

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

DOI: 10.30901/2227-8834-2016-2-99-107

УДК 575.12:633.854

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ К СУПРЕССИИ ФЕНОТИПА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ

Ю. И. Карабицина¹,
И. Н. Анисимова¹,
В. А. Гаврилова¹,
Н. В. Алпатьева¹,
А. Г. Пинаев²,
Е. Б. Кузнецова¹,
В. Т. Рожкова¹

¹ Федеральный
исследовательский центр
Всероссийский институт
генетических ресурсов
растений имени
Н. И. Вавилова,
190000 Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская д. 42, 44,
Россия,
e-mail:
irina_anisimova@inbox.ru

² Федеральное
государственное бюджетное
научное учреждение
Всероссийский
научно-исследовательский
институт
сельскохозяйственной
микробиологии,
196608,
Санкт-Петербург, Пушкин,
ул. Подбельского, д. 3

Ключевые слова:

генетика, подсолнечник, ли-
нии, генетическая коллекция,
ЦМС, восстановление фер-
тильности пыльцы, гены,
молекулярные маркеры

Актуальность. В селекции и семеноводстве гибридов подсолнечника широко используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) PET1, полученная в результате межвидового скрещивания *Helianthus petiolaris* Nutt. и *H. annuus* L. По данным литературы, для супрессии фенотипа ЦМС PET1 необходимо от одного до четырех генов восстановления фертильности пыльцы (*Rf*), причем присутствие гена *Rf1* является обязательным. Для выявления в генотипе отцовской линии генов, восстанавливающих фертильность, проводят тест-скрещивания с линией ЦМС и анализируют растения F1. В последние годы разработан ряд ПЦР-маркеров для идентификации гена *Rf1* подсолнечника, которые могут значительно облегчить этот весьма трудоемкий процесс. Цель настоящего исследования – характеристика линий генетической коллекции подсолнечника по наличию-отсутствию молекулярных маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*. **Материал и методы.** Изучены 95 линий генетической коллекции подсолнечника Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), различающихся по способности к супрессии фенотипа ЦМС; среди них – 92 фертильные линии и 3 линии ЦМС. Молекулярный анализ выполнен с использованием семи пар праймеров (SCAR, STS, SSR), фланкирующих сцепленные с ядерным геном *Rf1* фрагменты, а также митохондриальный ген *orfH522*, ассоциированный с ЦМС PET1. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле. Анализ полиморфизма SSR-фрагментов выполнен на приборе MultiNA (Schimadzu, Япония). **Результаты и выводы.** Изученная выборка линий охарактеризована с помощью SCAR-маркеров HRG01 и HRG02, STS-маркеров STS115 и *orfH522*, а также SSR-маркеров ORS224, ORS511 и ORS799. У 79 линий с помощью STS-маркера *orfH522* идентифицирован цитоплазматический стерильный (PET1) тип, что служит косвенным подтверждением присутствия в их генотипах генов восстановления фертильности пыльцы. У 9 линий, три из которых не восстанавливают фертильность в тест-скрещиваниях, маркер *orfH522* не обнаружен, следовательно, эти линии имеют цитоплазму фертильного типа. У 7 линий отсутствовали тесно сцепленные с геном *Rf1* маркеры HRG01, HRG02 и STS115. Тем не менее, стерильный тип цитоплазмы этих линий и результаты гибридологического анализа свидетельствовали о том, что они несут ген (или гены) восстановления фертильности пыльцы. Маркеры HRG01, HRG02 и STS115 рекомендованы для скрининга расщепляющихся гибридных популяций при создании отцовских линий гибридов на основе коллекции ВИР. Получены новые данные о характере аллельной изменчивости микросателлитных локусов *ORS224*, *ORS511* и *ORS799*. Локус *ORS511* оказался наиболее полиморфным: в нем выявлено 5 аллелей, тогда как в локусах *ORS224* и *ORS799* идентифицировано соответственно четыре и два аллеля.

