

Краткие сообщения

УДК 633.853.494:632.938.1:578.864:57.085.23

doi: 10.15389/agrobiology.2013.5.122rus

СОЗДАНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ *Brassica napus* L. — ДОНОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ МОЗАИКИ ТУРНЕПСА*И.А. ЗУБАРЕВА¹, Е.Н. ГОЛОВЕШКИНА¹, С.В. ВИНОГРАДОВА¹,
Т.Н. ГРИБОВА¹, С.Г. МОНАХОС², А.Н. ИГНАТОВ¹

Интерес к рапсу обусловлен его использованием для получения биотоплива, потребностью в растительных маслах и высокобелковых кормах. Однако при этом не решена проблема устойчивости культуры к вирусу мозаики турнепса (*Turnip mosaic virus* — TuMV), вызывающему большие потери. Получение устойчивых форм — единственный и экологически безопасный способ борьбы с этим вирусом. Мы изучили устойчивость растений к шести генетически полиморфным изолятам вируса мозаики турнепса TuMV в коллекции из 64 образцов хозяйственно ценных и диких представителей рода *Brassica* — растений видов *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea* и *B. juncea*. По результатам визуальной оценки развития симптомов мозаики и количественного иммуноферментного анализа выявлено 24 наиболее перспективных образца, обладающих устойчивостью ко всем изолятам TuMV (13 образцов) и к 5 из 6 изолятов (11 образцов). После этого через культуру микроспор от устойчивых форм получали гаплоидные растения. Для 12 устойчивых образцов подобраны условия тепловой обработки для стимуляции эмбриогенеза и получены удвоенные гаплоидные линии — доноры устойчивости к TuMV.

Ключевые слова: *Turnip mosaic virus*, культура микроспор, удвоенные гаплоиды, *Brassica napus* L.

Масличный рапс (*Brassica napus* L.) — важнейшая техническая культура. В России повышенный интерес к рапсу в последние годы обусловлен его использованием для получения биотоплива, потребностью в растительных маслах, высокобелковых кормах и поддерживается высокой продуктивностью современных сортов и гибридов при использовании прогрессивной технологии возделывания (1). Некоторые из них резистентны к определенным фитопатогенам, однако проблема устойчивости к вирусу мозаики турнепса (*Turnip mosaic virus* — TuMV) остается актуальной (2, 3). В роде *Potyvirus* только TuMV поражает растения семейства *Brassicaceae*, приводя к большим экономическим потерям (4, 5). Обеспечение естественной резистентности растений — единственный и экологически безопасный способ борьбы с вирусом.

Получение гаплоидов и дигаплоидов через культуру пыльников и микроспор в настоящее время стало общепризнанным методом в селекции устойчивых к патогенам гомозиготных линий растений для создания новых сортов и гибридов (6). Изолированные микроспоры при оптимальном сочетании условий культивирования и стрессов могут перейти от нормального гаметофитного пути развития к спорофитному, а затем производить эмбриониды и гаплоидные или удвоенные гаплоидные растения (7). Выращивание растений из микроспор часто используют в селекции и фундаментальных исследованиях.

Наша цель заключалась в оценке коллекции из различных представителей рода *Brassica* на устойчивость к TuMV и получении дигаплоидных линий масличного рапса — доноров устойчивости к вирусу.

Методика. Были использованы растения семейства *Brassicaceae*, полученные из коллекций Всероссийского НИИ растениеводства (г. Санкт-Петербург), Всероссийского научно-исследовательского и проектно-техно-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ГК № 14.518.11.7042 и РФФИ 12-04-32084-мол_а.

логического института рапса (г. Липецк) и Центра «Биоинженерия» РАН (всего 64 образца хозяйственно ценных и диких видов *B. napus*, *B. nigra*, *B. rapa*, *B. oleracea* и *B. juncea*).

Все исследуемые образцы в 4-кратной повторности механически инокулировали (8) 6 изолятами TuMV, выделенными из пораженных растений *B. oleracea* (изолят I2), *B. rapa* subsp. *rapa* (I3a), *B. napus* (I3b), выращенных в защищенном грунте, и из полевой культуры *B. rapa* subsp. *chinensis* (I7, I8, I10). Для оптимального инфицирования и развития (распространения) вирусной инфекции в растениях в экспериментальной установке искусственного климата поддерживали температуру 23-25 °С.

Симптомы заболевания оценивали визуально по двум 10-балльным шкалам каждые 7 сут в течение 4 нед после инокуляции, затем в растениях определяли содержание TuMV с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в модификации Double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) с использованием поликлональных антител к TuMV (тест-система «Neogen Corporation», США) согласно протоколу производителя.

