ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н. И. ВАВИЛОВА» (ВИР)

На правах рукописи

Карабицина Юлия Игоревна

«Генетическое разнообразие линий и наследование признака восстановления фертильности пыльцы подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-PET1»

03.02.07 – Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
И.Н. Анисимова

Санкт-Петербург – 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
1.1.Цитоплазматическая мужская стерильность у растений 11
1.2.Гены, восстанавливающие фертильность пыльцы 14
1.3.Признак ЦМС у подсолнечника 20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ 31
2.1. Растительный материал и условия вегетации 31
2.2. Молекулярно-генетический анализ 33
2.2.1. Выделение ДНК 33
2.2.2. Постановка ПЦР 34
2.2.3. Рестрикционный анализ 39
2.2.4. Клонирование фрагментов ДНК 39
2.3. Гибридологический анализ 41
2.4. Цитологический анализ пыльцы 42
2.5. Статистический анализ 43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 45
3.1. Генотипирование линий генетической коллекции подсолнечника ВИР 45
3.1.1. Генотипирование линий, с помощью маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf* 45
3.1.2. Генотипирование линий с помощью маркеров *PPR*-генов 55
3.1.3. Генотипирование линий с помощью молекулярных маркеров генов устойчивости к болезням 57
3.1.4. Структурирование изученной выборки линий 59
3.2. Наследование признака восстановления фертильности пыльцы в межлинейных скрещиваниях 63
3.3. Особенности наследования морфометрических параметров пыльцы при межлинейных скрещиваниях 71
3.3.1. Характеристика пыльцы отцовских линий 71
3.3.2. Характеристика пыльцы F_1 межлинейных гибридов 74

3.3.3. Изменчивость признака восстановления фертильности пыльцы в расщепляющихся гибридных популяциях 77
3.4. Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rf1* 86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 96
Список сокращений 98
Список литературы 99
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 126

ВВЕДЕНИЕ

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, занятой 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 проявляется 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, 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; Жуков и др., 2008).

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 семейства 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) PET1-типа, полученная P. Leclerq (1969) на основе межвидового гибрида *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus*. Мужская стерильность PET1-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 PET1 подсолнечника изучена недостаточно. Сообщалось о разном числе генов, контролирующих восстановление фертильности пыльцы при ЦМС PET1, однако до сих пор единого мнения по этому вопросу нет (Enns et al., 1970; Kinman, 1970; Fick, Zimmer, 1974; Vranceanu, Stoenescu, 1978; Whelan, 1980; Seilar, Jan, 1994; Serieys, 1999; Rukmini Devi, 2002; Sujatha et al., 2011). Полагают, что для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС PET1-типа необходимо присутствие в генотипе главного гена *Rf1*, локализованного в 13 группе сцепления. Данные об особенностях проявления признака восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника немногочисленны (Horn, Friedt, 1997; Liu et al., 2013, Воронова, Гаврилова, 2019). Гибриды F_1 характеризуются высоким уровнем фертильности пыльцы (Jan, 2000; Vassilevska-Ivanova, Tcekova, 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), однако его аннотация еще продолжается 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; Усатов и др., 2011, 2017; Маркин и др., 2009, 2013; Horn et al., 2003, 2019; Челюстникова и др., 2017).

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 – ЦМС и восстановителей 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 ряда линий по локусу (локусам) генов *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*.

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 PET1-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, сцепленные 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 F_2. 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 PET1 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 локусами молекулярных маркеров группы сцепления 13, несущей гены для ряда хозяйственно ценных признаков (восстановление фертильности пыльцы, устойчивость к возбудителю ржавчины и ложной мучнистой росы) и локусом *Rf1* 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, могут перспективны для идентификации доминантного аллеля *Rf1* в генотипах линий генетической коллекции ВИР, а также гибридов, полученных с их участием.

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 нуклеиновых кислот, 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. Линии генетической коллекции ВИР характеризуются значительным генетическим разнообразием, выявленным с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Rf1, R1,* R_{adv}*, Pl5/Pl8, RFL-PPR.*
2. Способность к восстановлению фертильности пыльцы при скрещиваниях с линией ЦМС PET1 определяется присутствием в генотипах линий генетической коллекции доминантного аллеля гена *Rf1* и не зависит от типа цитоплазмы линии-восстановителя (фертильная/стерильная) и наличия/отсутствия большинства диагностических маркеров.
3. Признак «малопыльцовости», проявляющийся в F_2 от скрещиваний линии ЦМС с линиями-восстановителями 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 и 14 научных работ в других изданиях.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Цитоплазматическая мужская стерильность у растений

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – наследуемый по материнской линии признак, при котором растение не способно продуцировать жизнеспособную пыльцу (Даниленко, Давыденко, 2003). Явление ЦМС было открыто М. М. Роудсом в 1931 г. (Rhoades, 1931) и, независимо от него, в Советском Союзе М. И. Хаджиновым в 1932 г. (Хаджинов, 1957, 1961) у кукурузы. ЦМС может возникать в популяциях цветковых растений спонтанно, но чаще всего является результатом отдаленной гибридизации (Kaul, 1988, Hanson, Bentolila, 2004; Horn et al., 2010, 2014; Reddemann, Horn, 2018). Число видов, у которых описан признак ЦМС, определить достаточно сложно. Согласно одним источникам, ЦМС известна у более 150 видов растений (Carlsson et al., 2008; Chen et al., 2017), по другим – более 300 (Garcia et al., 2019).

В настоящее время селекция многих сельскохозяйственных растений направлена на создание гибридов. Для проведения контролируемого опыления и снижения трудоемких ручных затрат на кастрацию и опыление с целью массового получения гибридных семян все чаще используют ЦМС либо генную (ядерную) мужскую стерильность. Первые простые гибриды на стерильной основе были получены в 1947-1948 гг. Д.Ф. Джонсоном и П. К. Мангельсдорфом (Mangelsdorf, 1951) у кукурузы. В настоящее время основными культурами, в производстве которых используются системы ЦМС, являются кукуруза, подсолнечник, рапс, рис, рожь. Фенотипическое проявление ЦМС у разных видов растений различно. При ЦМС у растений в большинстве случаев происходят нарушения в развитии пыльников, однако есть случаи изменения структуры других органов цветка (Carlsson et al., 2008). Например, у петунии и кукурузы цветки стерильных растений не отличаются от цветков нормальных фертильных растений, но в пыльниках стерильных растений отсутствует пыльца, либо наблюдается их деформация; у подсолнечника нередко пыльники и вовсе не

выдвигаются за пределы цветка (рис. 1). У редиса, моркови, пшеницы и мексиканского перца ЦМС вызывает превращение пыльников в петалоидные и карпелоидные гомеотические структуры (Hanson, Bentolila 2004; Бухарова, Бухаров, 2008). У азиатской моркови идентифицированы два типа ЦМС с различным фенотипическим проявлением: в одном случае пыльники преобразуются в лепестки, в другом – пыльники дефектные и имеют коричневый цвет (Kalia et al., 2019). Механизмы этих процессов изучены недостаточно (Kubo, Newton, 2008; Carlsson et al., 2008). Значительная изменчивость в фенотипическом проявлении стерильности у форм с различными типами ЦМС указывает на разные механизмы, лежащие в основе этого признака, однако наиболее часто нарушения отмечаются на стадии мейоза или пост-мейоза (Gillman et al., 2008; Юрина, Одинцова, 2010).

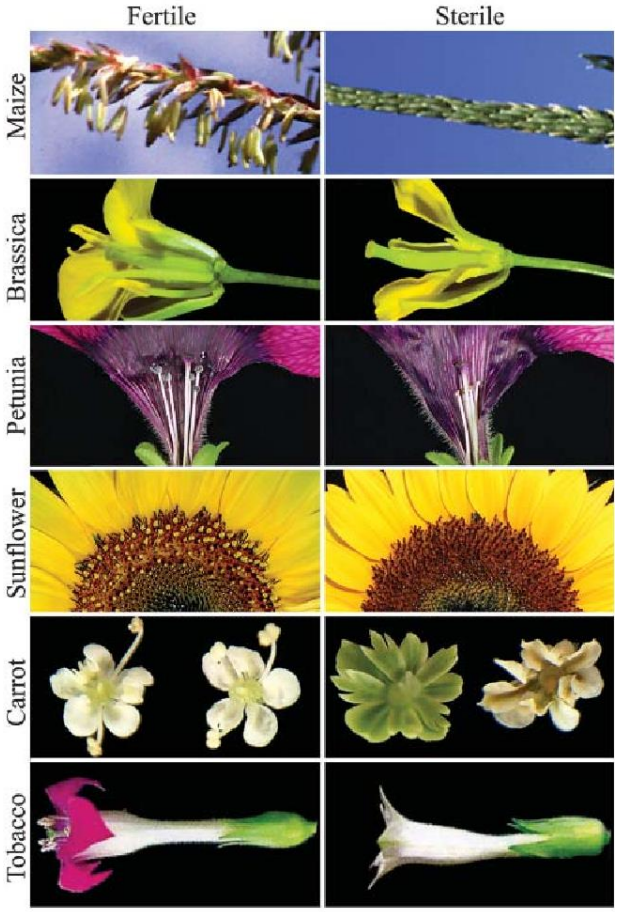


Рисунок 1 – Морфология генеративных органов некоторых видов растений при нормальном развитии и при ЦМС (по Hanson, Bentolila, 2004)

Помимо практической значимости, ЦМС как результат нарушений согласованной работы геномов ядра и митохондрий представляет идеальную модель для выяснения генетических механизмов ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. Изучению генетической, цитологической и эмбриологической природы ЦМС посвящен ряд работ (Han et al., 2017; Kim, Zhang, 2018; Воронова, Гаврилова, 2019; Wang et al., 2020). Анализ цитологии мужской стерильности у различных культурных растений показал, что процесс стерилизации пыльцевых зерен в пыльнике происходит несинхронно. Для пыльцевых зерен стерильных растений характерны аномальная вакуолизация генеративных и вегетативных клеток, гидратация кариоплазмы ядра вегетативной клетки, нарушение движения генеративной клетки, нарушение движения ядер в микроспоре и вегетативной клетке (Орел, 1968). Характерным признаком ЦМС является аномальное состояние тапетума, слоя клеток, через который происходит питание микроспороцитов. У одних растений с ЦМС происходит преждевременное разрушение клеток тапетума (Орел, 1978), у других – задержка лизиса тапетального слоя клеток, а для многих растений с ЦМС свойственны его гипертрофия, многоядерность и активное разрастание в полость гнезда пыльника. Отмечаются нарушения конъюгации и расхождении хромосом в мейозе, образование микро- и макро- ядер (Устинова, 1964; Орел, 1978; Воронова, 2014). Например, у ЦМС-линий перца в мейозе, наряду с бивалентами, отмечены квадриваленты и униваленты. Дегенерация микроспор начиналась либо после стадии тетрад в результате нарушения высвобождения микроспор (не растворяется каллоза) либо (в некоторых случаях) на других стадиях микроспоргенеза (Vesselina et al., 2010). В результате этих нарушений наблюдается масса «пустых» пыльцевых зерен (без цитоплазмы и ядер) в дегенерирующих пыльниках.

В большинстве случаев ЦМС связывают с работой так называемых «химерных генов» (Singh, Brown, 1991; Hanson, Bentolila, 2004; Satoh et al., 2004; Chase, 2007; Mackenzie, 2010; Woloszynska, 2010; Chen, Liu, 2014; Tan et al., 2015; Makarenko et al., 2019). Они возникают в результате множественных перестроек

последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК) и чаще всего включают в себя копии (или их фрагменты) генов «домашнего хозяйства» митохондрий и (или) последовательности (orf), кодирующие специфичные для ЦМС белки. Такие изменения в мтДНК приводят к образованию новых открытых рамок считывания, которые кодируют токсичные для развития пыльцы белки и, как следствие, – к стерильности. Ассоциированные с ЦМС локусы могут включать последовательности генов *cox* и *nad,* кодирующих белковые компоненты дыхательной цепи; фрагменты генов ядерной или хлДНК, но чаще всего содержат гены, кодирующие разные субъединицы АТФ-синтаз (*atp*), либо локализованы вблизи этих генов (Arrieta-Montiel et al., 2001; Даниленко, Давыденко, 2003; Hanson, Bentolila, 2004; Sofi et al., 2007; Mackenzie, 2010; Li et al., 2013; Анисимова, Гавриленко, 2017; Reddemann, Horn, 2018; Kalia et al., 2019).

1.2. Гены, восстанавливающие фертильность пыльцы

Для селекции гибридов на основе ЦМС необходимы специфические ядерные гены, эффект действия которых преодолевает действие ЦМС-генов. Эти доминантные гены при взаимодействии с митохондриальными генами, ассоциированными с ЦМС, обеспечивают восстановление фертильности пыльцы, однако действие их специфично и индивидуально для разных видов растений и типов ЦМС. Такие гены получили название *Rf (Restoration of fertility*), а генетические системы, основанные на использовании ЦМС и генов *Rf* – системами ЦМС-*Rf*. Селекция гетерозисных гибридов включает создание материнских стерильных линий ЦМС, закрепителей стерильности (фертильных аналогов стерильных линий) и отцовских линий-восстановителей фертильности, которые несут функциональные (как правило, доминантные) аллели генов *Rf*. В настоящее время основная проблема селекции гибридов у многих культур – ограниченное генетическое разнообразие линий – источников стерильности и закрепителей стерильности (Jordan et al., 2010, 2011; Mindaye et al., 2016).

Поэтому особое значение придается поиску новых линий-закрепителей и линий-восстановителей. Используя стерильную линию, можно путем обратных насыщающих скрещиваний (серии беккроссов) перевести любую женскую линию на стерильную основу, т. е. сделать ее стерильной.

Одним из классических методов изучения признака восстановления фертильности пыльцы и присутствия у линий генов *Rf* является гибридологический анализ. В селекции гибридов используют стабильные линии с ЦМС, однако бывают случаи неполного восстановления еще на стадии гибридов первого поколения (Wang et al., 2010). Наследование признака и работу генов-восстановителей изучают в расщепляющихся гибридных популяциях. Растения гибридов второго поколения оценивают визуально на наличие пыльцы в нормально развитых пыльниках, а затем проверяют фертильность пыльцы на цитологических препаратах, либо определяют ее жизнеспособность на питательных средах (Fujii, Toriyama, 2009; Ma et al., 2013; Воронова, Гаврилова, 2019). На основании учета соотношения фертильных и стерильных растений, выдвигаются гипотезы о генетическом контроле признака, однако не всегда в расщепляющихся популяциях растения дифференцируются фенотипически только на фертильные и стерильные. Так, например, у некоторых видов растений наряду с классами фертильных/стерильных растений наблюдались еще и полуфертильный или полустерильный (Elkonin, 2005; Jordan et al.; 2010, Sinha et al., 2013). Такие растения характеризовались пониженной фертильностью пыльцы и, следовательно, пониженной завязываемостью семян. Так называемый эффект «малопыльцовости» неоднократно отмечался авторами на разных видах растений (Jordan, 2010; Sinha et al., 2013; Анисимова и др., 2017; Karabitsina et al., 2019), однако до сих пор нет единого мнения о причине данного явления. Отдельные авторы связывали пониженную фертильность пыльцы на фоне ЦМС с действием полимерных генов, генов-модификаторов, эффектами QTL либо объясняли это влиянием генетического фона (Elkonin, 2005; Jordan et al., 2010).

К настоящему времени на молекулярном уровне охарактеризованы и определены нуклеотидные последовательности 15 генов *Rf* у восьми видов растений (табл. 1). Большинство клонированных и охарактеризованных к настоящему времени *Rf* генов кодируют белки, которые содержат повторяющиеся мотивы из 35 аминокислотных остатков (PPR, pentatricopeptide repeats) и регулируют согласованную работу ядра и митохондрий. *PPR*-гены с функцией восстановления фертильности выделены в отдельное подсемейство *RFL-PPR* (*Restoration of Fertility Like-PPR*). Структурно-функциональное разнообразие *PPR-RFL* генов поддерживается за счет изменчивости PPR-мотивов, а также сложной кластерной организации локусов *Rf* в геноме (O'Toole et al., 2008; Fujii at al., 2011; Dahan, Mireau, 2013; Chen, Liu, 2014; Gaborieau et al., 2016; Sykes et al., 2017). Кроме того, идентифицировано несколько необычных продуктов локусов *Rf*: глицин-богатый белок риса (ген *Rf2* (Itabashi et al., 2011)), митохондриальный фактор терминации транскрипции mTERF (ген *msm1* ячменя (Bernhard et al., 2019)) и *Rf3* ржи (Hackauf et al., 2017)), протеиназа OMA1, свойственная дрожжевым клеткам (ген bvORF20 сахарной свеклы (Matsuhira et al., 2012)), альдегиддегидрогеназа (ген *Rf2* кукурузы (Cui et al., 1996)), транскрипционный фактор bHLH (ген *Rf4* кукурузы (Jaqueth et al., 2020)) и ацилпереносящий белок (ген *Rf17* риса (Fujii, Toriyama, 2009)). Накопленные данные свидетельствуют о том, что эффект продуктов генов *Rf* может наблюдаться на уровне геномной ДНК, на уровне транскрипции или на уровне белка (Chen, Liu, 2014).

