

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 5, Number 315 (2017), 114 – 122

K.Zh.Zhambakin, M.Kh.Shamekova, A.K.Daurova, D.L.Daurov, K.K.Zhapar,
D.V.Volkov, A.K. Edilova, M.O. Bakbergenova, D.A. Tolegenova

Institute of plant biology and biotechnology, Almaty, Kazakhstan
e-mail: zhambakin@gmail.com

**PRODUCTION OF RAPESEED (*BRASSICA NAPUS*)
INTERSPECIFIC HYBRIDS WITH RAPE (*BRASSICA CAMPESTRIS*)
AND MUSTARD (*BRASSICA JUNCEA*)**

Abstract. This research paper presents a traditional method of remote hybridization for obtaining interspecific hybrids of *Brassica rapa* with *Brassica juncea* and *Brassica napus*. As a result, by the method of forced hybridization of *B. rapa* with *B. juncea* and *B. napus* according to reciprocal crossing in controlled and field conditions, 65 immature embryos were *in vitro* introduced into culture, of which 38 plants were obtained *in vitro*. Using the culture of isolated microspores, were obtained dihaploid plants of interspecies hybrids of the first and second generations (DGmg 1, DGmg 2). Was carried out identification of chromosomes, as a result, true hybrid plants were identified.

Key words: *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, SSR, GenBLm1, microspores, dihaploid.

УДК 575.222.72;575.222.73

К.Ж.Жамбакин, М.Х.Шамекова, А.К.Даурова, Д.Л.Дауров, К.К.Жапар,
Д.В.Волков, А.К.Едилова, М.О. Бакбергенова, Д.А. Толегенова

РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы, Казахстан.

**ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ РАПСА
(*BRASSICA NAPUS*) С СУРЕПИЦЕЙ (*BRASSICA CAMPESTRIS*)
И ГОРЧИЦЕЙ (*BRASSICA JUNCEA*)**

Аннотация. В данной научной статье представлен традиционный метод отдаленной гибридизации для получения межвидовых гибридов рапса с сурепицей и горчицей. В результате работ методом принудительной гибридизаций рапса с сурепицей и горчицей согласно реципрокному скрещиванию в контролируемых и полевых условиях были введены в культуру *in vitro* 65 незрелых зародышей, из которых были получены 38 растений *in vitro*. С использованием культуры изолированных микроспор были получены дигамплоидные растения межвидовых гибридов первого и второго поколения (ДГмг 1, ДГмг 2). Проведена идентификация хромосом, в результате чего, были выявлены истинные гибридные растения.

Ключевые слова: *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, SSR, GenBLm1, микроспоры, дигамплоид.

Введение

Основой любой селекционной программы является расширение диапазона генетической изменчивости с целью отбора желаемых признаков для улучшения возделываемых сортов сельскохозяйственных культур. Одним из методов решения данной задачи является отдаленная гибридизация. Этот вопрос особенно актуален для селекции рапса в связи с тем, что большинство современных сортов ярового рапса имеют узкую генетическую основу [1]. Уникальность семейства *Brassica* состоит в том, что в настоящее время найдены способы принудительного

скрещивания его видов между собой, в результате чего могут быть получены синтетические комплексы из различных видов и соответствующих им полиплоидов. Таким образом, могут быть получены одни из самых уникальных модельных систем для исследований влияния полиплоидии на урожай растения [2]. Стратегию получения гибридов можно значительно упростить путем определения потомства цитологическими методами, что позволяет отбирать растения, содержащие желаемый признак с минимальным фоном генома донора [3].

С помощью отдаленной гибридизации данной культуры возможно повысить урожайность, устойчивость к вредителям и болезням, улучшить жирнокислотный состав масла семян, увеличивая содержание олеиновой и линолевой кислот и уменьшая содержание эруковой кислоты, получить семена с желтой семенной оболочкой, характеризующихся улучшенным качеством масла (в отличие от темноокрашенных) [1,4]. Однако лишь ограниченное число межвидовых и межродовых скрещиваний в семействе *Brassicaceae* может привести к получению полноценных гибридных растений. Трудности создания отдаленных гибридов обусловлены барьерами несовместимости, которые выражены между растениями разных таксономических групп с момента опыления, а затем проявляются на протяжении всего онтогенеза гибридных растений [5].

Для преодоления естественных барьеров несовместимости разработаны биотехнологические методы изолирования и выращивания в условиях *in vitro* незрелых и зрелых зародышей, завязей и семян, что позволило получить фертильные растения межвидовых и межродовых гибридов многих важных сельскохозяйственных культур [1,5].

Вместе с тем, различные комбинации отдаленных гибридов возможно быстро перевести в гомозиготное состояние посредством культивирования изолированных микроспор [6]. Именно для семейства *Brassica* данная технология широко и удачно используется. Преимуществом получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор является быстрое получение гомозиготного материала, который можно сразу оценивать на перспективность использования в селекционном процессе, поскольку в последующих поколениях при семенном размножении в потомстве не будет происходить расщепления по количественным и качественным признакам [7].

