



НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.)

NEW GENETIC SOURCES OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF ONIONS (*Allium cepa* L.)

Логунов А.Н.¹ – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. селекции и семеноводства луковых культур
Будылин М.В.¹ – кандидат биол. наук, зав. лабораторией молекулярных маркеров
Тико Е.А.^{2,3} – аспирант, н.с. ООО «Селекцентр»

Logunov A.N.¹,
Budylin M.V.¹,
Tiko E.A.^{2,3}

¹ ООО «НИССОК»
127287, Россия, Москва, ул. 2-я Хуторская, д. 11, стр.1
E-mail: logunov1983@gmail.com, budylinmw@gmail.com
² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства»
143072, Россия, Московская обл.,
Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: elena06031991@mail.ru
³ ООО «Селекцентр»
E-mail: elena06031991@mail.ru

¹ Ltd «Research Institute of Vegetable Crop Selection»
127287, Russia, Moscow, 2-ya Khutorskaya st., 11, building 1
E-mail: logunov1983@gmail.com, budylinmw@gmail.com
² FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
Selectionnaya str., 14, p. VNISSOK, Odintsovo district, Moscow region, 143072, Russia
E-mail: elena06031991@mail.ru
³ Ltd «Selekcenr»
E-mail: elena06031991@mail.ru

Актуальной задачей в селекции лука репчатого (*Allium cepa* L.) является идентификация сортов и гибридов F₁ по типу цитоплазмы. Для создания линии закрепителя стерильности требуется цитоплазма N типа, однако гетерозисные гибриды F₁ и новые сорта лука репчатого, полученные из последующих поколений от фертильных гибридов F₁, обладающие хозяйственно ценными признаками и отвечающие требованиям рынка, не пригодны для создания из них линии закрепителя стерильности, так как цитоплазма всех гибридных растений имеет 100% S или T тип. Чтобы понять, в качестве какого родительского компонента следует использовать селекционный материал, имеющийся в лаборатории селекции и семеноводства луковых культур компании Гавриш, мы проводили фенотипический и молекулярный анализ коллекционных образцов по признаку мужская стерильность. Материал для исследований был выращен по общепринятым для зоны технологиям в г. Крымск, Краснодарский край. Фенотипический анализ проявления признака «мужская стерильность» был проведен на коллекционном материале визуально. Оценка материала с применением real-time PCR на тип цитоплазмы дала возможность выделить источники хозяйственно ценных признаков, в то же время среди них, возможно, найти закрепители стерильности, необходимые для создания трехлинейных гибридов лука репчатого. В результате проведенной работы были определены сорта и гибриды F₁, которые можно использовать в качестве генетических источников при создании новых стерильных линий и линий закрепителей стерильности, а также выделены образцы, которые следует использовать как линии-опылители. В дальнейшем эти линии будут использованы при создании гетерозисных гибридов F₁ с высокими показателями хозяйственных признаков с заданными свойствами.

Actual problem in breeding onion (*Allium cepa* L.) is the identification of cytoplasm type in varieties and F₁ hybrids. To create a parent sterile fixing line, is required a cytoplasm of type N. However, heterozygous F₁ hybrids and new onion varieties obtained from subsequent generations from F₁ fertility hybrids that possess economically valuable traits and meet market requirements are not suitable for creating a sterile fixing line from them, because all hybrid plants has 100% S-cytoplasm or T-cytoplasm type. In order to determine the most desirable parent component with subsequent use in the selection process, the Laboratory of Selection and Seed Production of Onion Cultures of the Gavrish company conducted a phenotypic and molecular analysis of collection samples of onions for the feature of male sterility. The material for research was grown according to the generally accepted technologies for the zone in the city of Krymsk, Krasnodar Territory. Phenotypic analysis of the manifestation of the "male sterility" feature was carried out with the help of visual analysis. As a result of the work, were identified varieties and F₁ hybrids that can be used as genetic sources for the creation of new sterile lines and lines of sterility fixers, as well as samples to be used as pollinators. In the future, these lines will be used to create heterotic F₁ hybrids with high indicators of economic characteristics with given properties.