Таблица 1 – Клонированные последовательности локусов генов *Rf* различных видов растений

Вид	**Тип ЦМС**	**Ген**	**Кодируемый белок**	**Хромо-сома**	**Генотип**	**Последовательность в базе данных NCBI (http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)**	**Ссылка**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Кукуруза (*Zea mays* L.)	T	*Rf2*	Альдегид-дегидрогеназа	9	rf2-m8122/Rf2-Ky21 × rf2-reflrf2-ref	NC_024467.2	*Cui et al., 1996*
Рис (*Oryza sativa* L.)	BT (Boro II)	*Rf1a*	PPR	10	MS-Koshihikari, IR8	NC_029265	*Komori et al., 2003*
		Rf1b	PPR	10	CMS 731A × C9083	нет данных	*Wang et al., 2006*
	LD	*Rf2*	Митохонд-риальный белок богатый глицином	2	LD-Akihikari, LD-Тайчжун 65 (T65)	AB583698.1	*Itabashi et al., 2011*
	WA	*Rf4*	PPR	10	Zhenshan 97A × Minghui 63	KJ680242-KJ680253	*Tang et al., 2014*
	Hong-Lian	*Rf5*	PPR	10	Milyang32	AB179840	*Hu et al., 2012*
	HL	*Rf6*	PPR	8	YTA, Wuyunjing7A	KY387609.1	*Huang et al., 2015, Zhang et al., 2017*
	CW	*Rf17*	Митохонд-риальный белок, содержащий часть синтазы подобного домена ацил-переносящего белка	4	CW (CWR) × Kasalath / Koshihikari CSSL209	AB481199.1	*Fujii, Toriyama, 2009*
Петуния (*Petunia hybrida* Vilm.)	нет данных	*Rf-PPR592*	PPR	4	клон SB5	AAM52339.1	*Bentolila et al., 2002*
Рапс (*Brassica napus* L.)	Ogura	*Rfo*	PPR	N19	SamRfo	AJ550021.2	*Uyttewaal et al., 2008, Feng et al., 2009*

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
Рапс (*Brassica napus* L.)	Pol	*Rfp*	PPR	нет данных	CMS line 1141A, B409	нет данных	*Liu et al., 2016*
	Nap	*Rfn*	PPR	A09	ЦМС линия 181A, H5 ЦМС-*Pol* линии: 1141A, 245A и 7492A	нет данных	*Liu et al., 2017*
Редис (*Raphanus sativus* L.)	Kosena	*Rfk1*	PPR	9	Одно фертильное растение из популяции KE3 описанной у *Koizuka et al. 2000*	AJ535623.1	*Koizuka et al., 2003*
Сорго (*Sorghum bicolor* L.)	A1	*Rf1*	PPR	8	AT × 623 (*rf1*, *rf1*), RT × 432 (*Rf1*, *Rf1*)	нет данных	*Klein et al., 2005*
Ячмень (*Hordeum vulgare* L.)	msm1	*Rfm3*	митохондриальный фактор терминации транскрипции mTERF	6H	нет данных	нет данных	*Bernhard et al., 2019*
Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.)	нет данных	*bvORF20*	протеиназа OMA1	нет данных	NK-219mm-CMS × NK-198	BAM64832.1	*Matsuhira et al., 2012*

Известно, что эффекты большинства генов *Rf* проявляются на уровне процессинга мРНК или трансляции (Schmitz-Linnenweber, Small, 2008). Для выяснения связи между структурой PPR-доменов и функцией генов *Rf* успешно использован метод направленного мутагенеза *RFL-PPR*-последовательностей и сравнительного анализа экспрессии *in vivo* (Qin et al., 2014). Данные первых экспериментов по изучению процессинга транскриптов митохондриального генома показали, что продукты генов *Rf* взаимодействуют с продуктами аберрантных митохондриальных генов через формирование комплексов с другими белками (Yue et al., 2010; Huang et al., 2013; Wu et al., 2019).

Вследствие высокой вариабельности и избыточности *RFL-PPR* генов затруднена их геномная идентификация. На сегодняшний день большинство ученых используют поиск геномных ассоциаций для идентификации кластеров генов *RFL-PPR* у видов с аннотированными геномами. С использованием данного подхода удалось идентифицировать гены-кандидаты *Rf* у нескольких видов, включая рис (Guzman, Oard, 2019), райграс (Sykes et al., 2017), хлопчатник (Zhao et al., 2018), ячмень (Melonek et al., 2019) и подсолнечник (Goryunov et al., 2019; Talukder et al., 2019). Для подтверждения уровня экспрессии у отобранных генов-кандидатов используют методы количественной ПЦР (Liu et al., 2013; Li et al., 2015; Rhee et al., 2015; Mei et al., 2016; Анисимова, Гавриленко, 2017). Однако четкого понимания механизмов экспрессии *Rf* генов пока нет (Touzet, Meyer, 2014), а имеющаяся информация пока еще очень фрагментарна либо фактически отсутствует для представителей многих видов.

Для подтверждения наличия у родительских линий генов восстановления фертильности пыльцы проводят тест-скрещивания – стерильные линии ЦМС скрещивают с предполагаемыми восстановителями и полученные гибриды F_1 оценивают по признаку фертильности пыльцы. Этот процесс может быть ускорен при использовании функциональных (аллель-специфичных) либо тесно сцепленных с локусами генов *Rf* молекулярных маркеров. Поэтому приоритетными задачами современных исследований генетических систем ЦМС-*Rf* является: изучение структуры и функции генов восстановления фертильности,

их локализации в геноме, а также разработка на основе полученной информации эффективных молекулярных маркеров для отбора генотипов с различными аллелями этих генов (Sykes et al., 2017). Только в случае, когда результаты молекулярного анализа согласуются с данными гибридологического анализа, мы можем говорить о диагностической ценности используемых молекулярных маркеров, однако до настоящего времени работы по определению диагностической ценности молекулярных маркеров генов *Rf* были выполнены лишь у ограниченного числа культур: подсолнечника (Horn et al., 2003, 2019; Kusterer et al., 2005; Маркин et al., 2013; Челюстникова, 2017), хлопчатника (Wang et al., 2007), кукурузы (Meyer et al., 2011).

1.3. Признак ЦМС у подсолнечника

Современная селекция подсолнечника ориентирована на создание высокопродуктивных гибридов на основе ЦМС, обладающих комплексной устойчивостью к патогенам. У подсолнечника известно более 70 типов ЦМС (Гаврилова, Анисимова, 2003; Ardila et al., 2010; Reddemann, Horn, 2018). Все они получены на основе межвидовой гибридизации культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. с многолетними и однолетними видами рода *Helianthus* L. Среди них наиболее изучены ЦМС типа PET1, PET2, RIG0, ARG-3, MAX1 (Christov, 2003; Усатов и др., 2012; Makarenko et al., 2018, 2019; Reddemann, Horn, 2018). Эффекты ЦМС при разных типах стерильной цитоплазмы различны. В большинстве случаев у растений с ЦМС пыльники дегенерируют на ранних стадиях развития и пыльца в них отсутствует. Нарушения в механизме формирования пыльцы происходят на разных этапах мейотического и мостмейотического делений. Например, в стерильном растении при ЦМС-PET1 происходит аномальная вакуолизация эндоплазматического ретикулума во время первого деления мейоза (Laveau et al., 1989), аномальное разрастание тапетальной ткани и как следствие – полная дегенерация микроспороцитов (Усатов и

др., 2012). При других типах ЦМС у подсолнечника нарушения проявляются позже, чем при PET1-типа: у форм на основе *H. petiolaris* Nutt ssp. *fallax* дегенерация происходит во время вакуолизации микроспоры на стадии формирования слоя эндекзины, при ЦМС-RES1 (на основе *H. resinosus* Small) нарушения происходят на постмейотических стадиях, а при ЦМС-GIG2 (на основе *H. giganteus* L.) формирование микроспор нарушается непосредственно во время мейотического деления микроспороцитов (Laveau et al., 1989; Echeverria et al., 2003; Zhang et al., 2010). В гибридной селекции подсолнечника в настоящее время используется лишь один тип ЦМС – PET1, полученный в результате межвидового скрещивания *H. Petiolaris* Nutt. × *H. annuus* L. (Leclercq, 1969).

Как и у других растений, ЦМС подсолнечника обусловлена мутациями митохондриальных генов. Молекулярные исследования выявили, что мужская стерильность ЦМС PET1 подсолнечника связана с экспрессией новой открытой рамки считывания orfH522, ко-транскрибируемой с геном *atp1*. Ген *orfH522* кодирует связанный с мембраной белок с молекулярной массой около 15 кДа, который губителен для развития пыльцы и присутствует во всех тканях мужски стерильных растений (Kohler et al., 1991; Moneger et al., 1994; Budar, Pelletier, 2001). Мужски-фертильный фенотип при ЦМС-PET1 может быть восстановлен путем введения в генотип гибрида доминантных ядерных генов *Rf*, вызывающих специфическое снижение уровня ко-транскрипта *atp1-orfH522* в пыльниках в течение мейоза и сопутствующее снижение количества белка ORFH522 (Nizampatnam et al., 2009).

Унификация типа ЦМС в гибридной селекции опасна, т.к. использование лишь одного типа цитоплазмы может привести к эпифитотиям в результате поражения носителей данного типа определенной расой фитопатогена. Так, в случае с кукурузой в 1970 году использование одного типа ЦМС в производстве гибридов привело к эпифитотии южного гельминтоспориоза расы Т и, как следствие, – гибели посевов (Александров, 2009).

Генетический контроль признака восстановления пыльцы у подсолнечника при ЦМС PET1-типа изучен недостаточно, в литературе нет единого мнения о

числе генов, контролирующих данный признак. На основании данных гибридологического анализа разными авторами были сделаны предположения о наличии одного (Enns et al., 1970; Kinman 1970; Rukmini Devi, 2002), двух комплементарных (Анащенко, Дука, 1985; Seilar, Jan, 1994; Serieys, 1999; Sujatha et al., 2011), трех (Vranceanu, Stoenescu, 1978) и даже четырех (Fick, Zimmer, 1974; Whelan, 1980) доминантных генов с различными типами взаимодействия.

В течение последних 50 лет, идентифицировано тринадцать генов восстановления фертильности пыльцы для шести типов цитоплазм – PET1, PEF1, GIG2, ANN3, PET2 и нового типа, полученного на основе *H. tuberosus* L. (табл. 2) К настоящему времени установлена локализация большинства известных генов *Rf* на молекулярно-генетических картах, построенных с использованием AFLP-, RFLP- и SSR-маркеров (Mestries et al., 1998; Gentzbittel et al., 1999; Horn et al., 2003; Yu et al., 2003; Tang et al., 2003; Feng, Jan, 2008; Yue et al., 2010; Liu et al., 2012, 2013; Qi et al., 2012; Talukder et al., 2019; Sajer et al., 2020). Однако данные о расстоянии между геном и маркерным фрагментом, полученные в различных экспериментах, зачастую противоречивы. Гены *Rf*, восстанавливающие фертильность при 6 различных типах ЦМС, локализованы в трех группах сцепления: LG3 – *Rf4* (GIG2) и *Rf6* (CMS 514A), LG7 – *Rf3* (PET1), LG13 *Rf1, Rf2, Rf5, Rf7* (PET1), *RF_PEF1* (PEF1), *Rf10, Rf11* (GIG2), *Rf-PET2* (PET2), точная локализация генов *MSc1* и *Rf9* не установлена (Kinman, 1970; Gentzbittel et al., 1995; Fick, Miller, 1997; Schnabel et al., 2008; Abratti, 2008; Feng, Jan, 2008; Qi et al., 2008, Liu, 2013, 2015, 2016; Talukder et al., 2019; Sajer et al., 2020).

Наибольший интерес представляют гены, локализованные в группе сцепления 13, а также ген *Rf3* (группа сцепления 7), поскольку известно, что данные гены также восстанавливают фертильность пыльцы линий с цитоплазмой типа ЦМС PET1. Кроме того, ведется поиск новых генов-восстановителей для других типов ЦМС. Так, например, гены восстановления фертильности при ЦМС PEF1 – *Rf_PEF1* и PET2 – *Rf-PET2* были локализованы в 13 группе сцепления недалеко от гена *Rf1* (Schnabel et al., 2008; Sajer et al., 2020). В работе Feng and

Jan (2008) сообщается о гене восстановления фертильности пыльцы *Rf4* для цитоплазмы GIG2. Liu et al. (2013) анализировали F_2, полученные от скрещиваний стерильной линии CMS 514A с группой опылителей: пятью тетраплоидными амфидиплоидами, а также гексаплоидным потомством F_1 от скрещивания *H. californicus* DC × *H. annuus* (HA 89). По результатам скрещиваний фертильное потомство было получено лишь в популяции с амфиплоидом от скрещивания *H. angustifolius* L. × *H. annuus* (P 21). Новый ген *Rf6*, был картирован на длинном плече чужеродной хромосомы LG3 амфиплоида *H. angustifolius*. Недавно опубликованы результаты поиска генов-кандидатов восстановителей фертильности пыльцы у подсолнечника с помощью GWAS-анализа, основанного на массивах данных SNP. В работах Owens с соавторами (2018) и Д. В. Горюнова с соавторами (Goryumov et al., 2019) в общей сложности описывается 22 гена-кандидата в локусе *Rf1*, 21 из которых кодирует PPR-белки и один – альдегиддегидрагеназу. R. Horn с соавторами (2019) идентифицировали 9 генов-кандидатов *Rf1*, три из которых считаются самыми перспективными (кодирующие PPR-белки). Qi с соавторами (2018) выявили два гена-кандидата для *Rf5*, также кодирующие PPR-белки.

Большинство авторов полагает, что наличие доминантного аллеля *Rf1* необходимо для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС PET1. Рядом авторов были разработаны тесно сцепленные с локусом *Rf1* маркеры, однако сам ген пока не клонирован и его нуклеотидная последовательность неизвестна (Tang et al., 2002; Horn et al., 2003; Horn, Hamrit, 2010; Yue et al., 2010). Полагают, что в генотипах, используемых в селекции линий-восстановителей, присутствует также и доминантный аллель *Rf2* (Serieys, 2005), однако его фенотипические эффекты не изучались, природа и хромосомная локализация неизвестны.

Таблица 2 – Идентифицированные гены, восстанавливающие фертильность пыльцы подсолнечника

Ген	**Группа сцепле-ния**	**Источник**	**Тип ЦМС**	**Метод анализа**	**Наличие гена-кандидата**	**Наличие маркера**	**Ссылка**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Rf1	13	*H. annuus* L.	PET1	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ, GWAS	+	RFLP, AFLP, STS, SCAR, CAPS, SSR, SNP	*Kinman, 1970* *Gentzbittel et al., 1995, 1999* *Berry et al., 1997* *Horn et al., 2003, 2019* *Yu et al., 2003* *Kusterer et al., 2005* *Jan, Vick, 2007* *Yue et al., 2010* *Owens et al., 2018* *Reddemann, Horn, 2018* *Gorunov et al., 2019*
Rf2	13	*H. annuus* L. (T66006-2-1-B × MZ01398)	PET1	Гибридологический	–	SSR	*Fick, Miller, 1997*
Rf3	7	*H. annuus* L. (RHA 280, RHA 340)	PET1	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ	–	SSR	*Abratti et al., 2008* *Liu et al., 2012*
Rf4	3	*H. maximilliani* Schrad. accession 1631	GIG2	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ	–	SSR, STS	*Feng, Jan, 2008*
Rf5	13	*H. annuus* L. (Rf ANN-1742)	PET1	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ	+	SSR	*Qi et al., 2012*
Rf6	3	*H. angustifolius* L.	CMS 514A	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ, GISH	–	SSR	*Liu et al., 2013*
Rf7	13	*H. annuus* L. (RHA 428)	PET1	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ, GWAS	–	SNP, SSR	*Talukder et al., 2019*

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
MSc1	7/ 12/ P	*H. annuus* L (GH × PAC2)	нет данных	RFLP-анализ	–	RFLP,	*Gentzbittel et al., 1995, 1999* *Mestries et al., 1998*
RF_PEF1	13	*H. annuus* L (Zaira (PI 371935), HA 60 (Ames 4035))	PEF1	AFLP	–	AFLP, SSR	*Schnabel et al., 2008*
Rf9	нет данных	нет данных	ANN3	нет данных	–	нет данных	*Liu et al., 2015*
Rf10	13	*H. grosseserratus* M.Martens	GIG2	SSR, EST-SSR	–	SSR	*Liu et al., 2016*
Rf11	13	*H. angustifolius* L.	GIG2	SSR, EST-SSR	–	SSR	*Liu et al., 2016*
Rf-PET2	13	нет данных	PET2	Гибридологический, цитологический, SSR-анализ, AFLP	–	AFLP, SSR, STS	*Sajer et al., 2020*

Помимо традиционного гибридологического анализа большое значение в исследованиях признака восстановления фертильности пыльцы имеет цитологический анализ пыльцевых зерен (ПЗ) отцовских форм и растений расщепляющихся гибридных популяций. В качестве показателей фертильности пыльцы используют определенные с помощью электронных и цифровых микроскопов морфометрические показатели ПЗ, а именно их контуры и равномерное окрашивание, а также диаметр (Воронова, Гаврилова, 2019). Такие исследования выполнены пока лишь на ограниченном материале: сортах, линиях, межвидовых и внутривидовых гибридах первого поколения (Воронова и др., 2011, 2019). Информация о характере наследования показателей фертильности ПЗ в расщепляющихся гибридных популяциях в литературе отсутствует.