В настоящем исследовании предпринята попытка изучить степень успеха скрещиваний между тетраплоидным *B. napus*, *B. juncea* и диплоидным *B. rapa* и получить межвидовые гибриды, которые позволят повысить эффективность создания новых отечественных сортов, а также с использованием метода культуры изолированных микроспор получить гомозиготные линии межвидовых гибридов.

Материалы и методы

Материалами исследования являлись сорта рапса–Крис, Антей; сорта сурепицы–Золотистая, Янтарная; сорта горчицы сарептской–Росинка, Славянка.

Методы принудительной гибридизации. Кастрацию проводили на бутонах 3-4 мм и закрывали изолятором до готовности пестика к опылению. Опыление производилось с 6.00 до 7.30 утра для обеспечения успешного опыления и закрывали изолятором на котором наносили даты кастрации и опыления [8].

Методика выделения незрелых зародышей гибридов Brassica [9,10]

Стручки полученные после скрещивания через 14 дней, стерилизуются в 50% растворе гипохлорита натрия в течение 10 минут, затем в 70% спирте 3-5 секунд с последующим 3-х кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Незрелые зародыши пересаживают в пробирки с питательной средой MS с добавлением кинетина 1мг/л, ИУК 0,1мг/л, гибберелловой кислоты 1мг/л, гидролизата казеина 10мг/л, рН 5,8. Через 10-15 дней изолирования зародышей, полученные регенеранты пересаживаются на питательную среду ½ MS без гормонов для клонирования.

Метод культуры изолированных микроспор для рапса [11]

Сбор бутонов проводится ранним утром в стадии одноядерной микроспоры в часы интенсивного деления пыльцы, размером 2-3 мм. Предобработка бутонов проводится в растворе нитрата серебра в концентрации 10 мг/л, при температуре +4°C в течение 2 суток. После проводится стерилизация бутонов с помощью 50% гипохлорита натрия в течение 7-10 минут, затем в 70% спирте в течение 3-5 секунд, после чего промывается дистиллированной водой три раза. Затем бутоны помещаются в прохладный микросмеситель (10 °C), используя 30-40 мл

прохладной среды В5 без гормонов (10-12 °С), и гомогенизируются 7-9 секунд при высокой скорости. Получившуюся суспензию пропускают через фильтр (80 мкм). Фильтрат центрифугируется (100g) в течение 5 минут. Супернатант сливается, к выпавшему осадку наливается 15 мл среды и снова центрифугируется в течение 5 минут. Повторив это действие еще раз, выпавший осадок переливают в чашки Петри и добавляется среда NLN с БАП 0,05 мг/л для культивирования микроспор. Плотность микроспор в среде NLN доводится до 35,000 – 50,000 микроспор/мл. Чашки Петри помещают в термостат шейкером при температуре 25°С. При появлении торпедоподобных эмбрионов, чашки Петри переставляются на свет при той же температуре.

Молекулярный метод

Геномная ДНК была экстрагирована из свежих листовых тканей родителей и 21 предполагаемых гибридных растений с использованием СТАВ метода [12]. Предполагаемые гибридные растения тестировали с использованием четырех праймеров *SSR (Simple Sequence Repeats)* Na12-H09, A9 Ra2-F11, O110-F11 и праймер *GenBLm1* (Таблица-1) [7,13]. Лиофилизированные олигонуклеотидные праймеры разводили с добавлением воды *Mili Q* для доведения концентрации до 100 мкМ. Затем из 100 мкМ маточных растворов готовили 10 мкМ разведений.

Таблица 2 – Праймеры для идентификации хромосом

Название	Олигонуклеотидная последовательность праймеров	Размер фрагментов (п.н.)	Температура отжига (t°)
Gen BLm 1	R ACGAAAGGCAAATAAACCGAGAAGC F CTCCTCCTTCACGGAAAGTCCATC	570	58,5
Na12-H09	F.AGGCGTCTATCTCGAAATGC R. GTTTTTCAGAATCTCGTTGC	130-215	61

Для проведения ПЦР-анализа готовим реакционную смесь объемом 20 мкл следующего состава: 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, 2 мкл 2,5 мМ смеси dNTP, по 1 мкл смеси праймеров, концентрацией 50 пмоль, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 2-5 мкл продукта обратной транскрипции, 8-11 мкл вода свободная от РНК.

Температурный режим реакции:

Стадия 1 – 94 °С 15 мин. - 1 цикл,

Стадия 2 - 94 °С 1 мин., 58,5 °С 1 мин., 72 °С 1 мин. - 33 циклов.

