УДК 635.152:631.527.52

РЕДИС МОХОВСКИЙ – ИСТОЧНИК MS- И MF-ЛИНИЙ ПРИ СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС

Федорова М.И. *– доктор с.-х. наук, профессор, главный научный сотрудник лаб. селекции и семеноводства столовых корнеплодов*
Заячковская Т.В. *– кандидат с.-х. наук, ст. научный сотрудник лаб. селекции и семеноводства столовых корнеплодов*
Домблидес Е.А. *– кандидат с.-х. наук, ст. научный сотрудник лаб. генетики и цитологии*
Домблидес А.С. *– кандидат с.-х. наук, ст. научный сотрудник лаб. генетики и цитологии, и.о. зав. лаб. генетики и цитологии*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур» (ФГБНУ ВНИИССОК)
143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
E-mail: vniissok@mail.ru

На основе гибридных и инбредных потомств сортопопуляции редиса Моховский с использованием ЦМС-ogura выделено девять линий со 100%-ной ms и подобраны полностью фертильные закрепители. Путем тестирования мультиплексной ПЦР подтверждено наличие цитоплазмы Ogura в ms-линиях и отсутствие таковой в mf-линиях. Создан исходный линейный материал для практической селекции редиса на гетерозис.

Ключевые слова: *редис Моховский, ЦМС-Ogura, гибридные комбинации, инбредные линии, потомства, мультиплексная ПЦР.*

Возможность создания гибридов первого поколения, превосходящих исходные образцы, как по урожайности, так и по скороспелости показана многими исследователями (Крючков А.В., 1997; Артемьева А.М., 1983). В настоящее время исследования по изучению гетерозиса редиса, редьки, брюквы и др. овощных культур этого семейства ведутся в большинстве развитых стран Европы, Японии, Китае, странах СНГ (Барашева Г.М., 2000; Зубик И.Н., 2005; Бунин М.С., 2002). На селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева показана возможность получения гибридов F_1 на основе самонесовместимости, превосходящих по продуктивности и по содержанию витамина С стандартные образцы (Барашева Г.М., 2000). В селекции F_1 гибридов капустных овощных культур используют мужскую стерильность и самонесовместимость (Bonnet A., 1975; Бунин М. С., 1994; Зубик И.Н., 2005).

В настоящее время ряд зарубежных компаний Monsanto (США), Syngenta (Швейцария), Bayer CropScience (Германия), Limagrain (Франция), Rijk Zwaan (Нидерланды), Sakata, TAKII (Япония) предлагают гибриды F_1 редиса, созданные на основе мужской стерильности – Донар, Тарзан, Ровер, Таурус и др. В Государственный реестр селекционных достижений РФ на 2014 год включено 28 гибридов F_1 редиса, в основном иностранной селекции (Нидерланды, Франция и др.). В России селекционную работу по созданию гибридов ведут ВНИИО,

селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева и ВНИИССОК. Во ВНИИ овощеводства выделены стерильные формы растений (Ogu-ЦМС) и создан перспективный линейный материал для селекции редиса на гетерозис (Янаева Д.А., 2010; Янаева Д.А., Ховрин А.Н., 2013).

Большой научный и практический интерес для гетерозисной селекции различных видов растений семейства *Brassicaceae* L. имеет использование формы дайкона в качестве донора Ogu-ЦМС. Во ВНИИССОК исследования по передаче ЦМС-Ogu от дайкона редису проводятся с использованием исходных линий и гибридных комбинаций многих сортовых и гибридных популяций редиса, в том числе сортопопуляции Моховский. Оценка потомств комбинаций скрещивания фертильных линий с линией ЦМС-Ogu показала, что в ряде гибридных поколений наблюдается 100% фертильность. Большинство сортов и селекционных форм редиса, участвовавших в скрещиваниях, имеют доминантный по фертильности генотип, и подобранные для скрещивания с Ogu-ЦМС опылители подходят для выделения из них закрепителя стерильности. Выявлены особенности наследования и характер проявления основных морфобиологических признаков растений гибридных потомств (Бунин М.С., Кириллова А.Б., 1997; Даньков А.М., 2001; Заячковская Т.В., Федорова М.И., Степанов В.А., 2005).

