

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНА *Rf1* ПОДСОЛНЕЧНИКА

Анисимова И. Н.<sup>1\*</sup>, Карабицина Ю. И.<sup>1</sup>, Алпатьева Н. В.<sup>1</sup>, Кузнецова Е. Б.<sup>1</sup>,  
Титов Н. В.<sup>2</sup>, Лютко А. Ю.<sup>2</sup>, Гаврилова В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44

<sup>2</sup>Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, 196605 Россия, г.Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, д. 10;

\* ✉ irina\_anisimova@inbox.ru

**Актуальность.** Современное производство семян подсолнечника основано на возделывании высокопродуктивных гетерозисных гибридов  $F_1$  от скрещиваний линий с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) РЕТ1-типа и линий-восстановителей фертильности пыльцы. Донором функционального аллеля ядерного гена *Rf1*, ответственного за восстановление фертильности пыльцы растений  $F_1$ , служит отцовская линия. Выявление носителей рецессивных и доминантных аллелей локуса *Rf1* с помощью диагностических молекулярных маркеров позволяет ускорить процесс селекции материнских и отцовских родительских линий для создания гибридов. **Материалы и методы.** Материалом для исследования служили 75 линий генетической коллекции подсолнечника ВИР различного происхождения, а также гибриды от скрещиваний стерильной линии ВИР 116А с фертильными линиями, различавшимися по типу цитоплазмы (фертильный или стерильный) и наличию молекулярных маркеров, большинство которых сцеплены с локусом *Rf1*. Для валидации маркеров использовали два подхода: 1) анализ ассоциаций между способностью линии к восстановлению фертильности пыльцы, либо к закреплению стерильности, и присутствием в генотипе молекулярных маркеров, а также 2) оценку частоты рекомбинации между локусом *Rf1* и маркерными локусами в четырех расщепляющихся гибридных популяциях  $F_2$ . **Результаты.** Ни один из маркеров не показал 100% эффективности при анализе изученной выборки генотипов. Чаще всего, среди линий, предположительно несущих доминантный аллель *Rf1*, отмечался маркер ORS511. Показатели фертильности пыльцы гибридов  $F_1$  от межлинейных скрещиваний составили 89-99%. Расщепление растений  $F_2$  по признаку фертильность/стерильность пыльцы было близко к теоретически ожидаемому 3:1 при моногенном контроле признака. Маркеры HRG01, HRG02, ORS511 наследовались сцепленно с признаком восстановления фертильности, при этом частота рекомбинации между локусом *Rf1* и маркерами различалась в разных комбинациях скрещиваний. По данным анализа гибридов ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130, среди изученных маркерных локусов ближе всех к локусу *Rf1* расположен маркер ORS511 (2,2 и 3,3%, соответственно). В скрещивании ВИР 116А × ВИР 210 частота рекомбинации между локусами *Rf1* и ORS511 составила 7,5%, а в комбинации ВИР116 × ВИР195 – 8,9%. **Заключение.** Для идентификации аллелей гена *Rf1* в коллекции генетических ресурсов подсолнечника и для маркер-опосредованного отбора в расщепляющихся гибридных популяциях, полученных с участием линий генетической коллекции ВИР, наиболее эффективны маркеры ORS511, HRG01 и HRG02.

**Ключевые слова:** *Helianthus annuus*, ЦМС РЕТ1, восстановление фертильности пыльцы, маркер-опосредованный отбор, наследование, рекомбинация

### Для цитирования:

Анисимова И.Н., Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В., Кузнецова Е.Б., Титов Н.В., Лютко А.Ю., Гаврилова В.А.

Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rf1* подсолнечника. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(2):28-37.

DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-03

**Прозрачность финансовой деятельности.** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.** **Дополнительная информация.** Полные данные этой статьи доступны <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-03> **Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы. Все авторы одобрили рукопись. Конфликт интересов отсутствует.**

**Благодарности:** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования России в рамках соглашения № 075-15-2020-911 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

---

# DIAGNOSTIC VALUE OF *Rf1* GENE MOLECULAR MARKERS IN SUNFLOWER

Anisimova I. N.<sup>1\*</sup>, Karabitsina Yu. I.<sup>1</sup>, Alpatieva N. V.<sup>1</sup>, Kusnetsova E. B.<sup>1</sup>, Titov N. V.<sup>2</sup>, Lyutko A. Yu.<sup>2</sup>, Gavrilova V. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia

<sup>2</sup>Pushkin Leningrad State University, 10 Petersburgskoye Shosse, Pushkin, St. Petersburg 196605, Russia;

\*  irina\_anisimova@inbox.ru

**Background.** Modern production of sunflower seeds is currently based on the cultivation of high-yielding heterotic F<sub>1</sub> hybrids from cross-breeding of lines with cytoplasmic male sterility (CMS) of PET1-type and fertility restorer lines. The paternal parent serves as a donor of the nuclear *Rf1* gene functional allele, which is responsible for pollen fertility restoration in F<sub>1</sub> plants. The detection of carriers of the *Rf1* locus recessive and dominant alleles using diagnostic molecular markers accelerates breeding of female and male parental lines for creating hybrids. **Materials and methods.** The material for the study included 75 lines of various origins from the VIR sunflower genetic collection as well as hybrids from crosses of VIR 116A sterile line with fertile lines differing in the type of cytoplasm (fertile or sterile) and the presence of molecular markers, most of which were linked to the *Rf1* locus. For marker validation, two different approaches were used: either by analyzing associations between the ability of a line to restore pollen fertility and the presence of molecular markers in its genotype, or by estimating recombination frequency between the *Rf1* locus and marker loci in four segregating hybrid populations. **Results.** According to the obtained results, no markers demonstrated 100% efficiency in the analysis of the sample of genotypes. The ORS511 marker was most frequently observed among the lines presumably carrying the dominant allele *Rf1*. Pollen fertility of F<sub>1</sub> hybrids from interline crossings was 89-99%. The segregation for fertility/sterility in F<sub>2</sub> fitted the theoretical ratio of 3:1 expected in case of the monogenic control of the trait. The markers HRG01, HRG02 and ORS511 were linked to the fertility restoration trait, with recombination rates between *Rf1* locus and markers varying in different cross combinations. The analysis of VIR 116A × VIR 740 and VIR 116A × RIL 130 hybrids showed that among the marker loci studied, the ORS511 was closest to the *Rf1* locus (*Rf1* (recombination frequency of 2.2 and 3.3%, respectively). The recombination rate between the *Rf1* and ORS511 loci equaled 7.5% in the cross VIR 116A × VIR 210 and 8.9% in VIR 116 × VIR 195. **Conclusion.** The markers ORS511, HRG01 and HRG02 are the most efficient for the identification of alleles of the *Rf1* gene and for the marker assisted selection in hybrid populations produced involving sunflower lines from the VIR collection.