Стадия 3 – 72 °С 5 мин. - 1 цикл

Продукты ПЦР анализируют с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Результаты и обсуждения

В исследовании межвидовой гибридизации среди нескольких видов *Brassica* известно, что гибридизация между *B. napus* и *B. juncea* была особенно трудной. Это свидетельствует о высоком уровне генетической несовместимости между *B. napus* и *B. juncea*. Препятствия можно преодолеть использованием культуры изолированных зародышей и соответственно оптимизированы питательные среды культивирования. Гибридный зародыш помещается на искусственную питательную среду, на котором он прорастает до целого растения.

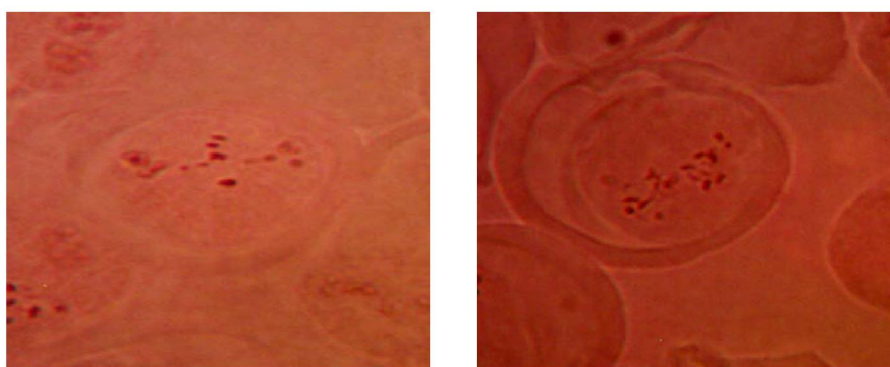
По результатам проведенных работ по принудительной гибридизации рапса с сурепицей и горчицей согласно реципрокному скрещиванию в контролируемых и полевых условиях в культуру *in vitro* были введены 65 незрелый зародыш из восьми межвидовых комбинаций. Завязываемость межвидовых гибридов достаточно низкая, у реципрокных гибридных комбинаций где родительской материнской формой является рапс завязываемость выше. Не всех из зародышей были получены растения регенеранты. Всего мы получили 38 растения *in vitro* из восьми гибридных комбинаций (Таблица -1). Из таблицы 1 видно, что завязываемость межвидовых гибридов достаточно низкая у тетраплоидных (рапс x горчица) гибридных комбинаций, а где

родительской материнской формой является рапс и отцовской формой является сурепица (рапс x сурепица) завязываемость выше. Полученные гибридные растения были клонированы по 3 клона каждой линии, для пересадки в грунт и хромосомных исследований.

Таблица 1 - Получение растений *in vitro* из гибридных незрелых зародышей

№ п/п	Наименование гибридных комбинаций	Количество опыленных цветков	Количество Полученных незрелых зародышей/завязываемость (%)	Количество полученных растений
1	♀ Антей (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Золотистое (<i>Brassica campestris</i>)	56	12/(21,4)	11
2	♀ Антей (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Янтарное (<i>Brassica campestris</i>)	28	9/(32,1)	7
3	♀ Янтарное (<i>Brassica campestris</i>) x ♂ Антей (<i>Brassica napus</i>)	15	6/(40)	3
4	♀ Антей (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Славянка (<i>Brassica juncea</i>)	51	1/(2)	1
5	♀ Антей (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Росинка (<i>Brassica juncea</i>)	19	3/(15,8)	2
6	♀ Крис (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Золотистое (<i>Brassica campestris</i>)	75	9/(12)	8
7	♀ Крис (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Янтарное (<i>Brassica campestris</i>)	64	24/(37,5)	5
8	♀ Крис (<i>Brassica napus</i>) x ♂ Славянка (<i>Brassica juncea</i>)	36	1/(2,7)	1

Через 10-15 дней изолирования зародышей, полученные регенеранты пересаживали на питательную среду $\frac{1}{2}$ MS без гормонов для клонирования, и были пересажены в грунт. Далее растения выращиваются в закрытом грунте при температуре 25 С°, 15000 люкс, влажность 60% для получение семян. Растения нормально растут и развиваются в контролируемых условиях. Однако понятно, что далеко не все растения будут фертильными, поскольку формирование полноценных генеративных клеток у отдаленных гибридов сопряжено с трудностями при мейотическом делении. Нарушения происходят из-за различий хромосом родительских сортов как по количеству так и по наличию гомологичных участков в них (Рисунок-1).