Молекулярное маркирование генов восстановления фертильности имеет принципиальное значение для развития исследований по детальной идентификации генов на основе позиционного клонирования. Среди многочисленных систем маркеров, основанных на использовании ПЦР, наиболее эффективными и доступными считаются: RFLP-, AFLP-, RAPD-, SSR-, SCAR-, CAPS- и STS-маркеры. Их используют исходя из целей и задач исследований (Алтухов, Салменкова, 2002; Anandhan et al., 2010; Zeinalzadeh-Tabrizi et al., 2016; Усатов и др., 2017). Первые данные по изучению полиморфизма фрагментов рестрикции ДНК у различных видов рода *Helianthus* получили У. Шуман и П. Хейцман (Choumane, Heizmann, 1988). Анализ методом RFLP успешно использован для создания генетических карт и определение QTL (*Quantitative Trait Loci*) у подсолнечника и многих других важных сельскохозяйственных культур. С помощью данного метода были построены три генетические карты для генома культурного подсолнечника (Gentzbittel et al., 1994; Berry et al., 1995; Jan et al., 1998) и одна – для однолетнего вида *H. anomalus* Blake (Rieseberg et al., 1993). Кроме того, молекулярные маркеры генов *Rf* исключительно перспективны в генетико-селекционных исследованиях. Они позволяют отбирать из расщепляющихся гибридных популяций носителей доминантных и рецессивных аллелей генов восстановления фертильности, что ускоряет процесс создания

родительских форм гибридов. Созданная в ВИРе генетическая коллекция подсолнечника насчитывает около 300 линий, в том числе стерильные линии на основе ЦМС PET1, закрепители стерильности и восстановители фертильности пыльцы (Gavrilova et al., 2014). Генетическое разнообразие коллекции по признаку фертильности пыльцы изучено недостаточно. С использованием диагностического маркера orfH522, ассоциированного с ЦМС PET1 (Schnabel et al., 2008), было показано, что большинство (87%) линий-восстановителей имеют стерильный (PET1) тип цитоплазмы. В то же время у отдельных линий, восстанавливающих фертильность пыльцы при скрещиваниях с линиями ЦМС, диагностические маркеры гена *Rf1* не выявлены (Анисимова и др., 2009, 2011; Карабицина и др., 2016).

RAPD-маркеры использованы также для геномного картирования гена восстановления фертильности при ЦМС и *Rf1* в популяции F_2 RHA 325 × HA 342 (Miller et al., 1992). R. Horn с соавторами (2003) разработали SCAR-маркеры OPK13_454, OPY10_740 на основе RAPD-маркеров и проанализировала их сцепление с геном *Rf1* на той же расщепляющейся комбинации, что и авторы предыдущей работы. Расстояние между ними составило 0,8 и 2,0 cM, соответственно (табл. 3).

К настоящему времени идентифицировано более тысячи SSR-маркеров для генома подсолнечника (Yu et al., 2002; Paniego et al., 2002, 2007; Tang et al., 2003). S. Tang с соавторами сконструировали генетическую карту подсолнечника на основе SSR-анализа, используя 94 рекомбинантных инбредных линии (RILs) и 408 полиморфных SSR-маркеров. На основе полученных данных было установлена локализация гена *Rf1* в 13 группе сцепления (Tang et al., 2003). Благодаря высокой вариабельности SSR-маркеров, расстояние между геном и маркерным фрагментом может варьировать в зависимости от генетического фона. Так, для определения величины сцепления SSR-маркеров (ORS224, ORS511 и ORS799) и одного TRAP-маркера B18I19bTrap13-190 с локусом *Rf1* B. Yue с соавторами (2010) проанализировали две расщепляющиеся гибридные популяции. По результатам анализа были построены две генетические карты, в зависимости

от комбинации расстояние варьировало от 3,7 до 4,5 сМ (рис. 2). На карте, полученной Z. I. Talukder с соавторами (2019), расстояние между маркерными фрагментами ORS224 и ORS511 составляет 6,4 сМ, в то время как у Yue оно превышает 15 сМ (рис. 2, рис. 3).

В работах последних лет показано сцепленное наследование признаков восстановления фертильности пыльцы и устойчивости к патогенам. Однако до сих пор нет единого мнения об их взаимном расположении. Известно, что гены восстановления фертильности пыльцы находятся в кластере с генами устойчивости к возбудителю ложной мучнистой росы (ЛМР) *Plasmopara halstedii* Farl. (*Ph*) (Talukder et al., 2019). Так, в работах B. Yue с соавторами (2010) было показано, что SSR-маркеры ORS224, ORS511 и ORS799 присутствуют у линий-восстановителей с геном *Rf1*, в то время как в работе Çabuk Şahin с соавторами (2018) эти же маркеры идентифицируют ген устойчивости к возбудителю ЛМР *Pl8*. По данным M. Bulos с соавторами (2013), маркеры OPK13_454 (HRG01) и ORS224 сцеплены с геном R_{HAR6}, определяющим устойчивость к возбудителю ржавчины *Puccinia helianthi* Schw. у линии HRA6, который также локализован в группе сцепления 13.

Таблица 3 – Генетические расстояния между геном *Rf1* и диагностическими маркерами

Ген/маркер	**Маркер**	**Тип маркера**	**Расстояние от гена *Rf1*, сМ**	**Генотип**	**Ссылка**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Rf1	OPK13_454	доминантный	0,8	RHA 325 × HA 342	Horn et al., 2003
	OPY10_740	доминантный	2		
Rf1	OPK13_454	доминантный	0,9	RHA 325 × HA 342	Kusterer et al., 2005
	OPY10_740	доминантный	2,2		
Rf1	STS115	доминантный	0,4	F2 популяции 2-6-5	Yue et al., 2010
	ORS511	доминантный	3,7		
	ORS224	доминантный	18,8		
Rf1	ORS511	доминантный	4,5	cmsHA441 × 2-6-5-1	
Rf1	ORS799	доминантный	нет данных		

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6
Rf1	CAPSH13	кодоминантный	7,7	Drofa F2 Valentino F2 Xenia F2	Kusterer et al., 2005; Port et al., 2013
R_{HAR6}	OPK13_454 (HRG01)	доминантный	18,4	HAR6-1 × R702CLPlus	Bulos et al., 2013
R_{HAR6}	ORS224	доминантный	40,4		
Pl8	ORS224	доминантный	нет данных	HA 89 × P6LC	Çabuk Şahin et al., 2018
Pl8	ORS511	доминантный	нет данных	HA 89 × P6LC	
Pl8	ORS799	доминантный	нет данных	HA 89 × P6LC	
ORS224	**ORS511**	доминантный	15,1	cmsHA441 × 2-6-5-1	Yue et al., 2010
ORS224	**ORS511**	доминантный	6,4	RHA 428 × HA 234	Talukder et al., 2019

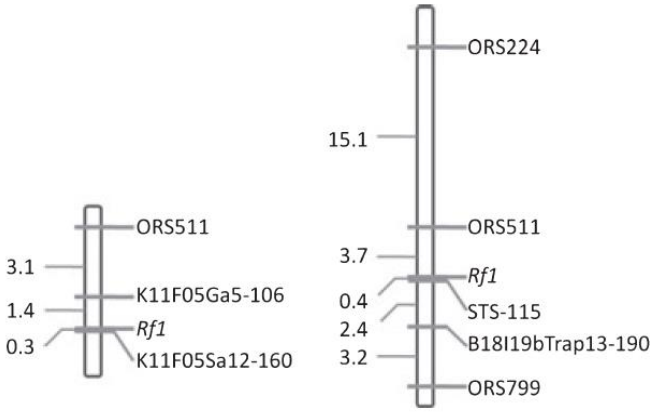


Рисунок 2 – Локализация гена *Rf1* на фрагментах генетических карт (Yue et al., 2010)

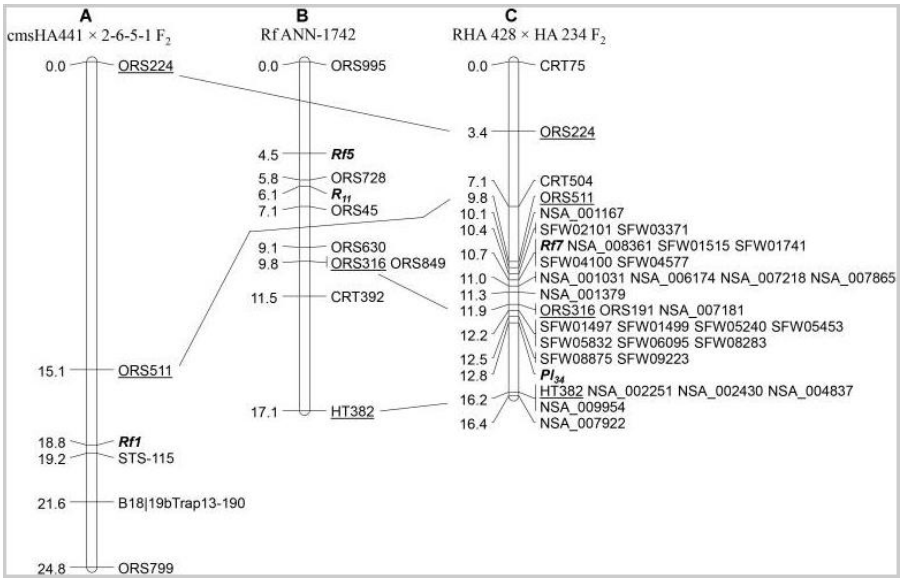


Рисунок 3 – Фрагменты генетических карт с локализованными генами *Rf1*, *Rf5* и *Rf7* (Talukder et al., 2019).

Таким образом, краткий обзор имеющихся литературных данных показывает, что в гибридной селекции подсолнечника используется лишь одна система – ЦМС PET1. Это обусловлено отсутствием до сих пор стабильных источников генов *Rf* для других типов цитоплазм. Унификация цитоплазмы в селекции гибридов является большой проблемой, т.к. может привести к эпифитотиям и снижению генетического разнообразия подсолнечника. В настоящий момент нет единого мнения о точном числе генов, контролирующих восстановление фертильности форм подсолнечника с ЦМС PET1, а также об особенностях наследования этого признака в гибридных поколениях. Предполагают, что присутствие гена *Rf1* обязательно для восстановления фертильности пыльцы, однако данные о нуклеотидной последовательности и продукте данного гена в литературе отсутствуют. В связи с этим не разработаны аллель специфичные маркеры для точной идентификации гена *Rf1* в генотипе линий коллекции. Поэтому в молекулярно-генетических исследованиях используют комплекс молекулярных маркеров, которые располагаются на небольшом расстоянии от гена (или тесно сцеплены с ним). В совокупности с классическим гибридологическим анализом они могут помочь в определении наличия генов восстановления фертильности у линий-опылителей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал и условия вегетации

Исходным материалом для исследований послужила выборка образцов генетической коллекции подсолнечника ВИР, включавшая 95 линий. В дальнейшем в результате молекулярного скрининга была сформирована выборка из 75 линий, в их числе 2 линии на основе ЦМС PET1 (линии А), 1 линия на цитоплазме типа RIG0 (линия А), 1 фертильный аналог стерильной линии (линия Б) и 71 фертильная линия различного происхождения. Большинство изученных линий созданы в ВИР в результате многолетних исследований (табл. 4). Все линии репродуцированы на Кубанской опытной станции – филиале ВИР (КОС ВИР, Гулькевичский район Краснодарского края). Характеристика изученного материала представлена в приложении 1. Изученные линии были любезно предоставлены куратором генетической коллекции подсолнечника д.б.н. В. А. Гавриловой и старшим научным сотрудником КОС ВИР к.с.-х.н. В. Т. Рожковой.

Таблица 4 – Список источников, участвовавших в создании линий генетической коллекции подсолнечника

Источник	Число
Образцы из временного или постоянного каталога коллекции ВИР	25
Питомник ЦМС	3
Гибриды: - внутривидовой - межвидовой	 14 5
Линии (российские и зарубежные)	16
Сорта (российские и зарубежные)	6
Нет данных	6

Кроме того, изученный материал включал гибриды F_1 от скрещиваний стерильных аналогов с фертильными линиями, потомство анализирующих скрещиваний, а также расщепляющиеся гибридные популяции F_2.

Полевые опыты проводили 2014-2019 гг. на КОС ВИР и научно-производственной базе «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (ППЛ ВИР, С.-Петербург, Пушкин). Линии генетической коллекции высевали на полях КОС ВИР, расположенной в степной части Прикубанской равнины. Почвы представлены предкавказскими черноземами с глубиной залегания гумусового горизонта 130-170 см, однако, содержание гумуса в поверхностных слоях почвы небольшое. Гибриды первого и второго поколений выращивали на опытных полях КОС ВИР и ППЛ ВИР. Почвы участка — дерново- мелкоподзолистые средне- и тяжелосуглинистые. Содержание гумуса в пахотном слое (0 - 20 см) 6%, в подпахотном — 4%. Основные метеорологические показатели представлены в приложениях 2-8.

Семена линий подсолнечника высевали по 20 шт. в 2 ряда ручными сажалками-хлопушками. Схема посева 70 × 70. На КОС ВИР посев проводили 25-28 апреля. Гибриды F_1 и F_2 в ППЛ ВИР высевали вручную по схеме 40 × 40 в шахматном порядке. Сроки посева семян зависели от температуры воздуха, преимущественно в конце мая – начале июня.

В течение вегетации проводили фенологические наблюдения, отмечая в журнале дату посева, начало цветения корзинок, визуальную оценку фертильности/стерильности растений, наличие/отсутствие ветвления, наличие фасциаций, повреждение растений вредителями и болезнями.

Гибриды F_1 высевали на полях Пушкине и Краснодарском крае. Для получения гибридов второго поколения на корзинку перед цветением надевали пергаментный изолятор. Гибриды F_2 и от анализирующих скрещиваний получены д.б.н. И. Н. Анисимовой (ППЛ ВИР) и к.с.-х.н. В. Т. Рожковой (КОС ВИР).

2.2. Молекулярно-генетический анализ

2.2.1. Выделение ДНК

Суммарную ДНК для маркирования линий выделяли из этиолированных проростков, а для анализа расщепляющихся популяций из листьев 5-6 недельных растений.

Подготовка материала для выделения ДНК из этиолированных проростков

Семена раскладывали на влажную вату в стерильные чашки Петри, которые затем помещали в термостат. Семена проращивали в термостате в темноте с фиксированной температурой +22°С. Через 7-10 дней после появления этиолированных (бесхлорофилльных) семядолей проводили выделение ДНК.

Подготовка материала для выделения ДНК из настоящих листьев

Материал собирали в фазе 3-4 настоящего листа. Предназначенные для сбора листьев пробирки типа Eppendorf (1,5-2,0 мл) помещали в сосуд с колотым льдом. Части листа помещали в маркированные пробирки, а затем приносили в лабораторию, промывали их дистиллированной водой и использовали для непосредственного выделения ДНК, либо замораживали. Каждое растение в поле было отмечено этикеткой.

Геномную ДНК выделяли модифицированным CTAB-методом (Saghai-Maroof et al., 1984; Doyle, Doyle, 1990) с модификациями И.Н. Анисимовой с соавторами (Анисимова и др., 2018).

