

УДК 635.25:[631.527.56:577.21]

И. В. ПАВЛОВА<sup>1</sup>, Н. П. КУПРЕЕНКО<sup>1</sup>, К. Б. ЗВЯГИНЦЕВА<sup>2</sup>, М. В. ИВАНОВСКАЯ<sup>1</sup>,  
А. В. ЛАГОДИЧ<sup>2</sup>, С. В. ГЛУШЕН<sup>2</sup>

**ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ  
СТЕРИЛЬНОСТИ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.)  
БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

<sup>1</sup>Институт овощеводства, аг. Самохваловичи, Беларусь, e-mail: hakuroshya@yahoo.com,  
belonion@tut.by, belnio@mail.ru,

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, e-mail: klava-zv@tut.by,  
lagodich@yahoo.com, sglush@mail.ru

Изучены два ДНК-маркера митохондриального гена *cob*, характеризующие S- и N-типы цитоплазмы, маркер митохондриального региона *orfA501*, выделяющий S- и T-стерильные типы цитоплазмы и два маркера, косегрегирующие с *Ms* или *ms*, ядерными генами, контролирующими фертильность фенотипов с S-цитоплазмой, лука репчатого (*Allium cepa* L.) на примере сортов белорусской селекции.

*Ключевые слова:* мужская стерильность, поддерживающая линия, ДНК-маркер, лук репчатый.

I. V. PAVLOVA<sup>1</sup>, N. P. KUPREENKO<sup>1</sup>, K. B. ZVYAGINTSEVA<sup>2</sup>, M. V. IVANOVSKAYA<sup>1</sup>, A. V. LAGODICH<sup>2</sup>, S. V. GLUSHEN<sup>2</sup>

**POLYPHORMISM OF LOCI OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF THE ONION (*ALLIUM CEPA* L.)  
VARIETIES OF BELARUSIAN BREEDING**

<sup>1</sup>Institute of Vegetable Growing, Samokhvalovichi, Belarus, e-mail: hakuroshya@yahoo.com, belonion@tut.by,  
belnio@mail.ru,

<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: klava-zv@tut.by, lagodich@yahoo.com, sglush@mail.ru

Studied are two DNA-markers of mitochondrial gene *cob* characterizing S- and N-cytoplasm, marker of mitochondrial region *orfA501* with S- and T-cytoplasm, and two markers co-segregating with *Ms* or *ms*, nuclear genes which control the fertility of phenotypes with S-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.) varieties developed in the Institute of Vegetable Growing.

*Keywords:* male sterility, maintainer line, DNA-marker, onion.

**Введение.** Первый гибридный сорт лука репчатого на основе сорта Italian Red вышел на рынок после Второй мировой войны. Современные гибриды F<sub>1</sub> лука репчатого получают с использованием цитоплазматической мужской стерильности. Коммерчески значимые цитоплазмы мужской стерильности гибридных сортов из Голландии, Японии, Индии являются независимо выделенными цитоплазмами сходного или одинакового типа – ЦМС-S и ЦМС-T [1]. ЦМС-S система стерильности, открытая у лука репчатого сорта Italian Red, наиболее широко распространена в сортах гибридного лука благодаря стабильности в различных условиях. Мужская фертильность этого типа восстанавливается доминантным аллелем ядерного локуса *Ms* [2, 3] или N-цитоплазмой. Размножение ЦМС-S линий проводят с помощью поддерживающей мужски фертильной линии, имеющей нормальную (N-) цитоплазму и гомозиготный рецессивный генотип ядерного восстанавливающего локуса *msms*. ЦМС-T тип открыт на сорте Jaune paille des Vertus [4, 5] и обусловлен тремя независимо сегрегирующими локусами в ядерном геноме. Фертильность восстанавливается доминантным аллелем в одном локусе *A/a* или в двух комплементарных локусах *B/b* и *C/c* [6]. Описано существование других типов цитоплазмы, которые не охарактеризованы [1, 4].

Выделение поддерживающих линий из популяции лука является трудоемким и продолжительным процессом [7, 8]. В связи с этим вспомогательный маркер-опосредованный отбор может стать немаловажным фактором. Типы цитоплазмы могут быть определены исходя из полиморфизма

митохондриальных генов *orfA501* и *cob* [9]. Маркер *orfA501* дает фрагмент молекулярной массой 473 п. о. у цитоплазм, индуцирующих стерильность, в отличие от N-цитоплазмы [10]. S-цитоплазма отличается от T-цитоплазмы с помощью маркера *cobS*, дающего фрагмент массой 414 п. о. у S-цитоплазмы [11]. N-цитоплазма отличается от стерильных по *cobN* маркеру наличием продукта амплификации 180 п. о. Исходные поддерживающие растения могут быть прямо отобраны с помощью двух маркеров, косегрегирующих с *Ms* или *ms* [12].