**Key words:** *Helianthus annuus*, CMS PET1, pollen fertility restoration, marker assisted selection, inheritance, recombination

## For citation:

Anisimova I.N., Karabitsina Yu.I., Alpatieva N.V., Kusnetsova E.B., Titov N.V., Lyutko A.Yu., Gavrilova V.A. Diagnostic value of *Rf1* gene molecular markers in sunflower. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(2):28-37. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-03

**Financial transparency.** The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

**The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. Additional information.**

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-03> **The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. All authors approved the manuscript. No conflict of interest.**

## ORCID ID:

Anisimova I.N. <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

Karabitsina Yu.I. <https://orcid.org/0000-0002-8384-5134>

Alpatieva N.V. <https://orcid.org/0000-0002-5531-2728>

Kusnetsova E.B. <https://orcid.org/0000-0002-9804-1286>

Gavrilova V.A. <https://orcid.org/0000-0002-8110-9168>

УДК 575.13:633.85

Поступила в редакцию: 10.05.2021

Принята к публикации: 23.06.2021

---

**Acknowledgments:** The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of Agreement No. № 075-15-2020-911 of 16.11.2020 on providing a grant in the form of subsidies from the federal budget for the implementation of state support for the creation and development of the world-class scientific center “Agrotechnologies for the future”.

## Введение

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) – одна из ведущих масличных культур в России и в ряде стран мира. Основное направление современной селекции подсолнечника – создание высокопродуктивных гетерозисных гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). В семеноводстве гибридов используется преимущественно ЦМС РЕТ1-типа, полученная Леклерком (Leclercq, 1969) в результате межвидового скрещивания дикого однолетнего вида *H. petiolaris* Nutt. с культурным подсолнечником *H. annuus*. Для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС РЕТ1 в генотипе гибрида должен присутствовать ген *Rf1* (от англ. *Restoration of fertility*), который находится в группе сцепления 13. Его донором служит отцовская линия. Поиск генов-кандидатов в локусе *Rf1* у подсолнечника проводили методом полногеномного поиска ассоциаций GWAS (от англ. genome-wide association studies), основанным на анализе массивов данных однонуклеотидных полиморфизмов SNP. В работах Оуэнса с соавторами (Owens et al., 2018) и Горюнова с соавторами (Goryunov et al., 2019) выявлены 22 гена-кандидата в локусе *Rf1*, из которых 21 – кодирует PPR-белки и один – альдегиддегидрогеназу. Хорн с соавторами (Horn et al., 2019) идентифицировали 9 генов-кандидатов в локусе *Rf1*, три из которых (кодирующие PPR-белки) считаются самыми перспективными. Однако до сих пор сам ген *Rf1* не клонирован, продукт гена не идентифицирован, его функция не определена.

Тестирование отцовских линий в отношении восстановительной способности, которую определяет наличие в генотипе доминантного функционального аллеля гена *Rf1*, – длительный и трудоемкий процесс, включающий постановку скрещивания со стерильной линией-тестером и последующую оценку проявления признака у гибрида  $F_1$ . Этот процесс может быть значительно ускорен при использовании молекулярных маркеров. В гибридной селекции подсолнечника широко используется способ выделения материнских и отцовских линий из популяций растений  $F_2$  коммерческого гибрида на основе ЦМС (Gavrilova, Rozhkova, 2005; Carvalho, Toledo, 2008). Ранняя диагностика носителей рецессивных и доминантных аллелей локуса *Rf1* в гибридной популяции весьма актуальна, поскольку позволяет значительно сократить время и затраты при создании материнских и отцовских линий для получения гибридов.

Диагностическая ценность, иными словами эффективность, информативность или надежность молекулярного маркера, используемого для идентификации генотипов, несущих ген интереса, определяется многими факторами. Наиболее высокой диагностической ценностью обладают функциональные (аллель-специфичные) маркеры, разработанные на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов гена-кан-

дидата (Leonova, 2013). Однако к настоящему времени такие маркеры разработаны лишь для небольшого числа генов *Rf*, в частности, *Rf0* рапса (Hu et al., 2008; Afjani et al., 2019), *Rf2* хлопчатника (Feng et al., 2021), *Rs-Rf1* редиса (Sun et al., 2012).

Альтернативой указанному подходу является поиск маркеров, сцепленно наследуемых с геном *Rf1*. К их числу относятся SSR-маркеры, отбираемые на основе анализа генетической карты, либо маркеры, источником которых являются, например, сцепленно наследуемые RAPD-фрагменты. Чем ближе друг к другу находятся ген и молекулярный маркер на генетической карте, тем выше вероятность того, что в результате рекомбинации в мейозе у гибрида  $F_1$  ген и маркерный фрагмент попадут в одну гамету и будут одновременно переданы потомству. Это значительно облегчает процесс отбора желаемых генотипов в  $F_2$ .