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

DOI: 10.30901/2227-8834-2016-2-99-107

MOLECULAR MARKING OF SUNFLOWER LINES WITH DIFFERENT ABILITY TO SUPPRESSION OF THE CYTOPLASMIC MALE STERILITY PHENOTYPE

Yu. I. Karbitsina¹,
I. N. Anisimova¹,
V. A. Gavrilova¹,
N. V. Alpatieva¹,
A. G. Pinaev²,
E. B. Kuznetsova¹,
V. T. Rozhkova¹

¹ The N. I. Vavilov
All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources,
42, 44, Bolshaya Morskaya str.,
St. Petersburg,
190000 Russia,
e-mail:
irina_anisimova@inbox.ru

² All-Russian Research Institute
for Agricultural Microbiology,
Shosse Podbelskogo, 3,
196608 St. Petersburg, Russia

Key words:

genetic, sunflower, lines, genetic collection, CMS, pollen fertility restoration, genes, molecular markers.

Background. Cytoplasmic male sterility (CMS) obtained after interspecific crossing between *Helianthus petiolaris* Nutt. и *H. annuus* L. is widely used in sunflower hybrid breeding and seed production. According to reference sources, one to four pollen fertility restoration genes (*Rf*) are necessary for suppression of the CMS PET1 phenotype, considering that the presence of the *Rf1* gene is obligatory. Test crosses with a CMS line are traditionally carried out, and the F1 plants are analyzed for their expression in the paternal line's genotype of the fertility restorer genes. During recent years the PCR markers were developed for the identification of the sunflower *Rf1* gene that can significantly facilitate this very laborious process. The research was aimed to characterize lines of sunflower genetic collection by the presence or absence of molecular markers associated with the CMS-*Rf* genetic system. **Materials and methods.** Ninety five lines of sunflower genetic collection differing by their ability to suppress the CMS phenotype were studied. The material included 92 fertile lines with different ability to suppress the CMS phenotype, and 3 CMS lines. Molecular analysis was performed using 7 primer pairs (SCAR, STS, SSR) flanking fragments linked to the nuclear *Rf1* gene and the mitochondrial *orfH522* locus which is associated with the PET1 type of CMS. Analysis of SSR fragments' polymorphism was carried out using the MultiNA equipment (Schimadzu, Japan). **Results and conclusions.** The lines were characterized using SCAR markers HRG01 and HRG02; STS markers STS115 and *orfH522*; SSR markers ORS224, ORS511 and ORS799. A sterile (PET1) cytoplasm was identified in 79 lines using the STS marker *orfH522* that confirmed indirectly the presence of fertility restoration genes in their genotypes. The *orfH522* marker was absent in 9 lines, three of which did not restore fertility in test crosses. It was concluded that these lines possessed fertile cytoplasm. Seven lines lacked the HRG01, HRG02 and STS115 markers tightly linked to the *Rf1* gene. Nevertheless, the sterile type cytoplasm of these lines and the results of hybridological analysis indicated that they possessed a gene (or genes) restoring pollen fertility. The HRG01, HRG02 and STS115 markers are recommended for screening of segregating hybrid populations when developing paternal hybrid lines using the material of the VIR collection. New data on allelic variation of the microsatellite loci *ORS224*, *ORS511* and *ORS799* were obtained. The *ORS511* locus was the most polymorphic. It involved 5 alleles whereas four and two alleles respectively were identified in the *ORS224* and *ORS799* loci.