А

Б

А – анафаза I задержка унивалентов (одного или нескольких) на экваторе

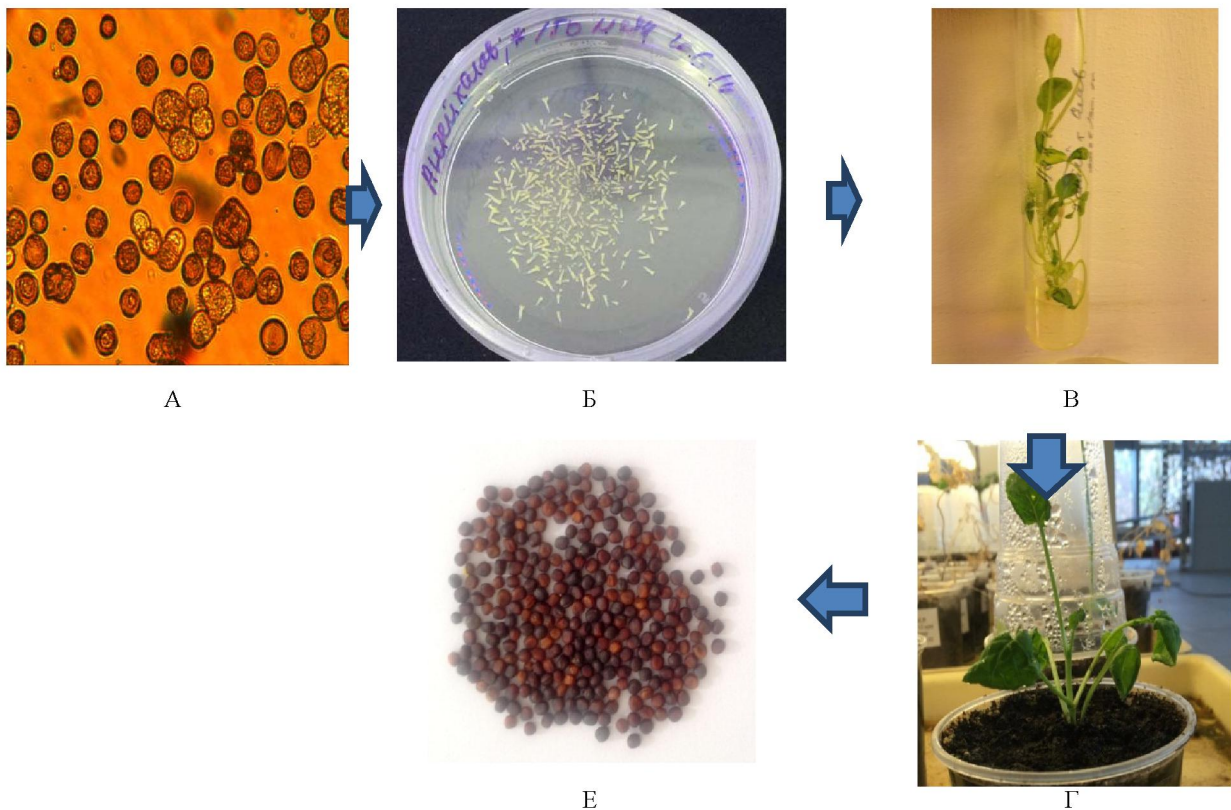
Б – Нарушение процесса мейоза во время первого деления, Появление отставания хромосом

Рисунок -1 Нарушение в мейозе, мостов.

С использованием культуры изолированных микроспор из 3 гибридной комбинации (Крис (*Brassica napus*) x Золотистое (*Brassica campestris*), Крис (*Brassica napus*) x Янтарное (*Brassica*

campestris, Антей (*Brassica napus*) x Славянка (*Brassica juncea*) были получены от 70 до 700 эмбриоидов и отобрано от 24 до 48 штук на комбинацию, которые были пересажены на твёрдую питательную среду Гамборга В5 с добавлением гибберелиновой кислоты 1 мг на литр. По мере образования регенерантов, растения пересаживали на среду Мурасиге-Скуга с половинным набором солей без гормонов по одной штуке в пробирку и помещались в светокультуральную комнату (Рисунок-2 А, Б).

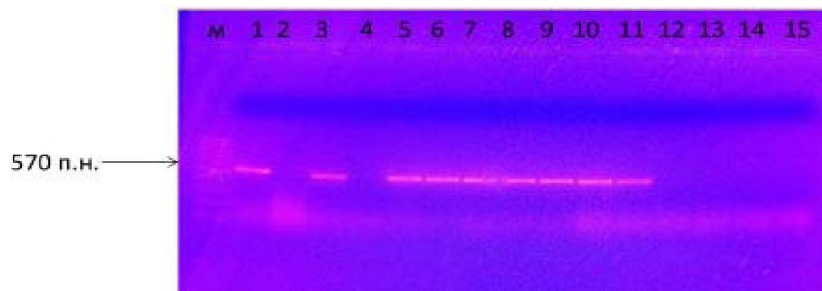
В дальнейшем была проведена обработка 0,05% раствором колхицина для получения удвоенных гаплоидных гибридных растений [14]. Из всех обработанных раствором гаплоидных гибридных регенерантов, были получены семена из межвидовых гибридов рапса с сурепицей комбинации Крис (*Brassica napus*) x Золотистое (*Brassica campestris*) и Крис (*Brassica napus*) x Янтарное (*Brassica campestris*) (Рисунок 2 В,Г). В тоже время межвидовые гибридные комбинаций рапса с горчицей оказались стерильными.