Как правило, при поиске молекулярного маркера используют ограниченное число генотипов, а силу сцепления с маркируемым геном определяют при анализе конкретной расщепляющейся популяции. В этой связи важным этапом работы по поиску молекулярного маркера является его валидация. Существуют два подхода для определения диагностической ценности молекулярного маркера. Наиболее широко используемый подход – апробация маркера с использованием большого количества генотипов. Другой подход заключается в валидации маркеров, разработанных для одной гибридной комбинации, в процессе анализа других гибридных популяций.

В литературе опубликован ряд молекулярных маркеров, расположенных в той же группе сцепления, что и локус *Rf1*: микросателлитные ORS224, ORS317, ORS511, ORS630, ORS799, ORS1030 (Tang et al., 2002), TRAP-маркеры и STS-маркер STS115 (Yue et al., 2010), SCAR-маркеры HRG01 и HRG02 (Horn et al., 2003). Однако оценка их диагностической ценности была выполнена на ограниченном числе генотипов и в единичных гибридных комбинациях.

Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова создана генетическая коллекция линий подсолнечника, в составе которой – линии с ЦМС РЕТ1, закрепители стерильности и восстановители фертильности пыльцы. Наличие признака восстановления фертильности пыльцы у большинства линий-восстановителей проверено методом парных скрещиваний со стерильными тестерными линиями и путем анализа потомства  $F_1$  и  $F_2$  (Gavrilova, Rozhkova, 2005; Gavrilova et al., 2014). Генотипы ряда линий по локусу *Rf1* пока не известны, что ограничивает перспективы их использования в гетерозисной селекции. Цель настоящего исследования – выяснение диагностической ценности молекулярных маркеров гена *Rf1* у линий коллекции подсолнечника ВИР, с использованием комплексного подхода, сочетающего методы ассоциативного и гибридологического анализов.

## Материал и методы

Изученный материал включал 75 различившихся по происхождению линий генетической коллекции подсолнечника ВИР, в числе которых: стерильные линии с ЦМС, закрепители стерильности и восстановители фертильности пыльцы. Линии были отобраны из расширенной выборки генотипов, предварительно проверенных на однородность с использованием различных молекулярных маркеров.

ДНК выделяли из верхних листьев пятидневных полевых растений с помощью модифицированного СТАВ-метода (Li et al., 2007; Anisimova et al., 2018). Оценивали полиморфизм фрагментов, амплифицированных с помощью восьми пар праймеров, специфичных для маркера *orfH522* митохондриального генома, а также для локализованных в группе сцепления 13 двух локусов, *Rfl* (восстановление фертильности пыльцы при ЦМС *PET1*) и *P15/P18* (устойчивость к мучнистой росе) (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика использованных праймеров

Table 1. Characteristics of the used primers

Локус/ Locus	Маркер/ Marker	Последовательность/ Sequence	Размер ампликона, пн/ Amplicon size, bp	Источник/ Reference
<i>Rfl</i>	HRG02	F- AAACGTGGGAGAGAGGTGG	740	Horn et al., 2003
		R- AAACGTGGGCTGAAGAАСТА		
<i>Rfl</i>	HRG01	F- TATGCATAATTAGTTATACCC	454	Horn et al., 2003
		R- ACATAAGGATTATGTACGGG		
<i>Rfl</i>	STS115	F- CGAACTAATCATCATAACAACC	115	Yue et al., 2010
		R- TCGGCTCTTATGTATGTTAC		
<i>Rfl</i>	ORS224	F- AACCAAAGCGCTGAAGAAATC	136	Tang et al., 2002
		R- TGGACTAАCTACCAGAAGCTAC		
<i>Rfl</i>	ORS511	F- TGGCTCAGATTAAGTTCACACAG	156	Tang et al., 2002
		R- CGGGTTGCGAGTAAACAGGTA		
<i>Rfl</i>	ORS799	F- ACTCCCTCCCATTCTCGTCT	143	Tang et al., 2002
		R- TCCAGCAAGTCAGCAACAAC		
		R- CAAGGGCAGAGAGTTTTCCAC		
<i>P15/P18</i>	HA4011	F- ACTTCTACCCTCCCCTCTT	200, 240	Sahin et al., 2018
		R- CTGTACACGTGCTGCTTTAG		
В геноме митохондрий	<i>orfH522</i>	F- TGCCTCAACTGGATAAATTCAC	516	Schnabel et al., 2008
		R- ACCGTTCTCTCACGAGTTGAAG		

Реакционную смесь объемом 25 мкл готовили по следующему протоколу: 1,5 мкл раствора ДНК концентрации 100 нг/мкл, 2,4 мкл 2,5 мМ dNTP, 2,5 мкл 10 реакционного буфера, 1,25 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров (10 пМ/мкл), 0,4 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 е.а./мкл), 0,06 мкл бычьего сывороточного альбумина (BSA, 20 мг/мкл) и 15,89 мкл дистиллята двойной перегонки (ddH<sub>2</sub>O). Амплификацию осуществляли при условиях, рекомендованных разработчиками праймеров. Продукты амплификации разделяли в 1,5 % агарозном геле.

Для статистической обработки результатов расщепления применяли метод хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Для определения частоты рекомбинации по данным анализа F<sub>2</sub> использовали формулы Рокицкого (Rokitskii, 1974).

С целью валидации маркеров оценивали также характер их совместного наследования с признаком восстановления фертильности в F<sub>2</sub> от скрещиваний стериль-

ной линии-тестера ВИР 116А (ЦМС *PET1*) с фертильными линиями ВИР 195, ВИР 210, ВИР 740, RIL 130, различающимися по типу цитоплазмы (стерильный или фертильный) и наличию маркеров гена *Rfl*. Скрещивания были выполнены в 2011 году на Кубанской опытной станции – филиале ВИР. Гибриды F<sub>1</sub> выращены в 2013 и 2016 годах, гибриды F<sub>2</sub> – в 2015 и 2020 годах на опытном поле НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР». Для получения семян на F<sub>2</sub> перед началом цветения отдельные соцветия были изолированы с помощью изоляторов, выполненных из спанбонда.