ЦМС-формы, относящиеся к определенному типу стерильности, характеризуются своим типом митохондриальной ДНК (мтДНК) и системой ядерного генетического контроля. Большинство митохондриальных генов, обуславливающих ЦМС, имеет химерную природу и содержит новые открытые рамки считывания, такие как *orf222, orf224, orf138, orf 263,* характерные для разных типов. Изучение нуклеотидной последовательности этих генов/локусов, а также их наличие и расположение в митохондриальном геноме позволяет дифференцировать различные типы цитоплазмы с использованием молекулярных маркеров. В 2010 Zhao H.X. и соавторы предложили способ идентификации типа цитоплазмы у образцов рапса с использованием мультиплексной ПЦР (Zhao H.X. et al., 2010). Этот метод позволял идентифицировать сразу пять основных типов: Ogura, Ogu-NWSU-AF, Nap, Pol, Cam. В 2014году этот метод был опробован и на других представителях семейства Капустные (Домблидес Е.А. и др, 2014).

Материалы и методы

Исследования проводили в условиях защищенного грунта ВНИИССОК. Изучаются ms и mf линии, инбредные потомства и гибридные комбинации сортопопуляции редиса Моховский, созданные с использованием формы дайкона с ЦМС-Ogura – MS Gensuke. Проведена оценка гибридных комбинаций msxmf, беккросированных и инбредных потомств сортопопуляции Моховский разных поколений инбридинга (I_1-I_4).

Маточные корнеплоды выращивали по общепринятой методике. При уборке проводили качественный и количественный учет урожая, биометрические исследования, изучали основные морфобиологические признаки листовой розетки и корнеплода и их изменчивость (коэффициент вариации, V%). Оценку растений по признаку ЦМС проводили в фазу массового цветения в пределах потомства и индивидуально по растениям. Для скрещиваний выделяли хорошо развитые семенные растения, изолированные в фазу бутонизации индивидуальными изоляторами; опыление проводили вручную. Инбредные и гибридные потомства от скрещивания msxmf оценивали по признаку ms в период массового цветения и по морфобиологическим параметрам. Методы работы – использован инбридинг, кроссбридинг, беккросс, сетпкросс, отбор и молекулярное тестирование путем мультиплексной ПЦР.

Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили из молодых листьев и/или бутонов с использованием набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» компании «Синтол» (Москва, Россия). Амплификация ДНК. В работе использовали следующие праймеры: P11 5'gaaacgggaagtgacaat3', P12 5'gcattattttctcggtccat3', P21 5'agctgtctggagggaatc3', P22 5'gcggtctcacgcactaatc3', P32 5'acgacatcaaggaggaac3', atp9-5' 5'cccgagatgttagaaggtgc3', atp9-3'5'caaaaaggccatcattgggg3'. Тотж для пары праймеров atp9-5' и atp9-3'была 60°C, для всех остальных 54°C. Продукты амплификации разделяли в 1,7% агарозном геле в 0,5ЧТВЕ-буфере.

Секвенирование продуктов амплификации. Секвенирование продуктов амплификации, полученных с праймерами P11 и P12, проводили в научно-производственной компании «Синтол» (Москва, Россия). Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей проводили по базе NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Множественные выравнивания последовательностей проводили, используя программу, доступную в Интернете: Mega5 v4.0.2 (www.megasoftware.net).

Результаты исследований

Сорт Моховский – единственный среди сортимента сорт со съедобными салатными листьями. Создан в период развития индустрии орбитального питания для космонавтов в 80-ые годы. Во ВНИИССОК в это время ученые работали в направлении выведения сортов скороспелых, быстрорастущих овощных культур, у которых были бы пригодны «и вершки, и корешки». Сорт Моховский и стал пищей для космонавтов.

В связи с 50-летием российской космонавтики в 2011 году памятные медали были вручены ученым ВНИИССОК, которые принимали участие в деле развития космонавтики (Пивоваров В.Ф., Примак А. П., Федорова М.И., Тареева М.М., 2011).