При выборе для гибридной селекции за основу мужски-стерильной линии с S-типом цитоплазмы молекулярная идентификация может существенно снизить число индивидуальных скрещиваний со стерильным тестером для идентификации поддерживающего генотипа за счет исключения растений с S-цитоплазмами и доминантными *Ms*-аллелями перед тесткроссами [11, 12].

Цель исследования – оценить с помощью ДНК-маркеров полиморфизм N-, S-, *Ms*, *ms* локусов у сортов лука репчатого белорусской селекции. Задачи – молекулярно-генетический анализ локусов S-, T- и N-цитоплазмы, *Ms/ms*-локуса ядра и наблюдение фенотипических характеристик фертильности установленных генотипов.

**Объекты и методы исследования.** Для исследования использовали два острых сорта лука репчатого белорусской селекции. Сорт Ветразь для двулетней культуры, выращивается через севок, сорт скороспелый, среднегнездный, образует 2–5 луковиц. Сорт Скарб литвинов для выращивания в однолетней культуре из семян, сорт среднеспелый, одногнездный, образует 1–2 луковицы. Использовали луковицы маточника селекционного материала, по 24 шт. для каждого сорта. ДНК выделяли из 1–2 высечек Ø 0,5 см запасающей чешуи маточной луковицы, наборами ИБОХ НАН Беларуси, связыванием на мембране.

ПЦР-амплификация нуклеотидных последовательностей, специфических для стерильных цитоплазм. Праймеры для *orfA501* – 5'-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3' и 5'-ССАAGCATTTGGCGCTGAC-3', соответствующая температура отжига 60 °С [11]. Праймеры для региона митохондриального гена *cob* для S-цитоплазмы – 5'-GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3'; для N-цитоплазмы – 5'TCTAGATGTCGCATCAGTGGAATCC-3'. Общий праймер – 5'-СТТТТСТАТGGTGACAАСТССТТТ-3', соответствующая температура отжига – 53 °С [12]. Олигонуклеотиды синтезированы ОДО «Праймтех». Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 ml содержала 50 ng матричной ДНК, 1 × «АМ» буфер для Tag-полимеразы «Праймтех, 0,2 mM каждого из dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 ед. Tag полимеразы и 10 гМ каждого праймера. После периода начальной денатурации 94 °С, 2 мин., выполняли 25 циклов: 94 °С – 30 с, 60 (53) °С – 1 мин., 72 °С – 2 мин. Терминальная элонгация 72 °С – 5 мин.

Праймеры для идентификации *Ms/ms* аллелей синтезированы согласно [9]. Для детекции доминантной ядерной фертильности: *MsF* – 5'-TACAGATTTGTTTATCTTCTTCTTCTTCT-3', *MsR* – 5'-TTCATTTGTTAGGATGTACTCTTACC-3', рецессивной ядерной стерильности *msF* – 5'-TCAGTATCAATAGAAGGAATCAC-3', *msR* – 5'-GTATACCATTTGGTACTTGATGCA-3'. Реакционная смесь общим объемом 25 ml содержала 50 ng матричной ДНК, 1 × «АМ» буфер для Tag-полимеразы «Праймтех», 0,2 mM каждого из dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 ед. Tag-полимеразы и 10 гМ каждого праймера. Условия ПЦР следующие: начальная денатурация 95 °С – 6 мин., 35 циклов 95 °С – 30 с, 58 °С – 45 с, 72 °С – 45 с. Терминальная элонгация 72 °С – 5 мин. Амплифицированные продукты ПЦР анализировали в 1%-ном агарозном геле, визуализировали в UV-свете после окрашивания бромистым этидием.

