

На правах рукописи



КАРАБИЦИНА

Юлия Игоревна

**«Генетическое разнообразие линий и наследование признака
восстановления фертильности пыльцы подсолнечника
(*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-РЕТ1»**

Специальность: 03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург

2020

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова» (ВИР)

Научный руководитель: **Анисимова Ирина Николаевна**
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник отдела генетики
Всероссийского института генетических ресурсов
растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), г. Санкт-
Петербург

Официальные оппоненты: **Матвеева Татьяна Валерьевна**
доктор биологических наук,
профессор кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного
университета (СПбГУ), г. Санкт-Петербург

Шнеер Виктория Семеновна
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
биосистематики и цитологии Ботанического
института имени В. Л. Комарова Российской
академии наук (БИН РАН), г. Санкт-Петербург

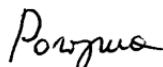
Ведущая организация: Федеральний научный центр «Всероссийский
научно-исследовательский институт масличных
культур имени В. С. Пустовойта» (ВНИИМК)

Защита диссертации состоится « 17 » февраля 2021 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <https://www.vir.nw.ru/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан « ___ » ___ декабря 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Елена Вячеславовна Рогозина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы. Подсолнечник *Helianthus annuus* L. – ведущая масличная культура в России и основная – в ряде стран мира. Производство семян подсолнечника в настоящее время ориентировано преимущественно на возделывание высокопродуктивных гибридов. Однако, доля отечественных гибридов в структуре посевов подсолнечника в России все еще невелика. В государственном реестре сортов, зарегистрированных на территории Российской Федерации (по данным 2019 г.), числится 672 сорта и гибрида, из них всего 67 гибридов отечественной селекции. По данным А. Д. Бочкового (2019) основная доля сортообразцов, высеваемых на территории Российской Федерации в 2017 г., принадлежит иностранным гибридам (69,8%), а в общей структуре сортовых посевов в РФ доля площадей, занятых отечественными сортами и гибридами, не превышает 28%. Для снижения трудоемких ручных затрат на кастрацию растений, в селекции подсолнечника используют материнские формы на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Признак ЦМС реализуется при определенных сочетаниях мутантных (как правило, химерных) митохондриальных генов, возникающих в результате перестроек митохондриального генома, и ядерных генов, называемых генами восстановления фертильности пыльцы *Rf* (*Restoration of fertility*) (Kaul, 1988; Эльконин, Тырнов, 2000; Иванов, Дымшиц, 2007; Анисимова, Гавриленко, 2017; Анисимова, 2020). Эффекты ЦМС супрессируются при включении в генотип функциональных аллелей генов-восстановителей *Rf*. Генетический контроль признака восстановления фертильности пыльцы у растений недостаточно изучен, число идентифицированных генов невелико, а молекулярные механизмы восстановления фертильности не выяснены. Практически у всех видов растений, для которых описаны генетические системы ЦМС-*Rf*, идентифицированы 1-2 главных гена, супрессирующие признак ЦМС. В большинстве описанных в литературе случаев эти гены относятся к подсемейству *PFL-PPR* (*Restoration-of Fertility-Like-PPR*), их продуктами являются PPR-белки (Fujii et al., 2011), а наиболее реалистичная картина контроля признака может быть получена в рамках гипотезы «ген-на-ген» (по аналогии с генами устойчивости), предполагающей взаимодействие митохондриального ЦМС-гена и конкретного ядерного гена *Rf* (Дьяков, 1996; Gaborieau et al., 2016).

Изменчивость признака восстановления фертильности у растений изучена мало. В единичных публикациях сообщалось об особенностях наследования морфометрических параметров пыльцы (соотношении числа фертильных и стерильных пыльцевых зерен, морфологии, размерах) в гибридных поколениях лишь у представителей однодольных – сорго (Эльконин и др., 2019) и пшеницы (Sinha et al., 2013). Фертильность пыльцы – значимый для гибридной селекции признак. При низком уровне фертильности пыльцы, как правило, наблюдается низкая завязываемость семян и, следовательно, снижение урожайности даже при использовании гетерозисных гибридов.

В семеноводстве гибридов подсолнечника используется преимущественно цитоплазматическая стерильность (ЦМС) РЕТ1-типа, полученная Р. Leclercq (1969) на основе межвидового гибрида *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus*. Мужская стерильность РЕТ1-типа у подсолнечника связана с экспрессией новой открытой рамки считывания *orfH522*, ко-транскрибируемой с геном *atp1* (Budar, Pelletier, 2001). Генетика признака восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС РЕТ1 подсолнечника изучена недостаточно. Сообщалось о разном числе генов, контролирующих восстановление фертильности пыльцы при ЦМС РЕТ1, однако до сих пор единого мнения по этому вопросу нет (Enns et al., 1970; Kinman, 1970; Fick, Zimmer, 1974; Vranceanu, Stoenescu, 1978; Whelan, 1980; Seiler, Jan, 1994; Serieys, 1999; Rukmini Devi, 2002; Sujatha et al., 2011). Полагают, что для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС РЕТ1-типа необходимо присутствие в генотипе главного гена *Rf1*, локализованного в группе сцепления 13. Сведения об особенностях проявления признака восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника немногочисленны (Horn, Friedt, 1997; Liu et al., 2013; Воронова, Гаврилова, 2019). Гибриды F₁ характеризуются высоким уровнем фертильности пыльцы (Jan, 2000; Vassilevska-Ivanova, Tsekova, 2003), однако данные о наследовании показателей фертильности в расщепляющихся гибридных популяциях в литературе отсутствуют.

Недавно Международным консорциумом по геномике подсолнечника (International Consortium on Sunflower Genomics – ICSG) завершено секвенирование генома линии XRQ

(Badouin et al., 2017), тем не менее, его аннотация еще не закончена и гены-кандидаты для многих признаков, в том числе и гены-кандидаты локусов *Rf*, включая *Rf1*, не найдены. Из-за отсутствия информации о нуклеотидных последовательностях доминантного и рецессивного аллелей гена *Rf1* разработка аллель-специфичных маркеров невозможна. В литературе предложен ряд молекулярных маркеров (STS, SCAR, SSR, TRAP), сцепленных с признаком восстановления фертильности пыльцы, однако их диагностическая ценность оценивалась на ограниченном селекционном и генетическом материале и лишь с использованием ассоциативного подхода (Анисимова и др., 2009, 2011; Маркин и др., 2013; Усатов и др., 2017; Челюстникова и др., 2017; Horn et al., 2019).

Одна из главных задач селекции гибридов подсолнечника на основе ЦМС заключается в расширении генетического разнообразия родительских линий. В ВИРе создана и в течение многих лет поддерживается генетическая коллекция линий подсолнечника, в составе которой линии ЦМС и восстановители фертильности пыльцы. Наличие признака восстановления фертильности пыльцы у большинства линий-восстановителей проверено путем парных скрещиваний со стерильными тестерными линиями и индивидуальным анализом по потомству F_1 и F_2 (Гаврилова, Рожкова, 2005; Gavrilova et al., 2014). Однако до сих пор генотипы линий по локусам *Rf* не определены, что ограничивает перспективы их использования в селекции. Для эффективного использования линий генетической коллекции ВИР в качестве родительских форм в селекции гибридов подсолнечника необходимо их всестороннее изучение по признаку восстановления фертильности пыльцы.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – характеристика генетического разнообразия перспективных для использования в селекции линий генетической коллекции подсолнечника ВИР по признаку восстановления фертильности пыльцы.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

1. С использованием серии молекулярных маркеров, выполнить генотипирование выборки линий коллекции и структурировать ее разнообразие.
2. Изучить наследование признака восстановления фертильности пыльцы при межлинейных скрещиваниях.
3. Изучить особенности наследования морфометрических параметров пыльцы у гибридов F_1 и в расщепляющихся гибридных популяциях от межлинейных скрещиваний.
4. Оценить диагностическую ценность молекулярных маркеров гена *Rf1*.

Материал, методология и методы исследования. Материалом исследования послужил уникальный генетический материал – линии генетической коллекции ВИР различного происхождения. Линии созданы с привлечением сохраняемого в ВИРе генофонда подсолнечника и насчитывают от 5-6 до 20 и более поколений инбридинга. В работе использовали методы молекулярно-генетического анализа (выделение ДНК, ПЦР, клонирование и секвенирование геномных фрагментов, генотипирование), классического гибридологического анализа (подбор родительских форм, постановка скрещиваний, фенотипирование, анализ расщеплений), цитологического анализа (подготовка цитологических препаратов, анализ морфометрических параметров пыльцы). Для обработки экспериментальных данных использовали стандартные статистические методы, факторный анализ и методы биоинформатики.