Сорт создан индивидуально-семейственным отбором из гибридной комбинации Бисер х Перл, относится к белым круглым редисам европейского подвида с неопушенными съедобными листьями, среднеранний (25-28 суток). Универсальный по способам выращивания: в условиях пониженной освещенности защищенного грунта в зимне-весенний период (январь-февраль); в пленочных теплицах и под малогабаритными укрытиями (март-апрель) и в открытом грунте во всех зонах районирования культуры. Розетка листьев полуприподнятая, лист зеленый. Два первых настоящих листа цельные, последующие листья лировидно-раздельные; форма листовых долек удлиненно-овальная, край листа волнистый, гладкий. Черешки тонкие, светло-зеленые. Неопушенные листья используются в пищу и содержат до 100 мг% аскорбиновой кислоты при низком содержании нитратов (319-530 мг/кг). Корнеплоды белые, округлые, плотные, без горечи, с нежной недрябнующей мякотью, массой 20-35 г. Основная форма корнеплода округлая (90%), постоянно сопутствующие сорту формы: плоскоокруглая (5%) и удлиненно-округлая (5%), индекс формы 0,75-1,14. Головка корнеплода маленькая, плоская, нежная, белая и светло-зеленая. Осевой корешок тонкий с небольшим количеством боковых корней, донце округлое. Корнеплоды могут храниться в холодильнике при температуре 3...5°С до 45 суток, не снижая вкусовых качеств. При многоразовой уборке корнеплоды можно оставлять в грунте до 30 суток. При этом качество и вкус остаются высокими. Корнеплоды содержат 4,7-5,2% сухого вещества, 2,3-3,2% моносахаров, до 40% аскорбиновой кислоты; слабо чувствительны к накоплению нитратов (270-500 мг/кг). Урожайность в пленочных теплицах при площади питания 42 и 49 см^2 составляет 4,2-4,8 кг/м^2, в открытом – 18,6 т/га. Семена округлой и округло-плоской формы, желтые. Масса 1000 семян 8,5-12 г. Урожайность семян составляет 0,42-0,72 т/га.

В результате анализа семенных растений гибридных и инбредных потомств по признаку ms, созданных ранее, выделены стерильные формы и фертильные линии различных сортопопуляций редиса (Федорова М.И., Заячковская Т.В., 2011). Полученные потомства сортопопуляции Моховский изучали по морфобиологическим признакам корнеплода и листовой розетки. За период исследований создано и изучено более 170 потомств сортопопуляции Моховский. Из-за разных сроков цветения семенных растений для опыления стерильных форм нередко использовали фертильные растения из комбинаций скрещивания или гибридных популяций. В связи с этим исследовали гибридные комбинации двух групп, полученные с использованием опылителей

1. Характеристика комбинаций скрещивания и инбредных потомств сортопопуляции Моховский по морфобиологическим признакам

Посевной номер	Название комбинации скрещивания	Высота листовой розетки		Индекс формы корнеплода		Рассеченность листовой пластинки
		X, см	V, %	X, см	V, %	
комбинации скрещивания со 100% ms						
10	83-3msx98-3mf	23,21	7,66	1,00	8,71	2-3 доли
85/379/13	85-5msx98-2mf	19,56	10,06	1,13	11,69	2-3 доли
79/382/13	79-1msx98-1mf	22,49	9,34	1,11	13,80	2-3 доли
14	79-2msx98-1mf	24,05	13,58	1,30	14,19	2-3 доли
72/378/13	72-1msx98-2mf	21,17	11,92	1,25	14,81	2-3 доли
11	83-2msx98-3mf	22,31	9,11	1,06	19,71	2-3 доли
12	70-1ms98-2mf	25,46	9,97	1,33	27,55	2-3 доли
83/388/13	83-2msx98-3mf	17,48	9,56	1,37	10,23	2-3 доли
54/12	455-1msx455-2mf	20,32	10,26	1,21	11,43	2-3 доли
100%-ные mf опылители						
19/14	89/08	22,47	7,33	1,19	13,06	3-4 доли
20/14	94/08	23,19	6,19	1,22	10,27	3-4 доли
24/14	637-2/11	30,43	10,42	1,10	5,22	2-3 доли
2514	91/08	26,69	5,96	1,16	16,93	2-4 доли
98/385/13	3mf 98/05	15,36	13,52	1,06	5,45	2-3 доли

инбредных потомств сортопопуляции Моховский (1) и опылителей инбредных потомств, выделенных из гибридных популяций (2).