Введение

Генетические системы ЦМС-*Rf* (цитоплазматическая мужская стерильность – восстановление фертильности пыльцы) широко используются при производстве гибридных семян различных сельскохозяйственных культур (кукурузы, подсолнечника, риса, сахарной свеклы, рапса и других). Впервые ЦМС у подсолнечника была получена в результате межвидового скрещивания *Helianthus petiolaris* Nutt. и *H. annuus* L. (Leclercq, 1969). Этот тип ЦМС носит название РЕТ1. В настоящее время он широко используется в селекции гибридов подсолнечника. В результате молекулярных исследований было установлено, что мужская стерильность ЦМС РЕТ1 связана с экспрессией новой открытой рамки считывания, *orfH522*, транскрибируемой вместе с геном *atp1*. Ген *orfH522* кодирует связанный с мембраной белок с молекулярной массой около 15 кДа, который присутствует во всех тканях стерильных растений. Фертильный фенотип может быть восстановлен путем введения в генотип гибрида доминантных ядерных генов *Rf*, вызывающих снижение уровня ко-транскрипта *atp1-orfH522* в пыльниках в течение мейоза и сопутствующее снижение количества белка ORFH522 (Nizampatnam et al., 2009). По различным данным, для восстановления фертильности пыльцы форм подсолнечника с ЦМС РЕТ1 необходимо от одного до четырех генов. Присутствие в генотипе гена *Rf1*, локализованного в группе сцепления 13 (Yu et al., 2003) является обязательным для супрессии фенотипа ЦМС РЕТ1.

Для выявления в генотипе отцовской линии генов, восстанавливающих фертильность, проводят тест-скрещивания с линиями ЦМС и анализируют растения F₁. Этот трудоемкий и длительный процесс может быть значительно упрощен благодаря использованию молекулярных маркеров – фрагментов ДНК, сцепленных с локусом *Rf*. В последние годы разработан ряд ПЦР-маркеров для идентификации гена *Rf1* подсолнечника. Однако их диагностическая ценность изучена лишь на ограниченном селекционном материале (Horn et al., 2003; Markin et al., 2013).

В настоящей работе изучено распределение молекулярных маркеров, сцепленных с локусом *Rf1*, в выборке линий генетической коллекции подсолнечника ВИР, и дана оценка их диагностической ценности.

Материалы и методы

Материалом исследования служили 95 линий генетической коллекции подсолнечника Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР); среди них – 92 фертильные линии и 3 линии ЦМС (Gavrilova et al., 2014). Материал был репродуцирован на Кубанской опытной станции ВИР. Фракции тотальной ДНК выделяли из этиолированных 7-дневных проростков с использованием модифицированного СТАБ-метода (Anisimova et al., 2010). Для молекулярного анализа из литературных источников были отобраны семь пар праймеров (SCAR, STS, SSR), фланкирующих сцепленные с локусом *Rf1* фрагменты, а также митохондриальный ген *orfH522*, ассоциированный с ЦМС РЕТ1 (табл. 1). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле. Анализ полиморфизма SSR-фрагментов выполнен на приборе MultiNA (Schimadzu, Япония) в ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии).

Результаты и обсуждение

Большинство изученных фертильных линий в разные годы исследований показали способность к восстановлению фертильности пыльцы при скрещивании с линией ЦМС РЕТ1 (Anisimova et al., 2011, 2014; Gavrilova et al., 2014) и, следовательно, могут считаться носителями генов *Rf*.

Линии выборки имели различное происхождение. Тринадцать линий были выделены из 11-ти коммерческих гибридов. Шесть линий выделены из потомств межвидовых гибридов от скрещиваний линии ЦМС *H. annuus* с многолетними или однолетними видами рода *Helianthus* L. Восемь линий были получены путем включения генов *Rf* в

генотипы других автофертильных линий. В целом, в происхождении линий выборки участвовали 66 источников, что свидетельствует о ее значительном генетическом разнообразии (Gavrilova et al., 2014).

Тип цитоплазмона линий генетической коллекции определяли по наличию или отсутствию митохондриального маркера *orfH522* и с учетом данных об их происхождении. Оказалось, что 79 (87%) фертильных линий выборки имеют стерильную цитоплазму PET1 типа (рис. 1).

У 9 линий маркер *orfH522* не обнаружен, следовательно, эти линии имели цитоплазму фертильного типа. Три линии из этой

группы (ВИР160, ВИР387 и ВИР449) не восстанавливали фертильность пыльцы в тест-скрещиваниях с линией ЦМС (Anisimova et al., 2014).