В ходе селекционной работы [9] показано, что доминантный *Ms* аллель имеет ограниченное проявление в фенотипе, благодаря чему растения с различными генотипами могут иметь одинаковый фенотип, поэтому имеется возможность ложной классификации отдельных мужски-фертильных растений как мужски-стерильных. Однако оба фенотипа (мужски-фертильный и мужски-стерильный) в расщепляющейся популяции соответствуют ожидаемому соотношению 1 : 1 для модели одиночного гена в ВС1. В связи с этим визуально-тактильное определение стерильности растений лука проводили на основании наличия или отсутствия пыльцы в течение цветения всего растения. Цветки проверяли ежедневно на наличие пыльцы прикладыванием к зрелым пыльникам тыльной стороны ладони. Если пыльца обнаруживалась хоть однажды, стебель помечали биркой и не проверяли снова. Цветки непомеченных зонтиков повторно проверяли в течение всего периода цветения.

Многочисленные зонтики на индивидуальных растениях проверяли независимо. После цветения растения помечали как мужски-фертильные, если хоть один зонтик имел метку.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе молекулярно-генетического анализа установлено, что маркер митохондриального гена *cobS* ожидаемого размера 414 п. о. [12] был выявлен в реакции амплификации при использовании в качестве матрицы препаратов тотальной ДНК отдельных луковиц Скарб литвинов. Фрагмент амплифицировался в количествах, позволяющих однозначно интерпретировать результаты (рис. 1). Для маркера *cobS* (S-цитоплазмы) выявлен межсортовой полиморфизм. У сорта Скарб литвинов выявлено 33,3 % растений с *cobS* маркером S-цитоплазмы. У сорта Ветразь *cobS* не детектирован (табл. 1). По результатам Y. Y. Yan et al. [12], у сорта Sapporoki, происходящего из сорта США Yellow Globe Danvers, интродуцированного в Японии в 1871 г., встречаемость S-цитоплазмы у производных сортопопуляций варьирует. У сортопопуляции Yamamoto 19 растений из 20 имели S-цитоплазму, одно растение – N-цитоплазму. В другой популяции Hayashi все растения имели N-цитоплазму, а S-тип отсутствовал. Автор указывает, что для создания поддерживающей линии нужно использовать такую сортопопуляцию, как Hayashi, а для создания мужски-стерильной, как Yamamoto.

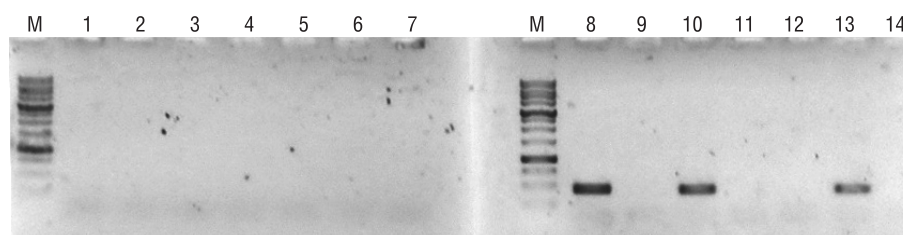


Рис. 1. Оценка *cobS* маркера у индивидуальных маточных луковиц лука репчатого: сорт Ветразь – дорожки 1–7; сорт Скарб литвинов – дорожки 8–14. Молекулярная масса ожидаемого продукта составляет 414 п. о. М – маркер молекулярного веса 1Kb, масса полосок снизу вверх 250, 500, 750, 1000 (более яркая полоса), 1500 п. о. и далее вверх

В наших исследованиях наблюдались количественные различия в амплифицированных продуктах маркеров *orfA501*, *Ms* и *ms*. Если продукт амплификации наблюдался в любом количестве, он учитывался. В результате применения маркеров *orfA501*, *Ms*, *ms* установлен внутрисортовой полиморфизм по соответствующим аллелям. Количество растений с T-цитоплазмой у сорта Ветразь составляет 33,3 %, у сорта Скарб литвинов – 25,0 %. Наличие фрагмента *orfA501* одновременно с фрагментом *cobS* у некоторых индивидуальных растений Скарб литвинов свидетельствует о возможности сосуществования S- и T-цитоплазм.

Маркер *cobN* обнаруживает фрагмент 180 п. о. мономорфно у всех изученных генотипов сходно с результатами [11] в отличие от [12]. Это значит, что на данном этапе исследований судить о наличии у растения N-цитоплазмы можно косвенно – по отсутствию аллелей для маркеров *cobS* и *orfA501*.

Частота выявления аллеля ядерной доминантной фертильности *Ms* у сорта Ветразь составляет 37,5 %, аллеля ядерной рецессивной стерильности *ms* – 33,3 %; у сорта Скарб литвинов *Ms* и *ms* – 37,5 и 54,1 % соответственно. В том числе среди исследованной выборки Скарб литвинов обнаружено 16,6 % гетерозигот *Msms*.

