

УДК 575.11.13:633.854.48

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНА ВІДНОВЛЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ ПИЛКУ (Rf_1) У ЛІНІЙ СОНЯШНИКА ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО SSR-МАРКЕРА

О.А. ЗАДОРЖНА

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України
61128 Харків, Московський просп., 142
e-mail: olzador@ukr.net

Проведено тестування ліній соняшника (*Helianthus annuus* L.) з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (PET1) Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А, лінії-закріплювача стерильності Х908Б, ліній-відновників фертильності пилку Х114В, Х526В, Х711В, Х712В, Х714В, Х720В, Х762В, Х782В, Х840В на наявність гена Rf_1 за допомогою SSR-маркера ORS511. Встановлено наявність гена Rf_1 у ліній-відновників фертильності пилку. Обговорено можливість диференціації ліній-відновників фертильності пилку та ліній-закріплювачів стерильності за допомогою SSR-маркера.

Ключові слова: *Helianthus annuus* L., Rf -гени, цитоплазматична чоловіча стерильність, закріплювач, відновник, SSR-маркер.

Важливим напрямом сучасної селекції соняшника (*Helianthus annuus* L.) є створення вихідних форм для гетерозисних гібридів. Вихідні стерильні материнські форми й батьківські лінії-відновники фертильності пилку потребують ретельного вивчення [3, 4]. Основним джерелом цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) сучасних комерційних гібридів соняшника як правило є цитоплазма PET1. Це джерело було ізольоване Леклерком з міжвидового гібрида *Helianthus petiolaris* Nutt. × *Helianthus annuus* L. і визначено як PET1 цитоплазма [19]. Стерильні лінії — носії цієї цитоплазми — відновлюються геном фертильності пилку Rf_1 . Відомі інші джерела ЦЧС, відмінні від PET1. Серед них, наприклад, джерела на основі цитоплазми *H. argophylus* Torr&Gray (ARG1, ARG3), *H. praecox* Engelm&Gray (PRR1, PRH1), *H. rigidus* (Cass.) Desf. (RIG2), *H. debilis* Nutt. (DEB2), які теж відновлюються геном Rf_1 . Виявлено також альтернативні джерела ЦЧС на основі цитоплазми *H. giganteus* L. (GIG1), *H. texanus* Heiser (ANT1), *H. fallax* Heiser (PEF1), *H. annuus* L. (ANN5), які не відновлюються донорами генів Rf_{PET1} [7]. Нові джерела ЦЧС [21, 25], у тім числі за участю молекулярних маркерів [11], вивчаються постійно.

Дослідженню генетики ознаки відновлення фертильності пилку соняшника у форм із ЦЧС класичного типу присвятили свої праці чимало вчених. Більшість із них доводить, що відновлення фертильності пилку забезпечується одним домінантним геном Rf в гомозиготному й гетерозиготному станах [1, 19]. Згідно з іншими дослідженнями, генетичний контроль ознаки відновлення фертильності пилку складний. Вважають, що фенотипний ефект відновлення чоловічої стерильності

контролюють неалельні домінантні гени, що взаємодіють комплементарно та за типом кумулятивної й некумулятивної полімерії [2].

Нині відомі конкретніші дані. Здебільшого фертильність пилку культурного соняшника відновлюється одним ядерним геном Rf_1 , який знаходиться на 13-й хромосомі (LG13) [24]. Існує також ген Rf_2 [18], комплементарний Rf_1 . Ген Rf_3 , відмінний від Rf_1 , знаходиться на 7-й хромосомі (LG7) і відновлює PЕТ1 так само ефективно, як і Rf_1 [14]. Ген Rf_4 розміщений у третій групі зчеплення (LG3) і контролює відновлення фертильності пилку в новому джерелі ЦЧС GIG2 [9].