Научная новизна исследования. Впервые с использованием методов молекулярных маркеров, секвенирования ПЦР-фрагментов, гибридологического и цитологического анализов изучено генетическое разнообразие выборки линий коллекции подсолнечника ВИР, различающихся по способности к восстановлению фертильности при ЦМС РЕТ1-типа. По результатам молекулярного анализа определена генетическая структура выборки из 75 линий. Идентифицированы и на молекулярном уровне охарактеризованы новые, не описанные в литературе аллельные варианты микросателлитных локусов ORS224 и ORS511, сцепленных с геном *Rf1*. Впервые определены генотипы по локусу *Rf1* семи перспективных для использования в селекции линий коллекции (ВИР 195, ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 740, RIL 80, RIL 130). Впервые для двудольных растений изучены особенности наследования морфометрических показателей пыльцы при межлинейных скрещиваниях. Впервые на цитологическом уровне охарактеризован признак «малопыльцовости» подсолнечника, проявляющийся с частотой около

9% у носителей доминантного аллеля гена *Rf1* в расщепляющихся гибридных популяциях F₂. На материале генетической коллекции подсолнечника ВИР впервые изучено совместное наследование признака восстановления фертильности пыльцы и молекулярных маркеров генов *Rf1*, *R1*, *Radv*, *Pl5/Pl8*. Впервые с использованием метода гибридологического анализа выполнена оценка диагностической ценности молекулярных маркеров гена *Rf1* подсолнечника.

Теоретическая и практическая значимость работы. Новые знания об изменчивости и характере наследования признака восстановления фертильности пыльцы вносят вклад в выяснение природы супрессии фенотипа ЦМС РЕТ1 у подсолнечника, а также будут полезны для понимания генетических механизмов этого важного биологического и хозяйственно ценного признака у других растений. Данные генотипирования выборки линий коллекции подсолнечника ВИР, информация об аллельной изменчивости сцепленных с геном *Rf1* микросателлитных локусов, уточненные данные о генетических расстояниях между локусом *Rf1* и локусами молекулярных маркеров группы сцепления 13, в которой также находятся гены, детерминирующие устойчивость к возбудителям ржавчины и ложной мучнистой росы, расширяют существующие представления об изменчивости генома вида *H. annuus*. Сведения о структуре генотипического разнообразия изученной выборки линий коллекции ВИР, могут быть полезны при планировании генетических экспериментов и работах по созданию нового исходного селекционного материала для гетерозисной селекции подсолнечника. Молекулярные маркеры, валидированные в ходе исследования, перспективны для идентификации доминантного аллеля *Rf1* в генотипах линий генетической коллекции ВИР, а также гибридов, полученных с их участием.

Положения, выносимые на защиту:

1. Линии генетической коллекции подсолнечника ВИР характеризуются значительным генетическим разнообразием, выявленным с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Rf1*, *R1*, *Radv*, *Pl5/Pl8*.
2. Способность к восстановлению фертильности пыльцы при скрещиваниях с линией ЦМС РЕТ1 определяется присутствием в генотипах линий генетической коллекции доминантного аллеля *Rf1* и не зависит от типа цитоплазмы линии-восстановителя (фертильный/стерильный), а также наличия/отсутствия большинства диагностических маркеров этого гена.
3. Признак «малопыльцовости», проявляющийся в F₂ от скрещиваний линии ЦМС с линией-восстановителем фертильности пыльцы, детерминирован генетически и характеризуется отличительными фенотипическими особенностями.

Апробация результатов. Результаты работы были доложены или представлены на международных и всероссийских конференциях, конгрессах и совещаниях, в том числе: Международной научной конференции, посвященной 120-летию основания Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» (Санкт-Петербург, 2014); X Международном конгрессе генетиков и селекционеров (Молдавия, 2015); V Международной школе для молодых ученых, посвященной памяти члена-корреспондента РАН, профессора Т. Б. Батыгиной «Эмбриология, генетика, биотехнология» (Санкт-Петербург, 2016); Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); II Международной конференции, посвященной 80-летию СИБНИИРС «Генофонд и селекция растений» (Новосибирск, 2016); Международных научно-практических конференциях молодых учёных «Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК» (Санкт-Петербург, 2017, 2018); IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (Санкт-Петербург, 2017); 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Г. С. Муромцева «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019); Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 5 научных статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 11 научных работ в других изданиях, а также каталог мировой коллекции ВИР «Генетическая коллекция подсолнечника» и Методические указания.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно в отделе генетики ВИР. Автор лично осуществлял анализ литературных данных по теме работы, планирование экспериментов, проведение лабораторных исследований, обработку экспериментальных данных, подготовку статей и докладов на конференциях. Полевые опыты проводились совместно с сотрудниками отделов генетики и генетических ресурсов масличных и прядильных культур ВИР, а также филиалов Кубанская опытная станция ВИР и НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР».

Структура работы

Диссертационная работа изложена на 134 страницах, содержит 26 таблиц, иллюстрирована 25 рисунками и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 206 источников, в том числе 160 ссылок на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены сведения о признаке ЦМС у растений, природе генов, восстанавливающих фертильность пыльцы у форм с ЦМС, обобщены данные литературы о ЦМС подсолнечника, современных методах изучения генетического контроля признака восстановления фертильности пыльцы и актуальная информация о генетике признака.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал Материалом для исследований послужила выборка образцов генетической коллекции подсолнечника ВИР, включавшая 75 линий, в их числе 2 линии на основе ЦМС РЕТ1 (линии А), 1 линия с цитоплазмой типа RIG0 (линия А), 1 фертильный аналог стерильной линии (линия Б) и 71 фертильная линия различного происхождения. Кроме того, изученный материал включал гибриды F₁ от скрещиваний стерильных аналогов с фертильными линиями, потомство анализирующих скрещиваний, а также расщепляющиеся гибридные популяции F₂.

Молекулярно-генетический анализ Суммарную ДНК линий выделяли из этиолированных проростков, а для анализа расщепляющихся популяций из листьев 5-6 недельных растений – модифицированным СТАВ-методом (Анисимова и др., 2018).

Для амплификации маркерных фрагментов использовали 15 пар праймеров. Маркерный фрагмент orfH522 специфичен для аберрантного митохондриального гена orfH522, обуславливающего РЕТ1 тип стерильности (Schnabel et al., 2008). Маркеры HRG01, HRG02 (Horn et al., 2003), STS115, а также SSR-маркеры ORS224, ORS511 и ORS799 находятся в группе сцепления 13 и в разной степени сцеплены с геном *Rf1* (Yue et al., 2010). Фрагменты, амплифицируемые с праймерами SCO04, SCX20, сцеплены с локализованным в той же группе геном *Radv*, а фрагмент STO06 сцеплен с геном *R1*, который находится в группе сцепления 8 (Lawson et al., 1998). Оба гена детерминируют устойчивость к возбудителю ржавчины *Puccinia helianthi* Schw. CAPS-маркеры QHL12D20_*HaeIII*, L12D20_*HaeIII* и B20M13_*RsaI* специфичны для гомологов генов восстановления фертильности – *RFL-PPR* (Анисимова и др., 2013, 2014). Их хромосомная локализация и ассоциация с признаком восстановления фертильности пыльцы пока не установлены. Маркеры HA-P1 (STS) и HA4011 (SSR), сцепленные с локусом *P15/P18*, контролирующим устойчивость к возбудителю ложной мучнистой росы (*LMР*) *Plasmopara halstedii* Farl., относятся к той же группе сцепления, что и ген *Rf1* (Radwan et al., 2004; Sahin et al., 2018).

ПЦР проводили на амплификаторах MyCycler и DNA Engine Tetrad 2 производства BioRad (США) с использованием набора реактивов фирмы Диалат при условиях, рекомендованных авторами, разработчиками праймеров. Рестрикционный анализ проводили с помощью рестриктаз

производства фирмы Thermo Fisher (США) при условиях, рекомендованных производителем либо с модификациями.

Продукты амплификации с помощью набора реактивов фирмы Евроген (Москва) «Cleanup Standard» выделяли из ПЦР-смеси, а затем клонировали в клетках *Escherichia coli* (штамм DH5 α) с помощью вектора pAL-TA (Евроген, Москва) в соответствии с протоколом (Алпатьева и др., 2019). Секвенирование фрагментов на приборе ABI Prism3500xL, анализ полиморфизма SSR-фрагментов на приборе MultiNA (Schimadzu) выполнены в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для выравнивания последовательностей использовалась программа MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для визуализации и редактирования последовательностей использовали программу BioEdit 7.2 (Hall, 1999). Для идентификации последовательностей использовали информационно-поисковую систему BLAST с сайта Национального института Биотехнологической Информации (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Гибридологический анализ Гибриды F₁ были получены при скрещивании линии ЦМС ВИР116А с группой линий, контрастных по типу цитоплазмона и наличию молекулярных маркеров гена *Rf1*, а также других маркеров, локализованных в группах сцепления 8, 13, и маркеров неизвестной локализации. Во второй серии скрещиваний материнской формой являлась фертильная линия ВИР 365. Изученный гибридный материал включал следующие комбинации: ВИР 116А × ВИР 365, ВИР 116А × RIL 130, ВИР 116А × ВИР 740, ВИР 116А × ВИР 210, ВИР 116А × ВИР 558, ВИР 116А × ВИР 195, ВИР 365 × RIL 130, ВИР 116А × RIL 80, (ВИР 116А × ВИР 211) × ВИР 211, ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130).

Цитологический анализ пыльцы Фертильность пыльцы оценивали визуально – по наличию нормально развитых пыльников, содержащих пыльцу, и на цитологических препаратах, окрашенных ацетокармином. Доля фертильных пыльцевых зерен (ПЗ) подсчитывалась по методике Навашина (цит. по Роскин, 1951) с изменениями, на глицерин-желатиновых препаратах (Воронова и др., 2011). Цитологический анализ выполнен с помощью микроскопа Zeiss Axioplan 2 Imaging с цифровой фотокамерой AxioVision и программным обеспечением AxioVision 4.8. Учитывали процент полностью окрашенных (фертильных), неокрашенных и дефектных ПЗ, а также их диаметр. Подсчет процента фертильных ПЗ проводили на основании анализа не менее 10 полей зрения при 20-кратном увеличении.

