения уменьшались (до 15 см) (рис.10б). Часть листьев в прикорневой розетке к моменту цветения растений отмирали и опадали. Тычинок шесть, из них две на коротких тычиночных нитях в наружном круге и четыре на длинных во внешнем круге.

Таблица 7– Сравнение морфологических признаков родительских линий и отдаленного гибрида *Brassica napus* x *Brassicoraphanus*

Признак	<i>Brassica napus</i> L.	Отдаленный гибрид	<i>Brassicoraphanus</i> (BR)
Вегетативная часть			
Длина листа (см)	8.06±0.52	26.59±1.16	15.47±0.99
Ширина листа (см)	4.15±0.26	9.1±0.92	7.25±0.48
Цвет листа	Сизо-зеленая	Темно-зеленая	Ярко зеленая
Опушение	отсутствует	Редкое, по краю листа	среднее
Восковой налет	+	+	-
	(слабовыраженный)	(сильновыраженный)	отсутствует

Признак	<i>Brassica napus</i> L.	Отдаленный гибрид	<i>Brassicoraphanus</i> (BR)
Поверхность листовой пластинки	Ровная, матовая	Волнистая, матовая	Слабоволнистая, глянцевая
Генеративная часть			
Окраска лепестков венчика	Цветки желтые	Чисто белые	Белые с антоциановыми прожилками
Средний диаметр цветка (мм)	14.2±1,5	25±0.99	26.2±0.99
Средняя ширина лепестка (мм)	6.9±0.41	11.2±0.29	6.2±0.25

Примечание: с каждого растения отбирали по 10 образцов (листья, цветки).

По данным морфологического анализа 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. Общие признаки, характерные для обоих видов: соцветие простая кисть, формула цветка. Андроцей четырехсильный, гинецей паракарпный из двух сросшихся плодолистиков. Завязь верхняя. Плод – стручок, раскрывающийся двумя створками, отделяющимися от ложной перегородки снизу-вверх. Семена без эндосперма. Все растения имели белые лепестки, что согласуется с данными Нейн (1979) об одновременном

наследование гена *W1*, отвечающего за белые лепестки и гена–восстановителя фертильности *Rfo* (приложение Г) (рис.10).

Для подтверждения гибридного происхождения был проведен цитологический анализ числа хромосом в митотических и мейотических клетках. Подсчет числа хромосом в корневых меристемах межвидовых гибридов (*B. napus* × *Brassicoraphanus*) выявил варьирование $2n=30...37$ (рис.11а).

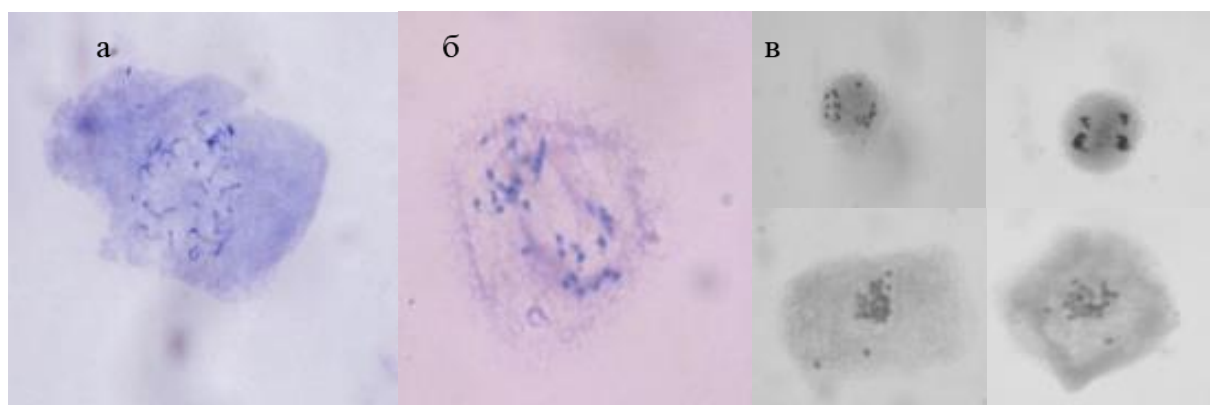


Рисунок 11 – Микрофотографии цитогенетических препаратов: а) корневой меристемы, гибрида *B.napus* x *Brassicoraphanus*, б) – мейотических клеток, в) – нарушения при мейотическом делении пыльцевых клеток.

Увеличение 630х.

В мейотических клетках наблюдается нестабильность хромосомного состава, происходящая из-за нарушений в процессе мейоза в микроспорах (рис.11б, в). На стадии метафазы I у части клеток наблюдалось отставание одной-двух хромосом или они вовсе не прикреплялись к нитям веретена деления. На стадии анафаза II также присутствовали отстающие хромосомы, из-за чего эти хромосомы вероятно элиминировались (рис. 11б, в).

Нарушения протекания мейоза в микроспорах отражалось на фертильности гибридных растений, у некоторых образцов фертильная пыльца появлялась волнообразно, стабилизация появления фертильной пыльцы происходила к концу цветения.

Цитологический анализ фертильности пыльцы показал, что из 16 межвидовых гибридов (*B. napus* × *Brassicoraphanus*) один в конце цветения

имел стабильное проявление фертильных цветков, у остальных отмечали волнообразное появление фертильной пыльцы, также отмечали наличие одновременно фертильных и стерильных цветоносных побегов на одном растении (таб.8). Фертильность пыльцы межвидовых гибридов объясняется высокими числовыми наборами конъюгирующих хромосом, позволяющими сформироваться веретену деления и пройти клеточному делению с образованием половых клеток. Фертильность межвидовых гибридов так же обусловлена действием гена-восстановителя фертильности *Rfo*.

Таблица 8 – Оценка фертильности поколений беккрасса после отдаленной гибридизации *Brassica napus* x *Brassicoraphanus*

Поколение отдаленной гибридизации	Число фертильных гибридов	Фертильность, %	Число стерильных гибридов
Отдаленный гибрид	1	2...55%	15 (полуфертильные)
BC1	5	10...75%	6
BC2	2	10...70%	4
BC3	4	30...98%	2

В дальнейших беккрассах межвидовой гибрид со стабильным проявлением фертильности использовали в качестве опылителя (рис.12).

Межвидовой гибрид *Brassica napus* x *Brassicoraphanus* (BR) беккроссировали с *Brassica napus* (приложение В (2-4)) для насыщения типичными для рапса морфологическими признаками и улучшения качества масла. Для скрещивания всегда использовали стерильные растения рапса с ЦМС типа Огуга, для контроля передачи гена-восстановителя фертильности в потомство.

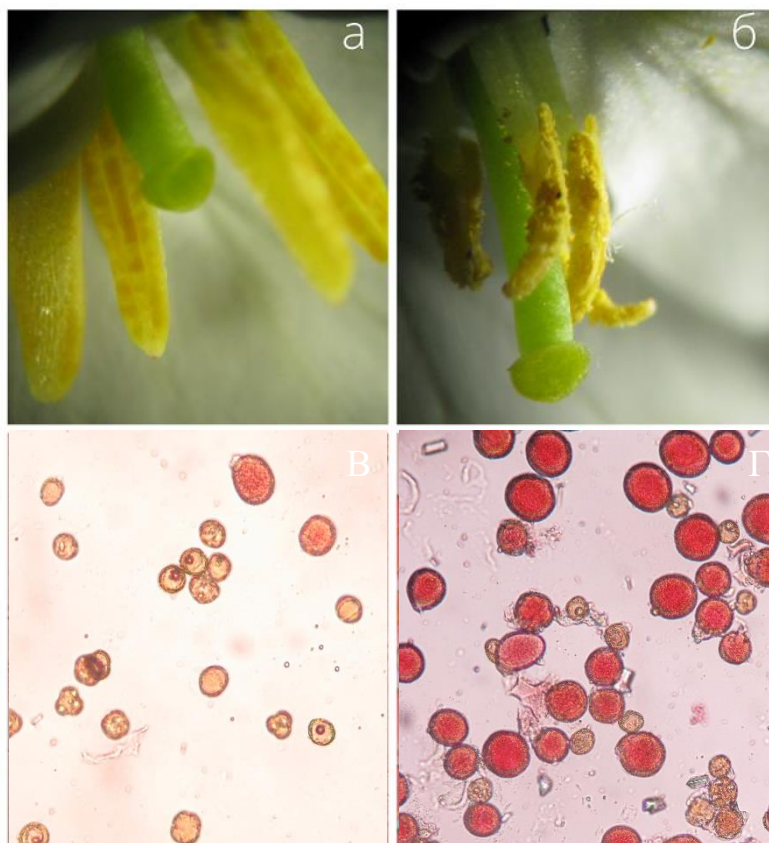


Рисунок 12 – Стерильный (а) и фертильный (б) цветки межвидового гибрида *V. napus* x *BR*, (в)- стерильная (неокрашенная) пыльца, фертильность 2%, (г) – фертильная (жизнеспособная, окрашиваемая) пыльца, фертильность -75%. Увеличение 400х

В качестве контроля фертильности на первых этапах селекционного процесса применяли метод ацетокарминового окрашивания пыльцевых зерен. Отдаленный гибрид, а также первый беккросс характеризовались низкой фертильностью (таб.8). Из 11 растений BC1 пять растений имели пыльцу, однако только два из них имело стабильное проявление фертильности ($\Phi=50-70\%$), у трех растения в начале цветения отметили наличие фертильной пыльцы, однако в конце цветения вся пыльца стала стерильной (таб.8). Фертильные цветки имели окраску от светло-лимонной до желтой, а также белую (приложение Г).

Во BC2 растения стали приобретать схожие с материнским растением рапса внешние признаки (рис.13), однако сохранялись признаки отдаленного гибрида, часть растений имела белую окраску лепестков, часть – желтую,

причем фертильные растения имели белую окраску (приложение Г). Половина растений имела фертильные цветки, но также отмечали непостоянство этого признака к концу цветения (таб.5)



Рисунок 13 – Растения ВС1 в условиях рассадной теплицы (октябрь 2021 года).

Растения ВС3 имели почти полное сходство с морфологическими признаками ярового рапса, за исключением наличия опушения первых настоящих листьев у сеянцев (рис.14) (приложение Г). Проявление фертильности стало постоянным и варьировало в диапазоне 30...98%, в качестве опылителей всегда использовали растения со стабильным проявлением фертильности.



Рисунок 14 – Растение ВС3 в грунтовой теплице (март 2023 года)

Цитологический анализ и подсчет числа хромосом установил в растениях ВС3 $2n=38$ – видовое для рапса (*B. napus*) число хромосом. Таким

образом, в результате гибридизации *B. napus* с *Brassicoraphanus* в третьем беккроссном поколении удалось отобрать растения рапса (*B. napus*).

Валидация ДНК-маркеров гена восстановителя фертильности Rfo на исследуемых образцах. Для оценки наследования гена *Rfo* помимо цитологических методов применяли молекулярные маркеры. Маркерная система, состоящая из трех пар праймеров, была разработана авторским коллективом Hu et al. (2008) на ген-восстановитель на основе референсного сиквенса редиса (Hu et al., 2008) (рис.15).

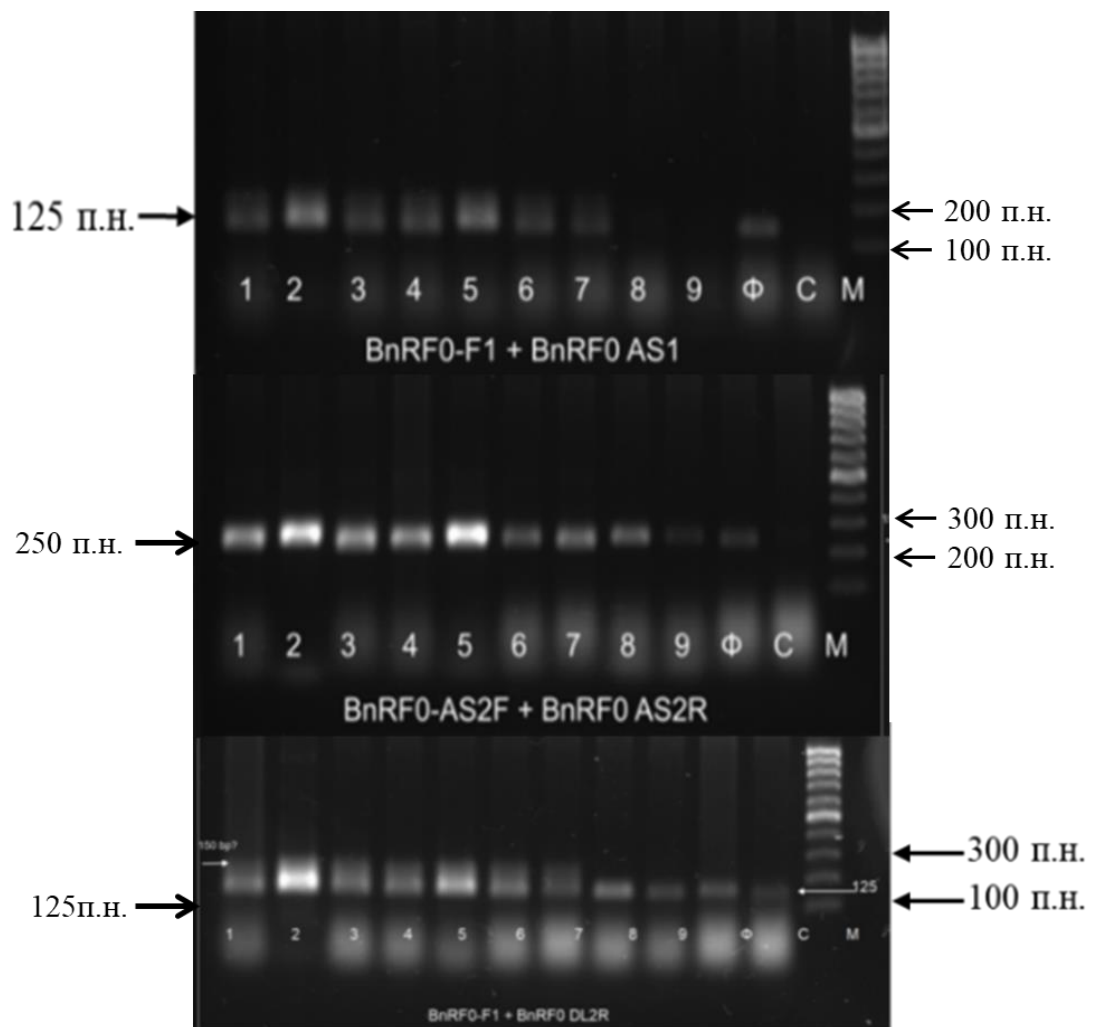


Рисунок 15 – Электрофореграмма продуктов амплификации молекулярных маркеров на ген *Rfo*, где 1-9 – растения BC2 *B. napus* x (*B. napus* x BR), Φ – стандарт линия-восстановитель фертильности, С – стандарт стерильная линия, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

Пара праймеров BnRF0-F1/BnRF0-DL2R не показывала полиморфизм для данной коллекции (рис.15). Для дальнейшей работы использовали

преимущественно пару праймеров BnRF0-AS2R/AS2F, как наиболее стабильную и демонстрирующую полиморфизм для данной коллекции.

Также была апробирована усовершенствованная версия маркера BnRF0-AS2R/AS2F (Hu et al., 2008) - BnRFO-AS2F, BnRFO-NEW-R (Yu et al., 2016) (рис.16). Данный маркер был разработан для *Brassica napus*, таким образом были получены ожидаемые ложноотрицательные результаты для редиса и линии Да8 (дайкон), несмотря на наличие ожидаемого фрагмента для *Brassicoraphanus*.