Фертильность пыльцы растений F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> оценивали в полевых условиях по наличию нормально развитых пыльников, содержавших пыльцу, и цитологическим методом. Долю фертильных пыльцевых зерен (ПЗ) подсчитывали по методике Навашина (Navashin, 1951) с изменениями, на глицерин-желатиновых препаратах (Voronova, Gavrilova, 2019). Цитологический ана-

лиз выполнен с помощью микроскопа Zeiss AxioPlan 2 Imaging с цифровой фотокамерой AxioVision и программным обеспечением AxioVision 4.8. Для определения содержания фертильных пыльцевых зерен просматривали не менее 10 полей зрения при 20-кратном увеличении.

### Результаты и обсуждение

У 75 линий генетической коллекции подсолнечника ВИР оценили связь между наличием молекулярных маркеров HRG01, HRG02, STS115, ORS224, ORS511, ORS799 и HA4011, находящихся в группе сцепления 13, и наличием в генотипе линии доминантного аллеля в локусе *Rfl* (табл. 2). В зависимости от способности к супрессии фенотипа ЦМС изученные линии были классифицированы как стерильные, закрепители стерильности и восстановители фертильности. Тип цитоплазмы определяли с помощью митохондриального маркера *orfH522*: наличие фрагмента размером 516 пн указывало на присутствие аберрантного митохондриального гена, ассоциированного с типом стерильности PET1 (цитоплазма S); его отсутствие указывало на то, что тип цитоплазмы был фертильным (цитоплазма N). Стерильный тип цитоплазмы, диагностированный с помощью маркера *orfH522*, свидетельствовал о наличии в генотипе фертильной линии доминантного аллеля *Rfl*. Для линий с фертильным типом

цитоплазмы способность восстанавливать фертильность или закреплять стерильность определена в тест-скрещиваниях со стерильным тестером (Anisimova et al., 2014).

В таблице 2 представлены результаты анализа ассоциаций между наличием у изученных линий молекулярных маркеров гена *Rfl* и их способностью закреплять мужскую стерильность либо восстанавливать фертильность пыльцы при скрещивании с линией ЦМС PET1. Полученные результаты показали, что ни один из семи использованных маркеров не обладал 100%-ной эффективностью при анализе изученной выборки генотипов, то есть его присутствие (или отсутствие) не всегда однозначно свидетельствовало о наличии (или отсутствии) в генотипе линии функционального аллеля в локусе *Rfl*. Более эффективным оказался митохондриальный маркер *orfH522*: он позволил диагностировать стерильный тип цитоплазмы и практически всегда указывал на наличие доминантного аллеля *Rfl*, у линий, восстанавливающих фертильность пыльцы в поле. Однако у линий с фертильной цитоплазмой маркер *orfH522* отсутствовал, поэтому на наличие функционального аллеля *Rfl* могли указывать другие маркеры, сцепленные с геном *Rfl*. Чаще всего среди линий с доминантным аллелем *Rfl* встречался микросателлитный маркер ORS511, который не был отмечен лишь у пяти из 67 линий-восстановителей фертильности пыльцы с цитоплазмами N и S (см. табл. 2).

**Таблица 2. Встречаемость молекулярных маркеров, локализованных в группе сцепления 13, среди линий коллекции подсолнечника, различающихся по способности к супрессии фенотипа ЦМС PET1**

**Table 2. Occurrence of molecular markers, localized in linkage group 13, among sunflower collection lines differing in their ability to suppress the PET1-cms phenotype**

Группа линий/ Line group	Число линий с молекулярным маркером (+) и без него (-)/ Number of lines with (+) and without (-) a molecular marker														
	STS115		HRG02		HRG01		ORS224		ORS511		ORS799		HA4011		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	240 пн/bp	200 пн/bp	-
Стерильные (ЦМС PET1-типа) – <i>rflrfl</i>	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	2	1	3	0	0
Закрепители стерильности (цитоплазма N) – <i>rflrfl</i>	4	1	3	2	2	3	1	4	3	2	2	3	2	3	0
Восстановители фертильности (цитоплазма S PET1- типа) – <i>Rf1Rf1</i>	49	12	48	13	41	20	40	21	58	3	35	26	30	24	7
Восстановители фертильности (цитоплазма N) – <i>Rf1Rf1</i>	5	1	4	2	4	2	3	3	4	2	0	6	1	5	0

Число изученных в работе стерильных линий с ЦМС РЕТ1 (линий А) и фертильных линий-закрепителей стерильности (в эту группу вошли как фертильные аналоги стерильных линий, так и линии, показавшие закрепительную способность при скрещиваниях со стерильным тестером), было невелико. Ранее, однако, отсутствие маркеров HRG01 и HRG02 у носителей рецессивного аллеля *rfl* было продемонстрировано нами на расширенной выборке генотипов, включавшей 7 А-линий с ЦМС РЕТ1-типа (Anisimova et al., 2009).

Нами не обнаружено четкой ассоциации между признаком восстановления фертильности пыльцы и наличием трех микросателлитных маркеров ORS224, ORS799, HA4011, последний из которых сцеплен с находящимся в той же группе сцепления локусом *P15/P18* и детерминирующим устойчивость подсолнечника к большому чис-

лу рас возбудителя ложной мучнистой росы *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni (см. табл. 2).

При создании материнских и отцовских родительских линий селекционеры широко используют метод «разложения» коммерческих гибридов на линии с целью отбора рекомбинантных генотипов. В этой связи особенно актуальны данные о характере совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы и молекулярного маркера при межлинейных скрещиваниях. Материнской линией в опытах служила стерильная линия ВИР116А, отцовскими – линии ВИР 195, ВИР 210, ВИР 740, RIL 130, различающиеся по типу цитоплазмы (стерильный у ВИР 116А, ВИР 195, ВИР 210, RIL 130, фертильный – у ВИР 740) и сочетаниям маркеров STS115, HRG01, HRG02, ORS511, HA4011 (табл. 3).