Все расходные материалы предварительно стерилизовали в автоклаве. Для экстракции использовали 2X CTAB буфер следующего состава: 10 мМ Трис-HCl, pH=8,0; 100 мм ЭДТА, pH-8,0; 1,4 М NaCl, 1% PVP, 2% CTAB, в который непосредственно перед использованием добавляли 0,5% $NaHSO_3$.

В микропробирки объемом 1,5 мл помещали отрезок семядоли либо часть настоящего листа площадью около 1 см² и растирали с помощью тефлонового пестика. Затем добавляли 600 мкл экстракционного буфера (2X CTAB буфер), предварительно нагретого до 65°С. После этого содержимое микропробирки

хорошо перемешивали переворачиванием и инкубировали в водяной бане при 65°С в течение 1-1,5 ч; в процессе инкубации пробирки периодически встряхивали. По завершении инкубации пробирки охлаждали до комнатной температуры и добавляли 300 мкл хлороформ-изоамиловой смеси (24:1), а затем плавно перемешивали в течение 20 мин до состояния эмульсии. Затем пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин, после чего надосадочную жидкость переносили в другую серию пробирок. К надосадочной жидкости добавляли РНКазу А (Fermentas) в концентрации 10 мг/мл из расчета 3 мл на каждые 300 мл надосадочной жидкости и инкубировали в термостате при 37°С в течение 1 ч. После этого для удаления фермента снова проводили обработку хлороформ-изоамиловой смесью.

Для осаждения ДНК в каждую микропробирку добавляли равный объем изопропанола, охлажденного до -20°С, перемешивали и выдерживали при -20°С в течение 15 мин. Затем смесь центрифугировали при 14000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 мин и удаляли надосадочную жидкость. К оставшемуся осадку добавляли 1 мл охлажденного до +4°С 75% этанола и, переворачивая микропробирку несколько раз, промывали осадок. Снова центрифугировали при +4°С 10 мин и удаляли надосадочную жидкость. Этап с отмывкой этанолом повторяли дважды.

Полученный осадок сушили в термостате при +37°С до полного испарения спирта и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воде в течение 1-1.5 ч при комнатной температуре.

Полученные фракции ДНК подсолнечника хранили при -20°С. Концентрацию и качество препаратов ДНК определяли методом электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически (Smart Spec (BioRad, США)).

2.2.2. Постановка ПЦР

Для амплификации маркерных фрагментов использовали 15 пар праймеров (табл. 5). Маркерный фрагмент orfH522 специфичен для аберрантного

митохондриального гена orfH522, обуславливающего PET1 тип стерильности. Маркеры HRG01, HRG02, STS115, а также SSR-маркеры ORS224, ORS511 и ORS799 находятся в группе сцепления 13 и в разной степени сцеплены с геном *Rf1*. Фрагменты, амплифицированные с праймерами SCO04, SCX20, сцеплены с локализованным в той же группе геном R_{adv}, а фрагмент STO06 сцеплен с геном *R1*, который находится в группе сцепления LG8. Оба гена детерминируют устойчивость к возбудителю ржавчины. CAPS-маркеры QHL12D20_*HaeIII*, L12D20_*HaeIII* и B20M13_*RsaI* разработаны при нашем участии в отделе генетики ВИР в 2012-2014 гг. в ходе выполнения проекта РФФИ. Они маркируют гомологи генов восстановления фертильности – *RFL-PPR*. Их хромосомная локализация и отношения с локусом *Rf1* пока не известны. Маркеры HA-P1, HA4011, сцепленные с локусом *Pl5/Pl8*, контролирующим устойчивость к возбудителю ЛМР, относятся к 13-ой группе сцепления, что и ген *Rf1*.

Для каждой пары праймеров подбирался термальный режим с учетом их нуклеотидного состава и рекомендацией разработчиков (табл. 6). ПЦР проводили в амплификаторах MyCycler и DNA Engine Tetrad 2 производства BioRad (США).

Для проведения ПЦР использовали стандартную для всех использовавшихся праймеров реакционную смесь (общим объемом – 25 мкл), содержащей 1,5 мкл ДНК, 2,4 мкл 2,5мМ dNTP, 2,5 мкл 10X реакционного буфера, 1,25 мкл 50мМ $MgCl_2$, по 0,5 мкл прямого и обратного праймера в концентрации 10 пМ, 0,4 мкл Taq полимеразы (5 е.а./мкл), 0,06 мкл BSA (20 мг/мкл) и 15,89 мкл ddH_2O (Диалат Лтд).

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле и окрашивали 0,05% раствором бромистого этидия. Гели документировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad США) в ультрафиолетовом свете. Для оценки размера полученных фрагментов использовали ДНК-маркеры Gene Ruler 100 bp and 1kb DNA Ladders (Fermentas США).

Анализ полиморфизма SSR-фрагментов выполнен на приборе MultiNA (Schimadzu) в ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, ВНИИСХМ) А. Г. Пинаевым.

Таблица 5 – Локусы, использованные для молекулярного маркирования линий генетической коллекции

Маркер (тип)	**5´- 3´ последовательность**	**Локус**	**Тип наследования**	**Размер амплифици-рованного фрагмента, пн**	**Ссылка**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
orfH522 (STS)	F- TGCCTCAACTGGATAAATTCAC R- ACCGTTCTCTCACGAGTTGAAG	*orfH522*	Материнское	516	*Schnabel et al., 2008*
HRG01 (SCAR)	F- TATGCATAATTAGTTATACCC R- ACATAAGGATTATGTACGGG	*Rf1*	Доминантный	454	*Horn et al., 2003*
HRG02 (SCAR)	F- AAACGTGGGAGAGAGGTGG R- AAACGTGGGCTGAAGAACTA	«»	Доминантный	740	*«»*
STS115 (STS)	F- CGAACTAATCATCATACAACC R- TCGGCTCTTATGTATGTTCAC	«»	Доминантный	115	*Yue et al., 2010*
ORS224 (SSR)	F- AACCAAAGCGCTGAAGAAATC R- TGGACTAACTACCAGAAGCTAC	«»	Доминантный	124, 148-153	*«»*
ORS511 (SSR)	F- TGGCTCAGATTAAGTTCACACAG R- CGGGTTGCGAGTAACAGGTA	«»	Доминантный	158-163, 210, 244	*«»*
ORS799 (SSR)	F- ACTCCCTCCCATTCTCGTCT R- TCCAGCAAGTCAGCAACAAC	«»	Доминантный	165-170	*«»*
SCO04 (SCAR)	F- AAGTCCGCTCACTTGGGTCA R- AAGTCCGCTCTACATGTTCTCTTT	R_{adv}	Кодоминантный	950, 850	*Lawson et al., 1998*
SCX20 (SCAR)	F- CCCAGCTAGACCACAAACCATTGT R- CCCAGCTAGATTCATTGGTAAAATGTT	«»	Доминантный	600	*«»*
SCT06 (SCAR)	F- CAAGGGCAGAAAACAAAACTACAC R- CAAGGGCAGAGAGTTTTCCAC	*R1*	Доминантный	950	*«»*
QHL12D20_ HaeIII (CAPS)	F- TGGCCTCACAAGGAATCAAG R- AGGTTGAATTCCCGCACTAA	*RFL-PPR*	Кодоминантный	1170	*Анисимова и др., 2013*
L12D20_ HaeIII (CAPS)	F- TGGTATGTGGAGTAAAGGTGTCA R- TAGCGTTGTTCAATGGGTCA	«»	Кодоминантный	630	*«»*

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6
B20M13_RsaI (CAPS)	F- TTGCAAATGCAAAAACATGG R- AAGACCGTGGACCAAAACTG	*Pl8*	Кодоминантный	421 (100, 140, 220, 300)	*Анисимова и др., 2014*
HA-P1	F- GCCCAAAATTGAAAGAAAGGTGTG R- GGCGAAATTGGTTCCCGTGAGTCG	*Pl5/Pl8*	Кодоминантный	1100, 1200, 1300, 1450, 1500, 1600, 1700, 2000, 2100	*Radwan O. et al., 2004*
HA4011	F- ACTTCTACCCTCCCCTTCTT R- CTGTACACGTGCTGCTTTAG	*Pl8*	Кодоминантный	200, 240	*«»*

Таблица 6 – Протоколы амплификации для использованных праймеров

Праймер	**Локус**	**Программа**	
orfH522	*orfH522*	Денатурация	95˚C – 2 мин
		Отжиг праймеров (36 циклов)	95˚C – 1 мин 59˚C – 1 мин 72˚C – 1 мин
		Элонгация	72˚C – 5 мин
Y10	*Rf1*	Денатурация	94˚C – 10 мин
		Отжиг праймеров (35 циклов)	94˚C – 45 сек 65˚C – 45 сек 72˚C – 1 мин
		Элонгация	72˚C – 6 мин
K13	*Rf1*	Денатурация	94˚C – 10 мин
		Отжиг праймеров (36 циклов)	94˚C – 45 сек 58˚C – 45 сек 72˚C – 1 мин
		Элонгация	72˚C – 6 мин
STS115 ORS224 ORS511 ORS799	*Rf1*	Денатурация	96˚C – 4 мин
		Отжиг праймеров (30 циклов)	94˚C – 30 сек 55˚C – 40 сек 72˚C – 1 мин
		Элонгация	72˚C – 5 мин
QHL12D20 L12D20 B20M13	*RFL-PPR*	Денатурация	94˚C – 4 мин
		Отжиг праймеров (36 циклов)	94˚C – 30 сек 59˚C – 45 сек 72˚C – 1 мин
		Элонгация	72˚C – 7 мин
HA-P1, HA4011 SCT06	*Pl5/Pl8* *Pl8* R_{adv}	Денатурация	95˚C – 3 мин
		Отжиг праймеров (35 циклов)	95˚C – 30 сек 60˚C – 30 сек 72˚C – 2 мин
		Элонгация	72˚C – 7 мин
SCO04 SCX20	R_{adv}	Денатурация	94˚C – 1 мин 30сек
		Отжиг праймеров (30 циклов)	94˚C – 1 мин 63˚C – 1 мин 72˚C – 2 мин
		Элонгация	72˚C – 7 мин

2.2.3. Рестрикционный анализ

Для идентификации SNP в последовательностях фрагментов *RFL-PPR*-генов продукты амплификации с праймерами QHL12D20, L12D20 и B20M13 обрабатывали рестриктазами *HaeIII* и *RsaI*.

В рестрикционном анализе использовались рестриктазы FastDigest *HaeIII* и FastDigest *RsaI* (Thermo Scientific™). Реакционную смесь для всех реакций общим объемом 10 мкл, содержала 5 мкл ПЦР продукта, 3 мкл ddH2O, 1 мкл 10x FastDigest Green Buffer и 1 мкл фермента. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле. Результаты фиксировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad США).

2.2.4. Клонирование фрагментов ДНК

Для более детального анализа аллельных вариантов SSR-локусов было проведено клонирование и секвенирование полученных фрагментов. Продукты амплификации с помощью набора реактивов фирмы Евроген (Москва) «Cleanup Standard» выделяли из ПЦР-смеси, чтобы очистить от примесей, а затем клонировали в клетках *Escherichia coli* (штамм DH5α) с помощью вектора pAL-TA (Евроген, Москва), который содержит ген устойчивости к ампицилину, что дает возможность, расти на селективной среде с антибиотиком только клеткам со вставкой. Кроме того, он содержит маркеры, обуславливающие окраску колоний при выращивании на среде, содержащей X-gal, IPTG и, таким образом, обеспечивает возможность бело-голубой селекции клонов. Клонирование ампликонов включало следующие этапы: лигирование ДНК с вектором, трансформация рекомбинантной ДНК в клетку *E. coli* методом термошока, отбор трансформантов нужной длины.

Для лигирования ампликонов использовался набор реактивов для клонирования Quick-TA kit (Евроген, Москва), включающий pAL2-TA вектор,

который непосредственно перед использованием растворяли в 25 мкл деионизированной воды.

Затем приготавливали реакционную смесь в пробирке типа Eppendorf в соответствии с протоколом производителя: к 1 мкл лигазного буфера 10X добавляли 1 мкл вектора pAL2-T (50 нг/мкл), 1 мкл T4 ДНК лигазы, 4 мкл ПЦР продукта и 3 мкл воды. Полученную смесь перемешивали, центрифугировали 1 сек при 5000 об/мин и ставили на ночь в штативе на водяную баню при +16°С. Утром пробирку со смесью перемещали в холодильник на +4°С.

Для проведения трансформации компетентные клетки *E. coli* размораживали на льду около 10 минут. К раствору ДНК с лигирующей смесью добавляли 50 мкл компетентных клеток и быстро перемешивали пипетированием и помещали на лед (на +4°С) на 20 мин. Пробы с компетентными клетками переносили на водяную баню на +42°С на 45 сек, после чего сразу помещали на лед. Затем добавляли 450 мкл среды SOC и перемешивали пипетированием. После этого пробирки горизонтально помещали в шейкер-инкубатор на 1 ч при +37°С (число оборотов 220). Далее ДНК-смесь с помощью стеклянного шпателя помещали на заранее приготовленную питательную селективную среду в чашки Петри. В течение 20 мин выдерживали чашки в ламинаре, а затем переносили в термостат (+37°С) и оставляли на ночь. На следующий день приготавливали ПЦР смесь согласно следующему протоколу: 18,5 мкл воды, 2,5 мкл 10X буфера, 1,3 мкл 50мМ Mg^{2+}, 2 мкл 2мМ dNTP, 0,1 мкл M13F, 0,1 мкл M13R, 0,5 мкл Tag полимеразы. Смесь раскапывали по пробиркам по 25 мкл. С помощью зубочистки белые колонии (предположительно, со вставкой) помещали в пробирки с ПЦР смесью. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Tetrad 2 по следующей программе: 95°С 3 мин; 35 циклов - 95°С 20 сек, 55°С 30 сек, 72°С 1 мин; 72°С 4 мин; 4°С ∞. По окончании ПЦР проводили проверочный электрофорез в 1,5% агарозном геле. Для дальнейшей работы отбирали только те пробы, которые содержали вставку нужного размера. Отобранные пробы чистили на колонках с помощью набора реактивов для выделения ДНК из реакционной смеси фирмы Eppendorf (Москва). Полученные ампликоны секвенировали по методу Сенгера.

Затравкой для начала секвенирования служили праймеры M13. Секвенирование проводили на приборе ABI 3500xl в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для выравнивания полученных последовательностей использовали программу MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), а для визуализации – BioEdit (Tippmann, 2004; http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html). Для идентификации последовательностей использовали информационно-поисковую систему BLAST с сайта Национального института Биотехнологической Информации (NCBI) (Nucleotide collection nr/nt) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.3. Гибридологический анализ

Для проведения гибридологического анализа выполнено две серии скрещиваний на КОС ВИР. В 2011 г. под руководством д.б.н. В. А. Гавриловой были получены гибриды от скрещиваний линии ЦМС ВИР 116А с группой линий, контрастных по типу цитоплазмона и наличию молекулярных маркеров гена *Rf1*, *RFL-PPR* генов, а также других маркеров, локализованных в 13 группе сцепления. Гибриды F_2 от этих скрещиваний были получены д.б.н. И. Н. Анисимовой в ППЛ ВИР в 2012-2014 гг. Во второй серии скрещиваний (2014 г.) материнской формой являлась фертильная линия ВИР 365, которая обладала стерильной цитоплазмой, но не имела маркеров локуса *Rf1*. Для стерилизации линии использовали метод химической кастрации гиббереллином в концентрации 0,005% (расход раствора составлял приблизительно 10 мл/растение). Материнские растения опрыскивали в фазу «звездочки» раствором гиббереллина в концентрации 0,0005% (Анащенко, 1967). Стерилизованные растения опыляли пыльцой линий ВИР 558, ВИР 637, ВИР 740, RIL 130, ВИР 449, различающихся по восстановительной способности (линии ВИР 449 и ВИР 637 утратили способность к восстановлению фертильности пыльцы), типу цитоплазмы и наличию молекулярных маркеров локуса *Rf1*. Скрещивания проводили путем

переноса отцовской (фертильной) пыльцы на предварительно заизолированные (до начала цветения) корзинки материнских стерильных линий. Пыльцу переносили несколько раз после начала цветения материнской линии. Процесс повторяли через день до окончания цветения корзинки.