Пошук нових відновників фертильності пилку традиційними зворотними схрещуваннями доволі дорогої процес, потребує багато часу та екстенсивних схрещувань. Робились спроби диференціювати стерильні лінії й відновники фертильності пилку за допомогою ізоферментного аналізу. У результаті встановлено поліморфізм і генетичний контроль певних ізоферментних систем, але для диференціації ліній за наявності гена Rf_1 цей метод виявився неефективним [4, 6]. Визначення відновників фертильності пилку значно пришвидшують молекулярні маркери, що тісно пов'язані з генами-відновниками фертильності пилку. Проведено дослідження з використанням різних молекулярних маркерів для ідентифікації генів Rf у ріпаку [15], кукурудзи [26], жита [22] та інших культур. Аналогічні роботи з вивчення генів відновлення фертильності пилку виконано і для соняшника. Оскільки найпоширенішою є система PЕТ1— Rf_1 , більшість досліджень присвячено маркуванню саме гена Rf_1 . Визначено RAPD-маркер OPAМ06₁₈₀₀, за допомогою якого можна диференціювати фертильні і стерильні лінії [20]. Молекулярне картування локусу Rf_1 проведено на різних популяціях. Для картування Rf_1 використовували RELP- [10], RAPD- SCAR-, AELP- [10, 12, 17] та SSR-маркери [16, 23]. Для визначення локалізації придатні і TRAP-маркери [13, 23].

Нині в селекції широко застосовують добори за маркерами, які забезпечують швидкий добір відповідних зразків із цінними ознаками.

У зв'язку з цим метою нашої роботи була ідентифікація за допомогою молекулярного маркера ORS511 гена Rf_1 у низці селекційних ліній, що в подальшому може знадобитися при доборі потрібних зразків.

Методика

Досліджували лінії з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (PЕТ1) Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А, лінію-закріплювача стерильності Х908Б, лінії-відновники фертильності пилку Х114В, Х526В, Х711В, Х712В, Х714В, Х720В, Х762В, Х782В, Х840В селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України.

Для ідентифікації гена Rf_1 застосовано SSR-маркер ORS511 [23]. ДНК для молекулярно-генетичного аналізу екстрагували СТАВ-методом [8, 13]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за стандартною методикою в термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) [5]. До складу реакційної суміші об'ємом 20 мкл входили: 1х буфер (10 мМ *tris*-HCl, 50 мМ KCl, 0,8 %-й нонідет Р40), 2 мМ dNTPmix, 0,2 мкМ кожного праймеру, 2,5 MgCl₂, 1 од. Таq-полімерази («Fermentas»). Початкову денатурацію проводили за 94 °С упродовж 2 хв, 35 циклів за таких режимів: денатурація 94 °С, 40 с; відпал 55 °С, 30 с; елонгація 72 °С, 2 хв; фінальну елонгацію — за 72 °С упродовж 5 хв. Продукти ампліфікації розподіляли у 2 %-му агарозному гелі в 1 х-кратному ТВЕ-

буфері. Маркером молекулярних мас слугував O'Range Ruler 100 bp DNA Ladder («Fermentas»). Візуалізацію проводили з використанням етидіум броміду й транслюмінатора UVT-1 («Біоком», Росія).

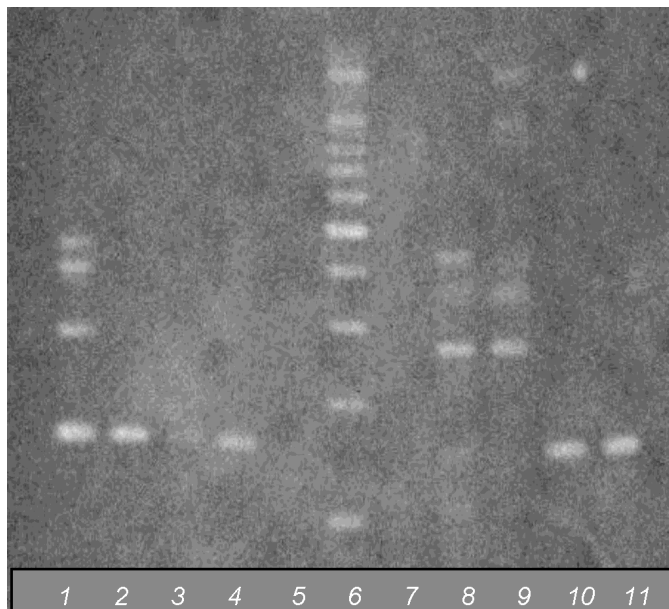
Отримані дані проаналізовано за програмою Gel Images-2 («Хелікон», Росія).