**Таблица 3. Характеристика родительских линий, использованных в скрещиваниях**

**Table 3. Characteristics of parental lines used in crossings**

Линия/ Line	Номер каталога ВИР/ VIR Catalogue number	Происхождение/ Origin	Тип цитоплазмы* Type of cytoplasm*	Наличие и размер (пн) маркерных фрагментов/ Presence and size of marker fragments (bp)				
				STS115	HRG01	HRG02	ORS511	HA4011
ВИР 116А	3455	Вымпел, Россия	S	-	-	-	-	240
ВИР 195	3285	Россия	S	-	-	-	159	-
ВИР 210	3292	Россия	S	-	-	-	214	-
ВИР 740	3528	ВИР 113 × <i>Rf</i> , <i>Pl</i> , Россия	N	115	454	740	158	200
RIL 130	3599	83HR4 × RHA 345 Франция	S	115	454	740	159	200

\*S – стерильный (РЕТ1)/ sterile (PET1), N – фертильный/ fertile

Цитологический анализ содержимого пыльников показал, что у всех отцовских форм доля окрашенных (фертильных) ПЗ превышала 90%. Самый высокий уровень частоты фертильных ПЗ (97%) отмечен у линии ВИР 740, зарегистрированной в ВИР как донор гена *Rf1*.

Растения гибридов первого поколения во всех четырех комбинациях скрещиваний (ВИР 116А × ВИР 195, ВИР 116А × ВИР 210, ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130) были выравнены по морфологическим признакам, фенотипически соответствовали материнскому типу и имели следующие признаки: ветвление отсутствовало (отцовские формы, использованные в скрещиваниях между линиями ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130, были ветвистыми), высота растений составляла 2 м и выше, присутствовала лишь одна крупная центральная корзинка. Показатели фертильности пыльцы гибридов F<sub>1</sub> составили от 89% (ВИР 116А × ВИР 740) до 98% (ВИР 116А × RIL 130).

Расщепление растений F<sub>2</sub> по признаку фертильность/стерильность пыльцы соответствовало теоретически ожидаемому 3:1 при моногенном контроле признака. Поэтому предположили, что в соответствии с общепринятой гипотезой, в контроле признака восстановления фертильности пыльцы в изученных комбинациях скрещиваний принимал участие ген *Rf1*. Фертильные растения имели хорошо развитые пыльники с большим количеством пыльцы (рисунок, а, б, у стерильных растений пыльники были недоразвитыми, пыльца в них отсутствовала (рисунок, в, з).

Каждое растение расщепляющихся популяций F<sub>2</sub> было генотипировано с помощью молекулярных маркеров STS115, HRG01, HRG02, ORS511 и HA4011. Результаты анализа совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы и маркеров STS115, HRG01, HRG02, ORS511 представлены в таблице 4. Все маркеры наследовались сцепленно с признаком восста-

новления фертильности (предположительно, локус *Rfl*), при этом частота рекомбинации между признаком и маркером в разных комбинациях скрещиваний была различной. В двух комбинациях – ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130 – оценивали расщепление по всем анализируемым маркерам, в комбинациях ВИР 116А × ВИР 210 и ВИР 116А × ВИР 195 – по ORS511 и HA4011, поскольку маркеры STS115, HRG01, HRG02 у отцовских линий ВИР 195 и ВИР 210 отсутствовали.

Результаты оценки частоты рекомбинации в скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130 показали, что маркер STS115 сцеплен с локусом *Rfl* слабее всех других изученных маркеров (частоты рекомбинации 35,4% и 31,1%), что маловероятно и противоречит дан-

ным ЮЭ с соавторами (Yue et al., 2010), свидетельствующим об очень тесном сцеплении данного маркера с локусом *Rfl* (0,4 сМ). В то же время для маркера ORS511 отмечено довольно тесное сцепление с признаком (частоты рекомбинации 2,2% и 3,3%). Расстояние между предполагаемым локусом *Rfl* и маркером ORS511 в двух комбинациях скрещиваний оказалось немного меньше значения 3,7 сМ, полученного ЮЭ с соавторами (Yue et al., 2010) при анализе скрещивания cmsHA441 × 2-6-5-1. В скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 210 и ВИР 116А × ВИР 195 частоты рекомбинации между локусами *Rfl* и ORS511 оказались вдвое больше и составили соответственно 7,5% для ВИР 116А × ВИР 210, а в комбинации ВИР116 × ВИР195 – 8,9%.