По трехлетним данным (2012-2014 годы) выявлены различия морфобиологических параметров между группами потомств. Растения потомств поколений инбридинга, в 50% случаев характеризовались небольшой листовой розеткой (17,5-21см). У большинства комбинаций (87%) 2-ой группы растения характеризуются более высокой листовой розеткой (21-36,2 см). Изменчивость признака высоты листовой розетки в обеих группах низкая – 8-10% (табл.1). Листовая розетка растений потомств 1-ой группы в 70% гибридных комбинаций образована слабо рассеченными листьями (2-3 доли). У растений 63% потомств 2-ой группы большее число листьев (от пяти до восьми), они более рассеченные, имеют от двух до пяти долей в 61% потомств. Во всех изученных потомствах корнеплоды округлой формы, белой окраски. Признак формы корнеплода мало изменчив – в 65% потомств коэффициент вариации от 7,9% до 15,1%.

Изучение проявления стерильности в гибридных комбинациях позволило оценить используемые в качестве опылителей инбредные потомства как потенциальных закрепителей стерильности. Разное происхождение потомств, используемых в качестве опылителей, оказало влияние на степень стерильности гибридных комбинаций и сохранение стерильности в следующих поколениях. Так, при использовании в скрещиваниях фертильных форм из сортовой популяции разных поколений инбридинга, степень стерильности в большинстве потомств увеличивалась, и лишь в пяти комбинациях из 20 наблюдалось снижение процента стерильности. В случае же опыления растениями, взятыми из гибридных популяций, увеличение степени стерильности полученных потомств не

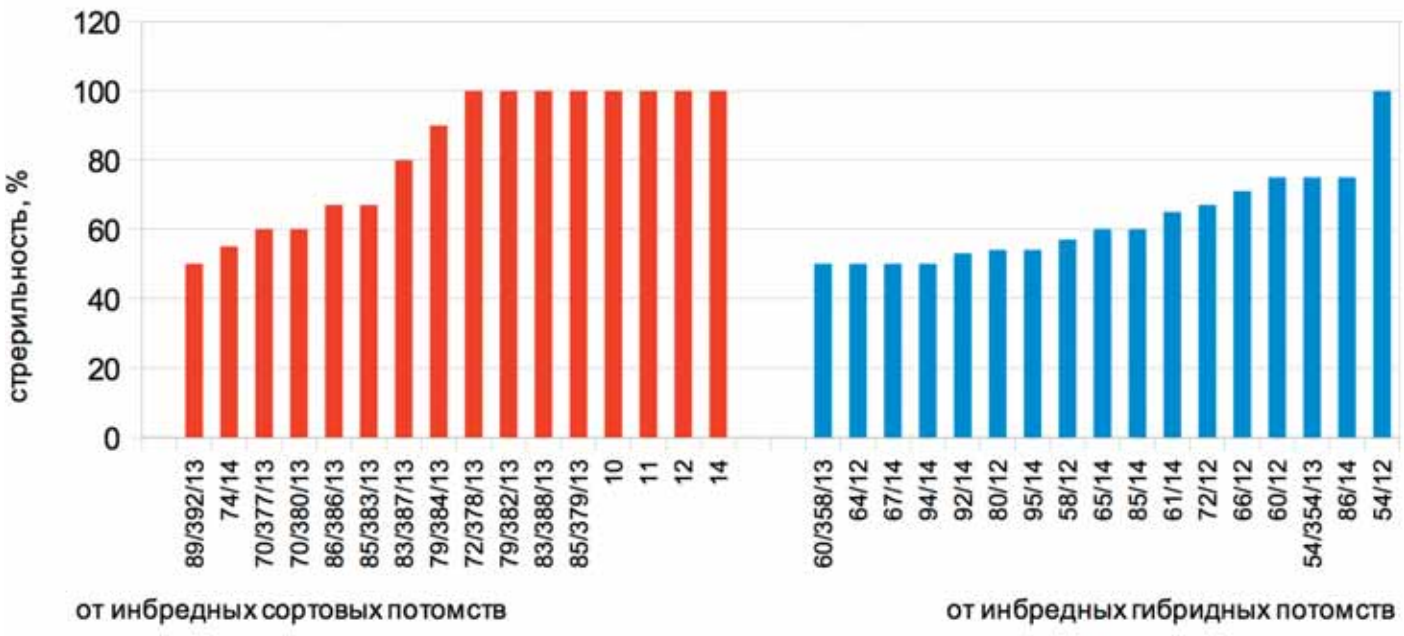

Рис. 1. Проявление стерильности в комбинациях скрещивания от инбредных потомств сортовых и гибридных популяций.