А- процесс образование эмбриоидов; Б – полученные гаплоидные эмбриоиды;
В – гаплоидный регенерант in vitro; Г – дигаплоидное растение в грунте; Е – дигаплоидные семена
Рисунок -2 Схема получения гибридных дигаплоидных семян

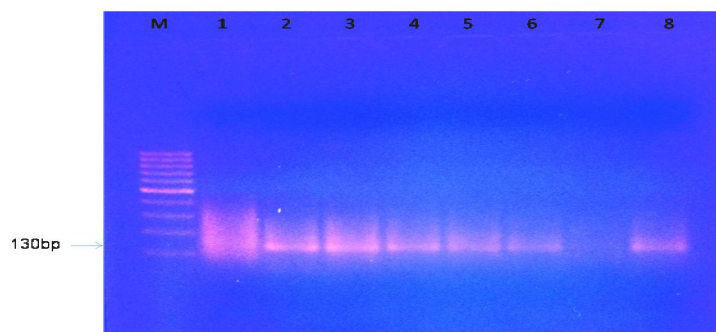
Для выбора подходящего решения селекционных задач, связанных с использованием метода интрогрессивной гибридизации, требуется набор различных ДНК маркеров. В частности, в селекции сурепицы (*B. Campestris*), овощных форм *B. rapa*, капусты (*B. Oleracea*) и рапса (*B. Napus*) играют важную роль интрогрессия генетического материала В генома, который может нести гены контролирующие устойчивость к таким бактериальным и грибным заболеваниям, как фомоз, черная ножка рапса, сухая гниль капусты (*Leptosphaeriatamaculans*) и сосудистый бактериоз (патоген *Xanthomonascampestrispv. Campestris*), а также к засухе и повышенным температурам [16]. Для того чтобы исследовать передачу В генома, в наборе должны содержаться ДНК-маркеры разбросанные равномерно по всем восьми хромосомам генома В [16]. Маркеры участков хромосом или отдельных хромосом генома В, несущие гены хозяйственно полезных признаков, позволят провести детальный анализ, чтобы выявить результаты гибридизации и проследить перенос хозяйственно ценных признаков, если эти маркеры картированы на хромосомах.

По результатам молекулярного подтверждения с праймером *GenBLm1* на присутствие хромосомы генома В доказано, что из 13 гаплоидных регенерантов комбинации Антей (*Brassica napus*) x Славянка (*Brassica juncea*) 8 были настоящими гибридами. (рисунок 3). На рисунке 3 видно, что в геномных ДНК 8 гаплоидных гибридных регенерантов амплифицируется ДНК-фрагмент длиной около 570 нуклеотидов, что показывает о присутствие хромосом с генома В (*Brassica juncea*).



М – маркер, 1- положительный контроль *Brassica juncea*; 2 – отрицательный контроль *Brassica napus* 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 – гаплоидные регенеранты, которые являются истинными межвидовыми гибридами; 4, 12, 13, 14, 15 – гаплоидные регенеранты, не являющиеся гибридами
Рисунок 3 – Электрофорез с праймером *GenBLm1* в 1,2% агарозном геле на присутствие хромосомы генома В (*Br. juncea*) в 8 регенерантов из 13 в гибридной комбинации Антей (*Brassica napus*) x Славянка (*Brassica juncea*)

Результаты по идентификации хромосом с использованием микросателлитного праймера Na12-H09 в полученных дигаплоидных растениях на присутствие хромосомы генома А (*Brassica campestris*) в комбинации Крис (*Brassica napus*) x Золотистое (*Brassica campestris*) показала, что из 6 растений истинными гибридами являются 5 (рисунок 4). Анализы ПЦР-продуктов показывают наличие ДНК-фрагмента на уровне 190 нуклеотидов в 5 гибридных образцах, что свидетельствует об успешно проведенной гибридизации.



М – маркер, 1- отрицательный контроль *Brassica napus*; 2 – положительный контроль *Brassicacampestris*; 3,4,5,6,8 – дигаплоидные растения, которые являются истинными межвидовыми гибридами; 7 – дигаплоидное растение не являющимся гибридом

Рисунок 4 – Электрофорез микросателлитным праймером Na12-H09 родительских форм и 6 гибридных растений в 1,2% агарозном геле, подтверждающий перехода хромосомы генома А сурепицы в гибридные растения комбинации комбинации Крис (*Brassica napus*) x Золотистое (*Brassica campestris*).