Самосовместимость индивидуальных семенных растений лука репчатого, у которых установлен генотип, определяли по количеству семян на соцветии при отсутствии свободного опыления (рис. 2). Изоляцию соцветий проводили под индивидуальным изолятором из полиэстера. У изученных растений сорта Ветразь самосовместимость проявилась завязыванием от 10 до 100 семян на соцветие в зависимости от растения, но независимо от комбинаций изучаемых аллелей. У 70 % изученных растений сорта Скарб литвинов самосовместимость слабо выражена, под изолятором завязывается от 2–3 до 100 семян. У растений Скарб литвинов № 17 и № 18 (Ск17 и Ск18), у которых детектирована S-цитоплазма и гетерозиготное состояние ядерного аллеля *Msms*, можно было наблюдать ограниченное проявление *Ms*, выразившееся в скудном количестве пыльцы и уровне самосовместимости – 2–3 семени на соцветие. У 30 % растений сорта Скарб литвинов наблюдался высокий уровень самосовместимости, при самоопылении на соцветии образовывалось

Т а б л и ц а 1. Распределение типов цитоплазмы и ядерных аллелей закрепителей-восстановителей стерильности у индивидуальных растений лука репчатого

№ растения	Фенотип	Детектированные маркеры					
		<i>Ms</i>	<i>ms</i>	<i>cobS</i>	<i>orfA501</i>	<i>CobN</i>	
<b>Сорт Ветразь</b>							
<i>Эксперимент с анализом фенотипа</i>							
1	Мужская фертильность	-	+	-	-	+	
6		+	-	-	-	+	
8		+	-	-	-	+	
9		-	+	-	-	+	
12		+	-	-	-	+	
15		-	+	-	±*	+	
16		+	-	-	-	+	
17		-	+	-	-	+	
21		+	-	-	-	+	
<i>Без наблюдения фенотипа</i>							
2		-	±	-	-	+	
3		-	-	-	±	+	
4		-	±	-	±	+	
5		-	-	-	±	+	
7		+	-	-	±	+	
10		+	-	-	±	+	
11		-	±	-	±	+	
13		-	-	-	-	+	
14		-	-	-	-	+	
18		-	-	-	-	+	
19		-	+	-	-	+	
20		-	-	-	-	+	
22		±	-	-	-	+	
23		-	-	-	-	+	
24		±	-	-	±	+	
<b>Сорт Скарб литвинов</b>							
<i>Эксперимент с анализом фенотипа</i>							
1	Мужская фертильность	+	-	+	+	+	
7		-	+	-	±	+	
8		+	-	+	±	+	
10		-	+	-	-	+	
14		-	+	-	-	+	
17		+	+	+	-	+	
18		+	+	+	-	+	
20		+	-	-	-	+	
21		±	+	+	±	+	
23		±	+	-	±	+	
24		-	+	-	-	+	
2		Мужская стерильность	-	+	-	±	+
16			-	+	+	±	+

№ растения	Фенотип	Детектированные маркеры				
		<i>Ms</i>	<i>ms</i>	<i>cobS</i>	<i>orfA501</i>	<i>CobN</i>
<i>Без наблюдения фенотипа</i>						
3		–	–	+	+	+
4		–	±	–	±	+
5		–	±	–	–	+
6		–	–	+	±	+
9		–	–	–	–	+
11		±	–	+	+	+
12		±	–	–	–	+
13		–	±	–	–	+
15		–	–	–	+	+
19		–	–	–	±	+
22		±	–	–	–	+

П р и м е ч а н и е. Более яркие фрагменты отмечены знаком «+», менее яркие – знаком «±», отсутствие фрагмента – знаком «–».