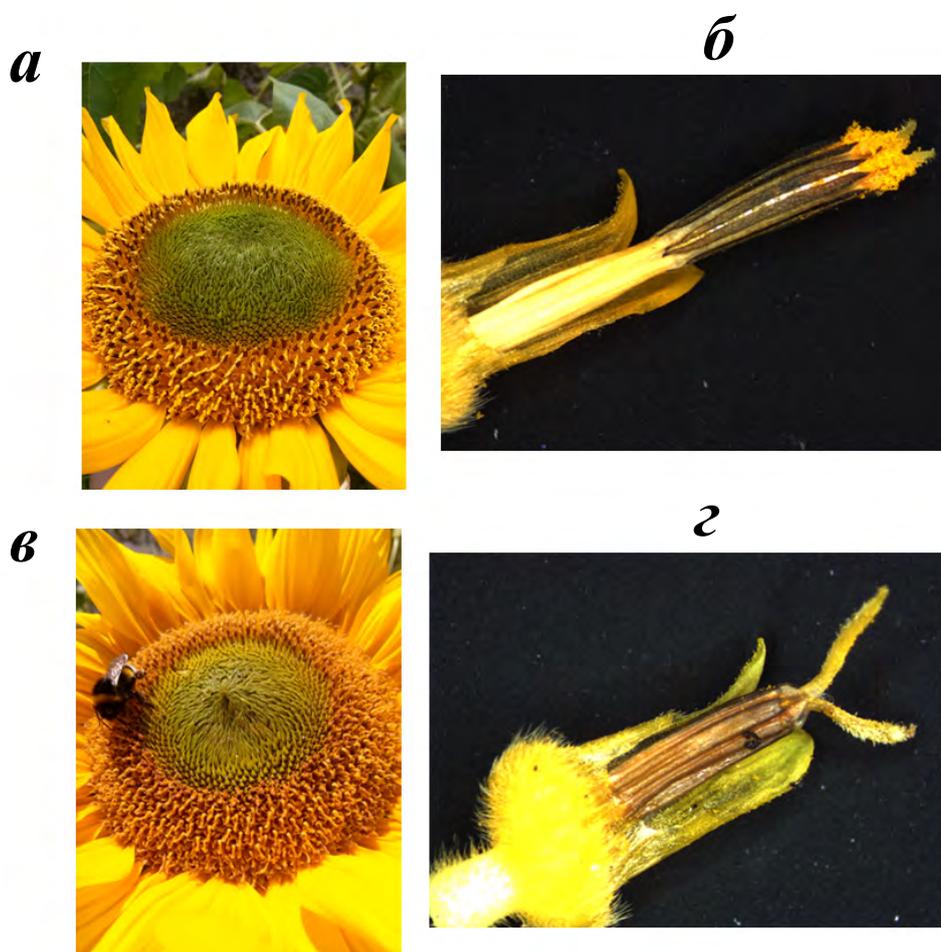


Рисунок. Соцветия и фрагменты трубчатых цветков с пыльником фертильного (а, б) и стерильного (в, з) растений

Figure. Inflorescences and fragments of tubular flowers with the anther of fertile (a, б) and sterile (в, з) plants

Частоты рекомбинации между локусом *Rfl* и маркерами HRG01 и HRG02 оказались выше опубликованных в литературе. Согласно оценкам, полученным Хорн с сотрудниками (Horn et al., 2003) при анализе результатов скрещивания RHA 325 × HA 342, расстояние между локусом *Rfl* и маркерами HRG01 и HRG02 составляет 0,8 сМ и 2 сМ (Horn et al., 2003). В наших экспериментах частота рекомбинации между локусом *Rfl* и маркерами HRG01 и HRG02 составила 6,7% и 5,1%, соответственно, в скрещивании ВИР 116А × ВИР 740, а в скрещивании

ВИР 116А × RIL 130 – 4,1% и 4,2%.

Таким образом, нами и другими исследователями при анализе различных комбинаций скрещиваний получены близкие, но неидентичные показатели силы сцепления признака восстановления фертильности (локус *Rfl*) с молекулярными маркерами. В наших экспериментах в качестве материнской формы использовался один и тот же тестер, поэтому наблюдаемые отличия в частоте рекомбинации можно объяснить влиянием генотипа отцовского родителя.

**Таблица 4. Расщепление по признаку восстановления фертильности пыльцы (локусу *Rfl*) и наличию маркеров гена *Rfl* во втором поколении гибридов ВИР 116А × ВИР 740 (1), ВИР 116А × RIL 130 (2), ВИР 116А × ВИР 210 (3) и ВИР 116А × ВИР 195 (4)/**

**Table 4. Segregation for pollen fertility restoration (*Rfl* locus) and the presence of the *Rfl* gene marker in the second generation of the hybrids VIR 116A × VIR 740 (1), VIR 116A × RIL 130 (2), VIR 116A × VIR 210 (3) and VIR 116A × VIR 195 (4)**

Локусы/ Loci	Комбинация/ Combination	Всего растений/ Total plants	Фенотипические классы F <sub>2</sub> Phenotype classes F <sub>2</sub>				χ <sup>2</sup> для фактического расщепления при ожидаемом 9:3:3:1 (df=3, p < 0,05)/ χ <sup>2</sup> for the actual segregation vs. the expected 9:3:3:1	r, %
			F/M(+)	F/M(-)	S/M(+)	S/M(-)		
<i>Rfl</i> , STS115	1	133	90	7	16	20	35,6	35,4
	2	123	91	2	24	6	26,5	31,1
<i>Rfl</i> , HRG01	1	133	91	6	3	33	110,5	6,7
	2	123	89	4	1	29	101,6	4,1
<i>Rfl</i> , HRG02	1	133	91	6	1	35	126,5	5,1
	2	123	91	2	3	27	92,1	4,2
<i>Rfl</i> , ORS511	1	133	95	2	1	35	135,2	2,2
	2	123	91	2	2	28	99,0	3,3
	3	101	75	1	6	19	57,2	7,5
	4	239	177	11	8	42	117,62	8,9

Примечания: F/M(+) – фертильное, с маркером; F/M(-) – фертильное, без маркера; S/M(+) – стерильное, с маркером; S/M(-) – стерильное, без маркера; r – частота рекомбинации

Notes: F/M(+) – fertile, with the marker; F/M(-) – fertile, without the marker; S/M(+) – sterile, with the marker; S/M(-) – sterile, without the marker; r – frequency of recombination

Признак восстановления фертильности пыльцы наследовался сцепленно с STS-маркером HA4011 сложного локуса *P15/P18*. Согласно данным литературы, генетическое расстояние между локусами *Rfl* и *P15/P18* составляет порядка 26 сМ (Bulos et al., 2013). Частота рекомбинации между маркером HA4011 и локусом *Rfl* в двух популяциях F<sub>2</sub>: ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130 составила 26% и 16,4%, соответственно. Микросателлитный маркер HA4011 можно использовать в качестве дополнительного к маркерам ORS511, HRG01 и HRG02 для идентификации генотипов

подсолнечника, несущих функциональный аллель гена восстановления фертильности пыльцы *Rfl*. Это актуально для линий, у которых данные маркеры отсутствуют. Маркер HA4011 – кодоминантен, и с его помощью можно выявлять гомозиготные по локусу *Rfl* генотипы в расщепляющихся гибридных популяциях F<sub>2</sub>.