Статистический анализ Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов вариационной статистики в программах MS Excell 2003-2007 и Statistica 6.0. Структурирование выборки линий коллекции относительно наличия/отсутствия у них молекулярных фрагментов проводили с помощью метода главных координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) в программе GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012) с использованием бинарной базы данных. Коэффициенты рекомбинации в F₂ рассчитывали по формулам П. Ф. Рокицкого (1974). При конструировании генетических карт использовалось программное обеспечение для графического представления генетических связей и QTL MapChart 2.32 (Voorrips, 2002).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Генотипирование линий генетической коллекции

В результате первичного скрининга у 20 из 95 линий генетической коллекции подсолнечника выявлены внутрилинейные различия между растениями по наличию/отсутствию молекулярных маркеров. Неоднородные линии были исключены из дальнейшего анализа, поэтому рабочая выборка состояла из 75 линий.

С использованием молекулярного маркера *orfH522* изученная выборка линий была дифференцирована по типу цитоплазмы. Оказалось, что 61 фертильная линия (86%) имеет стерильную цитоплазму РЕТ1-типа. У 10 линий маркер *orfH522* не был обнаружен, следовательно, эти линии имели фертильную цитоплазму или стерильную не РЕТ1-типа. У стерильных линий с цитоплазмой РЕТ1 ВИР 114А и ВИР 116А, а также у закрепителя стерильности ВИР 130Б (предполагаемый генотип *rf1rf1*), маркеры STS115, HRG01, HRG02 отсутствовали, тогда как у

линии ВИР 151А с цитоплазмой RIG0-типа амплифицировался фрагмент STS115 ожидаемого размера 115 пн. Среди линий-восстановителей со стерильной цитоплазмой РЕТ1-типа (предполагаемый генотип *Rf1Rf1*) все 3 маркера обнаружены у 39 линий и не выявлены у 8 линий. Тем не менее, наличие у последних стерильной цитоплазмы указывало на то, что эти линии несут доминантный аллель *Rf1*. Это подтверждено и результатами анализа тест-скрещиваний линии ЦМС ВИР 116А с линиями ВИР 365 и ВИР 210, не имевшими маркеров STS115, HRG01 и HRG02: гибриды F₁ от данных скрещиваний были фертильны. У пяти линий с фертильной цитоплазмой отмечалось наличие всех трех маркеров, из них три – ВИР 349, ВИР 369 и ВИР 740 получены из одного источника – гибрида от скрещивания линии ВИР 113 с источником генов *Rf* и *Pl*. В 2012 г. линия ВИР 740 была зарегистрирована как донор восстановления фертильности (Паспорта доноров, 2012). У линий, не обладавших восстановительной способностью (ВИР 160, ВИР 387 и ВИР 449), маркер HRG01 отсутствовал, но у отдельных растений выявлены маркеры HRG02 и STS115.

С использованием системы микроципового электрофореза для исследования нуклеиновых кислот МСЕ-202 MultiNA (Shimadzu, Япония) изучили полиморфизм микросателлитных локусов ORS224, ORS511 и ORS799 (рис. 1, табл. 1).

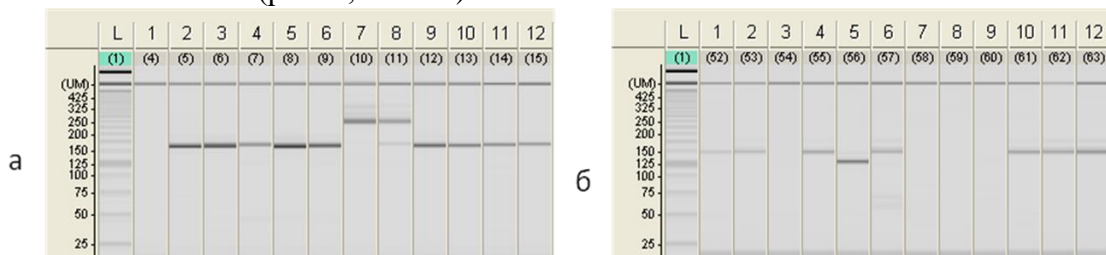


Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий с праймерами ORS511; а): 1 – ВИР 160, 2 – RIL 130, 3 – ВИР 740, 4 – ВИР 740, 5 – ВИР 740, 6 – ВИР 710, 7 – ВИР 370, 8 – ВИР 370, 9 – ВИР 700, 10 – ВИР 702, 11 – ВИР 369, 12 – ВИР 369; праймерами ORS224; б): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 740, 3 – ВИР 116А, 4 – ВИР 377, 5 – ВИР 376, 6 – ВИР 234, 7 – ВИР 151А, 8 – ВИР 160, 9 – ВИР 200, 10 – ВИР 703, 11 – ВИР 369, 12 – ВИР 369; (LM – маркер молекулярного веса 25 bp DNA Ladder, Shimadzu)

Таблица 1 – Уникальные аллели микросателлитных локусов, сцепленные с геном *Rf1*

Линия	Тип цитоплазмы	Аллельные варианты локуса, пн	
		ORS224	ORS511
ВИР 210	S	105, 106	210, 214
ВИР 370	S	106	244
ВИР 376, ВИР 378	S	124	159
ВИР 343, ВИР 381	S	нулевой	210, 212
ВИР 365, ВИР 705	S	нулевой	161 и 240
ВИР 377*	F	нулевой	161 и 240
ВИР 130Б*	F	нулевой	198

Примечание: * закрепляют стерильность в скрещиваниях с линией ЦМС

В локусах ORS224 и ORS511, наряду с аллелями стандартного размера, выявлены новые, не описанные в литературе. У локуса ORS511 выявлено 5 аллелей, в то время как в локусах ORS224 и ORS799 было идентифицировано 4 (нулевой, 105-106, 124, 140-146 пн) и 2 аллеля (нулевой, 147-161 пн) соответственно. У трех линий выборки (ВИР 365, ВИР 705 и ВИР 377) продукты амплификации с праймерами ORS511 включали 2 фрагмента размером 161 и 240 пн. В F₂ ВИР 365 × RIL 130 и ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130) оба фрагмента наследовались сцепленно (рис. 2, табл. 2) Таким образом, результаты гибридологического анализа позволяют предположить, что локус ORS511 линии ВИР 365 дублирован и содержит две тесно сцепленные последовательности.

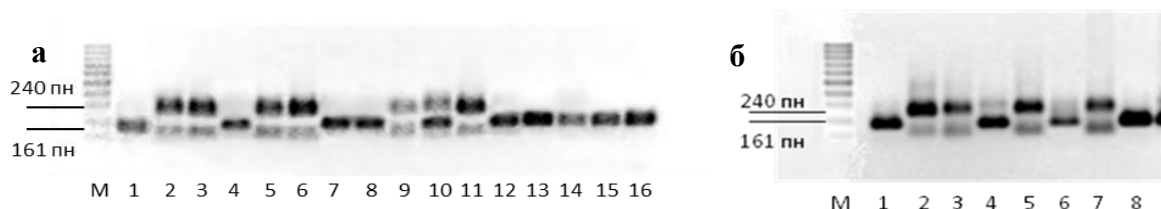


Рисунок 2 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий и гибридов с праймерами ORS511; **а):** F₂ ВИР 365 × RIL 130: 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3-16 – растения F₂; **б):** F₁ ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3-8 – гибридные растения F₁. М – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas).

Таблица 2 – Наследование уникальных аллелей локуса ORS511 в расщепляющихся гибридных популяциях

Комбинация	Число растений с аллелями, шт		Ожидаемое соотношение	χ^2	<i>p</i>
	159 пн	161, 240 пн			
F ₂ ВИР 365 × RIL 130	44	17	3 : 1	0,27	<i>p</i> > 0,05
F ₁ ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)	19	23	1 : 1	0,38	<i>p</i> > 0,05

Согласно литературным данным, аллель микросателлитного локуса ORS224 имеет структуру (GA)8N2(GA)13 и размер 136 пн (Tang et al., 2002). Структура аллелей локуса ORS224 у линий ВИР 376 и ВИР 740 отличалась от «стандартной» (рис. 3). У линии ВИР 376 амплифицированный фрагмент микросателлитного локуса ORS224 включал 13 GA-повторов и имел длину 113 пн, тогда как клонированные фрагменты линии ВИР 740 имели структуру (GA)20, а их длина составила 127 пн.

Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов локуса ORS511 были изучены у 4 линий генетической коллекции: ВИР 740, ВИР 376, ВИР 210 и ВИР 370 (рис. 4, табл. 3). Согласно литературным данным, маркерный фрагмент ORS511 имеет длину 156 пн, а микросателлитный локус ORS511 имеет структуру (AT)7 (GT)12 (Tang et al., 2002). Полиморфные аллели локуса ORS511 различались не только числом мотивов AT и GT, но также наличием вставки из пяти нуклеотидов G внутри микросателлита и однонуклеотидными заменами во фланкирующих последовательностях (рис. 4). Интересно отметить, что при анализе индивидуальных растений у линий ВИР 740 и ВИР 376 выявлена гетерозиготность по аллельным вариантам локуса ORS511.