Ключевые слова: лук репчатый (*Allium cepa* L.), цитоплазматическая мужская стерильность, гены закрепители стерильности, молекулярные маркеры, маркер-опосредованная селекция, HybProb, Real Time PCR.

Key words: onion (*Allium cepa* L.), cytoplasmic male sterility, genes of sterility fixers, molecular markers, marker selection, HybProb, Real Time PCR.

Для цитирования: Логунов А.Н., Будылин М.В., Тико Е.А. НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.). Овощи России. 2018;(2):32-34. DOI:10.18619/2072-9146-2018-2-32-34

For citation: Logunov A.N., Budylin M.V., Tiko E.A. NEW GENETIC SOURCES OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF ONIONS (*Allium cepa* L.). Vegetable crops of Russia. 2018;(2):32-34. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2018-2-32-34

С каждым годом на рынке семян появляются новые гибриды F₁ репчатого лука, успешно вытесняющие распространенные сорта. Гибридные семена приобретают все большую популярность благодаря гетерозисному эффекту. Гетерозисные гибриды имеют неоспоримые преимущества перед обычными сортами по урожайности, а также по товарности продукции, скороспелости, устойчивости к болезням и другим важным признакам.

Переход на выращивание F₁ гибридов вместо обычных сортов имеет приоритетное значение в современном сельскохозяйственном растениеводстве как в отношении повышения урожайности и качества выращиваемой продукции, так и экономической эффективности возделывания культуры. В развитых странах мира в сорimente овощных культур на долю F₁ гибридов приходится более 90%, в России – менее 25%.



Рис. 1. Фертильное соцветие лука репчатого.
Fig. 1. Fertile inflorescence of onions.

Широкое распространение гибридов F_1 в товарном производстве лука репчатого в Японии, Нидерландах и других странах, а также исследования, проведенные в России, показывают большое преимущество гибридов по продуктивности, выравненности гибридов по вызреванию, размеру, форме и качеству луковицы по сравнению с сортами. По данным разных исследователей, повышение продуктивности гибридов составляло 39-52%. Так как получение гибридных семян при искусственном опылении затруднено из-за кастрации цветков и в производственных масштабах невозможно, наиболее целесообразным является создание гибридов на основе мужской стерильности. В селекционной практике наиболее распространенным способом получения таких гибридов является использование в качестве материнских форм линий, обладающих цитоплазматической мужской стерильностью (CMS).

Существуют две генетические системы CMS, которые используются для коммерческого производства гибридных семян (Berninger, 1965; Jones and Clarke, 1943).

Первый источник CMS лука был обнаружен в сорте «Italian Red» (Jones and Emsweller, 1936); мужски-стерильные растения обладают стерильной цитоплазмой (S) и гомозиготные по рецессивным аллелям одного ядерного локуса восстановления фертильности (Ms) (Jones and Clarke, 1943). У растений этого типа цветок практически остается в бутоне, а столбик быстро выходит наружу из нераскрытого цветка. Пыльники не имеют жизнеспособной пыльцы, зонтики отличаются по яркости окраски от зонтиков растений с фертильной пыльцой.

Второй источник CMS (цитоплазма T) был обнаружен Berninger (1965) в сорте «Jaune paille des Vertus». Цветок со стерильной пыльцой по внешнему виду почти не отличается от цветка с фертильной пыльцой, за исключением того, что столбик у него растет несколько быстрее тычинок. Тычиночные нити короткие, пыльники светло-зеленые, слабо выполенные, усыхают, не вскрываясь (Пивоваров В.Ф., 2007).

Schweisguth (1973) определил систему из трех независимых локусов, вызывающих восстановление мужской фертильности для T-цитоплазмы, состоящую из доминантного аллеля в одном локусе (A-) или доминантных аллелей в двух других комплементарных локусах (BC-). За исключением нескольких гибридов Голландии и Японии, полученных с использованием цитоплазмы, напоминающей цитоплазму T-типа, подавляющее большинство гибридов лука созданы с использованием S-цитоплазмы (Havey, 1994). Этот источник стерильной цитоплазмы был обнаружен у единственного растения лука, идентифицированного в 1925 году в Дэвисе, штат Калифорния (Jones and Emsweller, 1936).