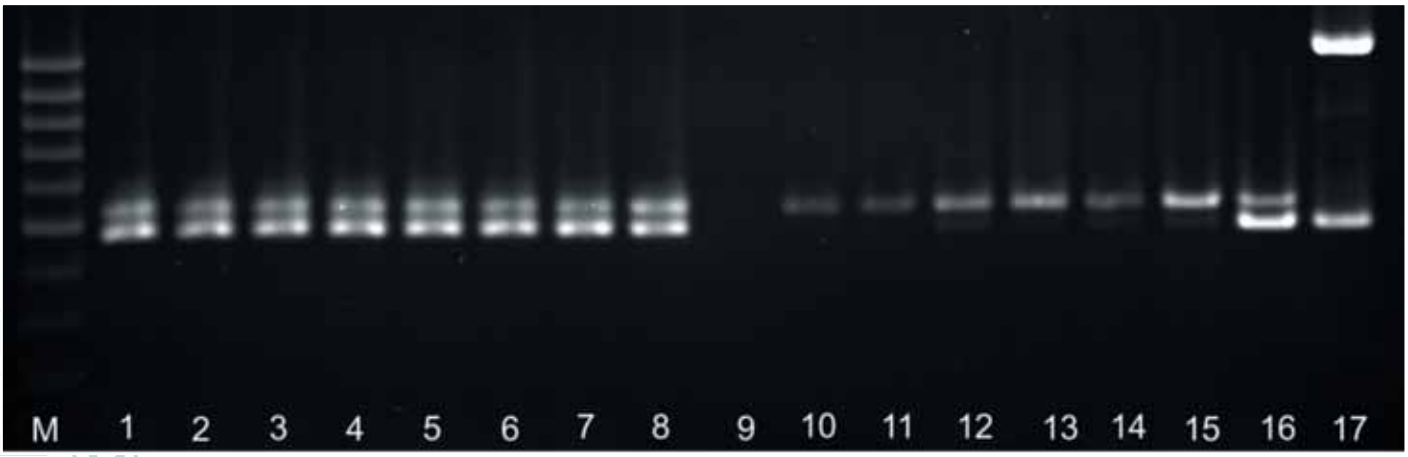

Рис. 2. Мультиплексная ПЦР.
Потомства: **1.** 85/37913 S, **2.** 79/382/13 S, **3.** 86/386/13 F, **4.** 86/386/13 S, **5.** 70/380/13 F, **6.** 70/380/13 S, **7.** 60/358/13 F, **8.** 60/358/13 S, **9.** K-, **10.** 19/14 F, **11.** 20/14 F, **12.** 24/14 F, **13.** 25/14 F, **14.** 98/385/13 F **15.** Ushiki-Gensuke F, **16.** MS-Gensuke S, M – маркером молекулярных масс 100 bp DNA ladder (MBI FERMENTAS, Латвия), **17.** Контроль цитоплазмы Ogu-NWSUAF.

наблюдалось. Большинство полностью стерильных потомств получено в группе комбинаций от инбредных потомств сортовых популяций (рис.1).

В результате из числа изученных потомств выделено девять комбинаций скрещивания с закрепленной 100%-ной ms – №№ 83/388/13; 79/382/13; 72/378/13; 85/379/13; 10/14, 11/14, 12/14, 14/14, 54/12 и исходные опылители для закрепления ms от инбредного потомства №3mf 98/05.

Растения выделенных потомств со 100%-ной ms обладают малой и средней по высоте листовой розеткой – от 17,5 до 25,5 см со слабой изменчивостью этого признака (V=7,7-13,6%), небольшим числом слабо рассеченных (на 2-3 доли) листьев в розетке. Корнеплоды округлой формы, с индексом 1,0-1,37; белой окраски. Вариабельность формы корнеплода, в основном, невысокая и составила 8,8-14,8% (табл.1).