Таблица 3 – Нуклеотидный полиморфизм аллелей микросателлитного локуса ORS511

Линия	Тип цитоплазмы	Структура аллеля		Размер фрагмента, пн	Вставка 5G	Наличие замен
		AT	GT			
ВИР 740	F	7, 10	10, 11	154, 158	-	-
ВИР 376	S	9	10, 11	156, 158	-	-
ВИР 210	S	12, 13 + AC	16, 17	183	+	+
ВИР 370	S	13 + AC	16, 17	183	+	+

Структурирование изученной выборки линий на основе данных молекулярного анализа

Анализ методом главных координат, выполненный с помощью программы для популяционно-генетического анализа GenAIEх 6.5, позволил структурировать изученную выборку линий в зависимости от наличия/отсутствия всех маркерных фрагментов на 4 группы (рис. 5). К группе 1 относятся 29 линий на стерильной основе с присутствием всех (или отсутствием от одного до трех) диагностических маркеров гена *Rfl*. Вторая группа (13 линий) характеризуется отсутствием (или присутствием одного или двух) диагностических маркеров гена *Rfl*, а также наличием у линий уникальных аллелей микросателлитных локусов ORS 224 и ORS 511 (ВИР 210, ВИР 343, ВИР 365, ВИР 370, ВИР 377, ВИР 381, ВИР 705). Большинство линий в этой группе имеют стерильный цитоплазмон, за исключением ВИР 160, ВИР 377, ВИР 394, ВИР 449; последние, судя по данным анализа генеалогии, имеют фертильный тип цитоплазмы либо стерильную цитоплазму не РЕТ1-типа. В третью группу вошли стерильные линии, характеризующиеся отсутствием диагностических маркеров гена *Rfl*, *Radv*, *RI*, а также наличием вариантов В20М13_*RsaI*_2, QHL12D20_*HaeIII*_2 *RFL-PPR*-генов (за исключением ВИР 151А). Тридцать линий, которые отличались друг от друга и от групп 1, 2, 3 различными сочетаниями маркерных фрагментов, объединены в группе 4, т.к. их нельзя отнести к трем другим группам. По характеру распределения линий можно сделать вывод о значительном генетическом разнообразии изученной выборки. Лишь единичные линии были полностью идентичны по наличию/отсутствию маркерных фрагментов, это линии ВИР 349 и ВИР 369 (группа 4), в происхождении которых участвовали идентичные источники (ВИР 113 × *Rf*, *PI*); линии ВИР 249 и ВИР 361; ВИР 582 и ВИР 633; ВИР 378 и ВИР 758; ВИР 437, ВИР 658 и ВИР 735 (группа 1). Следует отметить, что для линий ВИР 361, ВИР 735 сведения о происхождении отсутствуют.

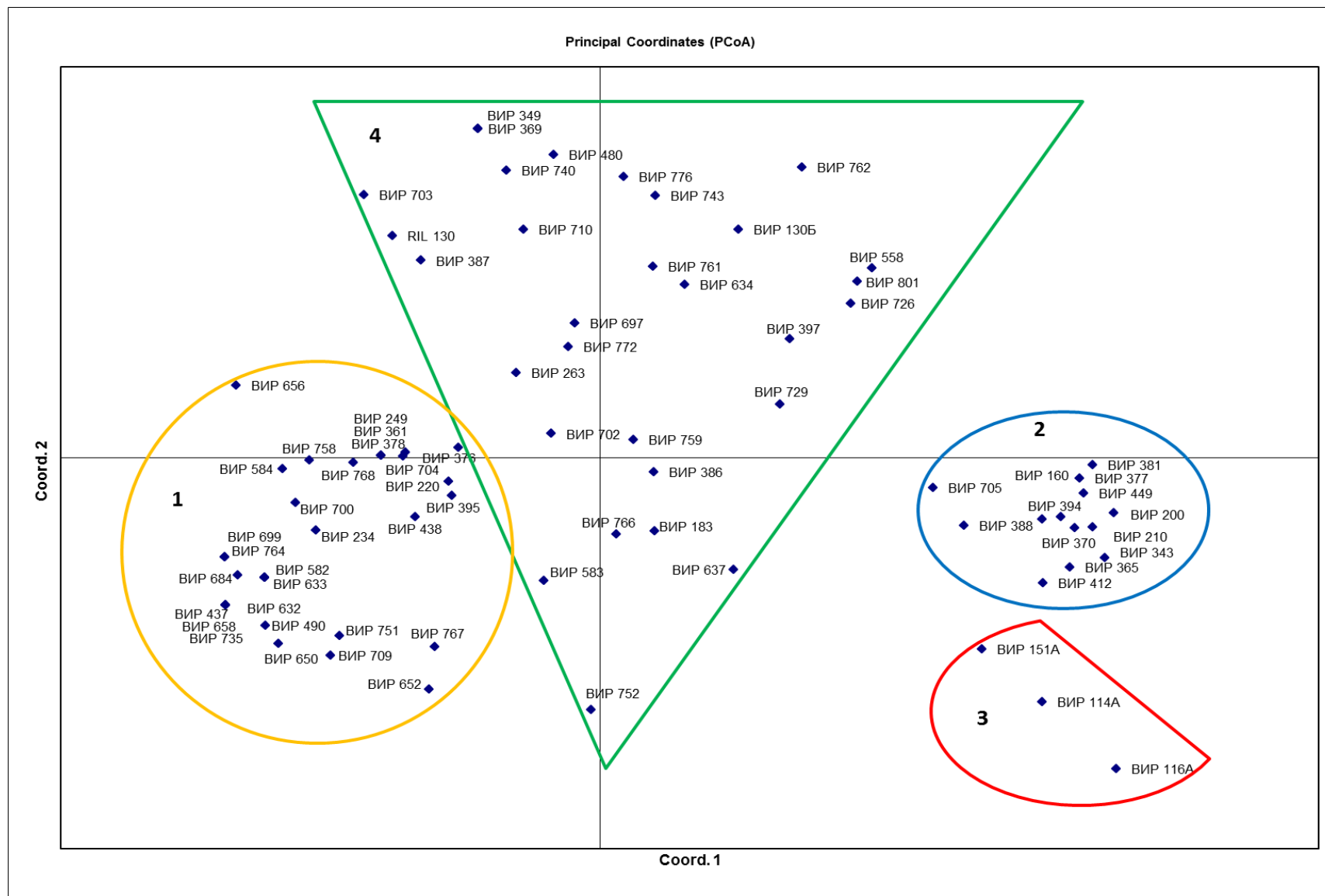


Рисунок 5 – Графическое распределение линий генетической коллекции в зависимости от наличия/отсутствия маркерных фрагментов

Наследование признака восстановления фертильности пыльцы в расщепляющихся гибридных популяциях

С целью определения генотипов линий генетической коллекции по признаку восстановления фертильности пыльцы были проведены две серии скрещиваний. В первой серии скрещиваний материнскими формами служили стерильные линии ВИР 116А и ВИР 111А с ЦМС РЕТ1-типа. Отцовские линии для скрещиваний были отобраны на основе предварительного молекулярного скрининга. Они различались по типу цитоплазмы (фертильная или стерильная), происхождению, наличию молекулярных маркеров гена *Rf1*, полиморфных фрагментов *RFL-PPR*-генов, а также маркеров генов устойчивости к патогенам – возбудителям ржавчины и ЛМР (табл. 4).

Все растения первого поколения гибридов ВИР 116А × ВИР 195, ВИР 116А × ВИР 210, ВИР 116А × ВИР 365, ВИР 116А × ВИР 558, ВИР 116А × ВИР 740, ВИР 116А × RIL 80, ВИР 116А × RIL 130, характеризовались высокими показателями фертильности пыльцы и фенотипически были сходны с материнской линией, независимо от наличия ветвления у отцовских форм.

Растения F₂ анализировали по следующим признакам: мужская фертильность (наличие хорошо развитых пыльников и пыльцы в них), наличие или отсутствие ветвления и наличие или отсутствие дефектов корзинки/пыльников. По признаку восстановления фертильности пыльцы было проанализировано более 100 растений F₂ в каждой комбинации скрещивания, за исключением ВИР 116А × ВИР 558 (93 растения). Во всех семи изученных популяциях F₂ число растений с фертильным и стерильным фенотипом соответствовало теоретическому ожидаемому соотношению 3 : 1, т.е. наблюдался моногенный характер расщепления по данному признаку (табл. 5). Таким образом, результаты гибридологического и молекулярно-генетического анализов позволили предположить наличие гена *Rf1* в генотипах линий ВИР 195, ВИР 210, ВИР 364, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 729, ВИР 740, RIL 80, RIL 130.