McCollum (1980) сообщил, что получил растения лука репчатого, которые имели новый тип стерильности. Он был получен путем межвидовой гибридизации от скрещивания *A. galanthum* x *A. sepa*. Материнские стерильные растения с цитоплазмой gal, в независимости от ядерных генов опылителя, дают потомство 100% стерильное и никогда не восстанавливают фертильность.

Обнаружить растения с мужской стерильностью довольно легко, но гораздо труднее сохранить и закрепить признак ЦМС в потомстве этих растений, т.е. создать стерильные линии – исходный материал для создания гибридов F_1 .

Для создания гибридов F_1 у лука репчатого используют трехлинейную схему, предложенную А.В. Крючковым, в основе которой лежит ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность, поэтому требуется иметь три линии: А – линия стерильная, В – линия закрепитель, С – линия опылитель (Прохоров и др., 1981).

Проблема состоит в том, что лучшие гетерозисные гибриды F_1 и новые создаваемые сорта, полученные из последующих поколений от фертильных гибридов F_1 , несут в себе хозяйственно ценные признаки, отвечающие требованиям рынка, но не пригодны для создания из них линии закрепителя стерильности, так как цитоплазма всех гибридных растений имеет 100% S или T тип, а для создания закрепителя требуется цитоплазма N типа. Поэтому нами была проведена оценка коллекционных образцов с помощью PCR real-time, с целью выявления нужных генотипов.

Материалы и методы

Материал для исследований был выращен по общепринятым для зоны технологиям на участках селекционного центра «Гавриш», г. Крымск, Краснодарский край. Фенотипический анализ проявления признака «мужская стерильность» был проведен на коллекционном и селекционном материале.

Для выделения, 0,2 г образца было гомогенизировано с 300 мкл экстракционного буфера (0,4 M LiCl, 25mM EDTA, 0,2 M Tris-HCL (pH 9), 2,5 % PVP-40) на гомогенизаторе Tissue Lyser II (Qiagen, Germany). Затем следовала очистка хлороформ/изоамилом 24/1 с последующим улавливанием ДНК при помощи диоксида кремния (силика) с добавлением 96% этанола и 6M NaI. Далее силику осаждали, промывали 70% спиртом и элюировали ДНК в MQ воду.

ПЦР реакционная смесь была рассчитана на 10 мкл 1 x буфер, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTPs, 0,5 U Taq полимеразы (Fermentas, Waltham, MA, USA) 3–10 μM праймеров и 10 нг ДНК. Условия реакции были следующие: первичная денатурация 95°C – 5 мин, последующие 40 циклов 95°C – 10 сек, 62°C – 15 сек, и 72°C – 5 сек. Затем проводили плавление ПЦР продукта при следующих условиях: 95°C – 1 мин, 42°C – 2 мин с поднятием температуры 0,04°C/с, до 95°C, проводя снятие флуоресценции по 5 раз/°C. Амплификацию проводили на приборе LightCycler 480 II. Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения LightCycler® 480 SW 1.5.1.

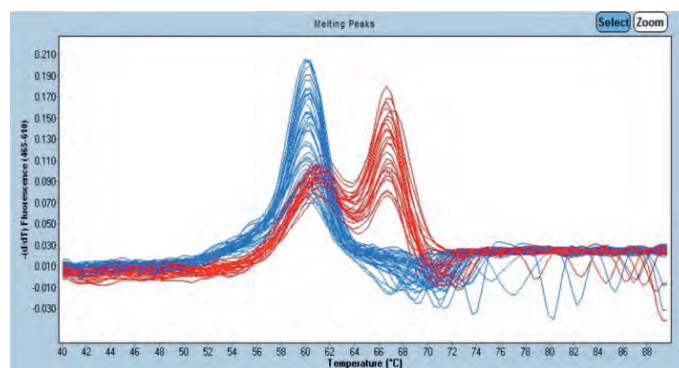


Рис 2. Пик распада, соответствующий S-типу цитоплазмы располагается на 60°C (синий цвет), пики распада для N-, T-типа цитоплазмы находится на 60°C и 68°C (красный цвет).
Figure 2. The melt peaks corresponding to the S-cytoplasm is located at 60 °C (blue), the melt peaks for the N-, T-cytoplasm are at 60 °C and 68 °C (red).