Наличие у линии цитоплазмона стерильного (PET1) типа является косвенным подтверждением присутствия в ее генотипе генов *Rf* необходимых для супрессии фенотипа ЦМС. Это значительно облегчает поддержание отцовских линий-восстановителей. В случае утраты функциональных аллелей *Rf*-генов растение линии становится стерильным, что служит причиной его выбраковки при размножении (Anisimova et al., 2011).

Таблица 1. Список использованных праймеров
Table 1. List of primers

Праймер	Маркер (тип)	T_m	Ожидаемый размер фрагмента, п.н.	5'–3' последовательность		Ссылка
orfH522	orfH522 (STS)	60°C	516	F	TGCCTCAACTGGATAAATTCAC	Schnabel et al., 2008
				R	ACCGTTCTCTCACGAGTTGAAG	
K13	HRG01 (SCAR)	54°C	454	F	TATGCATAATTAGTTATACCC	Horn et al., 2003
				R	ACATAAGGATTATGTACGGG	
Y10	HRG02 (SCAR)	59°C	740	F	AAACGTGGGAGAGAGGTGG	«»
				R	AAACGTGGGCTGAAGAACTA	
STS115	STS115 (STS)	58°C	115	F	CGAACTAATCATCATACAACC	Tang et al., 2003
				R	TCGGCTCTTATGTATGTTTAC	
ORS224	ORS224 (SSR)	63°C	136	F	AACCAAAGCGCTGAAGAAATC	«»
				R	TGGACTAACTACCAGAAGCTAC	
ORS511	ORS511 (SSR)	63°C	156	F	TGGCTCAGATTAAGTTCACACAG	«»
				R	CGGGTTGCGAGTAACAGGTA	
ORS799	ORS799 (SSR)	63°C	143	F	ACTCCCTCCCATTCTCGTCT	«»

Изучили распределение SCAR-маркеров HRG01 и HRG02, STS-маркера STS115, а также SSR-маркеров ORS224, ORS511 и ORS799. Маркеры STS115, HRG01, HRG02 (рис. 2) тесно сцеплены с локусом *Rfl* (Horn et al., 2003). Относительное расположение маркеров ORS224, ORS511 ORS799 в группе сцепления 13 до сих пор неизвестно. Так, по данным S. Tang

с соавторами (Tang et al., 2002), локусы *ORS224* и *ORS799* сцеплены. По данным В. Yue с соавторами (Yue et al., 2010), локус *ORS511* тесно сцеплен с локусом *Rfl*. В то же время, по недавно полученным данным (Bulos et al., 2014), маркер HRG01 сцеплен с локусом *ORS224*, что противоречит результатам других авторов.

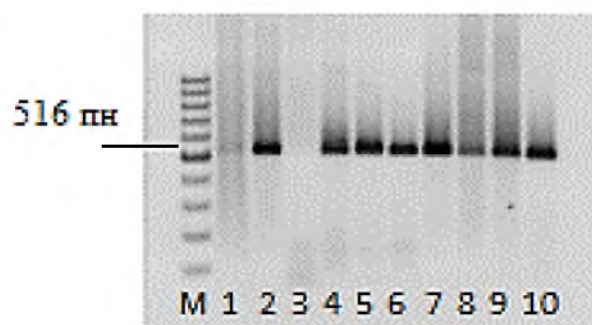


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами orfH522

1 – ВИР387, 2 – RIL80, 3 – ВИР183, 4 – ВИР195, 5 – ВИР234, 6 – ВИР378, 7 – ВИР381,
8, 9 – ВИР682, 10 – ВИР776

Fig. 1. Electrophoregrams of amplification products obtained using the orfH522 primers