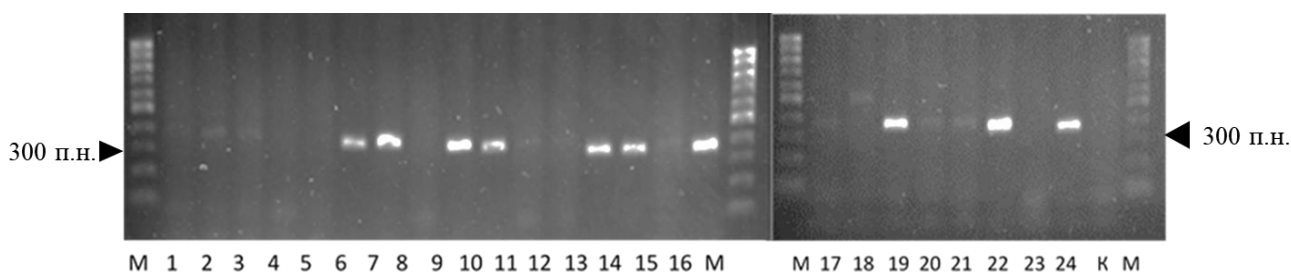


Рисунок 16 – Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R (Yu et al., 2016), где 1-5 – растения BC2 (8 бц), 6-8 - растения BC3 (8 с.о.), 9 – растения BC3 (8 бц), 10 - растения BC3 (Дж дгМС), 11-16 – растения BC3 (Дж х М)мс, 17 – F1 Килатон, 18 – Да-8, 19 - *Brassicoraphanus*, 20 – 1мс, 21 – М8мс, 22 – F1 Джаз, 23 – *Raphanus sativus*(MS), 24 – положительный контроль(рапс), К - контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

Амплификация маркера на ген *Rfo* с праймерами BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R обнаружила ожидаемые фрагменты у образцов с восстановленной фертильностью у беккроссного потомства рапса (образцы №9,10, 13,14,16 и 24), родительского компонента *Brassicoraphanus*, F1 гибрида рапса Джаз (рис.16). Результаты молекулярно-генетического скрининга растений первого и второго беккросса частично не совпадали с фенотипическими проявлениями.

Проведя молекулярно-генетический скрининг растений ВСЗ– [(Дж х М) МС х (1мс х (1мс х *BR*))] было выявлено, что все растения имеют маркер гена восстановителя фертильности (рис.17), что подтверждалось фенотипом (фертильность = 97%)

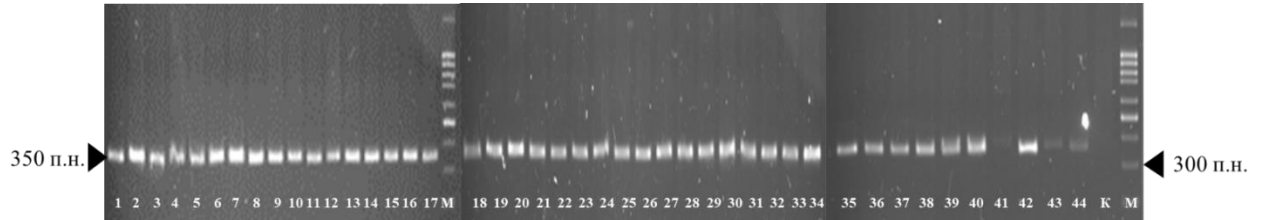


Рисунок 17 - Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров BnRFO-AS2F/BnRFOAS2-NEW-R (Yu et al., 2016), где 1-39 – растения ВСЗ [(Дж х М)МС х (В.napus х (В.napus х *BR*))], 40 – *Brassicoraphanus*, 41 – М8МС, 42 – Джаз F1, 43 – 1ф, 44 – 1мс, К – контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

По результатам отдаленной гибридизации *B. napus* с донором генов устойчивости к киле и настоящей мучнистой росы, гена-восстановителя фертильности *Rfo Brassicoraphanus* за три года были получены линии-восстановители фертильности ярового рапса с комплексом хозяйственно-ценных признаков, а также получены данные о возможности интрогрессии целевых генов путем отдаленной гибридизации.

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). Все исследованные растения показали незначительное поражение, при этом полностью устойчивых (незаражённых) растений выявлено не было (рис.18).



Рисунок 18 – Сравнение устойчивости линий *Brassica napus* к настоящей мучнистой росе (*Erysiphe cruciferarum*). Слева: восприимчивая линия МЛ12КО с выраженными симптомами заболевания (белый налёт на листьях). Справа: устойчивый образец ИНВ300дг x у3дг2 с минимальными или отсутствующими симптомами. Растения были выращены в грунтовой теплице весной 2025 года на естественном инфекционном фоне.

Средняя степень поражения составила 0–1 балл по 4-х балльной шкале, что соответствует поражению менее 50% листовой поверхности. У всех растений наблюдалась реакция гиперчувствительности, проявляющаяся в виде хлорозных пятен, указывающая на активный защитный ответ (табл. 9).

Таблица 9 – 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> x <i>Brassicoraphanus</i>	2.5	сильновыражен
BC1	2.0	выражен
BC2	1.5	слабовыражен
BC3	1.0	слабовыражен

У гибридов и их беккроссного потомства спороношение начиналось позже и было менее интенсивным по сравнению с восприимчивыми родительскими линиями, затрагивая менее 50% поверхности растений (листья, побеги, стручки). Восприимчивый стандарт (Джаз) демонстрировал раннее и более интенсивное спороношение, охватывающее более 75% поверхности, что соответствует 3 баллам. Также отмечали сильное поражение стручков.



Рисунок 19 – Поражение листовой пластины а) *Brassicoraphanus*, б) *B.napus*, в) Джаз, г) BC3

У *Brassicoraphanus*, источника устойчивости, восковой налёт полностью отсутствовал (рис.19а). Гибриды и беккроссное потомство имели менее выраженный восковой налёт на листьях по сравнению с восприимчивыми

линиями, у которых наблюдался плотный и яркий восковой слой (рис.19 б, в, г).

Частичная устойчивость отдалённых гибридов и их беккроссного потомства к мучнистой росе, вероятно, обусловлена генетическим вкладом *Brassicoraphanus*, который является источником устойчивости. 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* (рис.19 г, рис. 20).

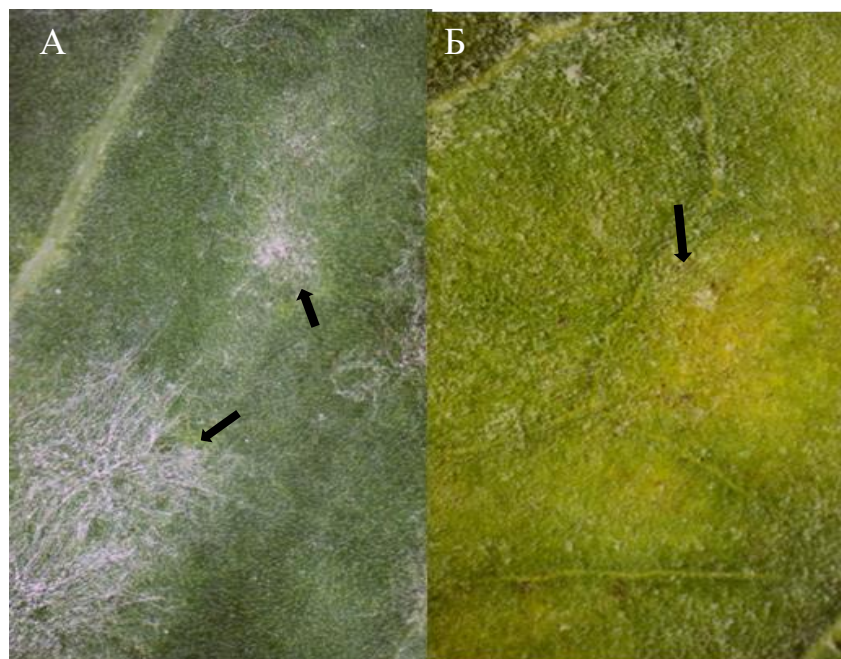


Рисунок 20 – Сравнение реакции на заражение *Erysiphe cruciferarum* у восприимчивого и устойчивого генотипов *Brassica napus*.

(А) Лист восприимчивого генотипа с обширными очагами спороношения, проявляющимися в виде белого налёта на поверхности листа, далее распространяется на побег. (Б) Лист устойчивого генотипа BC1, демонстрирующий реакцию гиперчувствительности в виде локализованных некротических пятен на листовой пластине в тех же условиях.

Отсутствие или слабая выраженность воскового налёта у устойчивых растений предполагает, что общее количество кутикулярного воска не является основным фактором устойчивости. Напротив, состав и структура воска могут играть ключевую роль. Например, в исследовании потомства

Brassica carinata × *B. napus* устойчивые растения имели меньшее количество воска, но с большим количеством игольчатых кристаллов, которые могли препятствовать адгезии или проникновению патогена (Zhang et al., 2022). Аналогично, в винограде специфические компоненты воска устойчивых генотипов ингибировали прорастание спор мучнистой росы (Abbasi et al., 2017).

Роль воскового налёта в устойчивости к болезням сложна и варьирует в зависимости от вида растений. Это подчёркивает важность состава воска, включая такие компоненты, как жирные кислоты или спирты, которые могут обладать противогрибковыми свойствами или изменять физические свойства поверхности листа, затрудняя установление патогена (Hansjakob et al., 2010).

Восприимчивость стандарта (Джаз) связана с плотным восковым налётом, который, вероятно, облегчает адгезию и прорастание конидий патогена. Исследования показывают, что длинноцепочечные альдегиды в воске могут стимулировать прорастание спор мучнистой росы (Hansjakob et al., 2010).

Оценка беккроссного потомства на искусственном инфекционном фоне на устойчивость к киле

Анализ проявления устойчивости/восприимчивости к киле на инфекционном фоне растений гибридной комбинации ВСЗ показал полную устойчивость всех растений (рис.21) (таб.10).



Рисунок 21 – Корневая система двух растений ВС3, балл поражения – 0.

Таблица 10. Реакция устойчивости/восприимчивости к киле растений рапса ВС3 на искусственном инфекционном фоне

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Балл поражения	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
№	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39	№1	№2
Балл поражения	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0

Примечание: №1 - стандарт восприимчивости, №2 - стандарт устойчивости

Оценка линий-восстановителей фертильности, полученных по технологии удвоенных гаплоидов, на искусственном инфекционном фоне показал полную устойчивость полученных гибридов, а также линий-восстановителей фертильности (рис.21).

Таблица 11 – Результаты оценки фертильных и стерильных линий, а также полученных гибридов на искусственном инфекционном фоне

Генотип	Число растений с баллом поражения, шт.			
	R		S	
Родительские линии				
М8мс				
1мс				
У17дг1				
Гибриды				
М8мс×у17дг1				
1мс×у17дг1				

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.11) (рис.22).



Рисунок 22 – Сеянцы стерильных и фертильных линий, F1 гибрид, а также сорт-стандарт Форпост через шесть недель после инокуляции

Молекулярно-генетический скрининг на гены устойчивости к киле: *Cra*, *Crb*, *CRA05*. Все родительские растения имеют устойчивость к киле, что было доказано с помощью испытания на искусственном инфекционном фоне, однако было неизвестно какими геном/генами устойчивость контролируется.

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 (рис.23А). У остальных образцов данный маркер отсутствует.

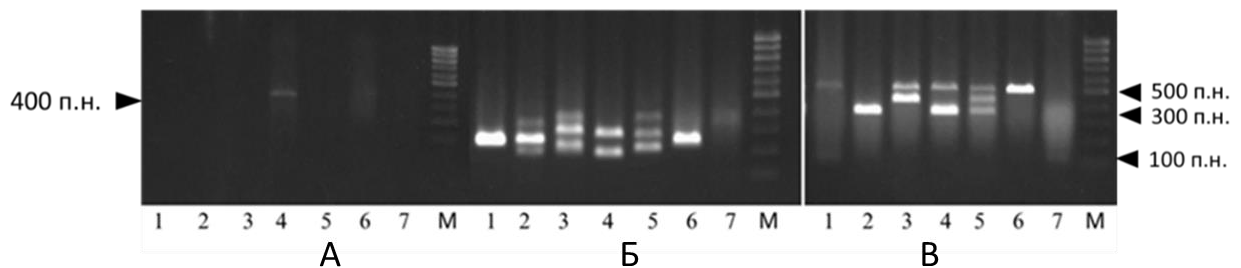


Рисунок 23 - Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров маркеров А)Tau_cBrCR_404, Б)B0902, В)GC3060, где 1 - Килатон, 2 - Да8, 3 - BR, 4 - 1мс, 5- М8мс, 6 - Джаз, 7 – контроль с водой, М - маркер молекулярных длин, 100 п.н.

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 (рис.23Б)

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. Следует отметить, что у *Brassicoraphanus* и Джаз был амплифицирован неспецифичный фрагмент размером 400 п.н. (рис.23В).

Таким образом, ожидается, что в гибридах будут сочетаться разные гены устойчивости к киле крестоцветных.

Скрининг 39 образцов ВСЗ проводили для дальнейшего отбора в качестве родительского компонента в селекции рапса. Желаемым было достичь наличия всех трех генов устойчивости к киле в одном генотипе, для сохранения устойчивости к различным расам патогена.