Таблица 4 – Характеристика линий, участвовавших в скрещиваниях

Линия	Происхождение	Тип цитоплазмы	Роль в скрещивании	Наличие и размеры маркерных фрагментов, пн											
				STS115	HRG01	HRG02	B20M13 <i>RsaI</i> *	L12D20 <i>HaeIII</i> **	ORS224	ORS511	SSR799	SCO04	SCX20	SCT06	HA4011
ВИР 111А	ВНИИМК № 309	ЦМС PET1	♀	–	–	–	–	2	–	–	–	850	–	–	–
ВИР 116А	сорт Вымпел, Россия	ЦМС PET1	♀	–	–	–	2	2	–	–	–	850	–	–	240
ВИР 195	неизвестно	ЦМС PET1	♂	–	–	–	2	1	–	159	–	950	600	–	–
ВИР 210	неизвестно	ЦМС PET1	♂	–	–	–	2	2	105,106	210-214	–	850	600	950	–
ВИР 211	неизвестно	F	♂	–	–	–	–	2	нет данных	нет данных	нет данных	–	–	950	240
ВИР 365	Прогресс × к-2699, Россия	ЦМС PET1	♀♂	–	–	–	2	1	–	161, 240	–	850	–	950	–
ВИР 449	Гибрид, Румыния	F	♂	–	–	–	2	2	–	159	–	850	600	950	200
ВИР 558	и459886, Австралия	ЦМС PET1	♂	115	–	740	1	1	–	159	–	950	600	950	–
ВИР 637	Гибрид SW 509 × W 637, Франция	ЦМС PET1	♂	115	454	740	1	2	–	–	–	850	–	950	240
ВИР 740	ВИР 113 × Rf, Pl, Россия	F	♂	115	454	740	2	1	143	159	–	950	600	950	200
RIL 80	П1083HR4 × RHA 345 Франция	ЦМС PET1	♂	115	454	740	2	2	143	159	–	950	–	–	–
RIL 130	П1083HR4 × RHA 345 Франция	ЦМС PET1	♂	115	454	740	2	1	143	159	143	950	600	950	200

* Варианты маркера B20M13_*RsaI*: 1 – 140 и 300 пн; 2 – 100, 140, 220 пн** Варианты маркера L12D20_*HaeIII*: 1 – 110, 150, 210, 360 и 400 пн; 2 – 110, 150, 360 и 610 пн.

Таблица 5 – Расщепление гибридов F₂ по признаку восстановления фертильности пыльцы (ППЛ ВИР, 2013-2019 гг.)

Комбинация скрещивания	Число растений с фенотипом, шт			χ^2	<i>p</i>
	фертильных	стерильных	всего растений		
ВИР 116А × RIL 130	94	31	125	0,003	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × RIL 80	106	38	144	0,15	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × ВИР 195	76	32	108	1,23	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × ВИР 210	76	25	101	0,003	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × ВИР 365	98	39	137	0,88	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × ВИР 558	67	26	93	0,43	0,05 < <i>p</i> < 0,8
ВИР 116А × ВИР 740	97	36	103	0,3	0,05 < <i>P</i> < 0,8

$$\chi^2 3,84, df = 1$$

Для проверки гипотезы об аллельности генов *Rf*, присутствующих в генотипах ряда фертильных линий генетической коллекции ВИР, была проведена вторая серия скрещиваний. Для этого материнскую линию ВИР 365, предварительно кастрированную гиббереллином, опыляли пыльцой линий RIL 130. Линия ВИР 365 имеет стерильную (PET1-типа) цитоплазму, однако у нее отсутствуют маркеры гена *Rf1* HRG01 и HRG02. Способность линии ВИР 365 восстанавливать фертильность пыльцы при ЦМС PET1 неоднократно показана в различных сериях скрещиваний. Целью эксперимента была проверка предположения о присутствии доминантных аллелей гена *Rf1* у линии ВИР 365, либо подтверждение альтернативной гипотезы о наличии у нее другого (или других) генов *Rf* (например, *Rfx*). Для проверки этой гипотезы мы получили F₂, а также провели анализирующее скрещивание, при котором линия ЦМС ВИР 111А была опылена пыльцой гибрида F₁ ВИР365 × RIL130. Расщепление на фертильные и стерильные растения в полученной популяции, а также в популяции F₂ ВИР365 × RIL130 отсутствовало. Этот факт можно рассматривать как доказательство наличия у линии ВИР 365 гена *Rf1*. В качестве альтернативной гипотезы можно предположить наличие у линии ВИР 365 другого, отличного от присутствующего у других линий, гена восстановления фертильности пыльцы, но тесно с ним сцепленного (либо находящегося в том же кластере). В пользу этой гипотезы могут свидетельствовать данные литературы о сложной структуре локуса *Rf1* подсолнечника, включающего целый ряд потенциальных генов-кандидатов (Goryunov et al., 2019; Horn et al. 2019; Talukder et al., 2019).

3.3. Цитологический анализ пыльцы

3.3.1. Анализ морфометрических характеристик пыльцы фертильных линий

Для изучения изменчивости морфометрических характеристик пыльцы были отобраны линии RIL 130, ВИР 449, ВИР 558, ВИР 637 и ВИР 740, различавшиеся по происхождению, типу цитоплазмона и наличию диагностических маркеров гена *Rf1*. Линии RIL 130, ВИР 558 и ВИР 740 в тест-скрещиваниях показали себя как восстановители фертильности пыльцы, в то время как у линий ВИР 449 и ВИР 637 отмечена утрата восстановительной способности (Анисимова и др., 2011). Практически у всех проанализированных линий доля окрашенных (фертильных) ПЗ превысила 90%, за исключением линии ВИР 449 (84,4%) (рис. 6). Кроме того, у линии ВИР 449 также зафиксирован большой размах изменчивости диаметра ПЗ (от 22,44 до 55,11 мкм). ПЗ линии ВИР 558 были более выровнены по диаметру (от 21,14 до 42,68 мкм). У линии ВИР 740 отмечено самое высокое содержание фертильных ПЗ (97%), промежуточный уровень варьирования по диаметру (от 24,62 до 48,42 мкм) и отсутствие на цитологических препаратах желтого масляного вещества, окружающего ПЗ (табл. 6). Природа данной субстанции до сих пор не известна. Предполагается, что это избыток спорополленина, образовавшийся в процессе формирования ПЗ (рис. 7) (Орел и др., 1978, Piffanelli et al., 1998). Это вещество препятствует нормальному окрашиванию ПЗ, а также приводит к слипанию пыльцы во время цветения растений.

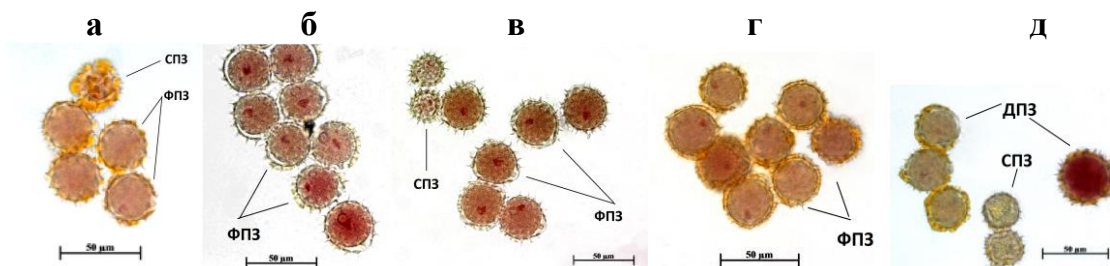


Рисунок 6 – Пыльца фертильных линий: а) ВИР 558, б) ВИР 740, в) ВИР 637, г) RIL 130, д) ВИР 449 то же, что и для ВИР 449 (КОС ВИР, 2014 г.)

Примечание: ФПЗ – фертильные ПЗ, СПЗ – стерильные ПЗ, ДПЗ – дефектные ПЗ.

Таблица 6 – Характеристика пыльцы линий генетической коллекции

Линия (тип цитоплазмона)	Характеристика пыльцы					наличие желтого вещества
	доля фертильных ПЗ, %	Сv, %	диаметр пыльцевого зерна, мкм			
			min	max	ср	
RIL 130 (PET1)	91,5	0,4	11,22	39,4	29,8	+
ВИР 449 (F)	84,4	1,2	22,44	55,11	35,11	+
ВИР 558 (PET1)	91,6	0,6	21,14	42,68	33,41	+
ВИР 637 (PET1)	94,2	0,4	21,94	46,24	32,52	+/-
ВИР 740 (F)	97,0	0,2	24,62	48,42	33,78	-

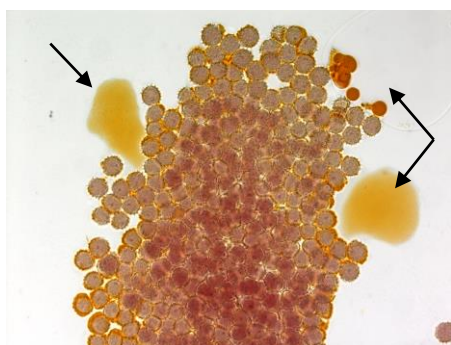


Рисунок 7 – Желтое вещество на цитологическом препарате пыльцы линии RIL 130 (КОС ВИР, 2014 г.)

Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные линии подсолнечника существенно различаются по фертильности ПЗ, их морфометрическим характеристикам, а также наличию дополнительных включений на цитологических препаратах.