1 – VIR387, 2 – RIL80, 3 – VIR183, 4 – VIR195, 5 – VIR234, 6 – VIR378, 7 – VIR381,
8, 9 – VIR682, 10 – VIR776

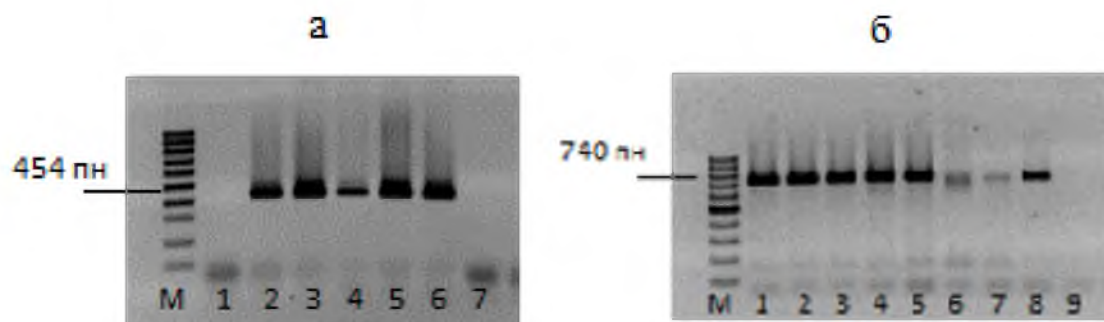


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами K13(а) и Y10(б)

а) 1 – ВИР160, 2 – RIL130, 3, 4, 5 – ВИР740, 6 – ВИР710, 7 – ВИР370; б) 1 – ВИР249, 2, 3 – ВИР349,
4, 5 – ВИР378, 6 – ВИР130Б, 7 – ВИР387, 8 – ВИР395

Fig. 2. Electrophoregrams of amplification products obtained using the primers K13 (a) and Y10 (б)

а) 1 – VIR160, 2 – RIL130, 3, 4, 5 – VIR740, 6 – VIR710, 7 – VIR370; б) 1 – VIR249, 2, 3 – VIR349,
4, 5 – VIR378, 6 – VIR130B, 7 – VIR387, 8 – VIR395

Впервые диагностическую ценность маркеров гена *Rfl* оценили И. Н. Анисимова с соавторами (Anisimova et al., 2009, 2011). Впоследствии Н. В. Маркин с соавторами (Markin et al., 2013) изучили распределение маркеров STS115, HRG01, HRG02, а также трех SSR-маркеров среди 46 селекционных линий Донской опытной станции ВНИИМК и определили, что наиболее информативны-

ми для выявления гена *Rfl* являются маркеры STS115, HRG01, HRG02. Как и следовало ожидать, у линий ЦМС ВИР116 и ВИР114 с цитоплазмой PET1, несущих рецессивный аллель *rfl*, и линии ВИР151 с цитоплазмой RIG0 типа SCAR-маркеры гена *Rfl*, а также маркер STS115 не выявлены. Лишь у 30 линий-восстановителей (со стерильной (PET1) цитоплазмой) обнаружены все 3 маркера. У 9 линий со стериль-

ной (PET1) цитоплазмой отсутствовал маркер HRG01. Отметим, что все они не имели в своей генеалогии коммерческих гибридов. Можно предположить, что при создании коммерческих гибридов, послуживших родоначальниками линий генетической коллекции, был использован генетически родственный материал. Маркеры STS115, HRG01 и HRG02 не отмечены у линий ВИР183, ВИР195, ВИР200, ВИР210, ВИР343, ВИР365, ВИР370. Тем не менее, стерильный тип цитоплазмы этих линий указывал на то, что они являются восстановителями фертильности пыльцы. Это подтверждено результатами тест-скрещиваний с линиями ЦМС, а также данными анализа гибридов F2 (Anisimova et al., 2014).

Исходя из данных литературы, у рецессивных гомозигот *rflrfl* (стерильных линий, их фертильных аналогов и фертильных линий, закрепляющих стерильность при скрещиваниях с линиями ЦМС PET1) в микросателлитных локусах *ORS224*, *ORS511* и *ORS799*, предположительно сцепленных с геном *Rfl*, могут присутствовать нулевые аллели. Однако среди изученного разнообразия линий наблюдались различные сочетания маркеров. Не всегда носители рецессивного аллеля в локусе *rfl* обладали нулевыми аллелями в анализируемых SSR-локусах, так же как у отдельных доминантных гомозигот по локусу *Rfl* встречались нулевые варианты (табл. 2).