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 (рис.24), что связано с тем, что два родительских компонента (1мс и М8мс) скрещиваний гомозиготы по гену устойчивости

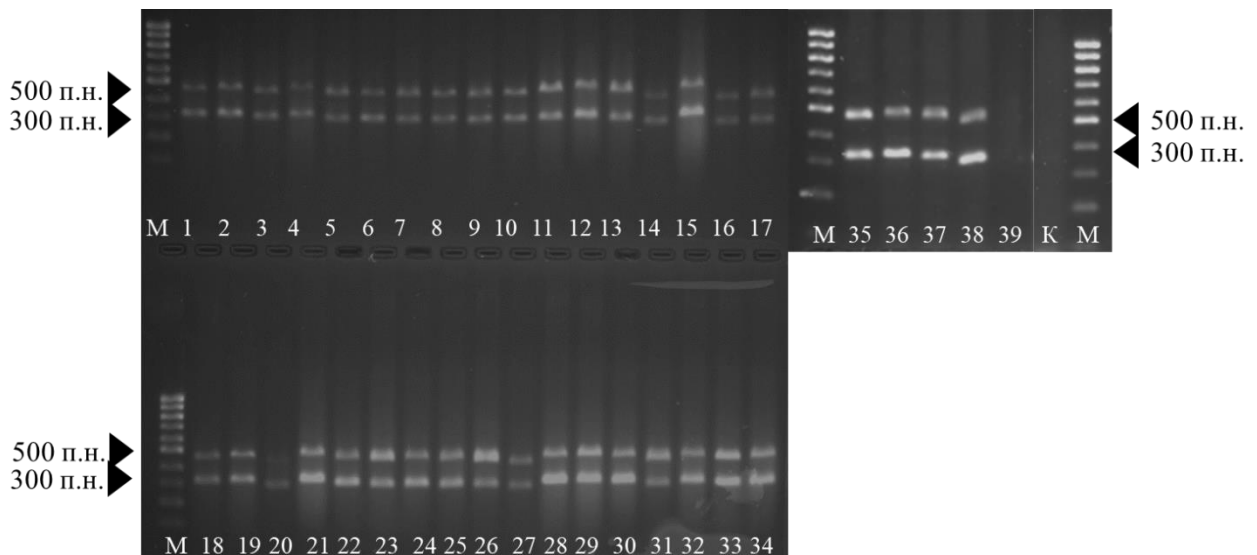


Рисунок 24 –Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров пары праймеров GC3060, где 1-39 – растения ВСЗ , К – контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

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 (рис.25)

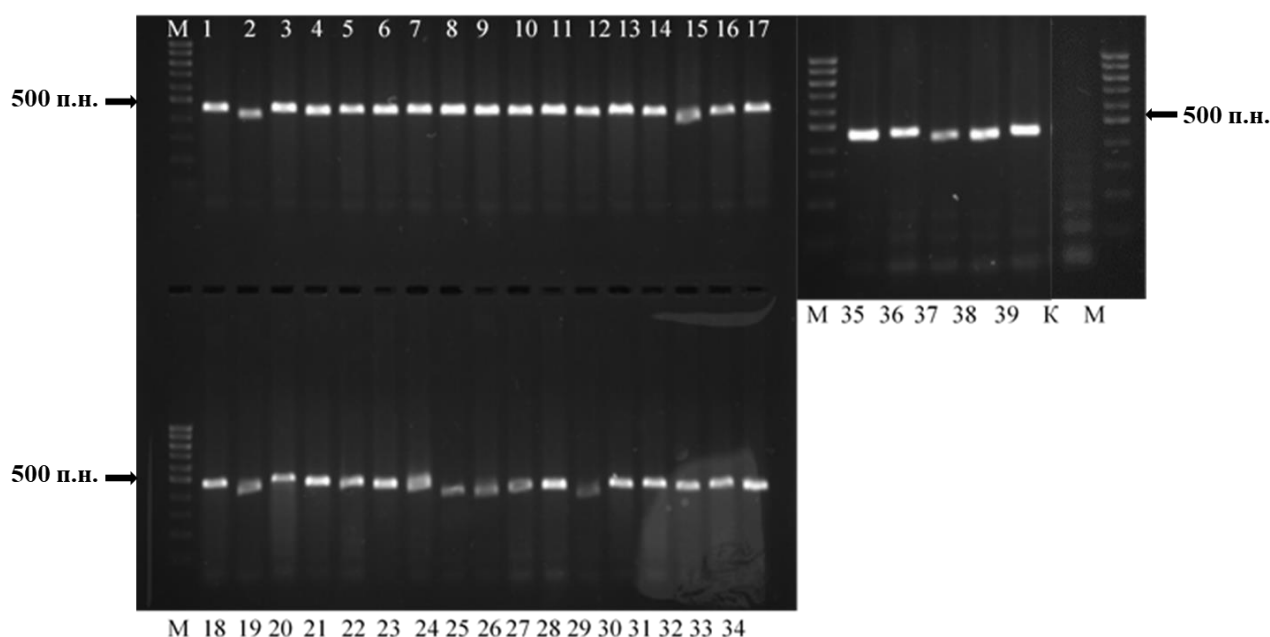


Рисунок 25– Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров пары праймеров B0902R,F, где 1-39 – генотип BC3, К – контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100 п.н.

Также у 1-13, 16, 22, 24, 28-39 идет неспецифичная амплификация, фрагменты размером 300 п.н, что схоже с электрофореграммой образца *Brassicoraphanus* (рис.22<). 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 BC3 (рис.26).

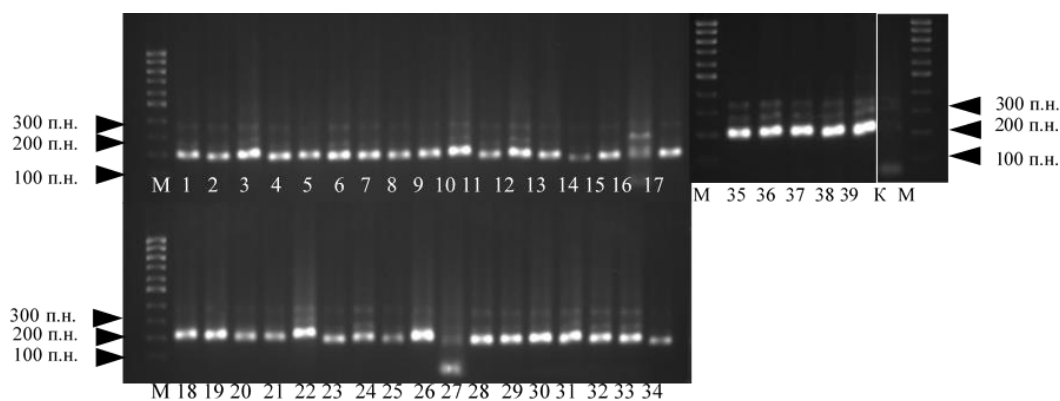


Рисунок 26 - Электрофореграмма продуктов амплификации пары праймеров Tau_cBrCR404 (BrCr026F; BrCr429R), где 1-39 – BC3 *B. napus* x

Brassicoraphanus, К – контроль с водой, М – маркер молекулярных длин, 100

П.Н.

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

Масличность и качественный состав масла. Проведена оценка хозяйственно ценных признаков семян гибридных комбинаций ярового рапса: масличность, жирнокислотный состав (основные полиненасыщенные жирные кислоты), пониженное содержание эруковой кислоты.

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. 18, приложение. Д). При этом масличность стандартных образцов – лучших зарубежных гибридов в эксперименте составила 34,04 и 36.91 для стандарта 1 и стандарта 2 соответственно (рис. 26, приложение Д).

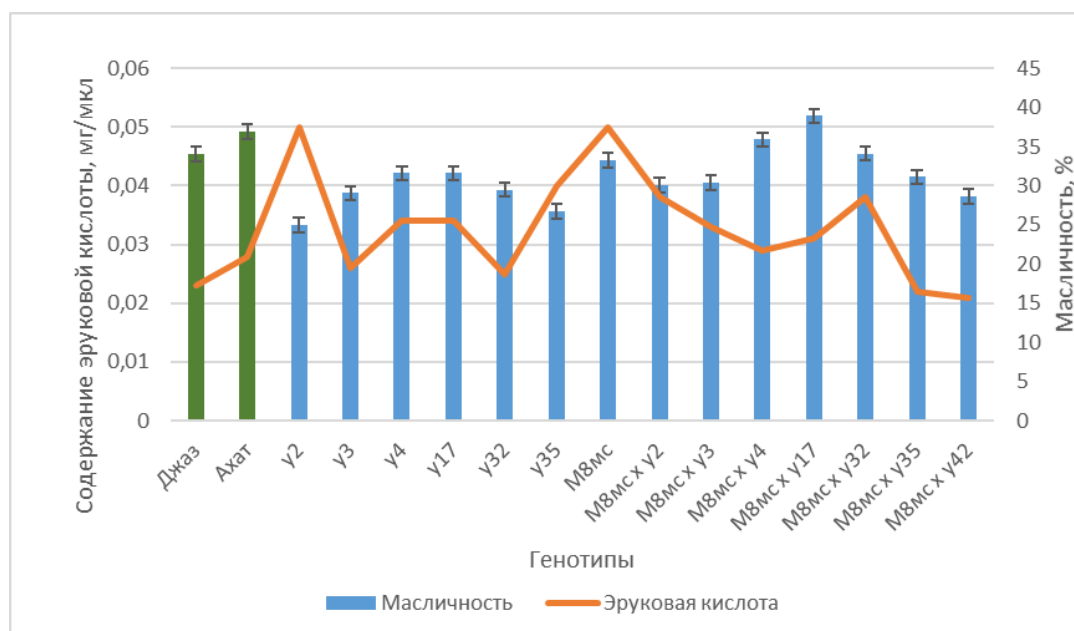


Рисунок 27 - Масличность (%) и содержание эруковой кислоты (мг/мкл) стандартов, родительских линий и гибридов, 2023 год.

Фертильные линии у2, у3, у17, у32, у35 ярового рапса показали низкий уровень эруковой кислоты (0,02-0,05%) и отвечают показания ГОСТ 10583-76

(рис. 18). Самое высокое содержание эруковой кислоты (C22:1) 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, М8мс х у42 (рис. 27).

Результаты анализа жирнокислотного состава исследуемых образцов, общего содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в исследованных образцах рапса приведены в приложение Д. Можно отметить, что изученные линии рапса содержат небольшое количество насыщенных жирных кислот (8,56-10,02%), тогда как ненасыщенные жирные кислоты составляют от 89,56 (М8мс х у3) до 91,44% (М8мс х у2) (приложение Д).

Среди насыщенных жирных кислот наиболее значимыми в составе исследованных образцов являются пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты, которые в совокупности составляют основную долю насыщенной фракции.

Пальмитиновая кислота, присутствующая в количестве от 4,67–5,04% у гибридов и от 4,46-5,35% у родительских линий является одной из ключевых насыщенных жирных кислот, влияющих на технологические свойства масла, а также на его пищевую ценность.

Стеариновая кислота, содержащаяся в диапазоне 2,13-2,52% у гибридов и 1,7-3,08% у родительских линий, причем наименьшее значение имела ЦМС линия М8мс, а наибольшее линия у35.

Прочие насыщенные жирные кислоты, такие как миристиновая (C14:0) (в среднем у гибридов – 0,07%), арахидовая (C20:0) (0,82%), бегеновая (C22:0) (0,46%) и другие, встречаются в следовых количествах и не оказывают значительного влияния на свойства масла (приложение Д).

Таким образом, можно отметить, что исследуемые гибридные комбинации ярового рапса характеризуются низким содержанием насыщенных жирных кислот, что делает их масличное сырье перспективным для производства пищевых масел с высоким содержанием полезных ненасыщенных жирных кислот.

Основную долю жирных кислот в исследуемых гибридных комбинациях составляют мононенасыщенные жирные кислоты: олеиновая, линоленовая и α -линоленовая кислоты с преобладанием олеиновой кислоты (C18:1), содержание которой варьировало от 58,12% (М8мс х у32) до 62,51% (М8мс х у42) (приложение Д).

В среднем в масле гибридов содержалось 60,43% олеиновой кислоты (C18:1). Стандарт №1 (64,56%) продемонстрировал наивысший уровень олеиновой кислоты среди исследуемых образцов, однако ни один из гибридов не превзошел его по данному показателю. Это свидетельствует о необходимости дальнейшей работы над созданием гибридов с повышенным содержанием C18:1, что может повысить их конкурентоспособность среди высокоолеиновых сортов.

Изученные гибриды пока не соответствуют высокоолеиновому типу (C18:1>72%). Однако среднее значение 60,43% указывает на потенциал для селекции гибридов рапса с улучшенным балансом жирных кислот, высокой пищевой ценности.

Содержание линолевой кислоты (C18:2, ω -6) в исследованных образцах варьировало в относительно узком диапазоне, что свидетельствует о стабильности данного показателя среди гибридов и родительских линий. В среднем в масле гибридов содержалось 21,25% линолевой кислоты, что несколько ниже, чем в родительских линиях (21,62%). Среди стандартов масла рапса наименьшее содержание C18:2 отмечено у стандарта №1 (20,11%) и стандарта №2 (18,44%), что указывает на их более сбалансированный жирнокислотный состав с уклоном в сторону мононенасыщенных жирных кислот (приложение Д).

Наибольшее содержание линолевой кислоты среди гибридов отмечено у М8мс х у32 (22,73%) (приложение 3), тогда как наименьшее – у М8мс х у42 (20,42%) (приложение Г). Среди родительских линий максимальное значение зарегистрировано у линии у2 (23,16%), а наименьшее – у ЦМС линии М8мс (20,97%) (приложение Д).

Таким образом, исследованные гибриды демонстрируют умеренный уровень линолевой кислоты (C18:2), что соответствует желаемому балансу между ω -6 и ω -3 кислотами. Гибрид М8мс х у32 с наибольшим содержанием C18:2 может быть перспективен для дальнейшей селекционной работы, если требуется повышенное содержание линолевой кислоты. В то же время снижение уровня линолевой кислоты в стандартах №1 и №2 может свидетельствовать о направленности их селекции на увеличение доли олеиновой кислоты, что повышает окислительную стабильность масла и улучшает его потребительские свойства.

В среднем в масле гибридов содержалось 6,81% α -линоленовой кислоты (C18:3n3, ω -3), что ниже, чем в родительских линиях (7,45%), но сопоставимо со стандартом стандарт №2 (6,77%). Стандарт №1 имел наибольшее содержание среди контрольных образцов – 8,42% (приложение Д).

Среди гибридов наибольшее содержание α -ЛНК (8,04%) отмечено у М8мс х у32 (приложение Г), тогда как наименьшее (6,1%) – у М8мс х у42. В родительских линиях максимальное значение зарегистрировано у линии у2 (8,67%), тогда как минимальное (6,52%) – у линии у35 (приложение Д).

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 (табл. 12), 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.

Таблица 12 - Семенная продуктивность F1 гибридов ярового рапса, г/раст.
2023 год.

Селекционный номер образца	Среднее X_i
M8мс x y2	19,30
M8мс x y3	20,85
M8мс x y4	17,87
M8мс x y6	12,23
M8мс x y10	12,32
M8мс x y15	16,20
M8мс x y17	20,50
M8мс x y18	14,97
M8мс x y26	13,67
M8мс x y30	14,45
M8мс x y32	16,28
M8мс x y33	15,30
M8мс x y40	13,43
Джаз	12,45
Ахат	13,21
НСР05	4,12

Гибридные комбинации M8мс x y3 и M8мс x y17 показали наибольшую семенную продуктивность, что может свидетельствовать о перспективности этих комбинаций для дальнейших исследований и селекционной работы. Комбинации M8мс x y6 и M8мс x y10 оказались наименее продуктивными, 12,23 г/раст, и 12,32 г/раст. соответственно.

Создание и оценка проявления хозяйственно-ценных признаков линий удвоенных гаплоидов

Для ускорения создания чистых линий для селекции F1 гибридов была применена технология удвоенных гаплоидов.

Культивирование микроспор проводили по стандартной методике в питательной среде NLN-13 с добавлением 130 г/л сахарозы и pH 5,8 2-е суток в темноте при температуре $32,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, далее в климатической камере при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в темноте. Чашки Петри с микроспорами культивировали на шейкере Excella E-24 при 70 об. /мин. 14-21 день. Наблюдение за эмбриодами производили каждые два дня.

Эмбриониды, достигшие семядольной стадии пересаживали на безгормональную регенерационную среду В5 Гамборга с добавлением 25 г/л сахарозы и 11 г/л агара, pH 5,8 по 6-12 эмбрионидов на контейнер. Культивировали в климатической комнате при температуре +22 °С с 16 часовым фотопериодом. Растения-регенеранты, полностью сформировавшие корневую систему и надземную часть, пересаживали в кассеты с увлажненным субстратом. После пересадки устанавливали плоидность растений-регенерантов косвенным методом по фенотипу. Частоту эмбриогенеза определяли для каждого генотипа отдельно в пересчете на 100 бутонов (табл.13).

Таблица 13 – Частота эмбриогенеза

Генотип	Количество бутонов, отобранных для изоляции микроспор, шт	Количество эмбрионидов за весь период культивирования, шт.	Эмбрионидов/100 бутонов
y2	4	40	1000
y3	9	64	711
y7	8	48	600
y17	13	96	738

Самую высокую частоту эмбриогенеза наблюдали у генотипа y2 и составила 1000 эмбриоида на 100 бутонов. Самая низкая частота эмбриогенеза составила 711 эмбриоида у генотипа y3.

Через 30 дней после пересадки эмбрионидов на агаризованную питательную среду для регенерации оценивали частоту прямого прорастания эмбрионидов. Данный показатель оценивали, как процентное отношение количества эмбрионидов пересаженных на регенерационную среду, к количеству растений, пересаженных в грунт на 30 день культивирования (таб.14).