Выводы

Межвидовая гибридизация остается одним из основных экспериментальных подходов для расширения генетического разнообразия семейства *Brassica*. Традиционные исследования по межвидовой гибридизации включают скрещивания исходных родительских видов и в случае стерильности отдаленных гибридов – их диплоидизацию с целью получения.

фертильных амфидиплоидов и создания интрогрессивных форм в поколениях беккроссов. На сегодняшний день успешные попытки получения межвидовых гибридов между *B. napus* x *B. oleracea* и *B. rapa* опубликованы в многочисленных научных работах [17]. Общеизвестно что рапс,

геномный состав ААСС, и сурепица, геномный состав АА, имеют общий набор геномов (АА), что облегчает межвидовое скрещивание между этими двумя видами. В полевых, естественных условиях успех гибридизации варьируется в широких пределах [18].

В настоящем эксперименте изучали возможность гибридизации между тетраплоидом *B. napus* (ААСС) с диплоидным *Br. campestris* (АА) и тетраплоидным *B. juncea* (ААВВ). Гибридизация была успешна только тогда, когда *B. napus* использовалась как материнской формой. Многие межвидовые гибриды *Brassica* были успешными, когда у родителя-женщины был более высокий уровень пloidности, чем у родителя-мужчины [19]. Гибридизация между тетраплоидными видами, *B. napus*, *B. juncea*, и диплоидным *B. rapa*, естественно, весьма несовместима [20]. Гибридизация может происходить, но только из-за несовместимости развития эмбрионов не продолжается, что становится причиной стерильных растений.

Для преодоления геномной несовместимости в нашей работе использовался биотехнологический метод, метод изолирования и выращивания в условиях *in vitro* незрелых и зрелых зародышей, что позволило получить фертильные растения межвидовых гибридов рапса с сурепицей и горчицей. Наилучшие результаты были получены комбинации где была проведена скрещивания рапса с сурепицей (от 12% до 38%). Чтобы подтвердить истинную гибридную природу предполагаемых растений использовались молекулярные праймеры (SSR). Молекулярные праймеры показали что из комбинации рапс с горчицей из 13 гаплоидных растений 8 были истинными гибридами, а в комбинации рапс сурепицей гибридами являются 5 из 6 дигаплоидных растений.

Создание гибридных растений семейства *Brassica*, вместе со всеми геномами А, В и С, будет иметь особый потенциал для создания новых отечественных сортов с признаками устойчивости к ряду биотических и абиотических стрессов, включая засуху, засоленность, вредителей и болезни, а с точки зрения производства семян гибридов будут иметь, более высокое содержание масла и более высокую питательную ценность.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Котлярова Е. Б., Жидкова Е. Н., Подвигина О. А. (2007) Применение методов *in vitro* для получения межвидовых и межродовых гибридов растений семейства *Brassicaceae*, Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2: 64-70
- [2] Lukens Lewis N, Pires J Chis, Leon Enrique, Vogelzang Robert, Oslach Lynne, Osborn Thomas (2006) Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids, Plant Physiology 140: 336-348.
- [3] Maluszynska J, Heslop-Harrison P (1993) Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species, Genome, 36:774-781
- [4] S. R. Weerakoon (2011) Producing inter-specific hybrids between *brassica juncea*(L.) Czern&Coss and *B. Oleracea*(L.) To synthesize trigonemic (abc) *brassica*, J.Sci.Univ.Kelaniya, 6: 13-34
- [5] Shyama r. Weerakoon, Ping Si, Wei Zili, Jinling Meng and Guijun Yan (2009) Production and confirmation of hybrids through interspecific crossing between tetraploid *b. Juncea* and diploid *b. Oleracea* towards a hexaploid *brassica* population, 16th Australian research assembly on *Brassicaceae*. Ballarat 20 hybrid. P. 1-7
- [6] Matthew N. Nelson, Annaliese A.S. Mason, Marie-Claire Castello, Linda Thomson, Guijun Yan, Wallace A. Cowling (2009) Microspore culture preferentially selects unreduced (2n) gametes from an interspecific hybrid of *Brassica napus* L. x *Brassica carinata* Braun, Theor Appl Genet, 119:497-505.
- [7] Md. Masud Karim, Asfakun Siddika, Nazmoon Naher Tonu, Delwar M. Hossain, MD. Bahadur Meah, Takahiro Kawanabe, Ryo Fujimoto and Keiichi Okazaki (2014) Production of high yield short duration *Brassica napus* by interspecific hybridization between *b. Oleracea* and *b. Rapa*, Breeding Science 63: 495-502
- [8] Vanl. Ripley and p. G. Arnison (1990) Hybridization of *Sinapis alba* L. and *Brassica napus* L. via embryo rescue, Plant Breeding, 104:26-33. E. 6.
- [9] Горягина, Е.Н. Жидкова (2008) Получение гибридов между рапсом яровым и горчицей белой методом эмбриокультуры // Научно-технический бюллетень всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 1 (138).
- [10] Jack Brown, Angela P. Brown, Jim B. Davis & Donna Erickson (1997) Intergenerichybridization between *Sinapis alba* and *Brassic napus*, Euphytica, 93: 163-168.
- [11] Eric B. Swanson. Microspore culture in *brassica* (1990) Methods in molecular biology, 6:159-169
- [12] Doyle, J.J. (1987) A rapid dna isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues, Phytochembull. 19:11-15.
- [13] I.A.P. Parkin, A.G. Sharpe, D.J. Keith, and D.J. Lydiate (1995) Identification of the a and c genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape), Genome, 38: 1122-1131.