Гибриды F_1 были получены только в комбинации ВИР 365 × RIL 130, т.к. в год скрещиваний много материнский растений погибло в связи с неблагоприятными погодными условиями. Список изученных гибридов представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Гибридные комбинации, изученные в работе

Комбинация скрещивания	**Год изучения**	**Место изучения**
F1, F2 (ВИР 116А × ВИР 365)	2013, 2017	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 116А × RIL 130)	2013, 2015	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 116А × ВИР 740)	2013, 2015	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 116А × ВИР 210)	2013, 2014, 2016	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 116А × ВИР 558)	2013, 2017	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 116А × ВИР195)	2013, 2017	ППЛ ВИР
F1, F2 (ВИР 365 × RIL 130)	2013, 2016	ППЛ ВИР, КОС ВИР
F1, F2 (ВИР 365 × RIL 80)	2013, 2018	ППЛ ВИР
F_a (ВИР 116А × ВИР 211) × ВИР 211	2014	ППЛ ВИР
F_a ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)	2016	ППЛ ВИР

2.4. Цитологический анализ пыльцы

Фертильность пыльцы оценивали визуально – по наличию нормально развитых пыльников, содержавших пыльцу, и на цитологических препаратах, окрашенных ацетокармином. Долю фертильных пыльцевых зерен подсчитывали по методике Навашина (цит. по Роскин, 1951) с изменениями, на глицерин-желатиновых препаратах (Воронова и др., 2011).

Для проведения цитологического анализа с отцовских растений в период массового цветения (июль – КОС ВИР, август – ППЛ ВИР 2011, 2014 гг.) с

помощью пинцета собирали цветки и фиксировали в пробирках типа Eppendorf с раствором фиксатора FAA (ФУС - спирт-формалин-уксусная кислота). Для приготовления раствора использовали нижеследующий протокол. К 100 мл 70° спирта добавляли 7 мл 40% формалина и 7 мл ледяной уксусной кислоты (Барыкина и др., 2000). Нераскрывшиеся трубчатые цветки собирали в утренние часы из разных (не менее 5) секторов корзинки. Затем в лабораторных условиях из каждой пробирки брали по 6 цветков, переносили их на предметное стекло и добавляли 3-4 капли ацетокармина. Продолжительность окраски варьировала от 30 мин до нескольких часов. После высыхания ацетокармина цветки промывали водой, раздавливали препаровальной иглой и добавляли пару капель мовиола, после чего накрывали покровным стеклом.

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 пыльцевых зерен, а также их диаметр. Подсчет процента фертильных пыльцевых зерен проводили на основании анализа не менее 10 полей зрения при 20-кратном увеличении.

2.5. Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики в программах MS Excel 2003-2007 и Statistica 6.0 (χ-квадрат, критерий Шапиро-Уилка). Структурирование 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.

Расчет частоты рекомбинации по результатам анализа расщепления в F_2 рассчитывали по формуле (Рокицкий, 1974):

$$np^2 - (N_1 - 2R_1 - 2R_2 - N_2)p - 2N_2 = 0$$, где

n – общее число растений F_2

p – квадрат частоты кроссинговера (r^2) для случая отталкивания

$(1-\sqrt{p})$ – частота кроссинговера для случая притяжения

N_1 – число растений A-B-

R_1 – число растений A-bb

R_2 – число растений aaB-

N_2 – число растений aabb

Ошибку рекомбинации рассчитывали по формуле:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Расчет частоты рекомбинации в анализирующем скрещивании проводили по формуле:

$$r = \frac{R}{n}$$, где

R – число растений с рекомбинантным фенотипом

n – общее число растений

При конструировании генетических карт использовалось программное обеспечение для графического представления генетических связей и QTL MapChart 2.32 (Voorrips, 2002).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Генотипирование линий генетической коллекции подсолнечника ВИР

Для генотипирования линий коллекции использовали следующие маркеры: STS115, HRG01, HRG02, ORS224, ORS511, ORS799, SCO04, SCX20 (группа сцепления LG13); SCT06 (группа сцепления LG8); митохондриальный маркер orfH522, а также маркеры QHL12D20, L12D20 и B20M13 хромосомная локализация которых была неизвестна.

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

3.1.1. Генотипирование линий, с помощью маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*

Согласно данным, любезно предоставленным д.б.н. В. А. Гавриловой и к.с.-х.н. В.Т. Рожковой, в родословной линий, отобранных для анализа, участвуют 56 источников различного происхождения, в числе которых–сорта, гибриды (в том числе и межвидовые), а также коллекционные образцы, что свидетельствует о ее значительном генетическом разнообразии.

С использованием молекулярного маркера orfH522 изученная выборка линий была дифференцирована по типу цитоплазмы. Оказалось, что 61 фертильная линия (86%) имеет стерильную цитоплазму PET1-типа. У 10 линий маркер orfH522 не был обнаружен, следовательно, эти линии имели фертильную цитоплазму или стерильную не PET1-типа (рис. 4).

Рисунок 4 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами orfH522: M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas), 1–ВИР 740 (F), 2–ВИР 116А (S), 3–ВИР 130Б (F), 4–RIL 130 (S), 5–ВИР 349 (F), 6–ВИР 710 (S), 7–ВИР 370 (S), 8–ВИР 702 (S), 9–ВИР 361 (S), 10–ВИР 249 (S), 11–ВИР 183 (S), 12–ВИР 220 (S), 13–ВИР 200 (S), 14–ВИР 369(F), 15–ВИР 234(S), 16–ВИР 263(S), 17–ВИР 376(S), 18–ВИР 449(F), 19–ВИР 387(F). Примечание. S – стерильный PET1-тип цитоплазмы; F – фертильный или стерильный не PET1-типа

Три линии из группы с фертильной (или стерильной не PET1-типа) цитоплазмами (ВИР 160, ВИР 387 и ВИР 449) в скрещиваниях с линией ЦМС PET1 закрепляли стерильность (Анисимова и др., 2014), другие линии по данному признаку не анализировались. Наличие у линии стерильного (PET1) типа цитоплазмона является косвенным подтверждением присутствия в генотипе гена (или генов) *Rf*, необходимых для восстановления фертильности пыльцы. Это значительно облегчает поддержание отцовских линий-восстановителей, т.к. в случае утраты функциональных аллелей *Rf*-генов растение становится стерильным, что служит причиной его выбраковки при размножении.

Для определения аллельного состояния гена *Rf1* использовали STS-маркер STS115, SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, а также SSR-маркеры ORS224, ORS511 и ORS799. У стерильных линий с цитоплазмой PET1 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 цитоплазмоном RIG0-типа амплифицировался фрагмент STS115 ожидаемого размера 115 пн (рис. 5). Среди линий-восстановителей со стерильной цитоплазмой PET1-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 давало основание предполагать, 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 F_1 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 образцом, несущего гены *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.

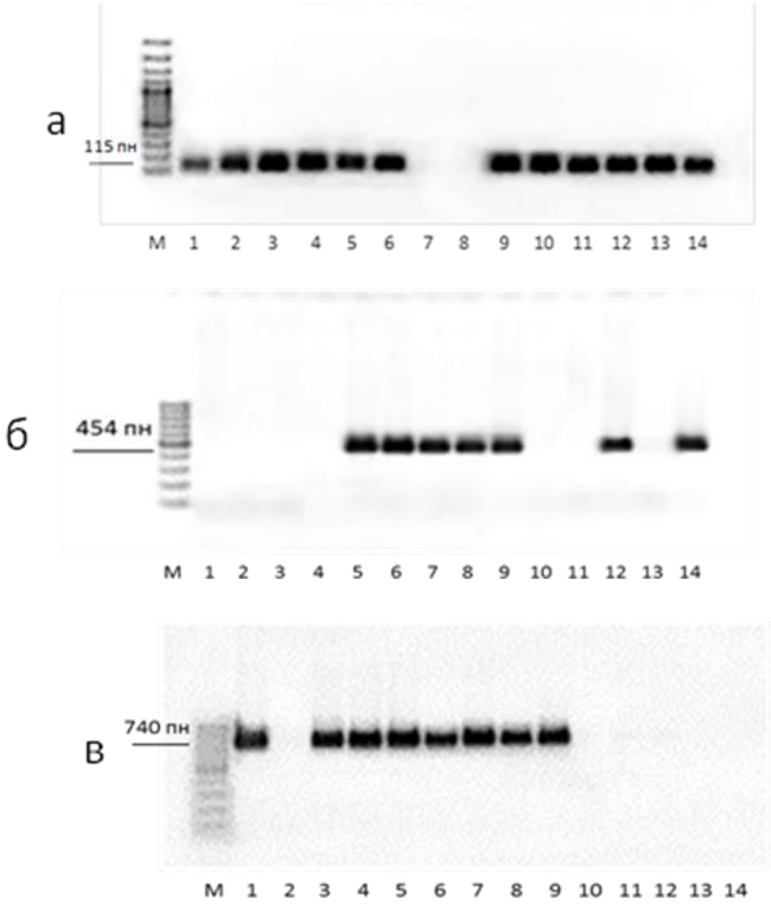


Рисунок 5 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами STS115 (**а**): 1 – ВИР 740, 2 – ВИР 349, 3 – ВИР 361, 4 – RIL 130, 5 – ВИР 386, 6 – ВИР 710, 7 – ВИР 583, 8 – ВИР 116А, 9 – ВИР 702, 10 – ВИР 249, 11 – ВИР 490, 12 – ВИР 220, 13 – ВИР 637, 14 – ВИР 369; K13 (**б**): 1 – ВИР 634, 2 – ВИР 114А, 3 – ВИР 116А, 4 – ВИР 210, 5 – RIL 130, 6 – ВИР 220, 7 – ВИР 234, 8 – ВИР 249, 9 – ВИР 361, 10 – ВИР 365, 11 – ВИР 449, 12

– ВИР 130Б, 13 – ВИР 900, 14 – ВИР 558; Y10 (**в**): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 116А, 3 – ВИР 220, 4 – ВИР 249, 5 – ВИР 361, 6 – ВИР 376, 7 – ВИР 130Б, 8 – ВИР 349, 9 – ВИР 369, 10 – ВИР 449, 11 – ВИР 412, 12 – ВИР 381, 13 – ВИР 900, 14 – ВИР 729. М – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas).

Поскольку в агарозном геле трудно уловить разницу в длине фрагментов микросателлитных локусов, для маркирования линий с помощью SSR-маркеров ORS224, ORS511 и ORS799 использовали систему микрочипового электрофореза для исследования нуклеиновых кислот MCE-202 MultiNA (Shimadzu, Япония). Результаты анализа аллельного полиморфизма данных локусов представлены на рисунке 6 и таблице 8.

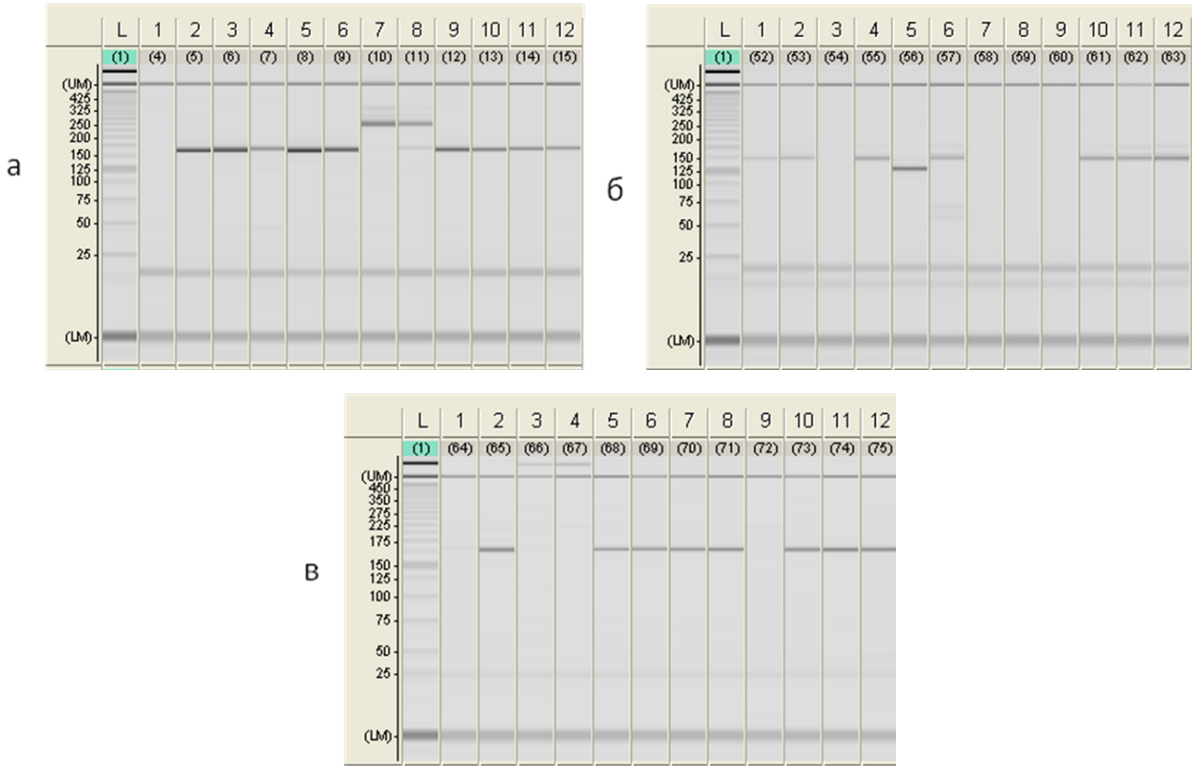


Рисунок 6 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК (MCE-202 MultiNA) с праймерами ORS511 (**а**): 1 – ВИР 160, 2 – RIL 130, 3 – ВИР 740, 4 – ВИР 740, 5 – ВИР 740, 6 – ВИР 710, 7 – ВИР 370, 8 – ВИР 370, 9 – ВИР 700, 10 – ВИР 702, 11 – ВИР 369, 12 – ВИР 369; праймерами ORS224 (**б**): 1 – RIL 130, 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; праймерами ORS799 (**в**): 1 – ВИР 160, 2 – RIL 130, 3 – ВИР 740, 4 – ВИР 740, 5 – ВИР 249, 6 – ВИР 361, 7 – ВИР 700, 8 – ВИР 702, 9 –ВИР 370, 10 – ВИР 702, 11 – ВИР 652, 12 – ВИР 656. (LM – маркер молекулярного веса 25 bp DNA Ladder, Shimadzu)

Таблица 8 – Аллельный полиморфизм микросателлитных локусов, сцепленных с геном *Rf1*

Линия (номер пробы)	Тип цитоплазмы	Аллельные варианты локуса, пн		
		ORS224	ORS511	ORS799
Линии со стандартными аллелями				
ВИР 387*	F	143	159	143
ВИР 349, ВИР 369, ВИР 740	F	143	159	нулевой
ВИР 449*, ВИР 743*	F	нулевой	159	нулевой
ВИР 160*, ВИР 394	F	нулевой	нулевой	нулевой
RIL 130, ВИР 249, ВИР 361, ВИР 437, ВИР 490, ВИР 582, ВИР 632, ВИР 633, ВИР 650, ВИР 656, ВИР 658, ВИР 684, ВИР 699, ВИР 700, ВИР 703, ВИР 704, ВИР 709, ВИР 735, ВИР 751, ВИР 758, ВИР 764, ВИР 768	S	143	159	143
ВИР 183, ВИР 220, ВИР 234, ВИР 263, ВИР 438, ВИР 480, ВИР 583, ВИР 584, ВИР 710, ВИР 729, ВИР 767	S	143	159	нулевой
ВИР 395, ВИР 652, ВИР 752	S	143	нулевой	143
ВИР 386, ВИР 634, ВИР 702, ВИР 761, ВИР 766, ВИР 772, ВИР 776, ВИР 801	S	нулевой	159	143
ВИР 200, ВИР 388, ВИР 397, ВИР 412, ВИР 558, ВИР 697, ВИР 726, ВИР 759, ВИР 762,	S	нулевой	159	нулевой
ВИР 114А, ВИР 151А	S	нулевой	нулевой	143
ВИР 116А, ВИР 637	S	нулевой	нулевой	нулевой
Линии с уникальными аллелями				
ВИР 210	S	105, 106	210, 214	нулевой
ВИР 370	S	106	244	нулевой
ВИР 376, ВИР 378	S	124	159	143
ВИР 343, ВИР 381	S	нулевой	210, 212	нулевой
ВИР 365, ВИР 705	S	нулевой	161 и 240	нулевой
ВИР 377*	F	нулевой	161 и 240	нулевой
ВИР 130Б*	F	нулевой	198	143

Примечание. *закрепляют стерильность в скрещиваниях с линией ЦМС

Присутствие маркерного фрагмента ORS511 длиной 154-162 пн наблюдали у 58 линий (77,3%), причем у 39 линии (67,2%) он был ассоциирован с наличием маркерных фрагментов HRG01 (454 пн), HRG02 (740 пн) и STS115 (115 пн). Это можно объяснить его более близким расположением на генетической карте к локусу *Rf1* по сравнению с другими SSR-маркерами. В локусах ORS224 и ORS511, наряду с аллелями стандартного размера выявлены новые, не описанные в литературе (табл. 8). Наиболее полиморфным оказался локус ORS511: у него выявлено 5 аллелей, в то время как в локусах ORS224 и ORS799 идентифицировано 4 (нулевой, 105-106, 124, 140-146 пн) и 2 аллеля (нулевой, 147-161 пн) соответственно. У большинства линий, обладавших уникальными аллелями локуса ORS511 с размерами амплифицированных фрагментов от 198 до 244 пн, маркеры STS115, HRG01, HRG02 отсутствовали. Исключением являлись линия ВИР 381, у которой обнаружен фрагмент STS115 пн, линия ВИР 705 (фрагмент HRG02 740 пн) и фертильный аналог стерильной линии ВИР 130Б, у которой отмечены все три маркера. Маркерный фрагмент ORS224 размером 140-146 пн выявлен у 40 линий коллекции (53,3%), причем у 30 линий данный фрагмент был ассоциирован с наличием маркерных фрагментов STS115, HRG01, HRG02. Интересно отметить, что у линий ВИР 210 и ВИР 370 с уникальными аллелями локуса ORS224 (105, 106 пн) и ORS511 (210-214 пн) маркеры гена *Rf1* STS115, HRG01, HRG02 отсутствовали, но они были обнаружены у линий ВИР 376 и ВИР 378 с уникальным аллелем ORS224 (124 пн) и стандартным ORS511 (161 пн), в происхождении которых участвовали идентичные источники.