У генотипа y17 частота прямого прорастания составила 39,6%, что больше чем у других генотипов. Самый низкий показатель у генотипа y7 (10,4%).

Таблица 14 – Частота прямого прорастания эмбрионидов ярового рапса

Генотип	Количество эмбриодов, пересаженных на регенерационную питательную среду, шт.	Кол-во растений-регенерантов, пересаженных в грунт на 30 день культивирования, шт.	Частота прямого прорастания эмбриодов ярового рапса, %
y2	40	10	25
y3	64	24	37,5
y7	48	5	10,4
y17	96	38	39,6

Растения с удвоенным числом хромосом отбирали по косвенным признакам: наличие фертильных цветков, а также число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

Больше всего растений успешно прошли адаптацию к внешним условиям генотипов y3 и 17 (24 и 38 соответственно). Удвоение числа хромосом проводили с помощью колхицина – все повторности погибли. У оставленных в качестве контроля адаптантов произошло спонтанное удвоение хромосом. В результате было отобрано 4 растения, по два каждого генотипа – y3 и 17, в дальнейшем получившие названия y3дг1, y3дг2, y17дг1, y17дг2.

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. 10). Все гибриды превысили порог в 30%, что указывает на пригодность для производства масла. М8мсху3дг2 (34,60%) приблизился к показателю стандарт №1 (36,50%), но был ниже стандарта №2 (38,30%). 1мсху3дг1 (33,30%) и 1мсху17дг2 (31,70%) были немного ниже, но все еще конкурентоспособны. 1мсху17дг1 (30,90%) оказался наименее результативным среди гибридов, но достиг порога. Среднемноголетнее значение масличности для ярового рапса, выращенного в условиях Москвы, а именно на территории РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева составляет 33,3%.

Таблица 15 – Показатели содержания масла, протеина, эруковой кислоты и глюкозинолятов

№	Образец	Масличность, %	Протеин, %	Эруковая кислота, %	Глюкозиноля ты, мкМг
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	-	-
НСР ₀₅		11,56	7,22	-	

Примечание: $F > F_{05}$ на 5% уровне значимости, значения не различаются значимо. «-» - измерения не были получены, так как прибор не предназначен для измерения данной величины

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%) (таб.15). Была установлена средняя отрицательная корреляция (-0,4) между содержанием белка и масличностью, таким образом, ведение селекции на оба этих признака не является рентабельно.

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 (таб. 16)

Таблица 16 – Значения семенной продуктивности гибридных комбинаций, родительских линий и стандартов в полевых испытаниях 2024 года, $M \pm m$

Генотипы	Семенная продуктивность, г/раст.
Стандарт №1	3.74±0.12
Стандарт №2	3.96±1.02
1мс	3.33±0.77
у17дг1	3.00±1.27
у17дг2	2.18±0.26
у3дг1	2.04±0.41
у3дг2	5.68±0.72
М8мс	5.10±1.48
М8мс х у17дг1	4.70±0.53
М8мс х у17дг2	5.97±1.73
М8мс х у3дг1	4.34±0.53
М8мс х у3дг2	6.29±0.50
1мс х у17дг1	5.89±1.16
1мс х у17дг2	4.34±0.79
1мс х у3дг1	4.47±0.43
1мс х у3дг2	4.41±0.50
НСР ₀₅	5,36

Наибольшую продуктивность среди исследуемых гибридов продемонстрировал гибрид М8мс х у3дг2, который показал семенную продуктивность 6,29 г/раст.

Фертильная линия у3дг1 продемонстрировала наименьшую продуктивность – 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, 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.

Родительские линии – М8мс и у17дг1. Происхождение стерильная линия М8мс получена гибридизацией стерильного растения из F2 Джаз (цитоплазма типа *Ogura*) с линией удвоенным гаплоидом М8, полученным из зарубежного устойчивого к киле образца с иным типом цитоплазмы и трехкратным беккроссом.

Линия у17дг1 выведен путем отдаленной гибридизации *B. napus* х *Brassicoraphanus* с последующим отбором по устойчивости к киле и настоящей мучнистой росе.

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. Форма куста полусомкнутая. Стебель цилиндрический, прямой, гладкий, слабая антоциановость у зоны гипокотилия. Листья очередные, слабо рассеченные, опущение на этапе сеянцев, далее отсутствует, покрыты незначительным восковым налетом. Нижние листья широко-перисто-надрезные, с округлой верхней долей Средние – удлинненно-копьевидные. Верхние – цельно-удлиненные, ланцетные.

Соцветие кистевидное, цветки крупные, желтоокрашенные, цветки начинают раскрываться с его нижней части. Плод – стручок, в созревшем состоянии охристо-желтый, без антоциана, бугристый, без опушения. Стручок отходит от стебля под острым углом. Пленчатая перегородка стручка заканчивается бессемянным носиком, средняя длина стручка 70 мм, длина носика до 9 мм, ширина стручка 4 мм.

Семена черные, округлые, в стручке 22-26 шт. семян. Масса 1000 семян – 4,2 г. Масличность – 38,9% в условиях Московского региона, гибрид 00-типа (безэруковый, низкоглюкозинолятный). Гибрид пищевого направления. В семенах содержится глюкозинолатов -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

Для изучения различных типов стерильной цитоплазмы из коллекции Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева и поиска закрепителя стерильности с отличным от *Ogura* типом цитоплазмы был проведен скрининг коллекции ярового рапса с устойчивостью к имидазолинонам с помощью мультиплексной ПЦР на три гена: *orf138*, *orf222*, *orf224* (Zhao et al., 2010) (рис.28).

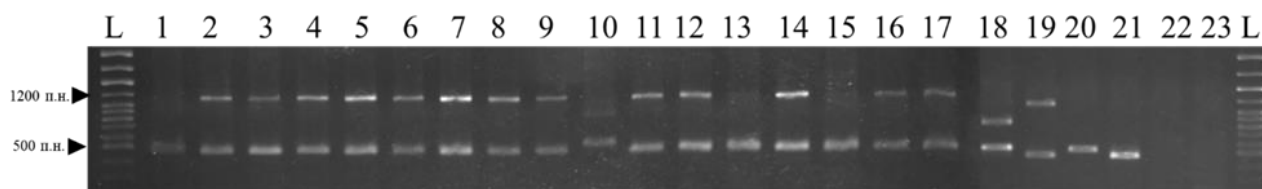


Рисунок 28 - Электрофореграмма продуктов амплификации праймеров маркеров на гены *orf138*, *orf224*, *orf222*, где 1-Р0021, 2-Р0023, 3-РЯ045, 4-РЯ008, 5-РЯ009, 6-РЯ015, 7-РЯ036, 8-РЯ023, 9-РЯ006, 10-РЯ016, 11-РЯ018, 12-Р0030, 13 –РЯ025, 14-РЯ010, 15-Р0026, 16 –Джаз F1, 17 – Маджонг F1, 18 – 1ф, 19 – 1мс, 20 – *Brassicoraphanus*, 21 – Rs Ms, 22-23 – контроль с водой, L – маркер молекулярных длин, Step100 Long (Biolabmix)

По результатам ПЦР-анализа с маркерной системой (Zhao et al., 2010) выявлено у образца РЯ016 отличный от *Ogura* типа цитоплазмы (тип цитоплазмы *cam*) (рис.25). Достоверность молекулярных маркеров подтверждается результатом гибридологического анализа потомства от скрещивания стерильной линии с типом цитоплазмы *Ogi* – М8мс (таб.17).

В таблице 17 представлены данные по количеству стерильных и фертильных растений в потомстве, а также результаты статистического анализа методом хи-квадрат (χ^2). В пяти комбинациях наблюдали расщепление 1:1, что свидетельствует о том, что генотип анализируемого отцовского образца был гетерозиготой *Rfrf*.

Таблица 17 - 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 х РЯ006	20	11	9	10	10	0,20
М8мс х РЯ036	24	13	11	12	12	0,17
М8мс х РЯ009	28	12	16	14	14	0,57
М8мс х РЯ016	27	27	0	13,5	13,5	27
М8мс х РЯ015	30	15	15	15	15	0
М8мс х РЯ018	22	9	13	11	11	0,73

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

В комбинации М8мс х РЯ016 все растения потомства были стерильными, что указывает на отсутствие гена-восстановителя Rf_o у РЯ016 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.

Стерильные цветки характеризуются недоразвитыми пыльниками и полным отсутствием жизнеспособной пыльцы (фертильность 0%) (рис.29 b, d), тогда как фертильные цветки демонстрировали хорошо сформированные пыльники с жизнеспособной пыльцой (фертильность 98%) (рис.29 а, с).

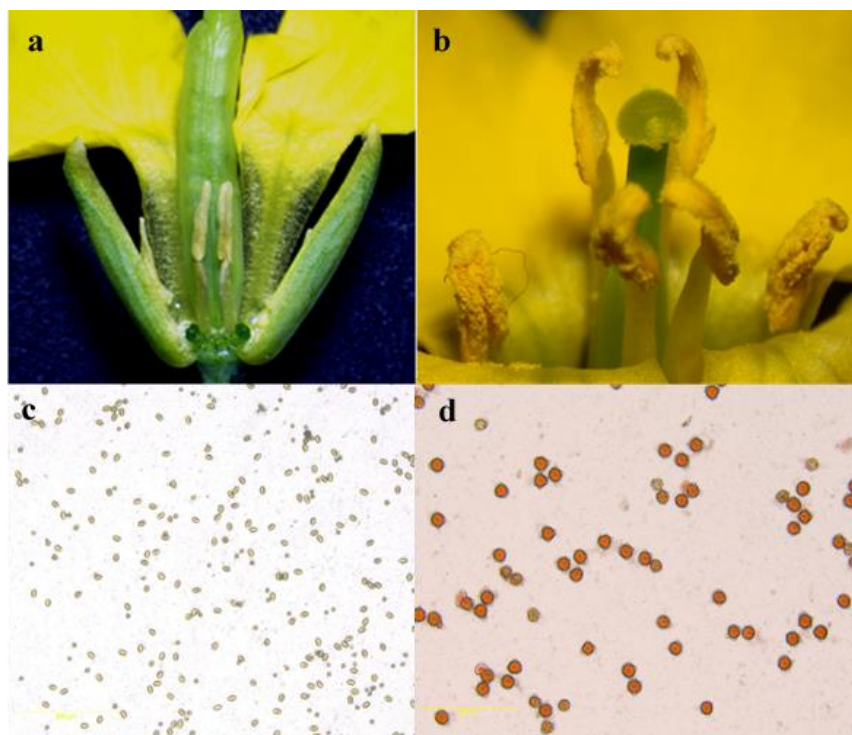


Рисунок 29 – Сравнение стерильного и фертильного цветков гибридов М8мс х РЯ016 (слева) и М8мс х РЯ036 (справа), полученное с помощью стереомикроскопа: (а) стерильный цветок с недоразвитыми пыльниками, характерными для ЦМС-линии; (б) фертильный цветок с полностью сформированными пыльниками, содержащими жизнеспособную пыльцу, (с) стерильная пыльца (фертильность 0%) с недоразвитыми, неокрашенными зернами; (d) фертильная пыльца (фертильность 98%) с полностью сформированными, интенсивно окрашенными зернами.

Для подтверждения фенотипического анализа использовали четыре пары молекулярных маркеров, разработанных на ген-восстановитель фертильности Rf_o (таблица 18, приложение Е). По результатам молекулярного генотипирования изученные растения, кроме РЯ016 должны иметь ген-восстановитель фертильности.

Согласно фенотипической оценке РЯ009, РЯ015, РЯ036, РЯ018, РЯ006 показывали способность к восстановлению стерильной цитоплазмы ЯЦМС линии М8мс, однако РЯ006 и РЯ018 имеет ожидаемые фрагменты только по двум маркерам (таблица 18). У РЯ009, РЯ015, РЯ036, РЯ023 обнаружены целевые фрагменты по всем четырем парам праймеров.

Результаты молекулярного скрининга подтверждают отсутствие гена-восстановителя *Rfo* у РЯ016.

Таблица 18 – Результаты молекулярного скрининга коллекции рапса четырьмя парами маркеров на ген-восстановитель фертильности *Rfo*

№	Генотип	BnRFO-AS1R/ BnRFO-AS1F	BnRFO-AS2R/ BnRFO-AS2F	BnRFO-DL2R/ BnRFO-AS1F	BnRFO-AS2-new- R/ BnRFO-AS2F
1	РЯ045	+	+	+	-
2	РЯ008	+	+	+	-
3	РЯ009	+	+	+	+
4	РЯ015	+	+	+	+
5	РЯ036	+	+	+	+
6	РЯ023	+	+	+	+
7	РЯ006	+	+	-	-
8	РЯ016	-	-	-	-
9	РЯ018	-	+	-	-
10	РЯ010	-	+	-	+

Различия в результатах амплификации между парами праймеров могут быть обусловлены вариациями в последовательности генома. Различия у РЯ006 и РЯ018, где фенотипически *Rfo* присутствует, но не все маркеры положительны, могут объясняться аллельными вариациями или наличием гомологов с делециями, приводящими к отсутствию амплификации для BnRFO-DL2R/BnRFO-AS1F и BnRFO-AS2-new-R/BnRFO-AS2F, несмотря на функциональность гена.

Изучение генетики наследования толерантности к гербицидам группы имидазолинонов

Анализируемая коллекция была изучена на провокационном фоне на устойчивость к гербицидам, группы имидазолинонов, путем обработки сеянцев гербицидом Нопасаран. Ранее в литературе сообщалось о наличии доминантного гена, отвечающего за устойчивость и наследование этого признака по типу полного или неполного доминирования.

В случае полного доминирования F1 гибриды, полученные для технологии Clearfield должны быть гетерозиготами и в селекционную схему

достаточно включать только один компонент с устойчивостью к гербициду. Такие гибриды будут иметь расщепление в потомстве от скрещивания с восприимчивым растением 1:1 (моногенное наследование).

Если ген наследуется по типу неполного доминирования, при анализирующем скрещивании расщепления отсутствует.

Оценку проводили на двухнедельных сеянцах через 14 дней после обработки гербицидом (таб.19). В качестве стандартов восприимчивости использовали F1 гибриды Джаз и Маджонг (рис.30а). Для них отсутствует информация о наличии толерантности к гербицидам, по результатам оценки это подтвердилось (таб.19).

Все семь испытываемых F1 гибрида Clearfield после обработки гербицидом нормально развивались, отсутствовали ожоги на листьях (рис.29а) (таб.19).

Полученное от самоопыления F2 не имело расщепления, все растения продолжили рост и развитие после обработки, отсутствовали следы поражения от гербицида (рис.30b) (таб.19).

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.30c) (таб.19).



Рисунок 30 – Результаты обработки сеянцев 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.

Таблица 19 – Фенотипическая реакция на гербицид НОПАСАРАН толерантных стандартов, восприимчивых линий и гибридов F1

	Генотип	R	S	Всего растений
Стандарты	Маджонг F1	0	48	48
	Джаз F1	0	48	48
F1 гибриды	РЯ008 кл	30	0	30
	РЯ006 кл	51	0	51
	РЯ 036 кл	24	0	24
	РЯ018 кл	25	0	25
	РЯ009 кл	37	0	37
	РЯ016 кл	24	0	24
	РЯ015 кл	24	0	24
F2	РЯ 008-1 F2	24	0	24
	РЯ 008-2 F2	23	0	23
	РЯ 036-1 F2	24	0	24
	РЯ036-2 F2	38	0	38
	РЯ015 F2	48	0	48
Гибридные комбинации	М8мс x РЯ036	48	0	48
	М8мс x РЯ018	18	0	18
	М8мс x РЯ015 (2023)	33	0	33
	М8мс x РЯ015	48	0	48
	М8мс x РЯ008	31	0	31

Примечание: R – растения развиваются после обработки гербицидом, S – растение погибло после обработки.