- [14] A. Gland (1981) Doubling chromosomes in interspecific hybrids by colchicine treatment, *EucarpiaCruciferae* nl, 6:20–22.
- [15] Delourme R., Chevre A.M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M.H., Dias J., Salisbury P., Renard M., Rimmer S.R. (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeriacumulans* in oilseed rape (*Brassica napus*), *Eur. J. Plant Pathol.* 114:41-52.
- [16] Vicente J.G., Taylor J.D., Sharpe A.G., Parkin I.A.P., Lydiat D.J., King G.J. (2002) Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonascampestrispv. Campestris* in Brassica genomes, *Phytopathology*. 92:1134-1141.
- [17] Sikander Pal Choudhary, H. Volkan Oral, RenuBhardwaj, Jing-Quan Yu and Lam-Son Phan Tran (2012) Interaction of Brassinosteroids and Polyamines Enhances Copper Stress Tolerance in *RaphanusSativus*, *JExp Bot.* Sep. 63(15): 5659–5675.
- [18] Pallett DW, Huang L, Cooper JI, Wang H (2006) Within-population variation in 121 hybridization and transgene transfer between wild *Brassica rapa* and *Brassica napus* in the UK. *AnnApplBiol* 148:147–155
- [19] Shelfhout, C. J., W.A. Snowdon, W.A. Cowling & J. M. Wroth (2006) Tracing B-genome chromatin in *Brassica napus* x *B. juncea* inter-specific progeny. *Genome* 49: 1490-1497.
- [20] Diederichsen, E. & M. D. Sacristan (1994) The use of ovule culture in reciprocal hybridization between *B. campestris* L. and *B. oleracea* L. *Plant Breeding* 113: 79–82.

REFERENCES

- [1] Kotlyarova E.B., Zhidkova E.N., Podvigina O.A. (2007) The Application of Methods in Vitro For Production Interspecific and Intergeneric Hybrid of the Plants of Family Brassicaceae (Review), *VNU Bulletin, Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2:64-70 (in Rus)
- [2] Lukens Lewis N, Pires J Chis, Leon Enrique, Vogelzang Robert, Oslach Lynne, Osborn Thomas (2006) Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids, *Plant Physiol* 140: 336-348.
- [3] Maluszynska J, Heslop-Harrison P (1993) Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species, *Genome*, 36:774-781
- [4] S. R. Weerakoon (2011) Producing inter-specific hybrids between *brassica juncea*(L.) Czern&Coss and *B. Oleracea*(L.) To synthesize trigonemic (abc) *brassica*, *J.Sci. Univ. Kelaniya*, 6: 13-34
- [5] Shyama r. Weerakoon, Ping Si, Wei Zili, JinlingMeng and Guijun Yan (2009) Production and confirmation of hybrids through interspecific crossing between tetraploid *b. Juncea* and diploid *b. Oleracea* towards a hexaploid *brassica* population, 16th Australian research assembly on *Brassicaceae*. Ballarat 121 hybridiz. P. 1-7
- [6] Matthew N. Nelson, Annaliese A.S. Mason, Marie-Claire Castello, Linda Thomson, Guijun Yan, Wallace A. Cowling (2009) Microspore culture preferentially selects unreduced (2n) gametes from an interspecific hybrid of *Brassica napus* L. x *Brassica carinata* Braun, *TheorAppl Genet*, 119:497–505.
- [7] Md. Masud Karim, Asfakun Siddika, Nazmoon Naher Tonu, Delwar M. Hossain, MD. Bahadur Meah, Takahiro Kawanabe, Ryo Fujimoto and Keiichi Okazaki (2014) Production of high yield short duration *Brassica napus* by interspecific hybridization between *b. Oleracea* and *b. Rapa*, *Breeding Science* 63: 495–502
- [8] Vanl. Ripley and p. G. Arnison (1990) Hybridization of *Sinapis alba* L. and *Brassica napus* L. via embryo rescue, *Plant Breeding*, 104:26–33.
- [9] E.B. Goryagina, E.N. Zhidkova (2008) The production of hybrids between rape spring and white mustard by embryo culture, *Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oilseeds*. 1:138. (in Rus)
- [10] Jack Brown, Angela P. Brown, Jim B. Davis & Donna Erickson (1997) Intergeneric hybridization between *Sinapis alba* and *Brassica napus*, *Euphytica*, 93: 163–168.
- [11] Eric B. Swanson. Microspore culture in *brassica* (1990) *Methods in molecular biology*, 6:159-169
- [12] Doyle, J.J. (1987) A rapid dna isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues, *Phytochembull.* 19:11-15.
- [13] I.A.P. Parkin, A.G. Sharpe, D.J. Keith, and D.J. Lydiat (1995) Identification of the a and c genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape), *Genome*, 38: 1122-1131.
- [14] A. Gland (1981) Doubling chromosomes in interspecific hybrids by colchicine treatment, *EucarpiaCruciferae* nl, 6:20–22.
- [15] Delourme R., Chevre A.M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M.H., Dias J., Salisbury P., Renard M., Rimmer S.R. (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeriacumulans* in oilseed rape (*Brassica napus*), *Eur. J. Plant Pathol.* 114:41-52.
- [16] Vicente J.G., Taylor J.D., Sharpe A.G., Parkin I.A.P., Lydiat D.J., King G.J. (2002) Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonascampestrispv. Campestris* in Brassica genomes, *Phytopathology*. 92:1134-1141.
- [17] Sikander Pal Choudhary, H. Volkan Oral, RenuBhardwaj, Jing-Quan Yu and Lam-Son Phan Tran (2012) Interaction of Brassinosteroids and Polyamines Enhances Copper Stress Tolerance in *RaphanusSativus*, *JExp Bot.* Sep. 63(15): 5659–5675.
- [18] Pallett DW, Huang L, Cooper JI, Wang H (2006) Within-population variation in 121 hybridization and transgene transfer between wild *Brassica rapa* and *Brassica napus* in the UK. *AnnApplBiol* 148:147–155
- [19] Shelfhout, C. J., W.A. Snowdon, W.A. Cowling & J. M. Wroth (2006) Tracing B-genome chromatin in *Brassica napus* x *B. juncea* inter-specific progeny. *Genome* 49: 1490-1497.
- [20] Diederichsen, E. & M. D. Sacristan (1994) The use of ovule culture in reciprocal hybridization between *B. campestris* L. and *B. oleracea* L. *Plant Breeding* 113: 79–82.