У трех линий выборки (ВИР 365, ВИР 705 и ВИР 377) продукты амплификации с праймерами ORS511 включали 2 фрагмента размером 161 и 240 пн (рис. 7).

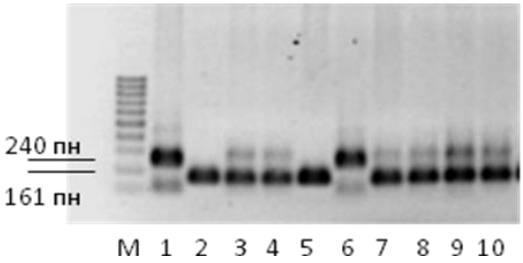


Рисунок 7 – Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами ORS511: 1 и 6 – линии с уникальными аллелями локуса ORS511 (ВИР 365, ВИР 705); 2-5, 7-10 – линии со стандартным аллелем. M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas).

Один из фрагментов мог появиться в результате неспецифической амплификации. Для проверки этой гипотезы мы провели анализ индивидуальных растений расщепляющейся гибридной популяции F_2 ВИР 365 × RIL 130, а также растений популяции от анализирующего скрещивания ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130) (рис. 8, табл. 9).

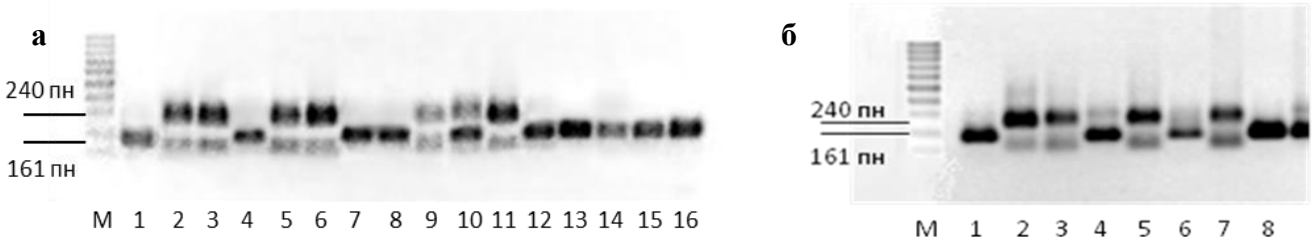


Рисунок 8 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК растений с праймерами ORS511: **а)** F_2 ВИР 365 × RIL 130, 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3-16 – растения F_2; **б)** F_a ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3-8 – гибридные растения F_a, M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas).

Таблица 9 – Наследование уникальных аллелей локуса ORS511 в расщепляющихся гибридных популяциях

Гибрид	**Число растений с аллелями, шт**		**Ожидаемое соотноше-ние**	χ^2	***p***
	159 пн	**161, 240 пн**			
F_2 (ВИР 365 × RIL 130)	44	17	3 : 1	0,27	$p > 0,05$
Fa ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)	19	23	1 : 1	0,38	$p > 0,05$

Продукты амплификации ДНК растений из популяции F_2 (ВИР 365 × RIL 130) были представлены двумя фенотипическими классами: фрагментами размером 161 пн (тип отцовского родителя RIL 130) и 161, 240 пн (двойной – тип линии ВИР 365) в соотношении 3:1 ($\chi^2 = 0{,}27$; $p > 0{,}05$). Популяция F_a ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130) расщеплялась на два фенотипических классах, соответствовавших фенотипам линий ВИР 365 и RIL 130; их соотношение соответствовало ожидаемому 1:1 ($\chi^2 = 0{,}38$; $p > 0{,}05$). Таким образом, результаты гибридологического анализа позволяют предположить, что локус ORS511 линии ВИР 365 дуплицирован и включает две тесно сцепленных последовательности.

Для более детальной характеристики полиморфизма SSR-локусов ORS224 и ORS511 амплифицированные фрагменты были клонированы и секвенированы. Были проанализированы нуклеотидные последовательности аллельных вариантов локуса ORS224 у линий ВИР 376 и ВИР 740. Согласно литературным данным, аллель микросателлитного локуса ORS224 имеет структуру (GA)8N2(GA)13 и размер 136 пн (Tang et al., 2002). В нашем случае структура аллелей локуса ORS224 у изученных генотипов отличалась от «стандартной» (рис. 9). У линии ВИР 376 амплифицированный фрагмент микросателлитного локуса ORS224 включал 13 GA-повторов и имел длину 113 пн, а клонированные фрагменты линии ВИР 740 имели структуру (GA)20 длиной 127 пн. Нуклеотидные последовательности локуса ORS511 были изучены у 4 линий генетической коллекции: ВИР 740, ВИР 376, ВИР 210 и ВИР 370 (рис. 6 (а), табл. 10).

Таблица 10 – Нуклеотидный полиморфизм аллелей микросателлитного локуса ORS511

Линия	**Тип цито-плаз-мы**	**Фактическое количество микросателлитных повторов**		**Размер фрагмента, пн**	**Вставка 5G**	**Однонуклеотидные замены во фланкирующих последователь-ностях**
		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	+	+

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 AT- и GT-мотивов, но также вставкой пяти нуклеотидов G внутри микросателлитного локуса и однонуклеотидными заменами во фланкирующих последовательностях (рис. 10). Интересно отметить, что при анализе индивидуальных растений у линий ВИР 740 и ВИР 376 выявлена гетерозиготность по аллельным вариантам локуса ORS511. У линии ВИР 740 присутствовали аллели 154 и 158 пн, а у линии ВИР 376 – 156 и 158 пн. Такие различия могут быть обусловлены специфической ошибкой амплификации, репликации ДНК (проскальзыванием матричной цепи). При анализе двух других линий (ВИР 210 и ВИР 370) мы выявили транзицию (T→C) внутри AT-части микросателлитного локуса и вставку пяти нуктеотидов G в GT-части, а также транзицию (G→A) и трансверсию (A→C) во фланкирующих областях. Такой аллельный полиморфизм можно объяснить высоким темпом мутирования в данных локусах (особенно в более длинных аллелях), а также возможным неравным кроссинговером. Изученные микросателлитные локусы лежат в не кодирующей области генома и поэтому изучение аллельного полиморфизма важно для оценки генетического разнообразия коллекции.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90        100       110       120
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
VIR_376_1   1       AACCAAAGCGCTGAAGAAATCAAGAAAAGGTTTATTGATTAAAAAAACTAATATGTAAAAGAATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA--------------TGTAGCTTCTGGTAGTTAGTCCA 113
VIR_376_2   1       ........................................................................................................--------------.......................  113
VIR_740_1   1       ........................................................................................................GAGAGAGAGAGAGAGA.......................  127
VIR_740_2   1       ........................................................................................................GAGAGAGAGAGAGAGA.......................  127
```

Рисунок 9 – Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов микросателлитного локуса ORS224 у линий коллекции подсолнечника.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90        100       110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
VIR740      1       TGGCTCAGATTAAGTTCACACAGTTCACTCTCAAACTAGTGTTCACTCTAGAACCCTACCATATATATATATAT----------------------------------------GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAAATTACACCAGATATTTCTTAACAAACTAATGGGATACCTGTTACTCGCAACCCG 155
VIR740_1    1       ........................................................................ATATAT--------------------------------------.......................................................................................... 159
VIR376      1       ........................................................................ATAT----------------------------------------.......................................................................................... 159
VIR376_1    1       ........................................................................ATAT----------------------------------------.......................................................................................... 157
VIR130B     1       ...............................C........................................ATATATATATATATATATATATATATATAT------GTGTGTGTGT.......................................................................................... 193
VIR130B_1   1       ...............................C........................................ATATATATATATATATATATATATATNTNT------GTATGTGTGT.......................................................................................... 193
VIR370      1       ...............................C.............................C.......ATATATATATATAT-------------GTGTGTGTGTGTGTGGG.G-.....................-.............................A.......................... 183
VIR370_1    1       ...............................C.............................C.......ATATATATATATAT-------------GTGTGTGTGTGTGTGGG.G-.......................................................A.......................... 184
VIR210      1       ...............................C.............................C.......ATATATATATATAT-------------GTGTGTGTGTGTGTGGG.G-.........................T........A...........A...A.......................... 184
VIR210_1    1       ...............................C.............................C.......ATATATATATAT--------------GTGTGTGTGTGTGTGGG.G.......................................................A.......................... 184
```

Рисунок 10 – Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов микросателлитного локуса ORS511 у линий коллекции подсолнечника.

3.1.2. Генотипирование линий с помощью маркеров *PPR*-генов

Большинство описанных к настоящему времени генов *Rf*, за небольшими исключениями, кодируют PPR-белки, содержащие повторяющиеся вырожденные мотивы из 35 аминокислотных остатков (Pentatricopeptide Repeats, PPR). Поэтому выборку генетической коллекции подсолнечника решили проанализировать с помощью молекулярных маркеров, разработанных на основе *RFL-PPR*-генов, продуктами которых являются PPR-белки, связанные с экспрессией признака восстановления фертильности. Часть выборки была проанализирована И. Н. Анисимовой с соавторами в 2014 г., однако данные о связи между полиморфизмом последовательностей *RFL-PPR*-генов и аллельным состоянием локуса *Rf1* не были выявлены. Поэтому было решено проанализировать всю коллекцию с целью поиска ассоциации между маркерными вариантами и аллельным состоянием гена *Rf1*.

В отделе генетики ВИР в 2012-2014 гг. на основе фрагментов экспрессирующей последовательности (EST) (Анисимова, 2014) были разработаны CAPS-маркеры QHL12D20_*HaeIII*, L12D20_*HaeIII* и B20M13_*RsaI*. После обработки амплифицированных фрагментов рестриктазами *HaeIII* и *RsaI* мы получили 2 типа спектров у каждого из маркеров. Различия между вариантами рестрикционных фрагментов обусловлены единичными заменами в интроне. Предположительно варианты маркеров QHL12D20_*HaeIII*_1 (110, 150, 210, 360 и 400 пн) и B20M13_*RsaI*_1 (140 и 300 пн) ассоциированы с присутствием в генотипе доминантного аллеля *Rf1*, тогда как QHL12D20_*HaeIII_2* (110, 150, 360 и 610 пн) и B20M13_*RsaI*_2 (100, 140, 220 пн) чаще обнаруживаются у носителей рецессивного аллеля. Результаты анализа распределения полиморфных вариантов данных маркеров представлены в табл. 11.

Таблица 11 – Распределение полиморфных вариантов фрагментов *RFL-PPR*-генов среди линий генетической коллекции

Группа линий (тип цитоплазмона)	Число линий с вариантами QHL12D20/*HaeIII*		Число линий с вариантами B20M13/*RsaI*	
	1	2	1	2
Фертильные (S PET1)	32	18	40	22
Фертильные (F или S(X))	5	3	5	4
Линии ЦМС и фертильный аналог	1	2	0	4

Примечание. S − стерильный цитоплазмон, F или S(X) − фертильный цитоплазмон или стерильный X типа.

Среди линий со стерильной цитоплазмой (предполагаемые носители доминантного аллеля гена *Rf1*) преобладали варианты фрагментов B20M13_*RsaI*_1 и QHL12D20_*HaeIII*_1: маркер B20M13_*RsaI*_1 имели 40 линий, а маркер B20M13_*RsaI*_2 – 22 (рис. 11). Маркер QHL12D20_*HaeIII*_1 выявлен у 32 линий со стерильной цитоплазмой, а вариант QHL12D20_*HaeIII*_2 – у 18 (рис. 12, табл. 11). Варианты 2 были характерны также для линий ЦМС и линии закрепителя стерильности ВИР 130Б, за исключением ВИР 151А с цитоплазмоном RIG0, которая имела вариант 1 маркера QHL12D20_*HaeIII*. К сожалению, для 13 линий нам не удалось получить продукты амплификации с праймерами QHL12D20. В то же время в работе И. Н. Анисимовой с соавторами (2014), выполненной на другой выборке генотипов, ассоциация маркеров QHL12D20_*HaeIII* с функциональным состоянием локуса *Rf1* оказалась более выраженной.

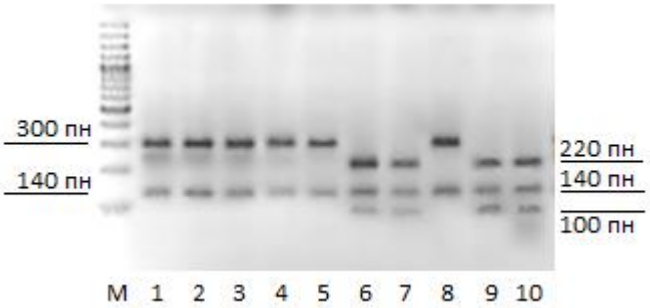


Рисунок 11 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами B20M13: M – маркер молекулярного веса 3000 bp (Fermentas), 1 – ВИР 220, 2 – ВИР 234, 3 – ВИР 349, 4 – ВИР 376, 5 – ВИР 437, 6 – ВИР 116А, 7 – ВИР 249, 8 – ВИР 490, 9 – RIL 130, 10 – ВИР 710.

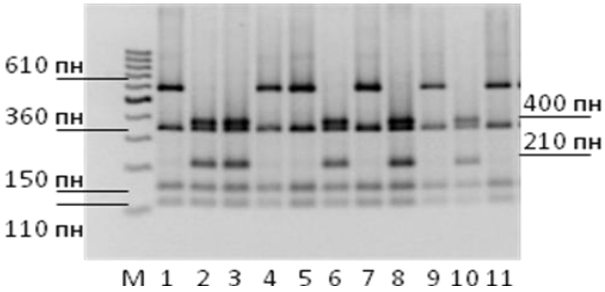


Рисунок 12 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами QHL12D20: M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas), 1 – ВИР 386, 2 – RIL 130, 3 – ВИР 234, 4 – ВИР 397, 5 – ВИР 703, 6 – ВИР 249, 7 – ВИР 637, 8 – ВИР 361, 9 – ВИР 381, 10 – ВИР 437, 11 – ВИР 388.

3.1.3. Генотипирование линий с помощью молекулярных маркеров генов устойчивости к болезням

В группе сцепления 13 генетической карты подсолнечника локализованы ген устойчивости к возбудителю ржавчины R_{adv} и ген *Pl8*, определяющий устойчивость к возбудителю ЛМР. В группе сцепления 8 находится ген устойчивости к ржавчине *R1*. Поскольку он одним из первых был введен в современные сорта подсолнечника, было решено проверить наличие данного гена у образцов коллекции. Для анализа использовали SCAR-маркеры, сцепленные с генами R_{adv} и *R1* (Lawson et al., 1998). Маркеры SCO04_950 и SCX20_600 сцеплены с геном R_{adv}, а маркер SCT06_950 – с геном *R1* (Приложение 1).

Диагностический фрагмент SCO04 размером 950 пн, указывающий на присутствие гена устойчивости к возбудителю ржавчины R_{adv} (рис. 13), имели 14 линий со стерильной и 6 линий – с фертильной цитоплазмой, у остальных же присутствовал фрагмент в 850 пн.