По результатам анализирующего скрещивания с восприимчивой линией М8мс, а также F2 было установлено, что признак устойчивости к гербицидам наследуется моногенно по типу неполного доминирования (таб.17). Таким образом, для создания толерантных F1 гибридов, необходимо отбирать доминантные гомозиготы во всех трех компонентах: стерильной линии, линии-восстановители фертильности и закрепители стерильности.

Экономическая эффективность возделывания ярового рапса «F1 Айрос» устойчивого к настоящей мучнистой росе и киле

На основе предоставленных данных по урожайности в 4 повторностях F1-гибрида Айрос и F1 INV140, коммерческого F1-гибрида от компании BASF, рассчитана экономическая эффективность выращивания в условиях Брянской области (табл. 20). Урожайность переведена в т/га для единообразия (1 ц/га = 0,1 т/га). Средние значения урожайности: стандарт INV140 — 22,1 ц/га (2,21 т/га), устойчивый F1-гибрид — 24,0 ц/га (2,40 т/га). НСР05 для урожайности рассчитана по стандартной методике и составила 2,1 ц/га (0,21 т/га). Разница в урожайности (1,8 ц/га) выше НСР, что указывает на статистически значимые различия на уровне 5%, наблюдается тенденция к преимуществу устойчивого гибрида.

Для расчёта экономических показателей использована средняя себестоимость производства 1 т семян — 22,6 тыс. руб./т (по данным аналитического центра компании RUSEED). Это значение интерпретировано как базовое для средней урожайности по опыту (23,1 ц/га или 2,31 т/га), что подразумевает фиксированные затраты на 1 га $\approx$ 52,2 тыс. руб./га (без учёта фунгицидных обработок; включает семена, удобрения, труд, технику и другие базовые расходы). Рыночная цена реализации семян рапса равна 35,6 тыс. руб./т (на октябрь 2025 г. варьируются от 38 до 50 тыс. руб./т, но для расчётов использована указанная). Себестоимость на тонну рассчитана как фиксированные затраты на га, делённые на урожайность в т/га.

Максимальная прибыль (33,2 тыс. руб./га) и рентабельность в опыте (63,6 %) получены при возделывании устойчивого к киле и настоящей мучнистой росе гибрида. Экономическая эффективность стандарта INV140 ниже (рентабельность 50,7 %), что связано с потерями урожайности ввиду патогенеза в период вегетации растений.

Таблица 20 - Результаты оценки экономической эффективности при отсутствии обработок фунгицидами F1-гибридов, Брянская область, 2025 г.

Наименование	Урожайность, т/га	Устойчивость к киле и НМР	Себестоимость, тыс. руб./т	Общая выручка продукции, тыс. руб./га	Прибыль, тыс. руб./га	Рентабельность, %
F1 Айрос	2,40	++	21,8	85,4	33,2	63,6
F1 INV 140	2,21	--	23,6	78,7	26,5	50,7
НСР	0,17	-	-	-	-	-

Кратность обработок, в зависимости от климатических условий и зоны возделывания, может составлять 4–8 для настоящей мучнистой росы (рекомендуемое число — до 6). Дополнительные затраты на одну обработку (техника, труд, ресурс) — около 250–1000 руб./га (среднее 500 руб./га по данным Agroservice и аналогичных сервисов).

При использовании в товарном производстве генетически устойчивого к настоящей мучнистой росе и киле ярового рапса F1 Айрос необходимость в проведении фунгицидных обработок против заболевания полностью исключается, что в свою очередь повышает экологичность производимой продукции, снижает пестицидную нагрузку на агроэкосистему, и снижает себестоимость производства маслосемян. Также из-за отсутствия эффективных методов борьбы с килой, выращивание устойчивого гибрида рапса, позволит снизить возникновения эпифитотий.

Выводы

1. Гибридизацией аллотетраплоидного *Brassica napus* (яровой рапс масличный, геномная формула AACC, $2n=38$) и аллотетраплоидного *Brassicoraphanus* (амфидиплоидный капустно-редечный гибрид, геномная формула CCRR, $2n=36$) 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* (AACC, $2n=38$) и фертильной линии *Brassicoraphanus* (CCRR, $2n=36$) 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* (CCRR, $2n=36$) 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* (AACC, $2n=38$), 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 мкМ/г, 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 мкМг)) М8мс×у17дг2 с названием F1 Айрос, зарегистрированным в Государственном реестре сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, допущенных к использованию.

Библиографический список

1. Указ Президента Российской Федерации "Указ Президента Российской Федерации от 21.01.2020 г. № 20 Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации" от 21.01.2020 №20 // Официальный интернет-портал правовой информации. - 2020 г. - с изм. и допол. в ред. от 10.03.2025 № 141.
2. ГОСТ 10583-76. Семена рапса. Промышленное сырье: утвержден и введен в действие Государственным комитетом стандартов Совета Министров СССР от 19 апреля 1976 года №857: дата введения 1977-07-01. - URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294840/4294840191.pdf> (Дата обращения 24.11.2024). – Текст: электронный.
3. ГОСТ 10857-64. Семена масличные. Методы определения масличности: утвержден и введен в действие Государственным комитетом стандартов, мер и измерительных приборов СССР от 22 апреля 1964 г.: дата введения 1964-07-01.— URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294840/4294840018.pdf> (Дата обращения 24.10.2024). – Текст: электронный.
4. ГОСТ 12042-80 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян: утвержден и введен Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 29 января 1980 г. №448: дата введения 1981-07-01. - URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294838/4294838872.pdf> (Дата обращения 20.09.2023). – Текст: электронный.
5. ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава: принят межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации №10 от 4 октября 1996 г.: дата введения 1998-01-01. - URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4294824/4294824891.pdf> (Дата обращения 24.11.2024). – Текст: электронный.

6. ГОСТ 31759-2012. Масло рапсовое. Технические условия: ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации от 15 ноября 2012 г. № 42: дата введения 2012-11-29. - URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293782/4293782190.pdf> (Дата обращения 25.09.2024). – Текст: электронный.
7. ГОСТ 8988-77 Масло рапсовое. Технические условия: УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 04.08.77 N 1916: дата введения 1978-07-01. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200022928.pdf> (Дата обращения 20.09.2024). – Текст: электронный.
8. Анисимова И. Н., Дубовская А. Г. Системы ЦМС у рапса и их использование в селекции отечественных гибридов //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – №. 3. – С. 171-180
9. Бочкарева Э. Б. и др. БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОБРАЗЦОВ РАПСА ЯРОВОГО (*BRASSICA NAPUS* L.) ТИПА «00» И «000» СЕЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК //ВЫЧИСЛЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ ФОРМ ЧЕРЕШНИ ПО ОБЪЕМУ КРОНЫ И ПРОЕКЦИОННОЙ ПЛОЩАДИ. – С. 16.
10. Вавилов Н. И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. – 1987.
11. Гончаров С. В., Горлова Л. А. Селекция рапса на устойчивость к гербицидам: результаты и перспективы //Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – Т. 4. – №. 176. – С. 42-47.
12. Егорова Т. А., Ленкова Т. Н. Рапс (*Brassica napus* L.) и перспективы его использования в кормлении птицы //Сельскохозяйственная биология. – 2015. – №. 2. – С. 172-182.
13. Иванова Е. М. и др. Новые перспективные виды растений в фиторемедиации загрязненных медью территорий //Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2011. – №. 2. – С. 28-38.

14. Карпеченко Г. Д. Теория отдаленной гибридизации //Теоретические основы селекции растений. – 1935. – Т. 1. – С. 293-354.
15. Карпеченко Г. Д. Увеличение скрещиваемости вида путем удвоения числа хромосом //Тр. по прикл. ботан., генет, и селекц. Сер. – 1937. – Т. 2. – С. 37-51.
16. Ларькина, Н. И. Межвидовая гибридизация – один из методов совершенствования культурных растений / Н. И. Ларькина // Вопросы. Гипотезы. Ответы: наука XXI века. Том Книга 5. – Краснодар: Индивидуальный предприниматель Акелян Нарине Самадовна, 2013. – С. 143-173. – EDN RZYXVJ.
17. Монахос С. Г., Богданова В. Д. Отдаленная гибридизация капустных растений (Brassica) //Технология «спасения зародышей»: методические рекомендации. Москва: Изд-во РГАУ–МСХА имени КА Тимирязева. – 2014.
18. 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.
19. 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.

20. 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
21. 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
22. Першина Л. А., Трубачеева Н. В. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – №. 4. – С. 416-425.
23. Пивень В. Т., Сердюк О. А. Фитосанитарный мониторинг болезней рапса //Масличные культуры. – 2011. – №. 2 (148-149). – С. 162-167.
24. Пидопличко Н.М. Грибы - паразиты культурных растений. Определитель. Том 1. Грибы совершенные, К.: "Наукова думка" 1977. - 296 с.
25. Рапсовый взлет. Экспертный анализ рынка рапса // АгроИНВЕСТОР URL: <https://www.agroinvestor.ru/analytics/article/39642-rapsovyuy-vzlyet-ekspertnyy-analiz-rynka-rapsa/> (дата обращения: 14.04.2023).
26. Рахимова Е.В. Краткий иллюстрированный определитель мучнисторосяных грибов Казахстана и приграничных территорий / Е.В. Рахимова, Г.А. Нам, Б.Д. Ермекова. – Новосибирск: Издательство ЦРНС, 2014. – 129 с.
27. Ригин Б. В. НИ Вавилов и основные направления и результаты исследований в отделе генетики ВНИИ растениеводства //Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11. – №. 3/4.
28. Савенков В. П. Инновационные технологии возделывания ярового рапса на семена // Земледелие. 2009. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/innovatsionnye-tehnologii-vozdelyvaniya-yarovogo-rapsa-na-semena> (дата обращения: 08.04.2025).

29. Указ Президента Российской Федерации "Указ Президента Российской Федерации от 21.01.2020 г. № 20 Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации" от 21.01.2020 № 20 // Официальный интернет-портал правовой информации. - 2020 г. - с изм. и допол. в ред. от 10.03.2025 № 141.

30. Холдоров, Б. Б. Исследования в области изучения рапсового масла / Б. Б. Холдоров, О. С. Эрматов, Б. А. Эргашев // Наука, образование, инновации: апробация результатов исследований: Материалы Международной (заочной) научно-практической конференции, Нефтекамск, 07 февраля 2020 года / под общей редакцией А.И. Вострецова. – Нефтекамск: Научно-издательский центр "Мир науки" (ИП Вострецов Александр Ильич), 2020. – С. 234-241. – EDN QSOKJQ.

31. Alemayehu N., Becker H. C. Variation and inheritance of erucic acid content in *Brassica carinata* germplasm collections from Ethiopia // Plant breeding. – 2001. – Т. 120. – №. 4. – С. 331-335.

32. Alkooranee J. T. et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe cruciferarum* on *Brassica napus* in China // Plant disease. – 2015. – Т. 99. – №. 11. – С. 1651-1651.

33. An H. et al. Transcriptome and organellar sequencing highlights the complex origin and diversification of allotetraploid *Brassica napus* // Nature communications. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 2878.

34. Anand I. J., Downey R. K. A study of erucic acid alleles in digenomic rapeseed (*Brassica napus* L.) // Canadian Journal of Plant Science. – 1981. – Т. 61. – №. 2. – С. 198-202. <https://doi.org/10.4141/cjps81-030>

35. Anderson E., Stebbins Jr G. L. Hybridization as an evolutionary stimulus // Evolution. – 1954. – С. 378-388.

36. Archibald J. M., Keeling P. J. Actin and ubiquitin protein sequences support a cercozoan/foraminiferan ancestry for the plasmodiophorid plant pathogens // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2004. – Т. 51. – №. 1. – С. 113-118.

37. Ashutosh, B., Kumar, P., Dinesh Kumar, V., Sharma, P. C., Prakash, S., & Bhat, S. R. (2008). A novel orf108 co-transcribed with the atpA gene is associated with cytoplasmic male sterility in *Brassica juncea*. *Plant and Cell Physiology*, 49(2), 284–289. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm171>
38. Ayers G. W. Studies on the life history of the club root organism, *Plasmodiophora brassicae* //Canadian Journal of Research. – 1944. – T. 22. – №. 4. – C. 143-149.
39. Bagherani N., Shimi P. Evaluation of some herbicides for weed control in oilseed rape (*Brassica napus* L.). – 2001.
40. Bailey C. D. et al. Toward a global phylogeny of the Brassicaceae //Molecular biology and evolution. – 2006. – T. 23. – №. 11. – C. 2142-2160.
41. Bass D. et al. Phylogeny and classification of Cercomonadida (protozoa, Cercozoa): Cercomonas, Eocercomonas, Paracercomonas, and Cavernomonas gen. nov //Protist. – 2009. – T. 160. – №. 4. – C. 483-521.
42. Bass D. et al. Polyubiquitin insertions and the phylogeny of Cercozoa and Rhizaria //Protist. – 2005. – T. 156. – №. 2. – C. 149-161.
43. Bechyne M., Kondra Z. P. Effect of seed pod location on the fatty acid composition of seed oil from rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*) //Canadian Journal of Plant Science. – 1970. – T. 50. – №. 2. – C. 151-154.
44. Bellaoui M. et al. The restorer Rfo gene acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids //Plant Molecular Biology. – 1999. – T. 40. – №. 5. – C. 893-902.
45. Bijanzadeh E., Naderi R., Behpoori A. Interrelationships between oilseed rape yield and weeds population under herbicides application //Australian journal of crop science. – 2010. – T. 4. – №. 3. – C. 155-162.
46. Blakeslee A. F., Satina S. New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media //Science. – 1944. – T. 99. – №. 2574. – C. 331-334.
47. Bohra A. et al. Cytoplasmic male sterility (IMC) in hybrid breeding in field crops //Plant Cell Reports. – 2016. – T. 35. – C. 967-993.

48. Bonhomme, S., Burdar, F., Lancelin, D., Samll, I., Defrance, M. C., and Pelletier, G. (1992). Sequence and analysis of Nco 2.5 Ogura-specific fragment correlated with male sterility in Brassica cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235, 240–248.
49. Botero-Ramírez A. et al. Clubroot symptoms and resting spore production in a doubled haploid population of oilseed rape (*Brassica napus*) are controlled by four main QTLs //Frontiers in Plant Science. – 2020. – T. 11. – C. 604527.
50. Bradshaw M., Braun U., Pfister D. H. Phylogeny and taxonomy of the genera of Erysiphaceae, part 4: Erysiphe (the “Uncinula lineage”) //Mycologia. – 2023. – T. 115. – №. 6. – C. 871-903
51. Brown, G.G.; Formanová, N.; Jin, H.; Wargachuk, R.; Dendy, C.; Patil, P.; Laforest, M.; Zhang, J.; Cheung, W.Y.; Landry, B.S. The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 2003, 35, 262–272.
52. Buczacki S. T., Ockendon J. G. Preliminary observations on variation in susceptibility to clubroot among collections of some wild crucifers //Annals of applied Biology. – 1979. – T. 92. – №. 1. – C. 113-118.
53. Buczacki, S.T., Toxopeus, H., Mattusch, P., Johnston, T.D., Dixon, G.R. and Hobolth, G.R. (1975) Study of physiological specialization in Plasmodiophora brassicae: proposals for attempted rationalization through an international approach. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65, 295–303.
54. Bulman S. R. et al. A phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Plasmodiophorida and Phagomyxida //Protist. – 2001. – T. 152. – №. 1. – C. 43-51.
55. Bulman S. et al. Genomics of biotrophic, plant-infecting plasmodiophorids using in vitro dual cultures //Protist. – 2011. – T. 162. – №. 3. – C. 449-461.
56. Carré P., Pouzet A., Rapeseed market, worldwide and in Europe //Oilseeds and fats, crops and lipids. – 2014. – T. 21. – №. 1. – C. D102.