**К.Ж. Жамбакин, М.Х. Шамекова, А.К. Даурова, Д.Л. Дауров, К.К. Жапар,
Д.В. Волков, А.К. Едилова, М.О. Бакбергенова, Д.А. Толегенова**

ҚР БҒМ ҒК «Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты», ШЖҚ РМК, Алматы, Қазақстан

**РАПСЫҢ (*BRASSICA NAPUS*) ҚЫШАБАС (*BRASSICA CAMPESTRIS*)
ЖӘНЕ ҚЫША (*BRASSICA JUNCEA*) ӨСІМДІКТЕРІМЕН ТҮРАРАЛЫҚ БУДАНДАРЫН АЛУ**

Аннотация. Бұл мақалада рапс өсімдігінің қышабас және қыша өсімдіктерімен тұраралық будандарын алу үшін алыстан будандастыру әдісі көрсетілген. Жұмыстың нәтижесінде, ілеспелі будандастыруға сәйкес рапстың қышабас және қыша алыстан будандастыру әдісімен бақыланатын және дала жағдайында *in vitro* дақылына 65 жетілмеген ұрық енгізілген, кейіннен олардан 38 *in vitro* өсімдік алынған. Оқшауланған микроспора дақылдан пайдалану арқылы тұраралық будандардың бірінші және екінші ұрпақты дигиплоидты (ДГтб 1, ДГтб 2) өсімдіктері алынған. Хромосомалардың сәйкестендірілуі жүргізілген, нәтижесінде анық буданды өсімдіктер анықталған.

Тірек сөздер: *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, *SSR*, *GenBLm1*, микроспоралар, дигиплоид.

Сведения об авторах:

Жамбакин К.Ж. - д.б.н., профессор, академик НАН РК, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, zhambakin@gmail.com, 3947267.

Шамекова М.Х. - PhD, ассоц.профессор, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, shamekov@gmail.com, 3947267.

Даурова А.К. - магистр, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, ai_ken.89@mail.ru, 3947267.

Дауров Д.Л., -магистр, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, dias.daurov@mail.ru, 3947267.

Жапар К.К. - докторант КазНАУ, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, zharar.zk@gmail.com, 3947267.

Волков Д.В. - магистр, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, spiritdem@gmail.com, 3947267.

Едилова А.К. - магистрант КазНУ, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, 3947267
Бакбергенова М.О., магистр, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, 85.makpal.bakbergenova@mail.ru, 3947267.

Толегенова Д.А. - магистрант КазНАУ, Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы Тимирязева 45, dana_tolegenova@mail.ru, 3947267, 29.09.2017 г.