Различными были и сочетания всех маркеров. Так, у линии ВИР183 (на основе ЦМС PET1) отсутствовали все 6 маркеров. Лишь у двух линий-восстановителей с фертильной цитоплазмой (ВИР740 и ВИР369) выявлены 5 маркеров, кроме *ORS799*. Обе линии являются восстановителями фертильности ЦМС PET1 и характеризуются общим происхождением. У линий, не обладавших способностью к супрессии фенотипа ЦМС (ВИР160, ВИР387 и ВИР449), маркер HRG01 отсутствовал, но у отдельных растений выявлены маркеры HRG02 и STS115. У линий-закрепителей стерильности ВИР160 и ВИР377 отсутствовали все 6 (3 SSR, 2 SCAR и 1 STS) маркеров. В це-

лом, микросателлитные маркеры оказались мало информативными для выявления носителей доминантных аллелей гена восстановителя фертильности, однако они могут быть использованы для скрининга расщепляющихся гибридных популяций в том случае, если отцовская линия гибрида маркирована аллелями микросателлитных локусов, а у материнской линии ЦМС эти маркеры отсутствуют.

Впервые у линий генетической коллекции изучена аллельная изменчивость микросателлитных локусов *ORS224*, *ORS511* и *ORS799*. Следует отметить, что амплифицированные фрагменты микросателлитных локусов значительно отличались по длине от указанных в литературных источниках (Tang et al., 2002). Локус *ORS511* оказался наиболее полиморфным. В нем выявлено минимум 5 аллелей: главный аллель с длиной амплифицированного фрагмента в диапазоне 154–163 пн, нулевой вариант и уникальные аллели. Поскольку погрешность прибора при определении длины фрагмента составляет ± 5 пн, разброс значений достигал 10 пн, причем наблюдались различия между отдельными растениями в пределах линии. Такие фрагменты оценивали, как один и тот же аллельный вариант. Уникальные аллели локуса *ORS511* имели длину 198, 210–214 и 244 пн. В локусах *ORS224* и *ORS799* было идентифицировано соответственно четыре (нулевой, 149–152 пн, уникальные 124 и 105 пн) и два (147–161 пн и нулевой) аллеля (рис. 3, табл. 2).

Выявлена связь между наличием/отсутствием SCAR-маркеров гена *Rfl* и присутствием SSR-маркеров *ORS511* и *ORS224* (69–73% проанализированных случаев), что, очевидно, обусловлено их близким расположением на генетической карте по отношению к локусу *Rfl*. Маркер *ORS799* был ассоциирован с маркерами HRG01, HRG02 у 65% линий. Наиболее часто у изученных линий отсутствовал маркер *ORS224* (самый удаленный от локуса *Rfl*). В зависимости от наличия/отсутствия аллельных вариантов микросателлитных

локусов *ORS224*, *ORS511* и *ORS799* изученные линии объединены в 12 групп. Наиболее многочисленная группа включает ли-

нии, у которых присутствуют все три SSR-маркера.

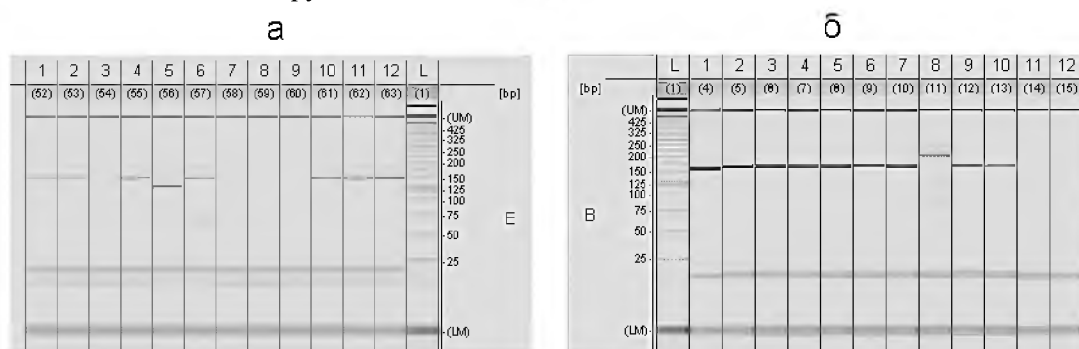


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами *ORS224* (а) и *ORS511* (б)