57. Castlebury L. A., Domier L. L. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of *Plasmodiophora brassicae* //Mycologia. – 1998. – T. 90. – №. 1. – C. 102-107.
58. Cavalier-Smith T., Chao E. E. Y. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa) //Protist. – 2003. – T. 154. – №. 3-4. – C. 341-358.
59. Chalhoub B. et al. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome //science. – 2014. – T. 345. – №. 6199. – C. 950-953.
60. Chen L., Liu Y. G. Male sterility and fertility restoration in crops //Annual review of plant biology. – 2014. – T. 65. – C. 579-606.
61. Chiang M. S., Chiang B. Y., Grant W. F. Transfer of resistance to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* from *Brassica napus* to cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). I. Interspecific hybridization between *B. napus* and *B. oleracea* var. *capitata* //Euphytica. – 1977. – T. 26. – №. 2. – C. 319-336.
62. Delourme, R.; Eber, F.; Renard, M. Transfer of radish cytoplasmic male sterility from *Brassica napus* to *B. juncea* and *B. rapa*. Crucif. Newsl. 1994, 16, 79.
63. Desloire, S.; Gherbi, H.; Laloui, W.; Marhadour, S.; Clouet, V.; Cattolico, L.; Falentin, C.; Giancola, S.; Renard, M.; Budar, F. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. EMBO Rep. 2003, 4, 588–594.
64. Diederichsen E. et al. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops //Journal of Plant Growth Regulation. – 2009. – T. 28. – №. 3. – C. 265-281.
65. Dieterich, J. H., Braun, H. P., & Schmitz, U. K. (2003). Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. Plant Molecular Biology, 53(5), 553–563.
66. Dixon G. R. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor.-A review of recent advances //IV International Symposium on Brassicas and XIV Crucifer Genetics Workshop 706. – 2004. – C. 271-282.

67. Dixon G. R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2009. – T. 28. – №. 3. – C. 194-202.
68. East E. M. Heterosis // *Genetics*. – 1936. – T. 21. – №. 4. – C. 375.
69. Engelke T., Hirsche J., Roitsch T. Metabolically engineered male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Theoretical and applied genetics*. – 2011. – T. 122. – C. 163-174.
70. Fan Z., Tai W., Stefansson B.R. Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male sterility systems in rape (*Brassica napus* L.) // *Canadian J. Plant Sci.* 1986. V. 66. P. 221–227.
71. Feng, J.; Primomo, V.; Li, Z.; Zhang, Y.; Jan, C.C.; Tulsieram, L.; Xu, S.S. Physical localization and genetic mapping of the fertility restoration gene *Rfo* in canola (*Brassica napus* L.). *Genome* 2009, 52, 401–407.
72. Ferreira M. E. et al. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus* // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1995. – T. 90. – №. 5. – C. 727-732.
73. Finlayson A. J., Krzymanski J., Downey R. K. Comparison of chemical and agronomic characteristics of two *Brassica napus* L. cultivars, Bronowski and Target // *Journal of the American Oil Chemists Society*. – 1973. – T. 50. – №. 10. – C. 407-410.
74. Fredua-Agyeman R. Et al. Assessment of resistance to ‘new’ virulent populations of *Plasmodiophora brassicae* reveals potential loss of clubroot resistance genes from donor parent *Brassica rapa* L. ssp. *rapifera* (ECD 04) during doubled haploid production // *Plant Pathol.* – 2017. – T. 67. – C. 892-901.
75. Fredua-Agyeman R., Rahman H. Mapping of the clubroot disease resistance in spring *Brassica napus* canola introgressed from European winter canola cv. ‘Mendel’ // *Euphytica*. – 2016. – T. 211. – C. 201-213.
76. Friberg H., Lagerlöf J., Rämert B. Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant // *European Journal of Plant Pathology*. – 2005. – T. 113. – №. 3. – C. 275-281.

77. Friedt W., Tu J., Fu T. Academic and economic importance of *Brassica napus* rapeseed //The *Brassica napus* genome. – Cham : Springer International Publishing, 2018. – C. 1-20.
78. Fu T. D. Production and research of rapeseed in the People's Republic of China. – 1981.
79. Fu T. D. et al. The discovery, research and utilization of pol cytoplasmic male sterile in *Brassica napus* //Prog Nat Sci Commun State Key Lab. – 1995. – T. 5. – C. 287-93.
80. Fujii S., Bond C. S., Small I. D. Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 4. – C. 1723-1728.
81. Fujii S. et al. Discovery of global genomic re-organization based on comparison of two newly sequenced rice mitochondrial genomes with cytoplasmic male sterility-related genes //Bmc Genomics. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 209.
82. Gobron N. et al. A cryptic cytoplasmic male sterility unveils a possible gynodioecious past for *Arabidopsis thaliana* //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 4. – C. e62450.
83. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells //Experimental cell research. – 1968. – T. 50. – №. 1. – C. 151-158.
84. Gautam R., Shukla P., Kirti P. B. Male sterility in plants: an overview of advancements from natural IqMC to genetically manipulated systems for hybrid seed production //Theoretical and applied genetics. – 2023. – T. 136. – №. 9. – C. 195.
85. Girke A., Schierholt A., Becker H. C. Extending the rapeseed gene pool with resynthesized *Brassica napus* II: Heterosis //Theoretical and applied genetics. – 2012. – T. 124. – №. 6. – C. 1017-1026.

86. Gu J. et al. The story of a decade: Genomics, functional genomics, and molecular breeding in *Brassica napus* //Plant Communications. – 2024. – T. 5. – №. 4.
87. Guo, Y.; Cheng, L.; Long, W.; Gao, J.; Zhang, J.; Chen, S.; Pu, H.; Hu, M. Synergistic mutations of two rapeseed AHAS genes confer high resistance to sulfonylurea herbicides for weed control. Theoretical and Applied Genetics. – 2020. – T. 133. – №. 10. – C. 2811-2824.
88. Hacquard S. The genomics of powdery mildew fungi: past achievements, present status and future prospects //Advances in Botanical Research. – 2014. – T. 70. – C. 109-142.
89. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development // Plant Cell. 2004. V. 16. S154–S169. <https://doi.org/10.1105/tpc.015966>
90. Harvey B. L., Downey R. K. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*) //Canadian Journal of Plant Science. – 1964. – T. 44. – №. 1. – C. 104-111. <https://doi.org/10.4141/cjps64-019>
91. Hasan M. J., Rahman H. Genetics and molecular mapping of resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes 2, 3, 5, 6, and 8 in rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*) //Genome. – 2016. – T. 59. – №. 10. – C. 805-815.
92. Haukka-pää A. L., Junnila S., Eriksson C. Efficacy of imazamox in imidazolinone-resistant spring oilseed rape in Finland //Agricultural and Food Science. – 2005. – T. 14. – №. 4. – C. 377-388.
93. Hatakeyama K. et al. The tandem repeated organization of NB-LRR genes in the clubroot-resistant CRb locus in *Brassica rapa* L //Molecular genetics and genomics. – 2017. – T. 292. – №. 2. – C. 397-405.
94. Heath D. W., Earle E. D. Synthesis of Ogura male sterile rapeseed (*Brassica napus* L.) with cold tolerance by protoplast fusion and effects of atrazine resistance on seed yield //Plant cell reports. – 1996. – T. 15. – C. 939-944.

95. Heyn F. W. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus* //Eucarpia Cruciferae Newsletter. – 1976. – T. 1. – C. 15-16.
96. Heyn F. W. Introgression of restorer genes from *Raphanus sativus* into cytoplasmic male sterile *Brassica napus* and the genetics of fertility restoration. – 1979.
97. Hirani A. H. et al. Transferring clubroot resistance from Chinese cabbage (*Brassica rapa*) to canola (*B. napus*) //Canadian Journal of Plant Pathology. – 2016. – T. 38. – №. 1. – C. 82-90.
98. Honig F. Der Kohlkropferreger (*Plasmodiophora brassicae* Wor.): Eine Monographie : дис. – Leipzig, Germany : Verlag nicht ermittelbar, 1931.
99. Hu J. Et al. Genomic selection and genetic architecture of agronomic traits during modern rapeseed breeding //Nature Genetics. – 2022. – T. 54. – №. 5. – C. 694-704.
100. Hu X. et al. Mapping of the Ogura fertility restorer gene *Rfo* and development of *Rfo* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.) //Molecular breeding. – 2008. – T. 22. – №. 4. – C. 663-674.
101. Hu M. Et al. Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production //Molecular Breeding. – 2015. – T. 35. – C. 1-13.
102. Hu Q. Et al. Establishment and identification of cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* by intergeneric somatic hybridization //Agricultural Sciences in China. – 2003. – T. 2. – C. 1321-1328.
103. Hu, J.; Wang, K.; Huang, W.; Liu, G.; Gao, Y.; Wang, J.; Huang, Q.; Ji, Y.; Qin, X.; Wan, L.; et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell* 2012, 24, 109–122.
104. Huang Q. et al. Inheritance and molecular characterization of a novel mutated *AHAS* gene responsible for the resistance of *AHAS*-inhibiting herbicides

in rapeseed (*Brassica napus* L.) //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 4. – C. 1345.

105. Huang C. H. et al. Resolution of Brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution //Molecular biology and evolution. – 2016. – T. 33. – №. 2. – C. 394-412.

106. Hunziker P. et al. De novo indol-3-ylmethyl glucosinolate biosynthesis, and not long-distance transport, contributes to defence of Arabidopsis against powdery mildew //Plant, Cell & Environment. – 2020. – T. 43. – №. 6. – C. 1571-1583.

107. HWANG S. F. et al. Plasmodiophora brassicae: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop //Molecular plant pathology. – 2012. – T. 13. – №. 2. – C. 105-113.

108. Ivanov M. K., Dymshits G. M. Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants //Russian Journal of Genetics. – 2007. – T. 43. – C. 354-368.

109. Javed M. A. et al. The clubroot pathogen Plasmodiophora brassicae: A profile update //Molecular Plant Pathology. – 2022. – T. 24. – №. 2. – C. 89.

110. Jeong S. W. et al. Chlorosis of Ogura-CMS *Brassica rapa* is due to down-regulation of genes for chloroplast proteins //Journal of Plant Biotechnology. – 2017. – T. 44. – №. 2. – C. 115-124.

111. Jing, B., Heng, S., Tong, D., Wan, Z., Fu, T., Tu, J., & Wen, J. (2012). A male sterility-associated cytotoxic protein ORF288 in *Brassica juncea* causes aborted pollen development. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1285–1295. <https://doi.org/10.1093/jxb/err355>

112. Jones D. F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1917. – T. 3. – №. 4. – C. 310-312.

113. JÖNSSON R. Erucic-acid heredity in rapeseed:(*Brassica napus* L. and *Brassica campestris* L.) //Hereditas. – 1977. – T. 86. – №. 2. – C. 159-170. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1977.tb01226.x>

114. Jourden C. et al. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed //Molecular Breeding. – 1996. – T. 2. – №. 1. – C. 61-71. <https://doi.org/10.1007/BF00171352>
115. Kageyama K., Asano T. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae* //Journal of Plant Growth Regulation. – 2009. – T. 28. – C. 203-211.
116. Kamei A. et al. QTL mapping of clubroot resistance in radish (*Raphanus sativus* L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – T. 120. – C. 1021-1027.
117. Kang, L., Li, P., Wang, A., Hao, X., Wu, X., & Wang, Y. (2017). A novel cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* (inap CMS) with carpelloid stamens via protoplast fusion with Chinese woad. *Frontiers in Plant Science*, 8, 529.
118. Kaneko Y., Bang S. W. Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of Brassicaceae crops //Breeding science. – 2014. – T. 64. – №. 1. – C. 14-22.
119. Kaeppler S. Heterosis: many genes, many mechanisms—end the search for an undiscovered unifying theory //International Scholarly Research Notices. – 2012. – T. 2012. – №. 1. – C. 682824.
120. Karim M. M. et al. Marker-assisted selection of low erucic acid quantity in short duration *Brassica rapa* //Euphytica. – 2016. – T. 208. – C. 535-544.
121. Kaul M. L. H. Male sterility in higher plants. – Springer Science & Business Media, 2012. – T. 10.
122. Khalid M. et al. *Plasmodiophora brassicae*—The causal agent of clubroot and its biological control/suppression with fungi—A review //South African Journal of Botany. – 2022. – T. 147. – C. 325-331.
123. Kliebenstein D. J., Rowe H. C., Denby K. J. Secondary metabolites influence *Arabidopsis*/*Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity //The Plant Journal. – 2005. – T. 44. – №. 1. – C. 25-36.
124. Kole C. et al. Comparative mapping of loci controlling winter survival and related traits in oilseed *Brassica rapa* and *B. napus* //Molecular Breeding. – 2002. – T. 9. – №. 3. – C. 201-210.

125. Konuskan D. B., Arslan M., Oksuz A. Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region //Saudi Journal of Biological Sciences. – 2019. – T. 26. – №. 2. – C. 340-344.
126. Kozar E. V., Domblides E. A. Imidazolinone Resistance in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.): Current Status, Breeding, Molecular Markers and Prospects for Application in Hybrid Seed Purity Improve
127. Kumar P. et al. An evolutionarily conserved mitochondrial orf108 is associated with cytoplasmic male sterility in different alloplasmic lines of *Brassica juncea* and induces male sterility in transgenic *Arabidopsis thaliana* //Journal of Experimental Botany. – 2012. – T. 63. – №. 8. – C. 2921-2932.
128. Labroo M. R., Studer A. J., Rutkoski J. E. Heterosis and hybrid crop breeding: a multidisciplinary review //Frontiers in genetics. – 2021. – T. 12. – C. 643761.
129. Laibach F. Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. – 1925.
130. Lammerts W. E. Embryo culture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seed //American Journal of Botany. – 1942. – C. 166-171.
131. Landry B. S. et al. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin) //Genome. – 1992. – T. 35. – №. 3. – C. 409-420.
132. Larue C. T. et al. Development of enzymes for robust aryloxyphenoxypropionate and synthetic auxin herbicide tolerance traits in maize and soybean crops //Pest Management Science. – 2019. – T. 75. – №. 8. – C. 2086-2094.
133. L'Homme Y. et al. *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol

CMS-associated orf224 gene //Current Genetics. – 1997. – T. 31. – №. 4. – C. 325-335.

134. Li P. et al. Development of a fertility restorer for inap CMS (Isatis indigotica) Brassica napus through genetic introgression of one alien addition //Frontiers in plant science. – 2019. – T. 10. – C. 257.

135. Li-Beisson Y. et al. Acyl-lipid metabolism //The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists. – 2013. – T. 11. – C. e0161. <https://doi.org/10.1199/tab.0161>

136. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus //Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. – 1982. – T. 105. – №. 5. – C. 427-434.

137. Liu P. Et al. Hybrid performance of an immortalized F2 rapeseed population is driven by additive, dominance, and epistatic effects //Frontiers in Plant Science. – 2017. – T. 8. – C. 815.