Первые данные о диагностической ценности SCAR-маркеров HRG01 и HRG02 получили Хорн с соавторами (Horn et al., 2003). Авторы проанализировали распределение маркеров HRG01 и HRG02 среди 9 закрепителей стерильности и 11 восстановителей фер-

тельности и не обнаружили их у двух линий-восстановителей. Маркин с соавторами (Markin et al., 2013) оценивали диагностическую ценность 9 молекулярных маркеров (6 SSR-маркеров, наиболее близко расположенных к локусу *Rf1* на генетической карте, маркера STS115 и SCAR-маркеров HRG01 и HRG02) на селекционном материале, созданном на Донской опытной станции им. Л.А. Жданова Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта (ВНИИМК). Этот материал был представлен 17 линиями ЦМС и 29 линиями-восстановителями и был сравнительно близкородственным. Согласно полученным данным, более информативными оказались три из девяти изученных маркеров – SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, и маркер STS115, тогда как ORS511, по мнению исследователей, был неинформативным. На этой же выборке линий авторы апробировали мультиплексную систему, разработанную на основе маркеров HRG01 и HRG02 и orfH522 (Markin et al., 2017).

Линии с ЦМС, восстановители и закрепители стерильности из генетической коллекции ВИР, были маркированы в работе Анисимовой с соавторами (Anisimova et al., 2011) с помощью SCAR-маркеров HRG01 и HRG02, а также STS-маркера митохондриальной ДНК orfH522. Авторы показали, что SCAR-маркеры HRG01 и HRG02 гена *Rf1* отсутствуют у ряда линий-восстановителей из коллекции ВИР, и о присутствии в генотипе гена *Rf1* можно надежно судить по наличию митохондриального маркера orfH522. Позднее маркеры orfH522 и HRG01, последний из которых разработан Маркиным (Markin et al., 2017) на основе последовательности фрагмента HRG01, а также HRG02 были апробированы Челюстниковой с соавторами (Chelyustnikova et al., 2017). Авторы использовали перечисленные маркеры при анализе выборки инбредных линий селекции ВНИИМК и рекомендовали их для оценки аллельного состояния гена *Rf1* в селекционной и семеноводческой практике. В результате проведенного нами исследования показано, что наибольшую диагностическую ценность имеют маркеры ORS511, HRG01 и HRG02 для идентификации генетических ресурсов подсолнечника по гену восстановления фертильности пыльцы *Rf1*.

### Заключение

Впервые на обширном генетическом материале, включавшем 75 линий коллекции ВИР, выполнена оценка диагностической ценности молекулярных маркеров STS115, HRG01, HRG02, ORS511 и HA4011, локализованных в группе сцепления 13 *Helianthus annuus*. Для валидации маркеров использовали два подхода – анализ ассоциаций между способностью линии к восстановлению фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности РЕТ1-типа, либо к закреплению стерильности, и присутствием в генотипе молекулярных маркеров STS115, HRG01, HRG02, ORS511, HA4011, а также гибри-

дологический анализ четырех расщепляющихся гибридных популяций  $F_2$  с оценкой частот рекомбинации между локусом *Rf1* и молекулярными маркерами. В качестве наиболее эффективных для идентификации в коллекции генетических ресурсов подсолнечника и для маркер-опосредованного отбора из расщепляющихся гибридных популяций предложены маркеры ORS511, HRG01 и HRG02.

### References/Литература

- Afjani J.A., Najafabadi M.S., Mirfakhraei R.G. Gene-based marker to differentiate among B, A, and R lines in hybrid production of rapeseed Ogura system. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2019;17(3):50-54. DOI: 10.29252/ijb.1870
- Anisimova I.N., Alpatyeva N.V., Abdullaev R.A., Karabitsina Y.I., Kuznetsova E.B. Screening of plant genetic resources with the use of DNA markers: basic principles, DNA isolation, PCR setup, agarose gel electrophoresis: (guidelines). E.E. Radchenko (ed.). St. Petersburg: VIR; 2018. [in Russian] (Анисимова И.Н., Алпатеева Н.В., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле: (методические указания) / под ред. Е.Е. Радченко. Санкт-Петербург: ВИР; 2018). DOI: 10.30901/978-5-905954-81-8
- Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Rozhkova, Port A.I., Timofeeva G.I., Duka M.V. Genetic diversity of sources of sunflower pollen fertility restorer genes. *Russian Agricultural Sciences*. 2011;37:192-196. DOI: 10.3103/S1068367411030025
- Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Alpatyeva N.V., Kuznetsova E.B., Karabitsina Y.I., Rozhkova V.T. Sunflower collection in the studies of pollen fertility restoration genetic mechanisms. *Proceedings of Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2014;175(4):72-82. [in Russian] (Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Алпатеева Н.В., Кузнецова Е.Б., Карабицина Ю.И., Рожкова В.Т. Коллекция подсолнечника в исследованиях генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2014;175(4):72-82).
- Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Rozhkova V.T., Timofeeva G.I., Tikhonova M.A. Molecular markers in identification of sunflower pollen fertility restorer genes. *Russian Agricultural Sciences*. 2009;35:367-370. DOI: 10.3103/S1068367409060020
- Bulos M., Ramos M.L., Altieri E., Sala C.A. Molecular mapping of a sunflower rust resistance gene from HAR6. *Breeding Science*. 2013;63(1):141-146. DOI: 10.1270/jsbbs.63.141
- Chelyustnikova T.A., Guchetl S.Z., Antonova T.S. Usage of molecular markers for identification of CMS-*Rf* system in parental lines of sunflower hybrids. *Oil Crops*. 2017;4(172):3-9. [in Russian] (Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Применение молекулярных маркеров для идентификации ЦМС-*Rf* системы в родительских линиях гибридов подсолнечника. *Масличные культуры*. 2017;4(172):3-9).
- Carvalho C.G.P., Toledo J.F.F. Extracting female inbred lines from commercial sunflower hybrids. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2008;43(9):1159-162. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000900009
- Feng J., Zhang X., Zhang M., Guo L., Qi T., Tang H., Zhu H., Wang H., Qiao X., Xing C., Wu J. Physical mapping and InDel marker development for the restorer gene *Rf2* in cytoplasmic male sterile CMS-D8 cotton. *BMC Genomics*. 2021;22(1):24. DOI: 10.1186/s12864-020-07342-y
- Gavrilova V.A., Rozhkova V.T. Donors of Pollen Fertility Restoration of Sunflower CMS Lines for Heterosis Breeding. In: *Identified plant gene pool and breeding*. St. Petersburg; 2005. p.377-379. [in Russian] (Гаврилова В.А., Рожкова В.Т. Доноры восстановления фертильности пыльцы линий ЦМС подсолнечника для гетерозисной селекции. В кн.: *Идентифицированный генофонд растений и селекция*. 2005;377-379).
- Gavrilova V.A., Rozhkova V.T., Anisimova I.N. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry. *Helia*. 2014;37(60):1-16. DOI: 10.1515/helia-2014-0001