Изучение изменчивости основных морфобиологических признаков растений инбредных потомств закрепителей ms в скрещиваниях показало, что опылители различались преимущественно высотой листовой розетки. Инбредные потомства разных поколений инбридинга характеризовались в 67% случаев малой и средней высотой листовой розетки (до 25см); потомства опылителей, полученные из гибридных популяций, в 77% случаев имели листовую розетку высотой 25-42 см. Изменчивость этого признака в обеих группах опылителей средняя (<15%).

Исходная отцовская линия-опылитель №3mf 98/05, из которой получены все отцовские формы для закрепления стерильности 100% (№№83/388/13; 79/382/13; 72/378/13; 85/379/13; 10/14, 11/14, 12/14, 14/14) характеризуется крупной листовой розеткой — 27,6см, корнеплодами округлой формы (I=1,1), белой окраски. Листья среднерассеченные на 2-4 доли со светло-зелеными черешками длиной 7-9 см. На основе исходной линии-опылителя №3mf 98/05 выделены как возможные закрепители стерильности инбредные потомства №№19/14, 20/14, 24/14, 25/14.

Включенные в данное исследование потомства сортопопуляции Моховский №№85/379/13, 79/382/13, 86/386/13, 70/380/13, 60/358/13, 19/14, 20/14, 24/14, 25/14, 385/14 протестированы с использованием мультиплексной ПЦР для идентификации типа стерильности цитоплазмы. Для внутреннего контроля присутствия в суммарных препаратах ДНК митохондриальной ДНК использовали пару праймеров atp9-5' и atp9-3'. Ампликоны размером 200 п.н. присутствовали во всех исследуемых образцах, подтверждая наличие мтДНК в суммарных препаратах ДНК. Новый образец протестировал мультиплексной ПЦР с использованием одновременно трех пар праймеров (P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32). По комбинации полученных продуктов идентифицируют одновременно несколько типов цитоплазмы: продукты размером 465 п.н. и 500 п.н. – тип цитоплазмы Ogura, 747 п.н. и 500 п.н. – тип *Polima*, 1102 п.н. и 800 п.н. – тип *Napus*, 800 п.н. и 500 п.н. – тип цитоплазмы *Cam*, а 465 п.н. и 1102 п.н. – тип *Ogu*-NWSUAF. У всех стерильных потомств амплифицировались продукты 465 п.н. и 500 п.н., диагностируя тип стерильности *Ogura*. У фертильных потомств редиса, гибридного происхождения – 86/386/13, 70/380/13, 60/358/13, полученных при скрещивании со стерильными материнскими формами, фрагмент размером 465 п.н. амплифицировался с такой же интенсивностью, как и у стерильных потомств – 85/379/13, 79/382/13 (рис.2). Это свидетельствует о присутствии у

этих потомств цитоплазмы *Ogura*, однако отсутствие внешнего проявления стерильности обусловлено присутствием в ядерном геноме генов – восстановителей фертильности *(Rf)*. У предполагаемых закрепителей стерильности – 19/14, 20/14, 24/14, 25/14 присутствовал только продукт 500 п.н., а размером 465 п.н. отсутствовал (рис. 2), что подтверждало отсутствие у них стерильной цитоплазмы.

По результатам расшифровки последовательности продукта размером 465 п.н. у стерильных потомств редиса и дайкона MS-Gensuke, который использовали в качестве контроля цитоплазмы *Ogura*, подтверждено наличие в них участка 417 п.н. на 100% гомологичного с митохондриальным геном *orf138* – типа А (всего выделяют девять типов гена *orf138* от А до I), причем этот продукт был абсолютно идентичен у всех изученных потомств.

Заключение

Сортопопуляция Моховский является по своей природе оригинальным источником для селекции на гетерозис. Для создания гибридов F_1 отобраны перспективные ms (№№ 83/388/13; 79/382/13; 72/378/13; 85/379/13; 10/14, 11/14, 12/14, 14/14, 54/12) и mf-линии (№№19/14, 20/14, 24/14, 25/14) сортопопуляции Моховский, которые протестированы мультиплексной ПЦР. Подтверждено наличие цитоплазмы Ogura в ms-линиях и отсутствие таковой у линий mf. Изменчивость основных морфобиологических признаков гибридных комбинаций позволила оценить опылители инбредных потомств из сортовых и гибридных популяций редиса, как потенциальных родоначальников линий закрепителей стерильности при получении гетерозисных гибридов F_1 на основе ЦМС-Ogura. Показана возможность использования гибридных популяций для получения ms линий.