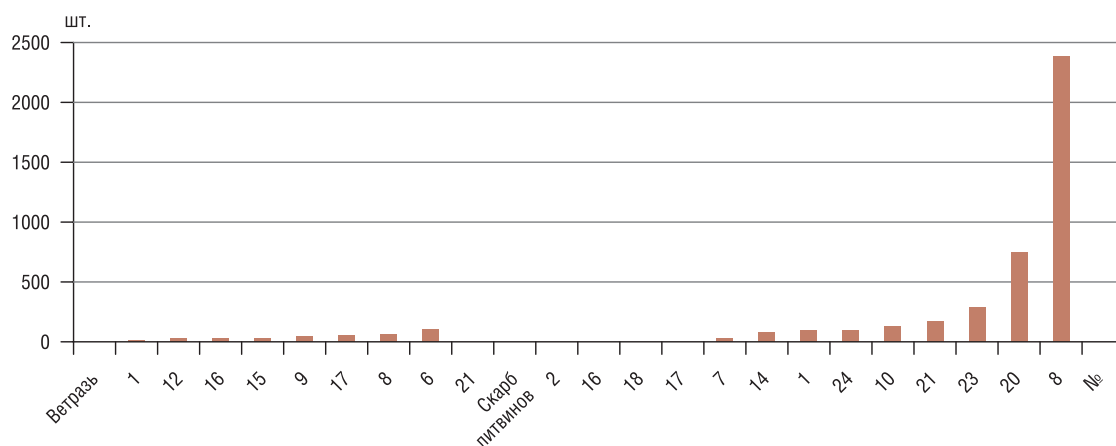


Рис. 2. Количество семян на соцветии при отсутствии свободного опыления ( $NCP_{05} = 8$ )

до 300 семян и более. У образца Скарб литвинов №8 (Ск8) при самоопылении получено 6,1 г семян, что составляет половину массы семян при свободном опылении на другом соцветии этого же растения. Образец имеет генотип *MsMs* и S-цитоплазму.

При анализе фенотипа среди ДНК-маркированных растений Скарб литвинов обнаружены растения с фенотипическими признаками мужской стерильности: отсутствие пыльцы на раскрывшихся цветках, дегенеративные пыльники (рис. 3, *b*). Одно растение из них Скарб литвинов №16 (Ск16) с генотипом *msms S-*, *orfA501* имело ожидаемый при таком генотипе фенотип мужской стерильности. У второго фенотипически стерильного растения Скарб литвинов №2 (Ск2) отсутствует маркер *cobS* и детектируется *orfA501*. В проанализированной выборке было еще одно растение с генотипом, как у Ск2, – Скарб литвинов №7 (Ск7), имевшее фертильный фенотип и образовавшее выполненные семена при скрещивании со Ск2 и Ск16.

Среди отобранных для фенотипического наблюдения растений сорта Ветразь не выявлено фенотипов мужской стерильности. Растение сорта Ветразь №15 (В15) с генотипом *msms*, *orfA501* было внешне фертильным, образовывало обильную пыльцу, однако отличалось от других растений зеленым цветом пыльников (рис. 3, *c*). Растение завязывало семена при самоопылении, в комбинации со стерильным растением Ск16 давало 3 шт. невыполненных семян (см. табл. 2).

Основываясь на данных молекулярно-генетического анализа, применяемого для производства линий лука репчатого с генетической мужской стерильностью на основе S-типа цитоплазмы, из проведенных нами 11 комбинаций скрещиваний с использованием мужски стерильных



Рис. 3. Полиморфизм пыльников в соцветиях маточных растений лука репчатого различных генотипов: *a* – сорт Скарб литвинов, S-цитоплазма, *MsMs*, мужски-фертильные цветки – пыльники развиты, желтого цвета, высыпание пыльцы обильное; *b* – сорт Скарб литвинов, S-цитоплазма, *msms*, мужски-стерильные цветки – пыльники недоразвиты, салатного цвета или дегенерировавшие, сморщенные, пыльца не высыпается; *c* – сорт Веразь, T-цитоплазма, *msms*, мужски-фертильные цветки – пыльники развиты, темно-зеленого цвета, высыпание пыльцы обильное

растений Скарб литвинов (см. табл. 2) только две (Ск16ЧВ9, Ск16ЧВ15) могут привести к получению желаемого генотипа. Поскольку только у материнского растения Ск16 детектирована S-цитоплазма и *msms* генотип ядра, а у Ветразь №9 (В9) и В15 – *msms* генотип ядерных аллелей закрепителей стерильности и N-цитоплазма. Однако остается выяснить будет ли помехой в этих комбинациях аллель *orfA501* (T-цитоплазмы) у материнского Ск16 и отцовского В15 растений и низкая выполненность гибридных семян обеих комбинаций.