3.3.2. Морфометрические характеристики пыльцы гибридов первого поколения

ПЗ растений F₁ ВИР 116А × RIL 130, ВИР 116А × ВИР 210 и ВИР 116А × ВИР 740 были однородны по размеру и характеризовались высокой фертильностью (более 88% окрашенных ПЗ). Кроме того, в каждой из комбинаций были обнаружены единичные микро- и макро- ПЗ, но они не влияли на общую характеристику пыльцы, также ни в одной из комбинаций на цитологических препаратах не было обнаружено желтое вещество (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика пыльцы растений F₁

Линия (тип цитоплазмона)	Характеристика пыльцы					наличие желтого вещества
	доля фертильных ПЗ, %	Сv, %	диаметр пыльцевого зерна			
			min	max	ср	
ВИР 116А × RIL 130	98,5	0,8	9,58	36,11	28,07	-
ВИР 116А × ВИР 210	96,2	1,6	20,52	32,56	27,91	-
ВИР 116А × ВИР 740	88,7	5,6	11,49	34,74	28,12	-

Пыльца гибридных растений во всех трех проанализированных комбинациях была однородной по диаметру, наибольшее число ПЗ имело диаметр 28-29 мкм, что соответствовало единичному пику на диаграмме (рис. 8).

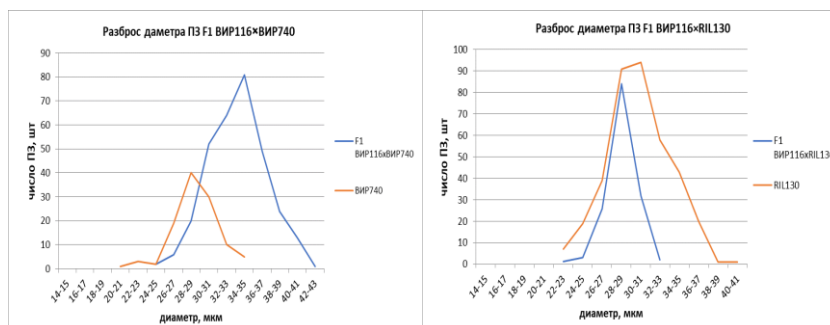


Рисунок 8 – Графики, иллюстрирующие изменчивость по диаметру ПЗ растений F₁ двух комбинаций скрещивания (ППЛ ВИР, 2015-2016 гг.)

Примечание: пик – наибольшая частота ПЗ определенного диаметра

Мы также провели цитологический анализ пыльцы растений гибрида F₁ от скрещивания ВИР 365 × RIL 130, выращенного в двух климатических зонах (ППЛ ВИР и КОС ВИР). По результатам анализа следует, что пыльца растений, выращенных в условиях Северо-Запада (ППЛ ВИР) характеризовалась более высокими показателями фертильности по сравнению с пыльцой растений той же гибридной комбинации, выращенной в условиях Краснодарского края (КОС ВИР). Важно отметить, что в обоих случаях материалом исследования служило потомство одного и того же материнского растения. Фертильность пыльцы растений F₁ ВИР 365 × RIL 130 на КОС ВИР не превышала 61%, в то время как в ППЛ ВИР она составила более 97%. У растений, полученных в результате анализирующего скрещивания ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130), пыльца характеризовалась высокой фертильностью (94,1%) и сравнительно небольшим варьированием по диаметру (от 20,79 до 33,65 мкм) в отличие от F₁ ВИР 365 × RIL 130 (от 21,07 до 35,57 мкм – ППЛ ВИР; от 19,42 до 38,3 мкм – КОС ВИР). Выявленные различия между растениями одной и той же гибридной комбинации, выращенными в разных климатических зонах, могут быть обусловлены различными условиями окружающей среды в период микроспорогенеза и микрогаметогенеза.

Таким образом, результаты исследования показали, что линии ВИР 210, ВИР 740 и RIL 130 при гибридизации со стерильной линией восстанавливают фертильность пыльцы до уровня 88-98%. У гибрида F₁ ВИР 365 × RIL 130 выявлены различия по степени восстановления фертильности и по качеству пыльцы в зависимости от условий выращивания.

3.3.3. Наследование особенностей фертильности пыльцы в расщепляющихся гибридных популяциях

Анализировались растения расщепляющихся гибридных популяций ВИР 116А × RIL 130, ВИР 116А × ВИР 210 и ВИР 116А × ВИР 740. В каждой из популяций F₂ были обнаружены «малопыльцовые» растения (их обозначили F/S), доля которых составляла в среднем 12,5% от числа фертильных растений и около 9% от общего числа растений в популяции. Во всех случаях фенотип «малопыльцовых» растений (фенотипический класс F/S) отличался от фенотипа высокофертильных растений (F) дефектами пыльников и корзинки, а также значительно меньшим, чем обычно, количеством пыльцы в соцветии (рис. 9).



Рисунок 9 – Растения комбинации F_2 ВИР 116А × ВИР 740: а) стерильное растение, б) фертильное растение, в, г) «малопыльцовые» растения (ППЛ ВИР, 2015 г.)

Мы предположили, что выщепление в F_2 группы «малопыльцовых» растений в каждой из комбинаций, полученных с участием одной и той же материнской формы, имеет генетическую основу. Это дало основание для выделения «малопыльцовых» растений в отдельный фенотипический класс. Заметим, что появление «малопыльцовых» форм с такой же частотой наблюдалось ранее и при анализе межлинейных гибридов, полученных с участием другой материнской линии с ЦМС РЕТ1-типа – ВИР 109А (Анисимова и др., 2014).

Во всех трех проанализированных гибридных комбинациях процент окрашенных (фертильных) ПЗ превышал 90% у высокофертильных растений F_2 , что соответствовало уровню фертильности растений F_1 . В то же время доля фертильных ПЗ у «малопыльцовых» растений составляла менее 72%. Процент фертильных ПЗ у растений с высоким уровнем фертильности пыльцы варьировал незначительно (C_v 4,1-5,7%), тогда как у «малопыльцовых» значения коэффициента вариации колебались от 12,8% до 38,6%. Пыльца «малопыльцовых» растений характеризовалась следующими особенностями: частота окрашенных (фертильных) ПЗ была ниже, чем у растений с высоким уровнем фертильности (11-78% и 80-100% соответственно), а содержание аномальных ПЗ достигало 88,5% у «малопыльцовых» и 18% у высокофертильных растений (рис. 10). У растений F_2 с высоким уровнем фертильности пыльцы диаметр ПЗ существенно не различался в пределах отдельных комбинаций. Следует отметить, что диаметр стерильных ПЗ варьировал в более широких пределах по сравнению с диаметром фертильных за счет наличия микро- и макро-ПЗ и составил 9,85-32,01 мкм у растений с высокой фертильностью пыльцы и 8,48-36,66 мкм – у «малопыльцовых».

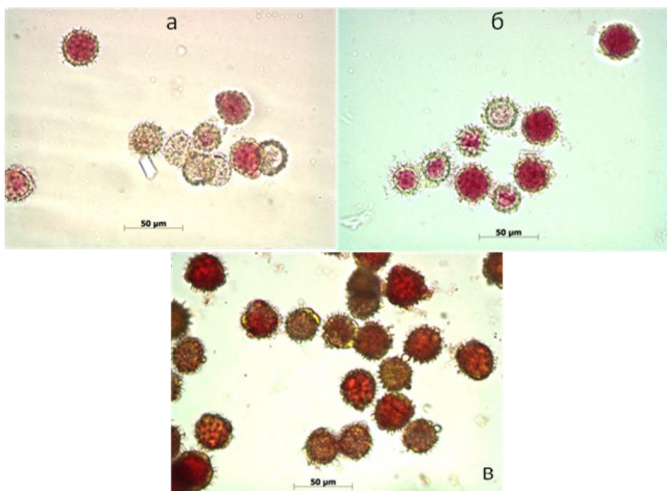


Рисунок 10 – Цитологические препараты пыльцы «малопыльцовых» растений F_2
а) ВИР 116А × ВИР 740,
б) ВИР 116А × ВИР 210,
в) ВИР 116А × RIL 130
(ППЛ ВИР, 2015-2016 гг.)

Для проверки гипотезы нормальности распределения растений F_2 гибридов по фертильности использовали критерий Шапиро-Уилка. С помощью программы Statistica 6.0. были построены гистограммы распределений (рис. 11). Во всех трех комбинациях кривые значительно смещены от центра, а уровень значимости $p < 0,05$ (значения критерия Шапиро-Уилка от 0,58 до 0,82) подтверждает ненормальность распределений в изученных выборках. Профили распределения групп растений с различным уровнем фертильности пыльцы у трех комбинаций совпадали, что может свидетельствовать об участии сходных генетических механизмов в контроле признака в разных комбинациях скрещиваний.

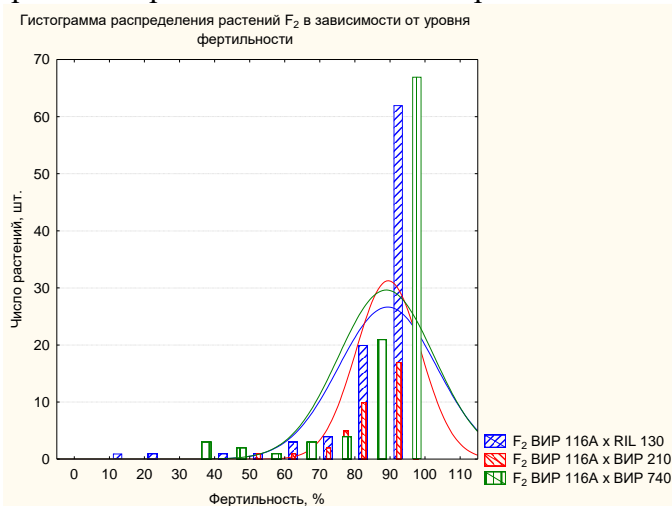


Рисунок 11 – Распределение растений F_2 в зависимости от уровня фертильности в трех различных комбинациях скрещиваний (критерий Шапиро-Уилка, $p < 0,05$).