а) 1 – ВИР220, 2 – ВИР263, 3 – ВИР343, 4 – ВИР369, 5 – ВИР376, 6 – ВИР378, 7 – ВИР386, 8 – ВИР397, 9 – ВИР449, 10 – ВИР480, 11 – ВИР582, 12 – ВИР583; б) 1,2 – ВИР361, 3 – ВИР249, 4,5 – ВИР349, 6,7 – ВИР378, 8 – ВИР130Б₂, 9 – ВИР387, 10 – ВИР395, 11,12 – ВИР183.

Fig. 3. Electrophoregrams of amplification products obtained using the primers *ORS224* (a) and *ORS799* (б)

(a) and *ORS799* (б): а) 1 – VIR220, 2 – VIR263, 3 – VIR343, 4 – VIR369, 5 – VIR376, 6 – VIR78, 7 – VIR386, 8 – VIR397, 9 – VIR449, 10 – VIR480, 11 – VIR582, 12 – VIR583; б) 1,2 – VIR361, 3 – VIR249, 4,5 – VIR349, 6,7 – VIR378, 8 – VIR130B₂, 9 – VIR387, 10 – VIR395, 11,12 – VIR183.

Таблица 2. Аллельный полиморфизм микросателлитных локусов, сцепленных с геном *Rf1*

Table 2. Allelic polymorphism of microsatellite loci linked to the *Rf1* gene

Линии	Тип цитоплаз- мы	Аллельные варианты локусов		
		ORS224	ORS511	ORS799
Линии с часто встречающимися аллелями				
ВИР387*	F	152	163	153
ВИР349, ВИР369, ВИР740	F	150–152	159–162	нулевой
ВИР449*	F	нулевой	160	148–158
ВИР743*, ВИР763	F	нулевой	160, 161	нулевой
ВИР160*, ВИР377*	F	нулевой	нулевой	нулевой
RII 130, ВИР249, ВИР361, ВИР395, ВИР700	S	150, 151	154–162	148–161
ВИР682, ВИР699, ВИР702, ВИР761, ВИР766	S	нулевой	159–161	149–161
ВИР260, ВИР395, ВИР752	S	151, 152	нулевой	148–158
ВИР183, ВИР220, ВИР438	S	149–152	161	нулевой
Линии с уникальными аллелями				
ВИР376	S	124	161, 162	148–157
ВИР 210	S	105	210, 214	нулевой
ВИР 343 (кол. 08)	S	нулевой	162, 210	нулевой
ВИР 370	S	нулевой	244	нулевой
ВИР 381 (2009)	S	нулевой	212	нулевой
ВИР130Б*	F	нулевой	198	147

* закрепляют стерильность в скрещиваниях с линией ЦМС

Выводы

Линии генетической коллекции подсолнечника различаются по наличию-отсутствию шести ПЦР-маркеров, локализованных в группе сцепления 13 и предположительно сцепленных с геном *Rf1* (SCAR, STS, SSR).

Наиболее высокой диагностической ценностью для выявления у линий генетической коллекции гена *Rf1* обладают маркеры HRG01, HRG02 и STS115. Это позволяет использовать их для эффективного отбора носителей гена *Rf1* из расщепляющихся гибридных популяций при создании отцовских линий гибридов на основе коллекции ВИР.

Впервые у линий генетической коллекции изучена аллельная изменчивость микросателлитных локусов *ORS224*, *ORS511* и *ORS799*. Локус *ORS511* наиболее полиморфен. В нем выявлено минимум пять аллелей: главный с длиной амплифицированного фрагмента в диапазоне 154–163 пн, нулевой вариант и уникальные аллели. В локусах *ORS224* и *ORS799* идентифицировано соответственно четыре (нулевой, 149–152 пн, уникальные 124 и 105 пн) и два (147–161 пн и нулевой) аллеля.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-04-00329).