Т а б л и ц а 2. Анализ фертильности гибридных комбинаций семенных растений

Вариант опыления	Количество семян, шт.	Масса семян, г	Особенности семян
<i>Ск2, количество соцветий – 5 шт.</i>			
×В8	0	0	Щуплые
×В1	7	0,01	
×В17	7 + 16	0,04 + 0,01	Выполненные + щуплые
×Ск7	20	0,051	
×В9	32	0,082	Выполненные
<i>Ск16, количество соцветий – 5 шт.</i>			
×Ск14	2	0	Щуплые
×В9	5	0,01	
×В15	3	0,008	
×Ск7	6	0,015	Выполненные
×В8	7	0,018	
×Ск10	20	0,051	

**Заключение.** Использованы ДНК-маркеры *Ms*, *ms* [9], *cobS*, *cobN* [12], *orfA501* [11], с помощью которых охарактеризован полиморфизм соответствующих аллелей сортов лука репчатого селекции Института овощеводства. На примере выборок из 24 маточных растений выявлены межсортовые отличия при выявлении маркера *cobS* (S-цитоплазмы). У сорта Ветразь аллель *cobS* S-цитоплазмы не обнаружен, у сорта Скарб литвинов выявлено 33,3 % таких растений. Количество растений с маркером *orfA501* T-цитоплазмы у сорта Ветразь составляет 33,3 %, у сорта Скарб литвинов – 25 %. У сорта Ветразь встречаемость маркера доминантного ядерного аллеля *Ms* составляет 37,5 %, рецессивного *ms* – 33,3 %, у сорта Скарб литвинов: *Ms* – 37,5 %, *ms* – 54,1 %. У сорта Скарб литвинов в выборке установлено 16,6 % гетерозигот *Msms*. Маркер *cobN* N-цитоплазмы обнаружен мономорфно у всех изученных генотипов.

Все семенные растения сорта Ветразь и 70 % растений сорта Скарб литвинов с аллелями *Ms* или *ms* слабо самосовместимы, однако некоторые дают достаточное количество семян для

размножения отцовских линий на их основе. Высокая самосовместимость у 30 % растений сорта Скарб литвинов с аллелями Ms и S- или T-цитоплазмой может отражать повышенную семенную продуктивность гибридных растений на основе стерильной цитоплазмы.

#### Список использованных источников

1. *Havey M.J.* Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasms of onion / M. J. Havey // *Theor. and Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 101. – Is. 5–6. – P. 778–782.
2. *Jones, H.A.* A male sterile onion / H. A. Jones, S. L. Emsweller // *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* – 1936. – N 34. – P. 582–585.
3. *Jones, H.A.* Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed / H. A. Jones, A. E. Clarke // *Hort. Sci.* – 1943. – N 43. – P. 189–194.
4. *Berninger, E.* Contribution a l'etude de la sterilite male de l'oignon (*Allium cepa* L.) / E. Berninger // *Ann. Amelior. Plant.* – 1965. – N 15. – P. 183–199.
5. *Pathak, C.* Breeding for the development of onion hybrids in India: problems and prospects / C. Pathak, R. Gowda // *Acta Hort.* – 1993. – N 358. – P. 239–242.
6. *Schweisguth, B.* Etude d'un nouveau type de sterilite male chez l'oignon (*Allium cepa* L.) / B. Schweisguth // *Ann. Amelior. Plant.* – 1973. – N 23. – P. 221–233.
7. *Havey, M.J.* Molecular confirmation that sterile cytoplasm has been introduced into open pollinated cultivars of grano onions / M. J. Havey, O. J. Bark // *Am. Soc. Hort. Sci.* – 1994. – N 119. – P. 90–93.
8. *Havey, M.J.* Combining abilities for yield and bulb quality among long- and intermediate-day open pollinated onion populations / M. J. Havey, W. M. Randle // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* – 1996. – N 121. – P. 604–608.
9. Определение типа цитоплазматической мужской стерильности лука репчатого (*Allium cepa* L.) селекции ВНИИССОК с помощью молекулярных маркеров / Т. П. Супрунова [и др.] // *Овощи России.* – 2011. – N 4 (13). – С. 20–21.
10. *Enkle, T.* PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.) / T. Enkle, D. Terefe, A. Tatlioglu // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – N 107. – P. 162–167.
11. *Sato, Y.* PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes in onion (*Allium cepa* L.) / Y. Sato // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – N 96. – P. 367–370.
12. Identification of two SCAR markers co-segregated with the dominant Ms and recessive ms alleles in onion (*Allium cepa* L.) / Y. Y. Yan [et al.] // *Euphytica.* – Apr. 2013. – Vol. 190. – Is. 2. – P. 267–277.

Поступила в редакцию 19.01.2016