Исходя из результатов анализа расщеплений, можно предположить, что отцовские линии всех трех комбинаций скрещиваний отличались от материнской по аллелям одного главного гена, контролирующего признак восстановления фертильности пыльцы – очевидно, *Rf1*. Для определения генотипов растений F_2 по локусу *Rf1* был проведен молекулярный анализ с использованием сцепленных с геном *Rf1* SCAR-маркеров HRG01 и HRG02. Популяция F_2 VIP 116A × VIP 210 не расщеплялась по наличию молекулярных маркеров HRG01 и HRG02, поскольку эти маркеры отсутствовали у родительских форм. Фертильные растения гибридов VIP 116A × RIL 130 и VIP 116A × VIP 740, в том числе и относившиеся к фенотипическому классу «малопыльцовых», за единичными исключениями, характеризовались наличием обоих маркеров, что подтверждает присутствие в их генотипах доминантного аллеля гена *Rf1* в гомо- или гетерозиготном состоянии. Кроме того, фертильные и «малопыльцовые» растения всех трех популяций имели SSR-маркер ORS511, тогда как у стерильных растений этот маркер отсутствовал. Таким образом, с помощью молекулярного анализа подтверждено присутствие доминантного аллеля гена *Rf1* в генотипах большинства как высокофертильных, так и «малопыльцовых» растений F_2 , а также его отсутствие – у стерильных. Однако гипотеза моногенного контроля не позволяет объяснить появление класса «малопыльцовых» растений. Для объяснения характера полученных расщеплений проверяли гипотезы о наличии двух генов с различным типом взаимодействия (при условии независимого наследования), однако ни одна из них не подтвердилась как в настоящем исследовании, так и при анализе гибридных комбинаций, полученных в другой работе (Анисимова и др., 2014). Известно, что при наличии в генотипе одного доминантного аллеля *Rf1* фертильность пыльцы гибридов F_1 подсолнечника восстанавливается почти полностью (Vassilevska-Ivanova, Tsekova, 2003). Это подтверждено и в настоящем исследовании. В таком случае появление в F_2 рекомбинантов с пониженной фертильностью пыльцы (и ассоциированным с этим признаком характерным фенотипом «малопыльцовости») можно объяснить негативными эффектами рецессивных аллелей генов, полученных от материнского родителя. Растения с пониженной фертильностью пыльцы отмечались в F_2 гибридов от скрещиваний линий ЦМС с восстановителями фертильности

пыльцы у других видов растений; их фенотип обозначали как полуфертильный или полустерильный, а пониженную фертильность на фоне ЦМС объясняли действием полимерных генов, модификаторов, эффектами QTL либо влиянием генетического фона (Elkonin, 2005; Gabay-Laudhnan et al., 2009; Jordan et al., 2010; Meyer et al., 2011; Sinha et al., 2013).

3.4. Анализ диагностической ценности маркеров гена *Rf1*

В таблице 8 представлены результаты анализа ассоциаций между наличием молекулярных маркеров у изученных линий генетической коллекции ВИР и способностью линии восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность при скрещивании с линией ЦМС РЕТ1. Ни один из пяти изученных маркеров не обладал 100%-ной эффективностью, т.е. его присутствие/отсутствие не всегда однозначно свидетельствовало о наличии (или отсутствии) функционального аллеля гена. В этом плане более эффективен митохондриальный маркер *orfH522*: его наличие свидетельствует о стерильном типе цитоплазмы и практически всегда о наличии доминантного аллеля гена *Rf1*. Однако в тех случаях, когда линия имеет фертильную цитоплазму, маркер *orfH522* вряд ли может быть использован. Среди маркеров гена *Rf1* наиболее высокой диагностической ценностью характеризовался ORS511 (он отсутствовал лишь у пяти из 67 линий-восстановителей).

Таблица 8 – Оценка диагностической ценности ядерных молекулярных маркеров гена *Rf1* на материале линий генетической коллекции ВИР

Группа линий	Число линий с молекулярным маркером и без него														
	STS115		Y10		K13		ORS224		ORS511		ORS799		HA4011		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	240 пн	200 пн	-
Стерильные линии	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	2	1	3	0	0
Закрепители стерильности (ВИР 130Б, ВИР 160, ВИР 387, ВИР 449, ВИР 637)	4	1	3	2	2	3	1	4	3	2	2	3	2	3	0
Линии-восстановители фертильности со стерильной цитоплазмой (подтвержденной наличием маркера <i>orfH522</i>)	49	12	48	13	41	20	40	21	58	3	35	26	30	24	7
Линии-восстановители с фертильной цитоплазмой	5	1	4	2	4	2	3	3	4	2	0	6	1	5	0

Среди изученных маркерных локусов лишь SCX20 и SCT06 (маркеры гена *R_{adv}*) наследовались независимо от локуса *Rf1*. Коэффициенты рекомбинации между локусом *Rf1* и локусами SCAR-маркеров SCX20 и STO06 в F₂ от скрещиваний ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130 составили около 50%. Этот результат свидетельствует о том, что гены *Rf1* и *R_{adv}* находятся в разных плечах хромосомы 13. Для других локусов (STS115, HRG01, HRG02, ORS511, HA4011) наблюдали сцепленное наследование с признаком восстановления фертильности пыльцы (геном *Rf1*), причем коэффициенты рекомбинации различались в разных комбинациях скрещиваний. Среди изученных маркерных локусов ближе всех к *Rf1* расположен ORS511 (2,2 сМ и 3,3 сМ соответственно) (рис. 16). Это расстояние меньше значения 5,5 сМ, полученного В. Yue et al. (2010). В то же время в комбинации ВИР 116А × ВИР 210 расстояние между локусами *Rf1* и ORS511 оказалось вдвое больше и

составило 7,5 сМ. Расстояния между локусом *Rfl* и маркерными локусами HRG01 и HRG02 оказались выше полученных в работе R. Horn с соавторами (2003). SSR-маркер HA4011, специфичный для локуса *P15/P18*, контролирующего устойчивость к ЛМР, наследовался сцеплено с признаком восстановления фертильности пыльцы. Коэффициент рекомбинации между локусами HA4011 и *Rfl* в двух расщепляющихся гибридных популяциях F₂ – ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130 – составил 26% и 16,4% соответственно. Следовательно, SSR-маркер HA4011 может быть использован в качестве дополнительного к маркерам ORS511, HRG01, HRG02 для идентификации генотипов подсолнечника, несущих ген восстановления фертильности пыльцы *Rfl*. Это особенно актуально для линий, у которых отсутствуют диагностические маркеры гена *Rfl*. Так, например, линия-восстановитель фертильности пыльцы со стерильной цитоплазмой ВИР 365 не имеет маркеров HRG01 и HRG02, но характеризуется наличием SSR-маркера HA4011. Таким образом, HA4011 может служить дополнительным диагностическим маркером гена *Rfl* линии ВИР 365, а также и ряда других линий генетической коллекции подсолнечника. Кроме того, маркер HA4011 – кодоминантен и поэтому он может быть использован в маркер-опосредованной селекции для выявления гомозиготных генотипов в расщепляющихся гибридных популяциях F₂, что позволит ускорить процесс создания родительских линий гибридов.

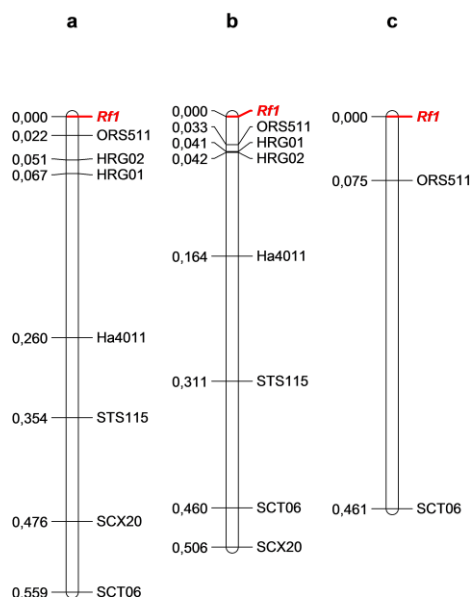


Рисунок 16 – Схемы взаимного расположения диагностических маркеров и локуса *Rfl*, построенные по данным анализа расщепляющихся гибридных популяций
а) F₂ ВИР 116А × ВИР 740,
б) F₂ ВИР 116А × RIL 130, в) F₂ ВИР 116А × ВИР 210

Согласно полученным результатам, в качестве наиболее эффективных для маркер-опосредованного отбора носителей гена *Rfl* из расщепляющихся гибридных популяций могут быть предложены маркеры ORS511, HRG01 и HRG02. Следует отметить, что диагностическая ценность этих маркеров проверена на гибридах, полученных с участием линий ВИР 740 и RIL 130, зарегистрированных в ВИР в качестве перспективных доноров признака восстановления фертильности пыльцы.