Результати та обговорення

Нами встановлено, що у локусі ORS511 відбулась ампліфікація у ліній X114В, X526В, X711В, X712В, X714В, X720В, X762В, X882В, X840В (рисунк). У більшості ліній виявлено алель ORS511_169, у ліній X114В, X720В — також алелі ORS_287, ORS_384, ORS_461, у лінії X762В — лише алелі ORS_287, ORS_384, ORS_461 (таблиця). З дев'яти проаналізованих генотипів лише три виявились поліморфними. Загалом у локусі ORS511 ідентифіковано чотири алелі; найпоширеніший із них — ORS511_169. Отже, аналізом локусу ORS511, який знаходиться на відстані 3,7 сМ від гена Rf_1 [23], підтверджено наявність маркерних алелів до гена Rf_1 у досліджених ліній-відновників фертильності пилку. Ці лінії соняшника є носіями гена Rf_1 , що раніше було визначено традиційним методом запилення стерильних форм на РЕТ1 цитоплазмі.

Аналізом локусу ORS511 для стерильних ліній Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А та лінії-закріплювача стерильності Х908Б маркерних алелів не виявлено (див. рисунок). Аналогічні результати отримано за використання SCAR-маркерів ОРК13_454/HRG01 та HRG02, які спостерігались у ліній-відновників фертильності пилку і були відсутні у закріплювачів стерильності [12].

Отже, у ліній-відновників фертильності пилку є ген Rf_1 ; лінії соняшника вітчизняної селекції можна диференціювати за здатністю до



Електрофореграма у 2 %-му агарозному гелі продуктів ампліфікації за локусом ORS511 у ліній X114В (1), X526В (2), X711В (3), X714В (4), Сх1006А (5), Х908Б (7), X720В (8), X762В (9), X782В (10), Х840В (11); 6 — М — маркер молекулярних мас 100 bp

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ

Алельный склад линий соняшника за локусом ORS511

Линия	Кількість алелів	Наявність алелів			
X114В	4	169	287	384	461
X526В	1	169	—	—	—
X711В	1	169	—	—	—
X712В	1	169	—	—	—
X714В	1	169	—	—	—
X720В	4	169	287	384	461
X762В	3	—	287	384	461
X782В	1	169	—	—	—
X840В	1	169	—	—	—

закріплення стерильності й відновлення фертильності пилку за допомогою молекулярного маркера ORS511.

1. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение II. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМСr // Генетика. — 1985. — **21**, № 12. — С. 1999—2004.
2. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение III. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМС₁ // Там же. — С. 2005—2010.
3. Попов В.Н., Кириченко В.В. Мужская стерильность подсолнечника. Теоретические и прикладные аспекты // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — **2**, № 11. — С. 18—33.
4. Попов В.Н., Кириченко В.В. Мужская стерильность подсолнечника. — Харьков, 2010. — 156 с.
5. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. — Одесса: Астропринт, 2011. — 336 с.
6. Шарипина Я.Ю., Попов В.Н., Кириченко В.В. Полиморфизм и генетический контроль некоторых изоферментных систем у мутантных линий подсолнечника // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 2. — С. 27—33.
7. Cherpurnaya A., Sherstyuk V., Tikhomirov V. CMS-Rf system for sunflower breeding // *Helia*. — 2003. — **26**, N 38. — P. 59—65.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue // *Focus*. — 1990. — **12**, N 1. — P. 13—15.
9. Feng J., Jiujuan J. Introgression and molecular tagging of Rf₄, a new male fertility restoration gene from wild sunflower *Helianthus maximiliani* L. // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — **117**, N 2. — P. 241—249.
10. Gentsbittel L., Vear F., Zhang Y.-X. et al. Development of a consensus linkage RELP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Ibid.* — 1995. — **90**, N 7—8. — P. 1079—1086.
11. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E. et al. Molecular diversity of CMS sources and fertility restoration in the genus *Helianthus* // *Helia*. — 2002. — **25**, N 36. — P. 29—40.
12. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E. et al. Molecular mapping of the Rf₁ gene restoring pollen fertility in PET1-based F₁ hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — **106**, N 4. — P. 599—606.
13. Hu J., Yue B., Vick B. Integration of TRAP markers into a sunflower SSR marker linkage map constructed from 92 recombinant inbred lines // *Helia*. — 2007. — **30**, N 46. — P. 25—36.
14. Jan C.-C., Vick B. Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower // *Plant Breed.* — 2007. — **126**, N 2. — P. 213—217.
15. Janeja H.S., Banga S.S., Lakshmikumaran M. Identification of AFLP markers linked to fertility restorer genes for tournefortii cytoplasmic male-sterility system in *Brassica napus* // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — **107**, N 1. — P. 148—154.