RADISH CV. MOKHOVSKIY IS A SOURCE OF MS- AND MF-LINES AT BREEDING FOR HETEROSIS

Fedorova M.I., Zayachkovskaya T.V., Domblides E.A., Domblides A.S.

Federal State Budgetary Scientific Research Institution
«All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production»
143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district, p. VNIISSOK, Selectionnaya street, 14
E-mail: vniissok@mail.ru

Abstract
Based on hybrid and inbreed population of radish cv. Mokhovskiy using CMS-ogura nine lines with 100% of male sterility and fertile maintainers were selected. Using the multiplex PCR, the presence of cytoplasm of Ogura type in ms-lines and its absence in mf-lines were confirmed.

Keywords: *radish cv. Mokhovskiy, CMS-ogura, hybrid combination, inbreed lines, multiplex PCR.*

Литература

1. Артемьева А.М. Общая и специфическая комбинационная способность самонесовместимых инбредных линий капусты белокочанной // Бюлл. ВИР. –Л.,1983. – Вып. 187. – С. 58-59.
2. Барашева Г.М. Наследование инбредными линиями редиса основных хозяйственных признаков и элементного состава // Автореф. дис. канд. с.-х. наук.–М.,2000. –21 с.
3. Бунин М.С. Мужская стерильность сельскохозяйственных растений семейства Brassicaceae L. и ее использование в селекции // С.-х. биология, сер. Биология растений. – 1994. – №1. – С.20-31.
4. Бунин М.С., Кириллова А.Б. Использование мужской стерильности в селекции гетерозисных гибридов корнеплодных овощных культур вида Raphanus sativus L. Гетерозис сельскохозяйственных растений. Международный симпозиум. – М. 1997. –Т.5, XII. – С.94-96.
5. Бунин М.С. Новые овощные культуры России // МСХ РФ. - М.: «Росинформагротех», 2002. – С.150-155.
6. Даньков А.М. Исходный материал для селекции редиса по основным хозяйственно ценным признакам // Канд.дисс.–М.,2001.
7. Домблидес Е.А., Домблидес А.С., Заячковская Т.В., Бондарева Л.Л.Диагностика типа ЦМС с использованием мультиплексной ПЦР// Сборник трудов 8-ой Международной научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», М. – Т.2. – С.435-436.
8. Заячковская Т. В., Федорова М. И., Бунин М.С., Степанов В. А., Заячковский В. А. Исходный материал редиса для селекции на гетерозис. // Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства овощных культур. Международный симпозиум (9-12 августа 2005).– М., 2005. – Т. 2. – С. 137-145.
9. Крючков А.В. Селекция гибридов F1 // В кн.: Селекция и семеноводство/ М.: Колос, 1997. – Гл.12. – С.106-147.
10. Пивоваров В.Ф., Примак А.П., Федорова М.И., Тареева М.М. Космические овощи ВНИИССОК // Овощи России. – 2011. – № 2. – С.59-64.
11. Федорова М.И., Заячковская Т.В. Использование мужской стерильности типа Ogura в селекции редиса на гетерозис // Овощи России. – 2011. – № 4. – С.22-31..
12. Янаева Д. А. Создается банк линий для получения гетерозисных гибридов редиса // картофель и овощи. М. – 2010. – №8. – С. 24-26.
13. Янаева Д. А., Ховрин А.Н. Редис европейский: селекция и технология выращивания // Картофель и овощи. – М., 2013. – №4.
14. Bonnet A. Introduction and utilization of a cytoplasmatic male sterility in early European varieties of radish-Raphanus sativus L. // Ann. Amelior. Plantes. – 1975. – V. 25. – №4. – P. 381-397.
15. Zhao H.X., Li Z.J., Hu S.W., Sun G.L., Chang J.J., Zhang Z.H. Identification of cytoplasm types in rapeseed (Brassica napus L.) accessions by multiplex PCR assay // Theor. Appl. Genet. 2010. – V. 121. – P. 643-650.