Заключение

С использованием методов молекулярного маркирования, секвенирования ПЦР-фрагментов, гибридологического и цитологического анализов изучено генетическое разнообразие линий генетической коллекции подсолнечника ВИР по признаку восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности РЕТ1-типа. В результате молекулярного скрининга сформирована выборка из 75 фертильных линий и линий ЦМС. С помощью метода главных координат линии объединены в четыре группы, различающиеся по типу цитоплазмы, а также по сочетаниям маркерных фрагментов (аллелей). У семи линий выявлены уникальные аллели микросателлитных локусов ORS224 и

ORS511, сцепленные с геном *Rf1*. Они отличаются от часто встречающихся аллельных вариантов по длине и числу повторяющихся единиц, наличию вставок и нуклеотидных замен во фланкирующих последовательностях. Длина типичного аллеля локуса ORS224 составляет около 143 пн, уникальных – 105 и 106 пн. Размер типичного аллеля локуса ORS511 равняется примерно 156 пн, а его вариантов – от 198 до 244 пн. У линий ВИР 365, ВИР 377 и ВИР 705 уникальный аллель локуса ORS511 представлен двумя сцепленно наследуемыми фрагментами длиной 161 и 240 пн. По результатам гибридологического анализа, линии-восстановители фертильности пыльцы ВИР 195, ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 740, RIL 80 и RIL 130, различающиеся по типу цитоплазмы и наличию диагностических маркеров гена *Rf1*, в том числе уникальных аллелей микросателлитных локусов, несут доминантный аллель гена *Rf1*, широко используемый в гибридной селекции. В F₂ от скрещивания этих линий со стерильной линией ВИР 116А (PET1) восстановление фертильности наследуется как моногенный признак. Гены восстановления фертильности линии ВИР 365, не имеющей большинства диагностических маркеров гена *Rf1*, и линии RIL130 – аллельны.

Пыльцевые зерна (ПЗ) гибридов F₁ от скрещиваний линии ЦМС с линиями-восстановителями выравнены по диаметру и обладают высокой (более 90%) фертильностью. Уровень фертильности пыльцы растений F₂ составляет более 80%; морфометрические параметры ПЗ варьируют в более широких пределах, чем у растений F₁. Около 9% растений F₂ от скрещивания стерильной линии с линиями-восстановителями продуцируют небольшое количество пыльцы и классифицируются как «малопыльцовые». Их пыльца имеет пониженную (11-78%) частоту фертильных ПЗ по сравнению с высокофертильными растениями (80-100%) и содержит больше аномальных ПЗ (до 88,5%), чем у растений с нормальной (до 18%) фертильностью. По данным молекулярного анализа, «малопыльцовые» растения несут доминантный аллель *Rf1*. По результатам анализа ассоциаций между наличием признака и молекулярных маркеров, а также по данным оценки частоты рекомбинации в расщепляющихся гибридных популяциях для идентификации аллеля *Rf1* в генотипах линий генетической коллекции ВИР могут быть использованы микросателлитный маркер ORS511 и SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, а также митохондриальный маркер orfH522. Генетическое расстояние между локусом *Rf1* и маркерами в зависимости от комбинации скрещивания составило от 2,2 до 7,5 сМ.

**Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:
Статьи в журналах из перечня ВАК:**

1. Анисимова, И. Н. Коллекция подсолнечника в исследованиях генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы / И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, Н. В. Алпатьева, Е. Б. Кузнецова, **Ю. И. Карабицина**, В. Т. Рожкова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2014. – Т. 175. – № 4. – С. 65–74.
2. Анисимова, И. Н. Идентификация генов хозяйственно ценных признаков подсолнечника на основе молекулярного скрининга / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, **Ю. И. Карабицина**, Е. Б. Кузнецова, В. Т. Рожкова, В. А. Гаврилова // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 7. – С. 39–42.
3. **Карабицина, Ю. И.** Молекулярное маркирование линий подсолнечника, различающихся по способности к супрессии фенотипа цитоплазматической мужской стерильности / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, Н. В. Алпатьева, А. Г. Пинаев, Е. Б. Кузнецова, В. Т. Рожкова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2016. – Т. 177. – № 2. – С. 99–107. – DOI: 10.30901/2227-8834-2016-2-99-107
4. Анисимова, И. Н. Полиморфные варианты *RFL-PPR*-генов подсолнечника как молекулярно-генетические маркеры / И. Н. Анисимова, **Ю. И. Карабицина**, Н. В. Алпатьева, Е. Б. Кузнецова, В. А. Гаврилова, Е. Е. Радченко / Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2017. – Т. 178. – № 3. – С. 82–90. – DOI: 10.30901/2227-8834-2017-3-82-90
5. **Karabitsina, Yu. I.** Peculiarities of inheritance of pollen fertility restoration trait in sunflower with cytoplasmic male sterility / Yu. I. Karabitsina, V. A. Gavrilova, N. V. Alpatieva, E. B. Kuznetsova, I. N. Anisimova // Russian Journal of Genetics. – 2019. – V. 55. – № 11. – P. 1375–1382. – DOI: 10.1134/S0016675819110079

Прочие издания – материалы конференций, в том числе:

1. Анисимова, И. Н. Коллекция подсолнечника в исследованиях генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы / И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, Н. В. Алпатьева, Е. Б. Кузнецова, **Ю. И. Карабицина**, В. Т. Рожкова // Тез. докл. междунар. науч. конф. «Генетические ресурсы растений - основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни». – 2014. – С. 43.
2. Anisimova, I. N. Genetic diversity of sources for male sterility and restoration of fertility in sunflower collection / I. N. Anisimova, N. V. Alpatieva, **Yu. I. Karabitsina**, E. V. Kuznetsova, V. T. Rozhkova, M. V. Duca, V. A. Gavrilova // Abstract Book «The Xth International Congress of Geneticists and Breeders». – Moldova, 2015. – P. 66.
3. Анисимова, И. Н. Полиморфизм гомологов генов восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, **Ю. И. Карабицина**, Е. Б. Кузнецова, В. А. Гаврилова, Е. Е. Радченко // Материалы междунар. научн. конф. «Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». – СПб, 2016. – С. 77–78.
4. Гаврилова, В. А. Создание и применение генетической коллекции подсолнечника ВИР / В. А. Гаврилова, И. Н. Анисимова, О. Н. Воронова, **Ю. И. Карабицина**, В. Т. Рожкова // Тез. докл. II Междунар. конф. «Генофонд и селекция растений». – Новосибирск, 2016. – С. 18–19.
5. **Карабицина, Ю. И.** Особенности наследования признака фертильности пыльцы у межлинейного гибрида подсолнечника / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, О. Н. Воронова, Н. В. Алпатьева, В. А. Гаврилова // Тез. докл. V Междунар. школы для молодых ученых «Эмбриология, генетика, биотехнология». – СПб, 2016. – С. 94–95.

6. Анисимова, И. Н. *RFL-PPR*-гены и перспективы их использования в селекционно-генетических исследованиях / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, **Ю. И. Карабицина**, В. А. Гаврилова, Т. А. Гавриленко, Е. Е. Радченко // Тез. докл. IV Вавиловской междунар. науч. конф. «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире». – СПб, 2017. – С. 223.
7. **Карабицина, Ю. И.** Генетический анализ признака восстановления фертильности пыльцы у линий подсолнечника коллекции ВИР / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, Е. Б. Кузнецова, В. А. Гаврилова // Тез. докл. IV Вавиловской междунар. науч. конф. «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире». – СПб, 2017. – С. 185–186.
8. **Карабицина, Ю. И.** Характеристика линий подсолнечника, перспективных для создания гетерозисных гибридов / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, В. А. Гаврилова, А. Г. Семенова // Материалы междунар. научно-практ. конф. «Роль молодых учёных в решении актуальных задач АПК». – СПб, 2017. – С. 40–42.
9. Гаврилова, В. А. Каталог мировой коллекции ВИР / В. А. Гаврилова, И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, В. Т. Рожкова, Т. Г. Ступникова, **Ю. И. Карабицина**, Е. Б. Кузнецова // под ред. Е. А. Соколовой – СПб. Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, 2017 – 23 с.
10. **Карабицина, Ю. И.** Генетическое разнообразие линий подсолнечника коллекции ВИР по локусу *P15/P18*, определяющему устойчивость к *Plasmopara halstedii* / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, А. Г. Семенова // Материалы Междунар. научно-практ. конф. «Роль молодых учёных в решении актуальных задач АПК». – СПб, 2018. – С. 20–23.
11. Анисимова, И. Н. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле. Методические указания / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, Р. А. Абдуллаев, **Ю. И. Карабицина**, Е. Б. Кузнецова // под ред. Е. Е. Радченко. – СПб. Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, 2018 – 47 с.
12. Алпатьева, Н. В. Диагностическая ценность SSR-маркера HA4011 для идентификации генотипов подсолнечника, несущих гены *P18* и *Rf1* / Н. В. Алпатьева, И. Н. Анисимова, **Ю. И. Карабицина**, Е. Б. Кузнецова, В. А. Гаврилова // Тез. докл. междунар. конф. «125 лет прикладной ботаники в России». – СПб, 2019 – С. 109.
13. **Карабицина, Ю. И.** Генетическое разнообразие линий подсолнечника по признаку восстановления фертильности пыльцы / Ю. И. Карабицина, И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, Е. Б. Кузнецова, В. А. Гаврилова // Тез. докл. междунар. конф. «125 лет прикладной ботаники в России». – СПб, 2019 – С. 141.