16. Kusterer B., Friedt W., Lazarescu E. et al. Map-based cloning strategy for isolating the restorer gene Rf_1 of the Pet1 cytoplasm in sunflower, *Helianthus annuus* L. // *Helia*. — 2004. — 27, N 40. — P. 1—14.
17. Kusterer B., Prufe M., Lazarescu E. Mapping of the restorer gene Rf_1 in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Helia*. — 2002. — 25, N 36. — P. 41—46.
18. Leclercq P., Philippon J.P. Identification de genes de restauration de fertilité sur cytoplasmes stérilisants chez le tournesol // *Agronomie*. — 1984. — 4, N 6. — P. 573—576.
19. Leclercq P. Use sterility male cytoplasmique chez le tournesol // *Annales de l'Amélioration de Plantes*. — 1969. — 19. — P. 99—106.
20. Serene I.M., Manivannan N., Muralidharan V. Identification of RAPD marker linked to a fertility restorer gene for PET-1 cytoplasm of sunflower — *Helianthus annuus* L. // *Helia*. — 2003. — 26, N 39. — P. 67—73.
21. Serieys H.A. Identification, study and utilisation in breeding programs of new CMS sources. FAO Progress Report (1996—1999) // *Helia*. — 1999. — 22, spec. iss. — P. 71—84.
22. Stojatowski S.A., Milczarski P., Hanek M. et al. DarT markers tightly linked with the $Rfc1$ gene controlling restoration of male fertility in the CMS-C system in cultivated rye (*Secale cereale* L.) // *J. Appl. Genet.* — 2011. — 52, N 3. — P. 313—318.
23. Yue B., Vick B., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the Rf_1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // *Plant Breed.* — 2010. — 129, N 1. — P. 24—28.
24. Yu J.K., Tang S., Slabaugh M.B. et al. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // *Crop. Sci.* — 2003. — 43, N 1. — P. 367—387.
25. Venkana V., Lokanadha R.D., Ranganatha A.R.G. Identification of restorers and maintainers for different CMS sources in sunflower using new inbreds // *Helia*. — 2008. — 31, N 49. — P. 65—70.
26. Zhang Z.F., Wang Y., Zheng Y.L. AFLP and PCR-based markers linked to Rf_3 , a fertility restorer gene for S cytoplasmic male sterility in maize // *Molecular genetics and genomics*. — 2006. — 276, N 2. — P. 162—169.

Отримано 20.02.2012

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЦЫ (Rf_1) У ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО SSR-МАРКЕРА

О.А. Задоржная

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков

Проведено тестирование линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) с цитоплазматической мужской стерильностью PET1 Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А, линии-закрепителя стерильности Х908Б, линий-восстановителей фертильности пыльцы Х114В, Х526В, Х711В, Х712В, Х714В, Х720В, Х762В, Х782В, Х840В на наличие гена Rf_1 с помощью SSR-маркера ORS511. Установлено наличие гена Rf_1 у линий-восстановителей фертильности пыльцы. Обсуждена возможность дифференциации линий-восстановителей фертильности пыльцы и линий-закрепителей стерильности с помощью SSR-маркера.

THE IDENTIFICATION OF THE POLLEN FERTILITY RESTORATION GENE (Rf_1) IN SUNFLOWER LINES WITH APPLYING OF MOLECULAR SSR-MARKER

O.A. Zadorozhna

V.Ya. Yuriev Plant Production Institute, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
142 Moskovskiy pr., Kharkiv, 61128, Ukraine

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with cytoplasmic male sterility (PET1) Cx908A, Cx1002A, Cx1006A, Cx1010A, Cx1012A, Cx2111A, Cx2552A, maintainer line X908B and restorer lines X114B, X526B, X711B, X712B, X714B, X720B, X762B, X782B, X840B were tested with applying SSR-marker on restore gene Rf_1 presence. It was determined the presence of Rf_1 in restorer lines. An opportunity for differentiation of restorer lines and maintainer lines with SSR-marker applying is discussed.

Key words: *Helianthus annuus* L., Rf genes, cytoplasmic male sterility, maintainer, restorer, SSR-marker.