References/Литература

1. Anisimova I. N., Gavrilova V. A., Rozhkova V. T., Timofeeva G. I., Tikhonova M. A. Molecular markers in the identification of pollen fertility restoration genes in sunflower // Russian Agricultural Sciences, 2009, vol. 35, no. 5, pp. 6–10. DOI: 10.3103/S1068 367409060020.
2. Anisimova I. N., Alpatieva N. V., Timofeeva G. I. Screening of plant genetic resources using DNA markers: basic principles, DNA isolation, PCR, electrophoresis in agarose gels. Guidelines of VIR (Ed. by E. E. Radchenko). SPb.: VIR, 2010, 30 p. [in Russian] (Анисимова И. Н., Алпатиева Н. В., Тимофеева Г. И. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле: Методические указания ВИР // под ред. Е.Е. Радченко. СПб.: ВИР. 2010. 30 с.).
3. Anisimova I. N., Gavrilova V. A., Rozhkova V. A., Timofeeva G. I., Duca M. V. Genetic diversity of sources pollen fertility restoration genes in sunflower // Russian Agricultural Sciences, 2011, vol. 37, no. 3, pp. 6–11. DOI: 10.3103/S1068367411030025.
4. Anisimova I. N., Gavrilova V. A., Alpatieva N. V., Kuznetsova E. B., Karabitsina Yu. I., Rozhkova V. T. Sunflower collection in the studies of pollen fertility restoration genetic mechanisms // Proceedings of applied botany, genetics and breeding, 2014, vol. 175, no. 4, pp. 72–82 [in Russian] (Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Алпатиева Н.В., Кузнецова Е.Б., Карабицина Ю.И., Рожкова В.Т. Коллекция подсолнечника в исследованиях генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 2014. Т. 175. № 4. С. 72–82).
5. Markin N. V., Usatenko T. V., Usatov A. V., Tihobaeva V. E., Gorbachenko O. F., Kulishova G. A., Azarin K. V. Informative DNA markers of gene *Rf1* – pollen fertility restorer CMS PET1 in sunflower. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2013. № 4. С. 110–9822 [in Russian] (Маркин Н. В., Усатенко Т. В., Усатов А. В., Тихобаева В. Е., Горбаченко О. Ф., Кулишова Г. А., Азарин К. В. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС PET1 подсолнечника //Современные проблемы науки и образования. 2013. № 4. С. 110–9822).
6. Bulos M., Vergani P. N., Altieri E. Genetic mapping, marker assisted selection and allelic relationships for the *Pu6* gene conferring rust resistance in sunflower // Breed. Sci., 2014, vol. 64, no. 3, pp. 206–212.
7. Gavrilova V. A., Rozhkova V. T., Anisimova I. N. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry // Helia, 2014, vol. 37, no. 60, pp. 1–16.
8. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prufe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring fertility in PETI- based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet., 2003, vol. 106, no. 4, pp. 599–606.
9. Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol // Ann. Amélior. Plant., 1969, vol. 19, no. 3, pp. 99–106.
10. Nizampatnam N. R., Doodhi H., Narasimhan Y. K., Mulpuri S., Viswanatha-swamy D. K.

- Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, orfH522 induces male sterility in transgenic tobacco plants // *Planta*, 2009, vol. 4, no. 229, pp. 987–1001.
11. Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding // *Plant Breed.*, 2008, no. 6, pp. 541–652.
12. Tang S., Yu J. K., Slabaugh M. B., Shintani K., Knapp J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 105, pp. 1124–1136.
13. Yu J. K., Tang S., Slabaugh M. B., Heesacker A., Cole G., Herring M., Soper J., Han F., Chu W. C., Webb D. M., Thompson L., Edwards K. J., Berry S., Leon A. J., Grondona M., Olungu C., Maes N., Knapp S. J. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // *Crop. Sci.*, 2003, vol. 43, no. 1, pp. 367–387.
14. Yue B., Vick B. A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // *Plant Breed.*, 2010, vol. 129, no. 1, pp. 24–28.