Таблица. Потенциальные закрепители стерильности, имеющиеся в лаборатории селекции и семеноводства луковых культур ООО «Селекцентр»

Table. Potential fixers of sterility, available in the Laboratory of Selection and Seed Production of Onion Cultures of the Ltd «Selekcenr»

№	Название	Компания производитель	Принадлежность, заявленная автором сорт/гибрид F ₁	Частота возникновения стерильных форм в фенотипическом проявлении, %	Тип цитоплазмы по анализу ПЦР
1	Эленка	Cora seed	гибрид F ₁	5	N,T,S
2	Фиама	Cora seed	гибрид F ₁	3	N,T,S
3	Денсити	Isi sementi	сорт	1	N,T,S
3	Супер нова	Isi sementi	гибрид F ₁	3	N,T,S
4	Дерек	Isi sementi	гибрид F ₁	1	N,T,S
5	Фабула	Isi sementi	гибрид F ₁	1	N,T,S
6	Леон	Bejo	сорт	1	N,T,S
7	Ред барон	Bejo	сорт	1	N,T,S
8	Робин	Bejo	сорт	3	N,T,S
9	Радар	Bejo	сорт	4	N,T,S
10	Сеншуй елов глобе	Sakata	сорт	3	N,T,S
11	Башар	Bayram tohum	гибрид F ₁	5	N,T,S
12	Байрам	Bayram tohum	гибрид F ₁	5	N,T,S
13	Инфинити	Newtech-agro	гибрид F ₁	32	S
14	Бонус	Takii seed	гибрид F ₁	20	S
15	Харисон	Nunhems	гибрид F ₁	100	S
16	Камперо	Nunhems	гибрид F ₁	100	S
17	Шерман	Bejo	гибрид F ₁	29	S
18	Талон	Bejo	гибрид F ₁	10	S
19	Тамара	Bejo	гибрид F ₁	11	S
20	Манас	Bejo	гибрид F ₁	35	S
21	Дайтона	Bejo	гибрид F ₁	70	S
22	Спирит	Bejo	гибрид F ₁	33	S
23	Бенефит	Takii seed	гибрид F ₁	100	S
24	Протеус	Takii seed	гибрид F ₁	22	S

Результаты исследований

В 2016 году нам удалось с помощью молекулярной диагностики подобрать маркер и различить гибриды F₁ и сортовые популяции, в которых возможно найти форму, закрепляющую мужскую стерильность посредством метода PCR real-time (Логунов и др., 2016).

В таблице представлены сорта и гибриды F₁, которые занимают более 80% площади под луком репчатым в России, поэтому мы считаем именно их лучшими генетическими источниками для селекции лука репчатого на гетерозис.

Анализ таблицы показал, что все изучаемые сорта (Денсити, Леон, Ред барон, Робин, Радар, Сеншуй елов глобе) имеют в своем генотипе как нормальную (N) так и стерильную цитоплазму (S, T) и могут быть использованы в качестве доноров для создания линий закрепителя стерильности. Образцы, заявленные их авторами как гибриды F₁ (Эленка, Фиама, Супер нова, Дерек, Фабула, Башар, Байрам), были фертильными, а PCR анализ показал, что в их генотипе есть нормальная цитоплазма. Соответственно в них можно искать потенциальных доноров закрепителей стерильности при

создании трехлинейного гибрида лука репчатого. Гибриды F₁ Инфинити, F₁ Бонус, F₁ Шерман, F₁ Талон, F₁ Тамара, F₁ Манас, F₁ Дайтона, F₁ Спирит и F₁ Протеус по результатам анализа real-time PCR имеют стерильную цитоплазму, но фенотипически расщепляются, поэтому их можно использовать как новые генетические источники при создании линий опылителей с генотипом SMsMs с 100% фертильностью. По результатам фенотипической и генотипической оценки гибриды: F₁ Харисон, F₁ Камперо, F₁ Бенефит можно использовать в качестве доноров стерильных линий, так как по результатам ПЦР анализа они имеют стерильную цитоплазму, а по результатам фенотипической оценки – полностью стерильную пыльцу.