Для изоляции микроспор из пыльников и получения жидкой культуры применяли питательную среду NLN-13 (9) с добавлением L-серина (0,1 г/л), L-глутамина (0,8 г/л), глутатиона (0,03 г/л) и 13 % сахарозы (рН 6,1). Бутоны размером 2,5-3,5 мм обеззараживали в 70 % этиловом спирте в течение 3 мин, трижды отмывали в стерильной дистиллированной воде (по 5 мин), гомогенизировали до однородной массы и фильтровали через нейлоновую мембрану с диаметром пор 0,4 мкм. NLN-средой доводили объем смеси из расчета 1 мл среды на 1 бутон и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость сливали и процедуру повторяли еще дважды (10). Суспензионную культуру разливали по 5-6 мл в чашки Петри (d = 10 см). Для индукции эмбриогенеза изолированную культуру микроспор подвергали тепловому шоку при 32, 33 и 35 °С в течение 24, 48 и 72 ч. Далее микроспоры культивировали при 25 °С. Через 21 сут образовавшиеся эмбриоиды переносили на плотную питательную среду MS (11), на которой проходило формирование семядольных листьев и корневой системы. Через 3 нед культивирования на плотной среде хорошо развитые проростки адаптировали к почвенным условиям и выращивали до стадии формирования 3-4 настоящих листьев. После подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц для проверки ploидности растений (12) во все пазушные почки инъецировали 0,2 % раствор колхицина с целью удвоения числа хромосом (13).

Результаты. При оценке устойчивости в коллекции растений рода *Brassica* были обнаружены различия в чувствительности образцов к изолятам TuMV (табл.) и в проявляемых симптомах заболевания. При заражении изолятом I2 наблюдали хлоротичную пятнистость (0-8 баллов), морщинистость листьев (от 0 до 4 баллов), угнетение роста и развития растений; изолятом I3a — хлоротичную пятнистость (0-6 баллов), морщинистость листьев (0-3 балла); I3b — хлоротичную пятнистость (0-9 баллов), морщинистость листьев (0-5 баллов), угнетение роста и развития. Изоляты I7, I8 и I10 вызывали хлороз листьев (4-7 баллов). ИФА подтвердил результаты визуальной оценки и выявил дополнительно три толерантных (бессимптомных) пары вирус—растение (изолят I2 с образцами *B. nigra* № 12, *Cobra* line 1.8 и STS K₀).

Всего было отобрано 13 образцов (№ 444, Центр-1, № 1, № 417, Jr-8, Ханна, Jr-4, Центр-2.1, Гриффин, Галант, Луговской, *Cobra* SR и ISA454.1 *B. oleracea*) с устойчивостью ко всем 6 изолятам TuMV и еще 11 (Оро, Jr-2, *Cobra* Winter, Центр-2.2, № 417.1.1, Jr-1, Гриффин DR, Грифф-

фин CR, FH1 *B. oleracea*, ISA454.1.36 *B. oleracea*, *B. nigra* № 12) с резистентностью к 5 изолятам (I2, I3a, I7, I8 и I10). Устойчивые ко всем изучаемым изолятам образцы в дальнейшем использовали для получения удвоенных гаплоидных линий — доноров устойчивости к TuMV через культуру микроспор.

Устойчивость изученных образцов *Brassica* к изолятам вируса мозаики турнепса TuMV при искусственном заражении

Группа образцов	Изолят вируса					
	I2	I3a	I3b	I7	I8	I10
№ 444, № 417 ¹ ; Ханна, Галант, Луговской ² , Центр-1; Jp-8, № 1, Jp-4, Центр-2.1, Гриффин, Cobra SR, ISA454.1 <i>B. oleracea</i> ³	R	R	R	R	R	R
№ 417.1.1 ¹ ; Оро, Jp-2, Cobra Winter, Центр-2.2, Jp-1, Гриффин DR, Гриффин CR, FH1 <i>B. oleracea</i> , ISA454.1.36 <i>B. oleracea</i> ³	R	R	S	R	R	R
<i>B. nigra</i> № 12 ³	T	R	S	R	R	R
Cobra line 1.8, STS K ₀ ³	T	R	R	R	R	R
№ 425, № 417.1, № 423 ¹ ; Cobra Spring, Галакси, Ратник ² ; STS I ₂ , STS I ₀ , RcBn, CB-1, STS II ₀ , STS K ₂ , горчица сарептская <i>B. juncea</i> сорт Краснолиственная, CrGC3.1, <i>B. oleracea</i> , FH3.5 <i>B. oleracea</i> ³	S	R	S	R	R	R
Местный украинский, Отрадненский, Старгейт ² ; BM8, BL3, Старгейт, Cobra Selting, № 442, F ₁ (Cms Poliva × CB-1), CB4.7.2, Jp-1 ³	R	S	S	R	R	R
STS K ₁ ³	S	R	R	R	R	S
Аоморы ¹ ; F ₁ (3177 × 9006), К-53 <i>B. rapa</i> ² ; CrGC5, RcBn CrGC5.1, DH99 (Siloga × Homei), STS II ₁ , STS II ₂ , Аоморы-1, Лада <i>B. juncea</i> , FBLM <i>B. juncea</i> , <i>B. carinata</i> № 78, Cobra S ³	S	S	S	R	R	R
Аоморы ²	R	S	S	S	R	R

Примечание. R — устойчивость (возможен иммунитет), S — восприимчивость (проявление симптомов), T — толерантность (бессимптомная инфекция); 1 — образцы из коллекции Всероссийского научно-исследовательского и проектно-технологического института рапса (г. Липецк); 2 — образцы из коллекции Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург); 3 — образцы из коллекции Центра «Биоинженерия» РАН.