138. Liu Y. et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of BnaFAE1 genes confers low-erucic acid in Brassica napus //Frontiers in plant science. – 2022. – T. 13. – C. 848723. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.848723>

139. Liu Y. et al. Screening of clubroot-resistant varieties and transfer of clubroot resistance genes to Brassica napus using distant hybridization //Breeding science. – 2018. – T. 68. – №. 2. – C. 258-267.

140. Liu Z. et al. Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene Rfp for pol CMS in rapeseed (Brassica napus L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – T. 125. – №. 4. – C. 773-779.

141. Macfarlane I. Germination of resting spores of Plasmodiophora brassicae //Transactions of the British Mycological Society. – 1970. – T. 55. – №. 1. – C. 97-112.

142. Manzanares-Dauleux M. J., Barret P., Thomas G. Development of a pathotype specific SCAR marker in Plasmodiophora brassicae //European journal of plant pathology. – 2000. – T. 106. – №. 8. – C. 781-787.

143. Meena P. D. et al. Alternaria blight: a chronic disease in rapeseed-mustard //Journal of Oilseed Brassica. – 2010. – T. 1. – №. 1. – C. 1-11.

144. Mikhaylova E. et al. Identification of the powdery mildew caused by *Erysiphe cruciferarum* on *Brassica napus* in Russia //AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing, 2021. – T. 2388
145. Miki B. L. et al. Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance //Theoretical and Applied Genetics. – 1990. – T. 80. – C. 449-458.
146. Muirhead K., Pérez-López E. Plasmodiophora brassicae CBM18 proteins bind chitin and suppress chitin-triggered immunity //PhytoFrontiers™. – 2022. – T. 2. – №. 1. – C. 21-29.
147. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures //Physiologia plantarum. – 1962. – T. 15. – №. 3.
148. Nagaharu U. Et al. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization //Jpn J Bot. – 1935. – T. 7. – №. 7. – C. 389-452.
149. Naiki T., Dixon G. R. The effects of chemicals on developmental stages of Plasmodiophora brassicae (clubroot) //Plant Pathology. – 1987. – T. 36. – №. 3. – C. 316-327.
150. Neik T. X., Barbetti M. J., Batley J. Current status and challenges in identifying disease resistance genes in *Brassica napus* // Frontiers in plant science. – 2017. – T. 8. – C. 1788
151. Neuhauser S., Kirchmair M., Gleason F. H. Ecological roles of the parasitic phytomyxids (plasmodiophorids) in marine ecosystems—a review //Marine and Freshwater Research. – 2011. – T. 62. – №. 4. – C. 365-371.
152. Ogura, H. (1968). Studies on the new male sterility in Japanese radish with special reference to the Utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 6, 39–78.
153. Pandolfo C. E. et al. Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus sativus*) to AHAS-inhibiting herbicides in Argentina //Planta Daninha. – 2013. – T. 31. – C. 657-666.

154. Pang W. et al. Development of a sinitic clubroot differential set for the pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* //Frontiers in Plant Science. – 2020. – T. 11. – C. 568771.
155. Parlevliet J. E., Zadoks J. C. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants //Euphytica. – 1977. – T. 26. – №. 1. – C. 5-21.
156. Pink D., Puddephat I. Deployment of disease resistance genes by plant transformation—a ‘mix and match’ approach //Trends in plant science. – 1999. – T. 4. – №. 2. – C. 71-75.
157. Plaszkó T. et al. Effects of glucosinolate-derived isothiocyanates on fungi: A comprehensive review on direct effects, mechanisms, structure-activity relationship data and possible agricultural applications //Journal of Fungi. – 2021. – T. 7. – №. 7. – C. 539.
158. Prakash S. et al. Expression of male sterility in alloplasmic Brassica juncea with *Erucastrum canariense* cytoplasm and the development of a fertility restoration system //Plant Breeding. – 2001. – T. 120. – №. 6. – C. 479-482.
159. Priyadarshan P. M. PLANT BREEDING: classical to modern. – 2019.
160. Primard-Brisset C. et al. A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA cms in rapeseed (*Brassica napus* L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – T. 111. – №. 4. – C. 736-746.
161. Qian W. et al. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.): I. Crosses between spring and Chinese semi-winter lines //Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – T. 115. – №. 1. – C. 27-34.
162. Qian W. et al. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.): II. Crosses between European winter and Chinese semi-winter lines //Plant Breeding. – 2009. – T. 128. – №. 5. – C. 466-470.
163. Radoev M., Becker H. C., Ecke W. Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus* L.) by quantitative trait locus mapping //Genetics. – 2008. – T. 179. – №. 3. – C. 1547-1558.

164. Raghavan V. Experimental embryogenesis in vascular plants. – 1976. – C. 603pp.
165. Raghavan V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2003. – T. 39. – №. 5. – C. 437-442.
166. Rashid A. et al. Effects of root exudates and pH on *Plasmodiophora brassicae* resting spore germination and infection of canola (*Brassica napus* L.) root hairs //Crop Protection. – 2013. – T. 48. – C. 16-23.
167. Ren, W.; Si, J.; Chen, L.; Fang, Z.; Zhuang, M.; Lv, H.; Wang, Y.; Ji, J.; Yu, H.; Zhang, Y. Mechanism and Utilization of Ogura Cytoplasmic Male Sterility in Cruciferae Crops. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9099.
168. Rieseberg L. H., Wendel J. F. Introgression and its consequences //Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, New York. – 1993. – C. 70-109.
169. Rousselle P., Bregeon M. Premiers résultats d'un programme d'introduction de l'androstérilité "Ogura" du radis chez le colza //Agronomie. – 1982. – T. 2. – №. 9. – C. 859-864.
170. Runno-Paurson E. et al. Powdery mildew (*Erysiphe cruciferarum*) evaluation on oilseed rape and alternative cruciferous oilseed crops in the northern Baltic region in unusually warm growing seasons //Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science. – 2021. – T. 71. – №. 6. – C. 443-452.
171. Saharan G. S., Mehta N. K., Meena P. D. Powdery mildew disease of crucifers: biology, ecology and disease management. – Springer Singapore, 2019.
172. Saini R. K., Keum Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review //Life sciences. – 2018. – T. 203. – C. 255-267.
173. Sanetomo R., Gebhardt C. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits // BMC Plant Biol. 2015. V. 15: 162. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0545-y>

174. Sang S.-F., Mei D.S., Liu J. et al. Organelle genome composition and candidate gene identification for Nsa cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* // BMC Genomics. 2019. V. 20: 813. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6187-y>
175. Sanyal A. et al. Erucic acid rapeseed: 1. Prospects of improvements // OCL. – 2015. – T. 22. – №. 3. – C. D303. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015011>
176. Schwabe S., Gruber S., Claupein W. Oilseed rape yield performance in the Clearfield® System under varying management intensities // Agronomy. – 2021. – T. 11. – №. 12. – C. 2551.
177. Shen J. et al. A comprehensive review of health-benefiting components in rapeseed oil // Nutrients. – 2023. – T. 15. – №. 4. – C. 999.
178. Shiga T., Baba S. Cytoplasmic Male Sterility in Oil Seed Rape. *Brassica napus* L., and its Utilization to Breeding // Japanese Journal of Breeding. – 1973. – T. 23. – №. 4. – C. 187-197.
179. Shiga T., Baba S. Cytoplasmic male sterility in rape plants (*Brassica napus* L.) // Jpn J Breed. – 1971. – T. 21. – C. 16-17.
180. Shirasu K., Schulze-Lefert P. Regulators of cell death in disease resistance // Plant Molecular Biology. – 2000. – T. 44. – №. 3. – C. 371-385.
181. Shull G. H. What is "heterosis"? // Genetics. – 1948. – T. 33. – №. 5. – C. 439.
182. Singh B. K., Shaner D. L. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field // The Plant Cell. – 1995. – T. 7. – №. 7. – C. 935.
183. Singh S. Current understanding of male sterility systems in vegetable Brassicas and their exploitation in hybrid breeding // Plant Reproduction. – 2019. – T. 32. – C. 231-256.
184. Singh M., Brown G. G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region // The Plant Cell. – 1991. – T. 3. – №. 12. – C. 1349.
185. Singh M., Brown G. G. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the *Brassica* "Polima" CMS: developmental influences // Current Genetics. – 1993. – T. 24. – №. 4. – C. 316-322.

186. Snowdon R. J., Friedt W. Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities //Plant Breeding. – 2004. – Т. 123. – №. 1. – С. 1-8.
187. Stefansson B. R., Hougen F. W., Downey R. K. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid //Canadian Journal of Plant Science. – 1961. – Т. 41. – №. 1. – С. 218-219
188. Stewart J. M. D. In vitro fertilization and embryo rescue //Environmental and experimental Botany. – 1981. – Т. 21. – №. 3-4. – С. 301-315.
189. Strehlow B., de Mol F., Struck C. Risk potential of clubroot disease on winter oilseed rape //Plant Disease. – 2015. – Т. 99. – №. 5. – С. 667-675.
190. Struck C., Rüsche S., Strehlow B. Control Strategies of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. Microorganisms 10: 620 [Электронный ресурс].
191. Takamatsu S. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences //Mycoscience. – 2004. – Т. 45. – №. 2. – С. 147-157.
192. Tanaka K. Agricultural Research in a Centrally Planned Economy: The Case of Rapeseed Research in the People's Republic of China (PRC) //Asian Journal of Social Science. – 1998. – Т. 26. – №. 1. – С. 69-92.
193. Thompson K. F. Cytoplasmic male-sterility in oil-seed rape //Heredity. – 1972. – Т. 29. – №. 2. – С. 253-257.
194. Tukey H. B. Growth patterns of plants developed from immature embryos in artificial culture //Botanical Gazette. – 1938. – Т. 99. – №. 3. – С. 630-665.
195. Van Overbeek J. Water uptake by excised root systems of the tomato due to non-osmotic forces //American Journal of Botany. – 1942. – С. 677-683.
196. Van de Wouw A. P. et al. Fungal diseases of canola in Australia: identification of trends, threats and potential therapies // Australasian Plant Pathology. – 2016. – Т. 45. – С. 415-423

197. Uyttewaal, M.; Arnal, N.; Quadrado, M.; Martin-Canadell, A.; Vrielynck, N.; Hiard, S.; Gherbi, H.; Bendahmane, A.; Budar, F.; Mireau, H. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for *Ogura* cytoplasmic male sterility. *Plant Cell* 2009, 20, 3331–3345.
198. Wan H. et al. Improvement of the resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Ogu* IQMC restorer in *Brassica napus* using wild *B. oleracea* as donor. – 2020.
199. Wan Z. et al. Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (hau) in *Brassica juncea* and its transfer to *B. napus* // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – T. 116. – C. 355-362.
200. Wan Z., Wang X., Fu T. Cytology study on the cytoplasmic male sterile line 6-102A in *B. juncea* // *Chinese journal of oil crop sciences*. – 2006. – T. 28. – №. 3. – C. 268.
201. Wang Q. B. et al. Development and application of high-throughput SNP markers for *Ogura*-IQMC fertility restorer gene in radish // *Acta Horticulturae Sinica*. – 2017. – T. 44. – №. 7. – C. 1309-1318.
202. Wang X. et al. A breeding method for *Ogura* CMS restorer line independent of restorer source in *Brassica napus* // *Frontiers in Genetics*. – 2025. – T. 15. – C. 1521277.
203. Wang, Y., Kang, L., Zhang, Z., Wang, A., Li, P., Wang, Y., & Wu, X. (2021). Unraveling the genetic basis of fertility restoration for cytoplasmic male sterile line WNJ01A originated from *Brassica juncea* in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 721476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721476>
204. Ward E., Adams M. J. Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus-and species-specific PCR primers // *Mycological Research*. – 1998. – T. 102. – №. 8. – C. 965-974.

205. Watson A. G., Baker K. F. Possible gene centers for resistance in the genus *Brassica* to *Plasmodiophora brassicae* //Economic Botany. – 1969. – T. 23. – №. 3. – C. 245-252.
206. Weis C. et al. CYP83A1 is required for metabolic compatibility of *Arabidopsis* with the adapted powdery mildew fungus *Erysiphe cruciferarum* //New Phytologist. – 2014. – T. 202. – №. 4. – C. 1310-1319.
207. Werner S. et al. Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape //Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – T. 116. – C. 363-372.
208. Wilmer J. A., Helsper J. P. F. G., van der Plas L. H. W. Effects of abscisic acid and temperature on erucic acid accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) //Journal of plant physiology. – 1997. – T. 150. – №. 4. – C. 414-419. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80091-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80091-0)
209. Wu, J., Cai, G., Tu, J., Li, L., Liu, S., Luo, X., & Wu, X. (2019). Organelle genome composition and candidate gene identification for Nsa cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*. BMC Genomics, 20, 813. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6183-4>
210. Xiao Q. et al. Molecular Analysis uncovers the mechanism of fertility restoration in temperature-sensitive polima cytoplasmic male-sterile *Brassica napus* //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 22. – C. 12450.
211. Xing M. et al. Analysis of Rfo-Mediated Network in Regulating Fertility Restoration in *Brassica oleracea* //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 22. – C. 12026.
212. Xue J. Y. et al. Maternal inheritance of U's triangle and evolutionary process of *Brassica* mitochondrial genomes //Frontiers in plant science. – 2020. – T. 11. – C. 805.
213. Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops // Breed. Sci. 2014. V. 64. P. 38–47. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.38> Wang, T.; Guo, Y.; Wu, Z.; Xia, S.; Hua, S.; Tu, J.; Li, M.; Chen, W. Genetic characterization of a new radish introgression line carrying the restorer gene for Ogura IIMC in *Brassica napus*. PLoS ONE 2020, 15, e0236273.

214. Yu H. et al. Development of a novel allele-specific Rfo marker and creation of Ogura CMS fertility-restored interspecific hybrids in Brassica oleracea //Theoretical and Applied Genetics. – 2016. – T. 129. – №. 8. – C. 1625-1637.
215. Yu Q., Powles S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding //Pest management science. – 2014. – T. 70. – №. 9. – C. 1340-1350.
216. Zandberg J. D. et al. The global assessment of oilseed brassica crop species yield, yield stability and the underlying genetics //Plants. – 2022. – T. 11. – №. 20. – C. 2740.
217. Ziebur N. K., Brink R. A. The stimulative effect of Hordeum endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro //American Journal of Botany. – 1951. – C. 253-256.
218. Zhan Z. et al. Association of clubroot resistance locus PbBa8. 1 with a linkage drag of high erucic acid content in the seed of the European turnip //Frontiers in plant science. – 2020. – T. 11. – C. 810.
219. Zhang X. et al. Pan-genome of Raphanus highlights genetic variation and introgression among domesticated, wild, and weedy radishes //Molecular Plant. – 2021. – T. 14. – №. 12. – C. 2032-2055.
220. Zhang, H., Li, S., Li, Y., Zhao, Y., Wang, D., Yang, J., & Zhang, M. (2020). Comparative cytological and transcriptome analyses of anther development in Nsa cytoplasmic male sterile (1258A) and maintainer lines of Brassica napus. International Journal of Molecular Sciences, 21(24), 9498. <https://doi.org/10.3390/ijms21249498>
221. Zhao H. X. et al. Identification of cytoplasm types in rapeseed (Brassica napus L.) accessions by a multiplex PCR assay //Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – T. 121. – №. 4. – C. 643-650.
222. Zheng M. et al. Integrated strategies for increasing rapeseed yield //Trends in Plant Science. – 2022. – T. 27. – №. 8. – C. 742-745.
223. Zhu M. et al. Introgression of clubroot resistant gene into Brassica oleracea L. from Brassica rapa based on homoeologous exchange //Horticulture Research. – 2022. – T. 9. – C.195.