Таким образом, оценка материала с применением real-time PCR на тип цитоплазмы дала возможность выделить источники хозяйственно ценных признаков, соответствующих требованиям сегодняшнего рынка, в то же время среди них возможно найти закрепители стерильности, необходимые для создания трехлинейных гибридов лука репчатого.

Литература

1. Логунов А.Н., Будылин М.В., Тико Е.А. Использование молекулярных маркеров в современной селекции лука репчатого (*Allium cepa* L.) // «Селекция, семеноводство и сортовая агротехника овощных, бахчевых и цветочных культур» // Сб. науч. трудов по материалам Международной научно-практической конференции, посвященной VII Квасниковским чтениям. 2016. – С.194-198.
2. Пивоваров В.Ф. Селекция и семеноводство овощных культур. – М.: ВНИИССОК, 2007г. – 816 с.
3. Прохоров И.А., Крючков А.В., Комиссаров В.А. Селекция и семеноводство овощных культур. М.: Колос, 1981.
4. Семеноводство гетерозисных гибридов [Электронный ресурс] <http://window.edu.ru/library/pdf2txt/466/64466/35294/page2>
5. Berninger E. 1965. Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). Ann. Amélior. Plantes 15:183-199.
6. Havey M.J. 1994. The cytoplasm of sterile lines used to produce commercial hybrid-onion seed. *Allium Improvement Nwsl.* 4:25-27.
7. Jones H., A. Clarke. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 43:189-194.
8. Jones H., G. Davis. 1944. Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions. *USDA Tech. Bul.* 874.
9. Jones H., S. Emsweller. 1936. A male sterile onion. *Proc. Amer. Soc.Hort. Sci.* 34:582-585.
10. Joshi H., D J. Tandon. 1976. Heterosis for yield and its genetic basis in the onion. *Indian J. Agr. Sci.* 46:88-92.
11. McCollum G. 1980. Development of the amphidiploid of *Allium galanthum* x *A. cepa*. *J. Hered.* 71:445-447.

References

1. Logunov A.N., Budylin M.V., Tiko E.A Use of molecular markers in the modern selection of onion (*Allium cepa* L.) // "Selection, seed production and varietal agrotechnics of vegetable, melons or pumpkins and flower crops" // Sat. sci. works on the materials of the International Scientific and Practical Conference, devoted to the VII Kvasnikovsky readings. 2016. P.194-198.
2. Pivovarov V.F. Selection and seed-growing of vegetable crops. M.: VNISSOK, 2007. – 816 p.
3. Prokhorov I.A, Kryuchkov A.V, Komissarov V.A; Ed. V. A. Komissarov. Selection and seed-growing of vegetable crops. – M.: Kolos, 1981.
4. Seed breeding of heterosis hybrids [Electronic resource] <http://window.edu.ru/library/pdf2txt/466/64466/35294/page2>
5. Berninger E. 1965. Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). Ann. Amélior. Plantes 15:183-199.
6. Havey M.J. 1994. The cytoplasm of sterile lines used to produce commercial hybrid-onion seed. *Allium Improvement Nwsl.* 4:25-27.
7. Jones H., A. Clarke. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 43:189-194.
8. Jones H., G. Davis. 1944. Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions. *USDA Tech. Bul.* 874.
9. Jones H., S. Emsweller. 1936. A male sterile onion. *Proc. Amer. Soc.Hort. Sci.* 34:582-585.
10. Joshi H., D J. Tandon. 1976. Heterosis for yield and its genetic basis in the onion. *Indian J. Agr. Sci.* 46:88-92.
11. McCollum G. 1980. Development of the amphidiploid of *Allium galanthum* x *A. cepa*. *J. Hered.* 71:445-447.