Для каждого образца были подобраны условия тепловой стимуляции. Так, при воздействии температурой 32 °С в течение 72 ч получили эмбриониды четырех образцов *B. napus* — № 444, Jp-8, Ханна и Jp-4; в варианте 33 °С/72 ч — № 1, № 417, Луговской и Гриффин; 35 °С/24 ч — Cobra SR, Центр-1 и Центр-2.1, 32 °С/48 ч — ISA454.1 *B. oleracea*.

После переноса сформированных эмбрионидов на плотную питательную среду, адаптации и обработки колхицином отобрали 12 дигаплоидных форм (чистые линии), которые могут использоваться как доноры устойчивости к 6 изученным изолятам TuMV.

Таким образом, на основе исследования устойчивости коллекционных образцов *Brassica* к различным изолятам вируса мозаики турнепса TuMV через культуру микроспор получены гаплоидные линии, а после их обработки колхицином — удвоенные гаплоидные линии для использования в селекции в качестве доноров устойчивости к TuMV.

¹ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН,
117312 Россия, г. Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1,
e-mail: i_a_zubareva@rambler.ru, an.ignatov@gmail.com, sveta2506@bk.ru,
patrik10@rambler.ru, elenagoloveshkina@yandex.ru;

Поступила в редакцию
23 апреля 2013 года

²ФГОУ ВПО Российский государственный аграрный
университет РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: plantphys@timacad.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2013, № 5, pp. 122-125

**THE DEVELOPMENT OF *Turnip mosaic virus* RESISTANT
DOUBLED HAPLOID LINES OF *Brassica napus* L.**

I.A. Zubareva¹, E.N. Goloveshkina¹, S.V. Vinogradova¹, T.N. Gribova¹,
S.G. Monakhos², A.N. Ignatov¹

¹Center “Bioengineering”, Russia Academy of Sciences, 7/1, prosp. 60-letiya Oktyabrya, Moscow, 117312 Russia,
e-mail i_a_zubareva@rambler.ru, an.ignatov@gmail.com, sveta2506@bk.ru, patrik10@rambler.ru,

Abstract

Oilseed rape is a valuable crop used for biodiesel, vegetable oil and high-protein animal feed. However, there is a need for cultivars resistant to turnip mosaic virus (TuMV), which causes a great losses. Resistant plants are the only efficient and environmentally safe way to control this virus. We have studied the resistance in collection of 64 accessions of cultivated and wild brassicas (*Brassica napus*, *B. rapa*, *B. oleracea* and *B. juncea*) to six genetically different isolates of TuMV. Assessment of visual mosaic symptoms and quantitative ELISA test identified 24 most promising accessions that were resistant to all isolates of TuMV (13 accessions) and 5 of 6 isolates (11 accessions). Then, the haploid resistant plants were obtained using microspore culture. An optimal condition of high temperature treatment to induce embryogenesis were found for 12 accessions, and doubled haploid lines, the donors of resistance to TuMV, were propagated.

Keywords: *Turnip mosaic virus*, microspore culture, double haploids, *Brassica napus* L.

REFERENCES

1. Tarasov V.I. *Promyshlennik Rossii*, 2008, 9: 28-36.
2. Walsh J.A., Jenner C.E. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 2002, 3(5): 289-300.
3. Walsh J.A., Jenner C.E. *Resistance to Turnip mosaic virus in the Brassicaceae*. In: *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses* /G. Loebenstein, J.P. Carr (eds.). Springer, Netherlands, 2006.
4. Shattuck V.I. The biology, epidemiology, and control of Turnip mosaic virus. *Plant Breed. Rev.*, 1992, 14: 199-238.
5. Lesmann D.-E., Vetten H.J. The occurrence of tobacco rattle and Turnip mosaic virus in *Orchis* spp. and of an unidentified Potyvirus in *Cypripedium calceolus*. *ISHS Acta Horticulturae*, 1985, 164: 45-54.
6. Thomas W.T.B., Gertson B., Forster B.P. *Doubled haploids in breeding*. In: *Doubled haploid production in crop plants: a manual* /M. Maluszynski, K.J. Kasha (eds.). KAB, Netherlands, 2003.
7. Touraev A.M., Forster B.P., Jain S.M. *Advances in haploid production in higher plants*. Springer Science + Business Media B.V., 2009.
8. Jenner C.E., Wang X., Tomimura K., Ohshima K. The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in **Brassicaceae**. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2003, 16(9): 777-784.
9. Nitsch C., Nitsch J. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta*, 1967, 72: 355-370.
10. Coventry J., Kott L., Beversdorf W. *Manual for microspore culture technique for Brassica napus*. Guelph, Ont. Canada, 1988.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15: 473-496.
12. Pukhal'skii V.A., Solov'ev A.A., Badaeva E.D., Yurtsev V.N. *Praktikum po tsitologii i genetike rastenii* [Plant Cytology and Cytogenetics (Practical Course)]. Moscow, 2007.
13. Guo Y.-D., Pulli S. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. *Plant Cell*, 1996, 46: 219-225.