224. Zou J. et al. Genome-wide selection footprints and deleterious variations in young Asian allotetraploid rapeseed //Plant biotechnology journal. – 2019. – T. 17. – №. 10. – C. 1998-2010.

Приложение

Приложение А

Компоненты питательных сред MS (Murashige and Skoog, 1962) и B5 (Gamborg et al., 1968), применяемых для технологии спасения зародышей

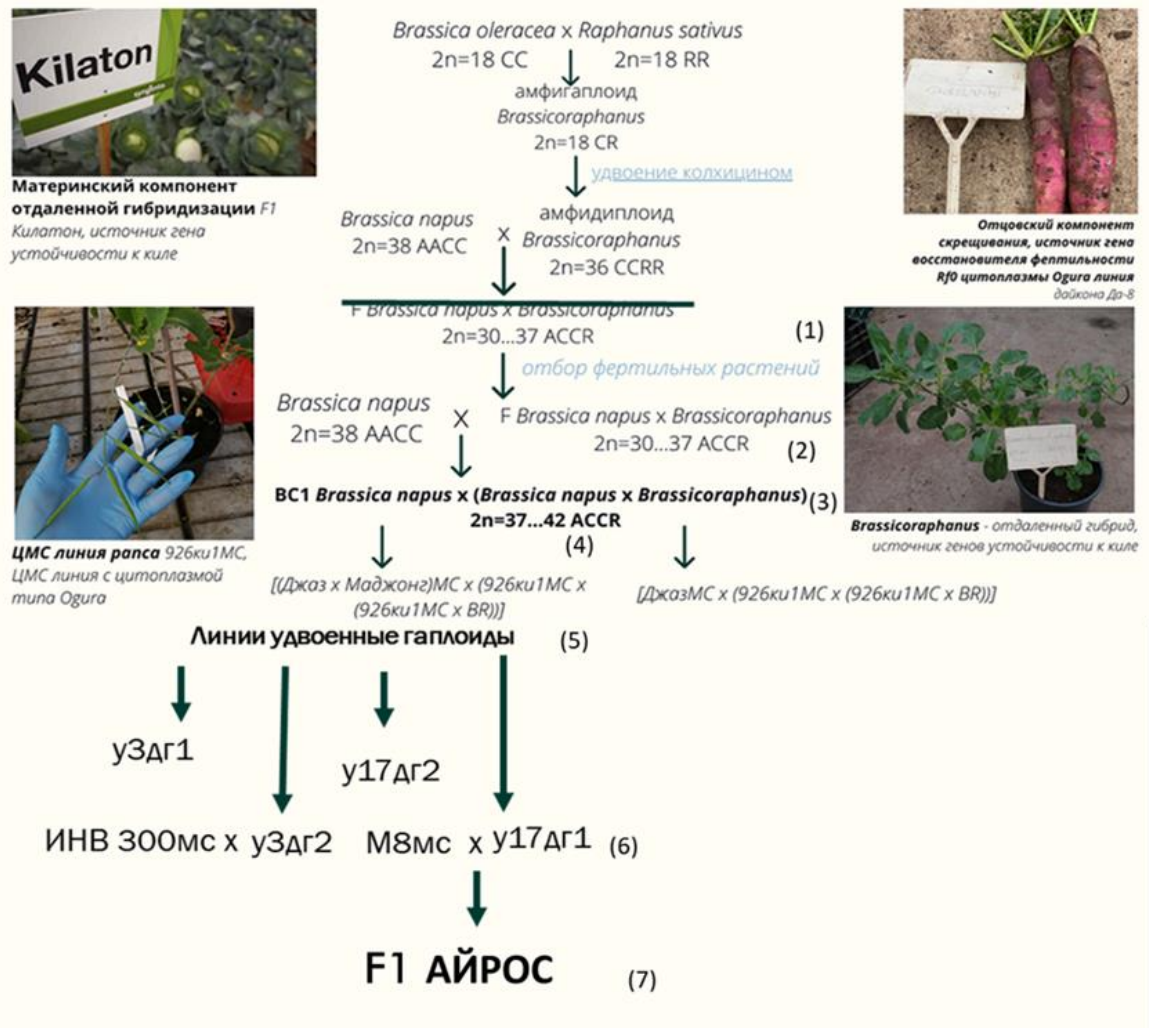
Компонент	Химический реагент	Конечная концентрация, мг/мл	
		MS	B5
Макроэлементы	KNO ₃	1900	2500
	NH ₄ NO ₃	1650	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	150
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	370	250
	KH ₂ PO ₄	170	-
	NaH ₂ PO ₄ * 4H ₂ O	-	150
Микроэлементы	KJ	0,83	0,75
	H ₃ BO ₃	6,3	3
	MnSO ₄ * 4H ₂ O	22,3	-
	MnSO ₄ * H ₂ O	-	10
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	2
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,025
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	0,025
Источник железа	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8
	Na ₂ ЭДТА x 2H ₂ O	37,3	37,3
Органические компоненты	Никотиновая кислота	0,5	1
	Пиридоксин-HCl	0,1	1
	Тиамин-HCl	0,5	10
	Глицин	2	-
	Мио-инозитол	100	100

Приложение Б

Компоненты среды NLN (Lichter, 1982), применяемой для изоляции, промывания и культивирования микроспор

Компонент	Химический реагент	Конечная концентрация, мг/мл
		MS
Макроэлементы	KNO ₃	125
	Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	500
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	125
	KH ₂ PO ₄	125
Микроэлементы	H ₃ BO ₃	10
	MnSO ₄ * 4H ₂ O	25
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	10
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025
Источник железа	NaFeПЭДТА	40
Органические компоненты	Никотиновая кислота	5
	Пиридоксин-HCl	0,5
	Тиамин-HCl	0,5
	Глицин	2
	Фолиевая кислота	0,5
	Биотин	0,05
	L-Серин	100
	L-Глутамин	800
	Глутатион	30
	Мио-инозитол	100

Приложение В



Педигри линий-восстановителей фертильности, полученных в результате отдаленной гибридизации *B. napus* x *Brassicoraphanus*

Приложение Г

Сравнение морфологических признаков родительских линий и отдаленного гибрида *Brassica napus* x *Brassicoraphanus* и беккроссного потомства

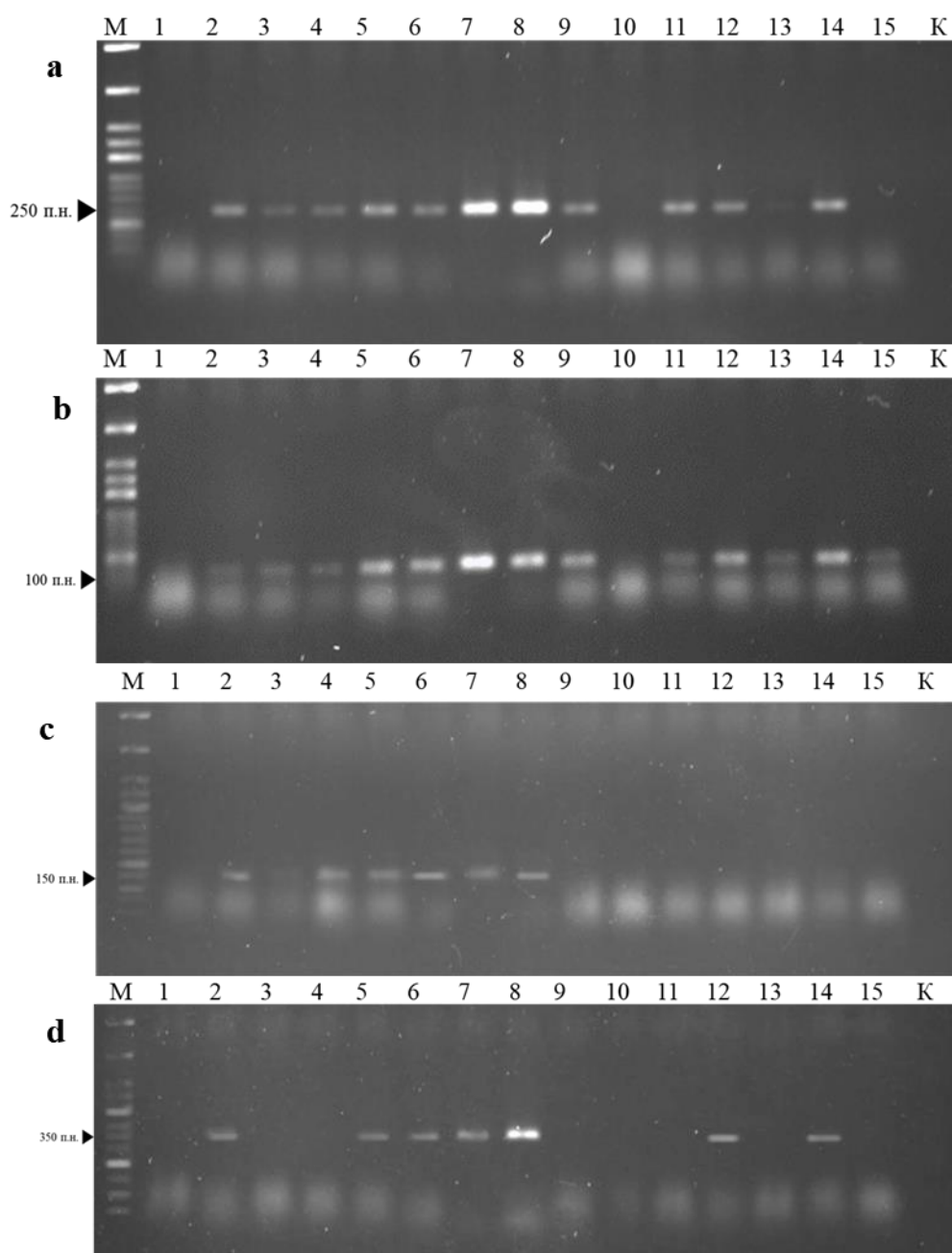
Признак	<i>B. napus</i>	<i>B. napus</i> x <i>BR</i>	<i>Brassicoraphanus</i> (BR)	<i>BC1</i>	<i>BC2</i>	<i>BC3</i>
Вегетативная часть						
Длина листа (см)	8.06±0.52	26.59±1.16	15.47±0.99	15.8±0.47	13.3±	14.5±1.03
Ширина листа (см)	4.15±0.26	9.1±0.92	7.25±0.48	8.1±0.23	6.4±0.59	5.6±0.36
Цвет листа	Сизо-зеленая	Темно-зеленая	Ярко зеленая	Светло-зеленый	Сизо-зеленый	Сизо-зеленый
Опушение	-	+	++	+	+	-
Восковой налет	++	+++	-	++	+	+
Поверхность листовой пластинки	Ровная, матовая	Волнистая, матовая	Слабоволнистая, глянцевая	Волнистая, матовая	Волнистая, матовая	Волнистая, матовая
Генеративная часть						
Окраска лепестков венчика	Цветки желтые	Белые	Белые с антоциановыми прожилками	Белые/желтые	Желтые/белые	Желтые
Средний диаметр цветка, мм	14.2±1,5	25±0.99	26.2±0.99	22.3±0.9	19.7±0.89	16.6±0.75
Средняя ширина лепестка, мм	6.9±0.41	11.2±0.29	6.2±0.25	9.1±0.34	7.3±0.41	6.5±0.15
Фертильность/стерильность	С	Ф	Ф/С	Ф/С	Ф	Ф
Развитость тычинок	-	+	±	±	+	+

Приложение Д

Масличность и жирнокислотный состав изучаемых гибридов ярового рапса (2023 год) (%)

Жирные кислоты		Стандарты		ЦМС линия	Линии восстановители фертильности						Гибридные комбинации						
		№1	№2	M8mc	y2	y3	y4	y17	y32	y35	M8mc x y2	M8mc x y3	M8mc x y4	M8mc x y17	M8mc x y32	M8mc x y35	M8mc x y42
Масличность, %		34,04	36,91	33,3	25,01	29,05	31,6	25,15	29,5	26,72	30,12	30,36	32,87	38,9	27,58	31,12	28,65
Эруковая кислота		0,02	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,4	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,02
Насыщенные жирные кислоты																	
C14:0	Миристиновая	0,07	0,05	0,06	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,06	0,07
C15:0	Пентадекановая	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03
C16:0	Пальмитиновая	4,87	4,10	4,46	5,35	5,22	5,23	4,92	5,05	4,97	4,71	4,81	5,04	4,92	4,92	4,85	4,67
C17:0	Гептадекановая	0,04	0,04	0,03	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
C18:0	Стеариновая	2,15	2,36	1,70	2,77	2,87	2,69	2,39	2,80	3,08	2,13	2,19	2,36	2,28	2,26	2,17	2,52
C20:0	Арахиновая	0,77	0,83	0,66	0,97	0,96	0,91	0,83	0,91	1,03	0,79	0,83	0,83	0,83	0,81	0,8	0,85
C22:0	Бегеновая	0,42	0,43	0,4	0,56	0,51	0,49	0,46	0,47	0,55	0,45	0,48	0,45	0,45	0,47	0,46	0,45
C23:0	Трикозановая	0,08	0,08	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,13	0,03	0,02	1,25	0,09	0,03	0,03	-	0,02
C24:0	Лигноцериновая	0,29	0,33	0,27	0,40	0,38	0,36	0,34	0,35	0,43	0,33	0,32	0,31	0,32	0,33	0,33	0,35
Ненасыщенные жирные кислоты																	
C16:1	Пальмитолеиновая	0,30	0,26	0,27	0,45	0,41	0,41	0,35	0,38	0,38	0,33	0,34	0,36	0,35	0,36	0,31	0,35
C17:1	Гептадеценивая	0,13	0,13	0,11	0,16	0,14	0,14	0,12	0,13	0,14	0,12	0,14	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12
C18:1n9	Олеиновая	60,57	64,56	62,74	55,53	58,47	59,45	60,21	57,08	60,62	61,58	59,67	60,76	60,21	58,12	61,32	62,51
C18:2n6	Линолевая	20,11	18,44	20,97	23,16	21,77	21,30	21,27	22,72	20,40	20,77	21,20	21,34	21,27	22,73	21,08	20,42
C18:3n3	α-Линоленовая	8,42	6,77	6,63	8,67	7,49	7,26	7,07	8,22	6,52	6,94	6,56	6,65	6,60	8,04	6,83	6,10
C20:1n9	цис-11-Эйкозеновая	1,30	1,28	1,34	1,29	1,23	1,22	1,23	1,22	1,24	1,31	1,30	1,20	1,25	1,27	1,28	1,19
C20:2	цис-11,14-Эйкозадиеновая	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,07	0,07
C24:1n9	Нервоновая	0,21	0,23	0,21	0,37	0,25	0,25	0,24	0,27	0,35	0,27	0,25	0,23	0,24	0,28	0,23	0,22

Приложение Е



Электрофореграмма продуктов амплификации пар праймеров а BnRFO-AS1R/ BnRFO-AS1F, б BnRFO-AS2R/ BnRFO-AS2F, в BnRFO-DL2R/ BnRFO-AS1F, д BnRFO-AS2-new-R/ BnRFO-AS2F, где 1-PO021, 2-PO0233-РЯ045, 4-РЯ008, 5-РЯ009, 6-РЯ015, 7-РЯ036, 8-РЯ023, 9-РЯ006, 10-РЯ016, 11-РЯ018, 12-PO030, 13 –РЯ025, 14-РЯ010, 15-PO026, К – отрицательный контроль, М – маркер молекулярных длин, Step100+50 (Biolabmix).