- Goryunov D.V., Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Chernova A.I., Sotnikova E.A., Martynova E.U., Boldyrev S.V., Ayupova A.F., Gubaev R.F., Mazin P.V., Gurchenko E.A., Shumskiy A.A., Petrova D.A., Garkusha S.V., Mukhina Z.M., Benko N.I., Demurin Y.N., Khaitovich P.E., Goryunova S.V. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower. *Agronomy*. 2019;9(2):49. DOI: 10.3390/agronomy9020049.
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prüfe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rfl* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;106(4):599-606. DOI: 10.1007/s00122-002-1078-y
- Horn R., Radanovic A., Fuhrmann L., Sprycha Y., Hamrit S., Jockovic M., Miladinovic D., Jansen C. Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rfl* in sunflower. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(6):1260. DOI: 10.3390/ijms20061260
- Hu X., Sullivan-Gilbert M., Kubik T., Danielson J., Hnatiuk N., Marchione W., Greene T., Thompson S.A. Mapping of the Ogura fertility restorer gene *Rfo* and development of *Rfo* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding*. 2008;22:663-674. DOI: 10.1007/s11032-008-9207-1
- Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* 1969;19(2):99-106. [In French].
- Leonova I.N. Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Russian Journal of Genetics*. 2013;17(2):314-325. [in Russian] (Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(2):314-325). DOI: 10.1134/S2079059713060051
- Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.I., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genetics and Molecular Research*. 2007;6(4):1064-1071.
- Markin N.V., Usatenko T.V., Usatov A.V., Tikhobaeva V.E., Gorbachenko O.F., Kulishova G.A., Azarin K.V. Informative DNA markers of gene *Rfl* – pollen fertility restorer CMS PET1 in sunflower. *Modern Problems of Science and Education*. 2013;4:110-122. [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 *Rfl* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС PET1 подсолнечника. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;4:110-122).
- Markin N., Usatov A., Makarenko M., Azarin K., Gorbachenko O., Kolokolova N., Usatenko T., Markina O., Gavrilova V. Study of informative DNA markers of the *Rfl* gene in sunflower for breeding practice. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2017;53(2):69-75. DOI: 10.17221/108/2016-CJGPB
- Navashin S.G. Selected works. Vol. 1. V.N. Sukachev, P.A. Baranov, M.S. Navashin (eds). Moscow; Leningrad: Academy of Sciences of the USSR; 1951. [in Russian] (Навашин, С.Г. Избранные труды. Т. 1 / под ред. В.Н. Сукачева, П.А. Баранова, М.С. Навашина. Москва; Ленинград: Изд-во АН СССР; 1951).
- Owens G.L., Baute G.J., Hubner S., Rieseberg L.H. Genomic sequence and copy number evolution during hybrid crop development in sunflowers. *Evolutionary Applications*. 2018;12(1):54-65. DOI: 10.1111/eva.12603.
- Rokitskii P.F. Introduction to statistical genetics (Vvedenie v statisticheskuyu genetiku). Minsk: Vysheishaya shkola; 1974. [in Russian]. (Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Высшая школа; 1974).
- Şahin E., Kalenderoğlu A., Aydın Y., Evci G., Uncuoğlu A. SSR markers suitable for marker assisted selection in sunflower for downy mildew resistance. *Open Life Sciences*. 2018;13(1):319-326. DOI: 10.1515/biol-2018-0039
- Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding. *Plant Breeding*. 2008;127(6):587-591. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01516.x
- Sun X., Liu Y., Wang L., Zhu X., Gong Y., Xu L., Liu L. Molecular characterization of the *Rs-Rf* gene and molecular marker-assisted development of elite radish (*Raphanus sativus* L.) CMS lines with a functional marker for fertility restoration. *Molecular Breeding*. 2012;30(4):1727-1736. DOI: 10.1007/s11032-012-9756-1.
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani K., Knapp J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;105:1124-1136. DOI: 10.1007/s00122-002-0989-y
- Voronova O.N., Gavrilova V.A. Quantitative and qualitative analysis of sunflower pollen (*Helianthus* L.) and its use in breeding work. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(1):95-104. [in Russian] (Воронова О.Н., Гаврилова В.А. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):95-104. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-95-104).
- Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rfl* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breeding*. 2010;129(1):24-28. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01661.x