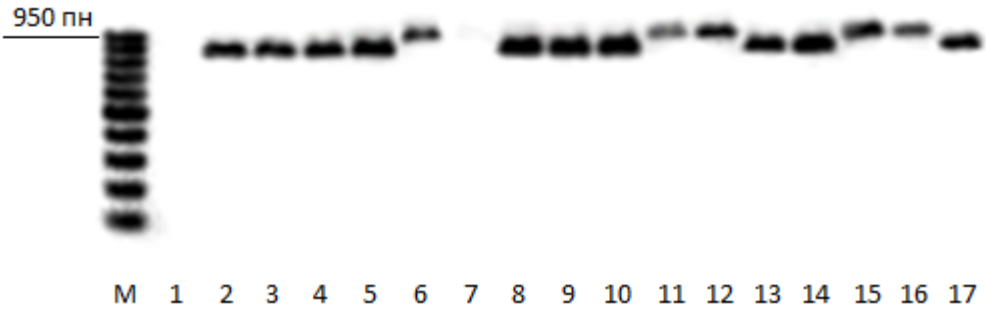


Рисунок 13 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами SCO04: M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas), 1 – ВИР 710, 2,3 – ВИР 370, 4 – ВИР 700, 5 – ВИР 702, 6,7 – ВИР 369, 8, 9 – ВИР 361, 10 – ВИР 249, 11,12 – ВИР 349, 13,14– ВИР 378, 15 – ВИР 130Б, 16 – ВИР 387, 17 – ВИР 395.

Выборку оценили на присутствие маркера SCX20. Оказалось, что 60% образцов имели фрагмент 600 пн. Возможно, это объясняется более слабым сцеплением данных маркеров с геном R_{adv} (Анисимова и др., 2015). У 13 линий выявлены оба диагностических маркера – SCO04_950 и SCX20_600. Результаты показали, что у линий генетической коллекции ВИР и, следовательно, у исходных форм, на основе которых они были созданы, широко распространен ген *R1*, тогда как ген R_{adv} встречается реже. Диагностический фрагмент SCT06_950 был обнаружен у 62 проанализированных линий (82,7%). Все три маркерных фрагмента выявлены у 12 линий коллекции (RIL 130, ВИР 130Б, ВИР 349, ВИР 369, ВИР 387, ВИР 480, ВИР 558, ВИР 634, ВИР 703, ВИР 710, ВИР 740, ВИР 801). Интересно отметить, что 4 линии получены от скрещивания линии ВИР 113 с источником генов *Rf* и *Pl*, а линии ВИР 634 и ВИР 801 выделены из французского гибрида Sunbred265. С помощью молекулярных маркеров не удалось выявить гены *R1* и R_{adv} у стерильных линий на основе ЦМС PET1. Таким образом, при создании коммерческого гибрида на основе этих линий гены устойчивости к ржавчине должны быть переданы от отцовской линии-восстановителя.

Генетическую коллекцию дифференцировали с помощью кодоминантного SSR-маркера HA4011 (рис. 14), который идентифицирует ген устойчивости к

возбудителю ЛМР *Pl8* (Radwan et al., 2004). Диагностический фрагмент размером 240 пн, указывающий на наличие гена устойчивости, встречался у 36 линий (48%), в том числе и у стерильных линий ВИР 114А, ВИР 116А и ВИР 151А, у остальных линий наблюдали фрагмент 200 пн, либо фрагмент отсутствовал.

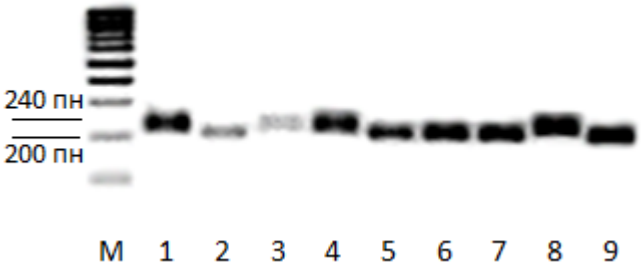


Рисунок 14 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК с праймерами HA4011. M – маркер молекулярного веса 1000 bp (Fermentas), 1 – ВИР 116А, 2 – ВИР 740, 3 – ВИР 114А, 4 – ВИР 130Б, 5 – ВИР 449, 6 – ВИР 160, 7 – ВИР 370, 8 – ВИР 583, 9 – ВИР 377.

3.1.4. Структурирование изученной выборки линий

Анализ методом главных координат, выполненный с помощью программы для популяционно-генетического анализа GenAlEx 6.5, позволил структурировать изученную выборку линий на 4 группы. На точечной диаграмме (рис. 13) показана группировка линий генетической коллекции в зависимости от наличия/отсутствия всех маркерных фрагментов (рис. 15). К группе 1 относятся 29 линий на стерильной основе с присутствием всех (или отсутствием от одного до трех) диагностических маркеров гена *Rf1*. Вторая группа (13 линий) характеризуется отсутствием (или присутствием одного или двух) диагностических маркеров гена *Rf1*, а также наличием у линий уникальных фрагментов микросателлитных локусов ORS224 и ORS511 (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, предположительно имеющих, судя по данным анализа генеалогии, фертильный тип цитоплазмы либо стерильную цитоплазму не PET1-

типа (Х-тип цитоплазмы). В третью группу вошли стерильные линии, характеризующиеся отсутствием диагностических маркеров генов *Rf1*, $R_{adv,}$ *R1*, а также наличием вариантов B20M13_*RsaI*_2, QHL12D20_*HaeIII*_2 *RFL-PPR*-генов (за исключением ВИР 151А). Тридцать оставшихся 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 большом генетическом разнообразии коллекции. Лишь единичные линии были идентичны по наличию/отсутствию маркерных фрагментов это линии ВИР 349 и ВИР 369 (группа 4), характеризующиеся идентичным происхождением (ВИР113 × *Rf, Pl*); 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 и ВИР 735 сведения о происхождении отсутствуют.

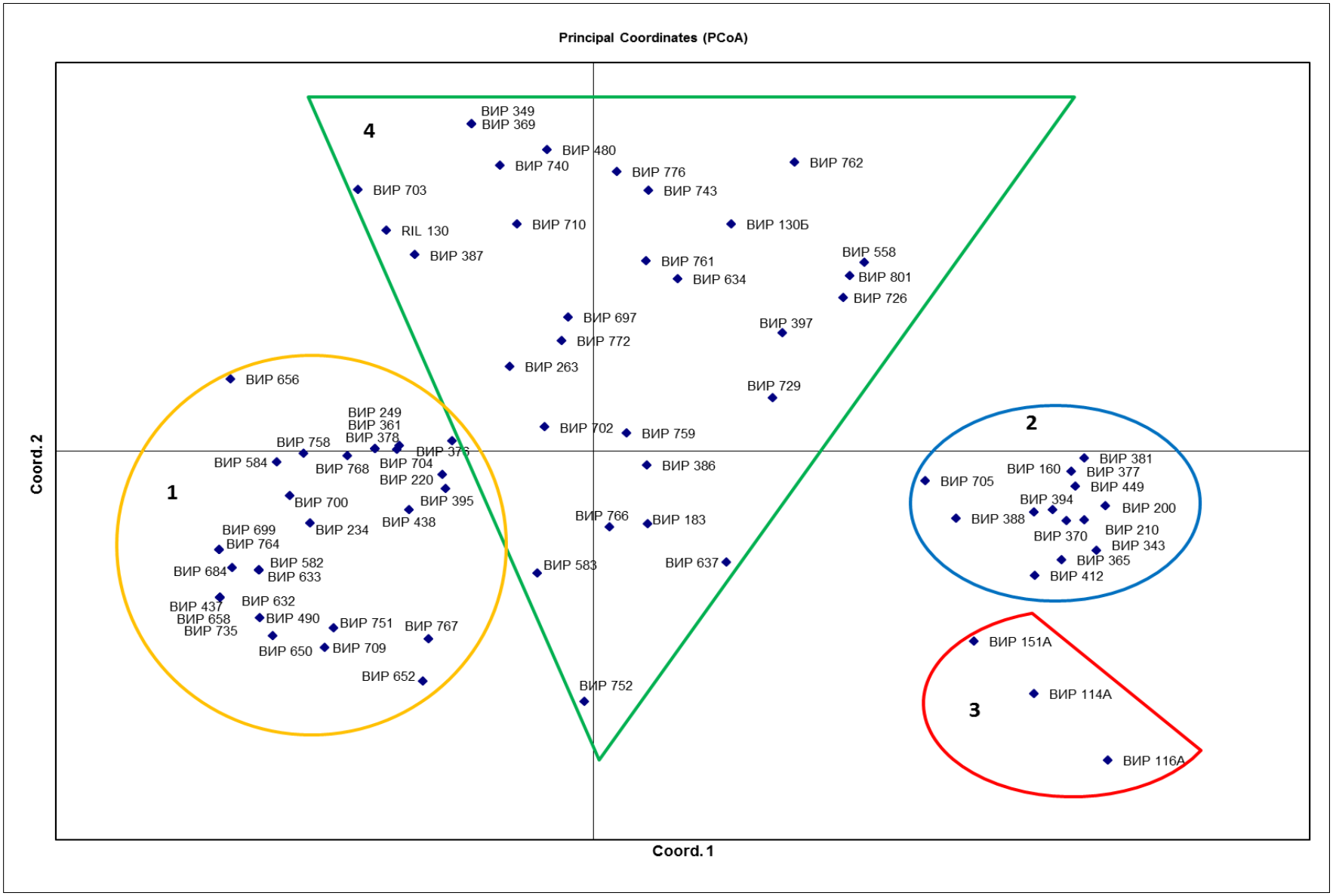


Рисунок 15 – Распределение линий генетической коллекции в зависимости от наличия/отсутствия маркерных фрагментов

Для более детальной оценки генетического разнообразия линий по генам устойчивости к возбудителю ЛМР в работе, помимо маркера HA4011, использовали праймеры HA-P1, специфичные для локуса *Pl5/Pl8*. Согласно Radwan et al. (2004), на присутствие гена устойчивости указывают фрагменты длиной более 1500 пн (для *Pl5* – 2021 пн, для *Pl8* – 1569, 2119, 2237). Была проанализирована ограниченная выборка из 48 линий. Амплифицированный фрагмент HA-P1 2021 пн (*Pl5*) идентифицирован у линий ВИР 160, ВИР 370 и ВИР 387, спектр из трех фрагментов HA-P1 1569, 2119, 2237 пн (*Pl8*) выявлен у ВИР 583, ВИР 726, ВИР 729. Лишь у линии ВИР583 одновременно присутствовали диагностические маркеры HA-P1 (1569, 2119, 2237 пн) и HA4011 (240 пн). Следует отметить, что линия ВИР 583 была отобрана непосредственно из линии RHA 340, которая считается донором гена устойчивости *Pl8* и поэтому может считаться носителем эффективного аллеля. Остальные линии распределились на 15 групп в зависимости от интенсивности и размеров амплифицированных фрагментов, что свидетельствует о высоком уровне разнообразия линий генетической коллекции подсолнечника (рис. 16, табл.12).

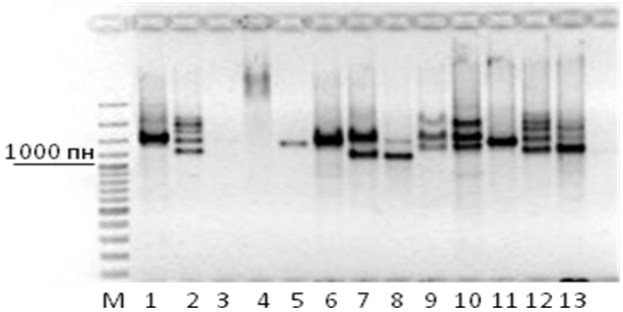


Рисунок 16 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника с праймерами HA-P1: M – маркер молекулярного веса 3000 bp (Fermentas), 1 – ВИР 343, 2 – ВИР 249, 3 – RIL 130, 4 – ВИР 116А, 5 – ВИР 210, 6 – ВИР 365, 7 – ВИР 369, 8 – ВИР 386, 9 – ВИР 130Б, 10 – ВИР 220, 11 – ВИР 377, 12 – ВИР 801, 13 – ВИР 710.

Таблица 12 – Размеры фрагментов, амплифицированных с парой праймеров HA-P1

№ группы	Количество фрагментов	Размер амплифицированного фрагмента, пн	Линия
1	1	1300	ВИР 210, ВИР 365, ВИР 377, ВИР 754, ВИР 778
2		1500	ВИР 234
3		1600	ВИР 343
4		2000	ВИР 160, ВИР 370, ВИР 387
5	2	1100(200), 1500	ВИР 369, ВИР 386, ВИР 397, ВИР 438, ВИР 558, ВИР 653, ВИР 684, ВИР 743, ВИР 759, ВИР 761, ВИР 763
6		1500, 1600	ВИР 196, ВИР 388, ВИР 584, ВИР 633, ВИР 640, ВИР 652, ВИР 658, ВИР 702, ВИР 704
7		1600, 2000	ВИР 729
8		1500, 2100	*ВИР 583 (Pl8)*
9	3	1100, 1500, 2000	ВИР 130Б, ВИР 220, ВИР 349, ВИР 369, ВИР 710, ВИР 740
10		1200, 1450, 1600	ВИР 764, ВИР 766
11		1200, 1500, 1600	ВИР 376
12		1200, 1500, 2000	ВИР 703
13		1500(50), 1600(700), 2000(100)	ВИР 726
14	4	1200, 1500, 1600, 2000	ВИР 697
15	5	1200, 1500, 1600, 2000, 2100	ВИР 249, ВИР 260, ВИР 361, ВИР 378, ВИР 395, ВИР 480, ВИР 490, ВИР 632, ВИР 637, ВИР 751, ВИР 700, ВИР 801

3.2. Наследование признака восстановления фертильности пыльцы в межлинейных скрещиваниях

С целью определения генотипов линий генетической коллекции по признаку восстановления фертильности пыльцы были проведены две серии скрещиваний. В первой серии, выполненной в 2011 г., материнскими формами служили стерильные линии ВИР 116А и ВИР 111А с ЦМС PET1-типа, а также фертильная линия ВИР 365, имеющая стерильную цитоплазму PET1. Отцовские линии для скрещиваний были отобраны на основе предварительного молекулярного скрининга. Они различались по типу цитоплазмы (фертильная или

стерильная), происхождению и наличию молекулярных маркеров гена *Rf1* (STS115, HRG01, HRG02, SSR224, SSR511, SSR799), полиморфных фрагментов *RFL-PPR*-генов B20M13, L12D20, а также маркеров генов устойчивости к патогенам – возбудителям ржавчины (SCX20, SCO04, SCT06) и ЛМР (HA4011) (табл. 13). Характеристики использованных молекулярных маркеров приведены в предыдущих разделах.

Таблица 13 – Характеристика родительских линий

Линия	Происхождение	Тип цито-плазмы	Роль в скрещивании	Наличие маркера											
				STS115	HRG01	HRG02	B20M13 _*Rsal* *	L12D20 _*HaeIII* **	SSR224	SSR511	SSR799	SCO04	SCX20	SCT06	HA4011
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ВИР 111А	ВНИИМК №309	ЦМС PET1	♀	–	–	–	–	2	–	–	–	850	–	–	–
ВИР 116А	сорт Вымпел, Россия	ЦМС PET1	♀	–	–	–	2	2	–	–	–	850	–	–	240
ВИР 160	к-2227, США	F	♂	115	–	–	2	1	нет данных	нет данных	нет данных	–	600	950	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 364	ВИР 116 × источник *Rf*, *Pl*, Россия	ЦМС PET1	♂	115	–	740	1	2	нет данных	нет данных	нет данных	–	600	950	–
ВИР 365	Прогресс × к-2699, Россия	ЦМС PET1	♀♂	–	–	–	2	1	–	161 и 240	–	850	–	950	–
ВИР 366	Россия, Краснодарский край	F	♂	нет данных	–	–	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
ВИР 371	ВИР158	F	♂	–	–	–	1	1	нет данных	нет данных	нет данных	950	–	950	–
ВИР 387	Питомник ЦМС 83	F	♂	115	–	740	1	1	143	159	143	950	600	950	240
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

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ВИР 729	неизвестно	ЦМС PET1	♂	–	454	–	2	2	–	159	–	–	–	950	–
ВИР 740	ВИР 113 × *Rf, Pl,* Россия	F	♂	115	454	740	2	1	143	159	–	950	600	950	200
RIL 80	I1083HR4 × RHA 345 Франция	ЦМС PET1	♂	115	454	740	2	2	143	159	–	950	–	–	–
RIL 130	I1083HR4 × RHA 345 Франция	ЦМС PET1	♂	115	454	740	2	1	143	159	143	950	600	950	200

Примечание:

* Варианты маркера B20M13_*RsaI*: 1 вар. – 140 и 300 пн; 2 вар. – 100, 140, 220 пн.

** Варианты маркера L12D20_*HaeIII*: 1 вар. – 110, 150, 210, 360 и 400 пн; 2 вар. – 110, 150, 360 и 610 пн.

Данные о характере наследования признака восстановления фертильности пыльцы в F_1 от скрещиваний стерильных линий ЦМС ВИР 109А и ВИР 116А с группой фертильных линий, различающихся по наличию/отсутствию молекулярных маркеров гена *Rf1* и типу цитоплазмона, представлены в табл. 14. По результатам тестерных скрещиваний, линии (ВИР 195, ВИР 210, ВИР 364, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 729, RIL 80, RIL 130) со стерильной цитоплазмой PET1 и характеризующиеся наличием маркеров гена *Rf1*, восстанавливали фертильность пыльцы в скрещиваниях с тестерами ВИР 109А и ВИР 116А. Линии ВИР 195 и ВИР 365, у которых отсутствовали диагностические маркеры гена *Rf1*, но цитоплазма, по данным молекулярно-генетического анализа, была стерильной, также восстанавливали фертильность пыльцы при скрещиваниях со стерильными тестерами. Линия ВИР 740, характеризовавшаяся фертильной цитоплазмой и наличием всех диагностических маркеров гена *Rf*, также восстанавливала фертильность при скрещиваниях. В то же время линии с фертильным типом цитоплазмона и не имеющих маркерных фрагментов гена *Rf1* (ВИР 211, ВИР 371) либо характеризующиеся наличием лишь одного маркерного фрагмента STS115 (ВИР 160 и ВИР 387), оказались закрепителями стерильности (Анисимова и др., 2014). К сожалению, данные о наличии диагностических маркеров у линии ВИР 366 отсутствуют.

Таблица 14 – Результаты тест-скрещиваний линий подсолнечника с ЦМС с фертильными линиями (ППЛ ВИР, 2012-2014) (Анисимова и др., 2014)

Материнская линия ЦМС (PET1)	**Отцовская линия**		**Фертильность растений F_1**
	Название	**Тип цитоплазмона**	
ВИР 116А	**ВИР 195, ВИР 210**, ВИР 364, **ВИР 365**, **ВИР 558**, ВИР 729, **RIL 80, RIL 130**	ЦМС PET1	F
	ВИР 740	фертильный	F
	ВИР 160, ВИР 211, ВИР 366, ВИР 371, ВИР 387	фертильный	S
ВИР 109А	ВИР 364, ВИР 558	ЦМС PET1	F

Примечание: F – растения F_1 мужски фертильные, S – растения F_1 мужски стерильные

Жирным шрифтом выделены отцовские линии, гибриды с участием которых изучены в работе

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 и ВИР 116А × RIL 130 характеризовались высокими показателями фертильности пыльцы и фенотипически соответствовали материнскому типу, а именно имели следующие признаки: ветвление отсутствовало, высота растений составляла 2 м и выше, присутствовала лишь одна крупная центральная корзинка. Данные анализа морфометрических параметров пыльцы отцовских линий и гибридов приведены в разделе «Цитологический анализ пыльцы».

Растения F_1 самоопыляли для получения расщепляющихся гибридных популяций. Растения F_2 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 проанализировали более 100 растений F_2 в каждой комбинации скрещивания, за исключением ВИР 116А × ВИР 558 (93 растения). Во всех изученных популяциях F_2 число растений с фертильным и стерильным фенотипом соответствовало теоретически ожидаемому соотношению 3 : 1, т.е. наблюдали моногенный характер расщепления по данному признаку (табл. 15).

Таблица 15 – Расщепление гибридов F_2 по признаку восстановления фертильности пыльцы (ППЛ ВИР, 2013-2019 гг.)

Гибрид	**Число растений с фенотипом**			χ^2	***p***
	фертильный	**стерильный**	**Всего растений**		
ВИР 116А × RIL 130	94	31	125	0,003	$p > 0,05$
ВИР 116А × RIL 80	106	38	144	0,15	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 195	76	32	108	1,23	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 210	76	25	101	0,003	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 365	98	39	137	0,88	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 558	67	26	93	0,43	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 740	97	36	103	0,3	$p > 0,05$

$\chi^2_{0,05} = 3,84$, df = 1

Таким образом, результаты гибридологического и молекулярно-генетического анализов подтвердили наличие гена *Rf1* в генотипах линий ВИР 195, ВИР 210, ВИР 364, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 729, ВИР 740, RIL 80, RIL 130. В то же время следует отметить, что наличие молекулярных маркеров гена *Rf1* (STS115, HRG01, HRG02, ORS224, ORS511 и ORS799) не во всех случаях было связано со способностью линии восстанавливать фертильность пыльцы при скрещивании со стерильной линией с цитоплазмой PET1. Более эффективным маркером для прогнозирования наличия гена восстановления фертильности оказался маркер orfH522, идентифицирующий митохондриальный ген, ассоциированный со стерильностью PET1-типа. Линии с цитоплазмой PET1 восстанавливали фертильность пыльцы при скрещивании со стерильными линиями независимо от наличия или отсутствия у них молекулярных маркеров гена *Rf1*, а во втором поколении наблюдалось моногенное расщепление. Однако такой характер расщепления мог наблюдаться в случае различий материнской линии ЦМС и отцовской фертильной линии по локусам других генов восстановления фертильности пыльцы.

Для проверки гипотезы об аллельности генов *Rf*, присутствующих в генотипах ряда фертильных линий генетической коллекции ВИР, была проведена вторая серия скрещиваний в 2014 г. на КОС ВИР. Планировали оценить аллельные отношения генов восстановления фертильности пыльцы, присутствующих в генотипах фертильных линий ВИР 365, RIL 130, ВИР 449, ВИР 558, ВИР 637 и ВИР 740. Материнскую линию ВИР 365, предварительно кастрированную гиббереллином, опыляли пыльцой линий RIL 130, ВИР449, ВИР 558, ВИР 637, ВИР 740. Семена гибридов F_1 были получены лишь в комбинации скрещивания ВИР 365 × RIL 130 (все растения гибрида были фертильными). Не случайно линия ВИР 365 была выбрана для скрещиваний. Данная линия – восстановитель фертильности, имеет стерильную (PET1-типа) цитоплазму, однако у нее отсутствуют маркеры гена *Rf1*. Способность линии ВИР 365 восстанавливать фертильность пыльцы при ЦМС PET1 неоднократно показана в различных сериях скрещиваний. В связи с этим и было решено

проверить присутствие доминантных аллелей гена *Rf1* у линии ВИР 365, либо подтвердить гипотезу о наличии у нее другого (или других) генов *Rf* (например, *Rfx*). При гипотезе дигенного характера расщепления мы ожидали выщепление в F_2 стерильных растений с генотипом *rf1rf1rf2rf2*. Все растения F_2 ВИР 365 × RIL 130 были фертильными, следовательно, можно предположить, что обе родительские линии являются носителями одних и тех же аллелей гена *Rf1*. Для проверки этой гипотезы провели анализирующее скрещивание, при котором линия ЦМС ВИР 111А была опылена пыльцой гибрида ВИР 365 × RIL 130. Расщепление на фертильные и стерильные растения в полученной популяции отсутствовало. Этот факт можно рассматривать как доказательство наличия у линии ВИР 365 гена *Rf1* (табл. 16). В качестве альтернативной гипотезы можно предположить наличие у линии ВИР 365 другого, отличного от *Rf1*, гена восстановления фертильности пыльцы, но тесно с ним сцепленного. 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). В литературе имеются данные, свидетельствующие о существовании в пределах одного локуса генов-кандидатов *Rf*, имеющих в митохондриальном геноме разные мишени (при разных типах ЦМС). Так, гены *Rfn* и *Rfp* рапса *Brassica napus* L. восстанавливают фертильность при ЦМС nap- и pol-типов (Liu et al., 2017). По результатам гибридологического анализа, гены *Rfn* и *Rfp* наследуются как аллельные варианты, но фактически представляют разные гаплотипы, каждый со своей функцией: ген *Rfn* не восстанавливает фертильность при ЦМС pol, а ген *Rfp* соответственно ЦМС nap. Идентификация таких генов возможна только на основе тонкого генетического картирования и ресеквенирования районов генов, в которых они локализованы.

Таблица 16 – Результаты теста на аллелизм генов восстановления фертильности пыльцы, присутствующих в генотипах линий ВИР 365 и RIL 130 (ППЛ ВИР, 2013-2016 гг.)

Гибрид	**Поко-ление**	**Число растений с фенотипом**		**Всего растений**
		фертильный	**стерильный**	
ВИР 365 × RIL 130	F_1	6	0	6
ВИР 365 × RIL 130	F_2	69	0	69
ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)	F_a	50	0	50

Таким образом, на основании результатов гибридологического анализа можно сделать вывод, что линии-опылители, участвовавшие в скрещиваниях и от которых получено фертильное потомство (ВИР 195, ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 740, RIL 80, RIL 130), являются носителями гена *Rf1*, независимо от наличия/отсутствия у них диагностических маркеров и типа цитоплазмы.

3.3. Особенности наследования морфометрических параметров пыльцы при межлинейных скрещиваниях

3.3.1. Характеристика пыльцы отцовских 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* (см. главу «Гибридологический анализ» табл. 13). 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). Фертильность пыльцы оценивали визуально и на цитологических препаратах (рис. 17). Практически у всех проанализированных линий доля окрашенных (фертильных) ПЗ превысила 90%, за исключением линии ВИР 449

(84,4%). Кроме того, у линии ВИР 449 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, зарегистрированной как донор гена *Rf1* (Паспорта доноров, 2012), отмечен самый высокий уровень частоты фертильных ПЗ (97%), промежуточный уровень варьирования по диаметру (от 24,62 до 48,42 мкм) и отсутствие желтого масляного вещества на цитологических препаратах вокруг ПЗ (табл. 17). Наличие желтого вещества на цитологических препаратах неоднократно отмечалось у диких и культурных видов подсолнечника в работах О. Н. Вороновой и В. А. Гавриловой (2019). Природа этой субстанции до сих пор не известна. Предполагается, что это избыток спорополленина, образовавшийся в процессе формирования ПЗ (рис. 18) (Орел и др., 1978; Piffanelli et al., 1998). Это вещество препятствует нормальному окрашиванию ПЗ, а также приводит к слипанию пыльцы во время цветения растений.

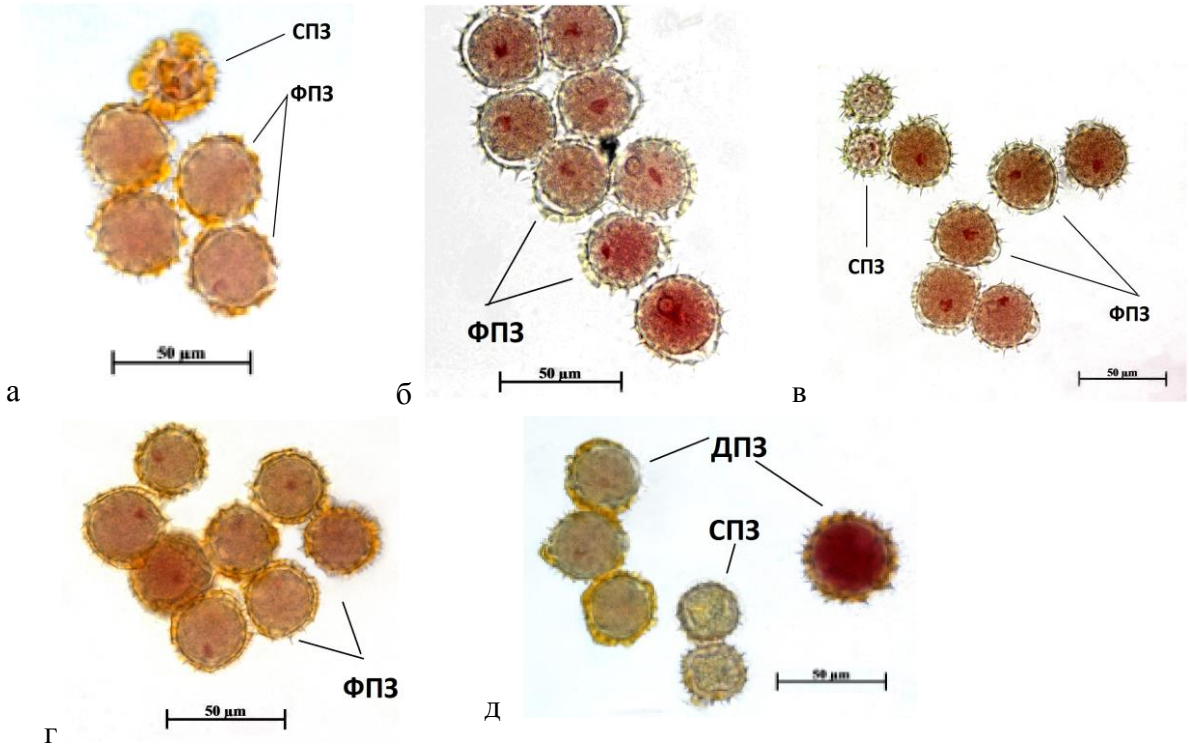


Рисунок 17 – Пыльца фертильных линий: а) ВИР 558, б) ВИР 740, в) ВИР 637, г) RIL 130, д) ВИР 449 (КОС ВИР, 2014 г.) Примечание: СПЗ – стерильные ПЗ, ФПЗ – фертильные ПЗ, ДПЗ – дефектные ПЗ.

Таблица 17 – Характеристика пыльцы линий генетической коллекции (КОС ВИР, 2014)

Линия (тип цитоплазмона)	**Характеристика пыльцы**					
	Доля фертильных ПЗ, %	***Cv*, %**	**Диаметр ПЗ, мкм**			**Наличие желтого вещества**
			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	-

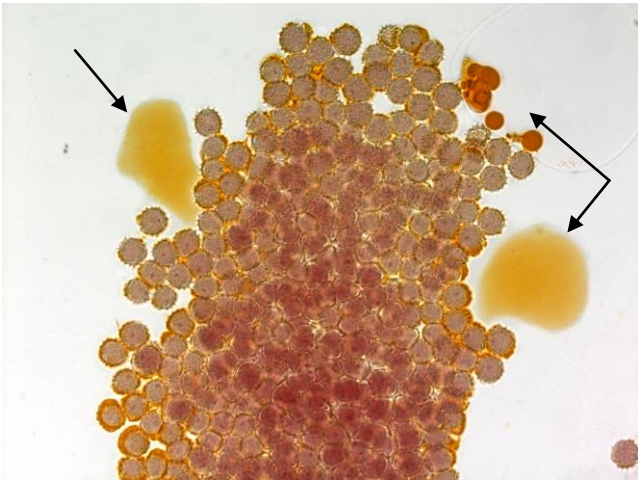


Рисунок 18 – Желтое вещество на цитологическом препарате пыльцы линии RIL 130 (КОС ВИР, 2014 г.)

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. Такие различия могут оказывать влияние на их опылительную способность. Это предположение подтверждено экспериментально в работе A.M. Chamer et al. (2015). Авторы показали, что завязываемость семян гибридов подсолнечника, а также продуктивность в значительной степени зависит от качества и количества пыльцы. Следовательно,

морфометрические характеристики пыльцы можно рассматривать как важный биологический признак, который необходимо учитывать при создании отцовских линий гибридов.

3.3.2. Характеристика пыльцы F_1 межлинейных гибридов

Анализировали гибриды первого поколения ВИР 116А × RIL 130, ВИР 116А × ВИР 210 и ВИР 116А × ВИР 740. ПЗ растений F_1 были однородны по размеру и характеризовались высокой фертильностью (более 88% окрашенных ПЗ). Однако были обнаружены единичные микро- и макро- ПЗ в каждой комбинации, но они не влияли на общую характеристику пыльцы, также ни в одной из комбинаций на цитологических препаратах не было обнаружено желтое вещество (табл. 18).

Таблица 18 – Характеристика пыльцы растений F_1 (ППЛ ВИР, 2013-2014 гг.)

Линия (тип цитоплазмона)	**Характеристика пыльцы**					
	Доля фертильных ПЗ, %	***Cv*, %**	**Диаметр ПЗ**			**Наличие желтого вещества**
			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	-

Диаграммы, иллюстрирующие характер изменчивости ПЗ по диаметру, представлены на рис. 19. Пыльца гибридных растений всех трех гибридов была однородной по диаметру, наибольшее число ПЗ имело диаметр 28-29 мкм, что соответствовало единичному пику на диаграмме.

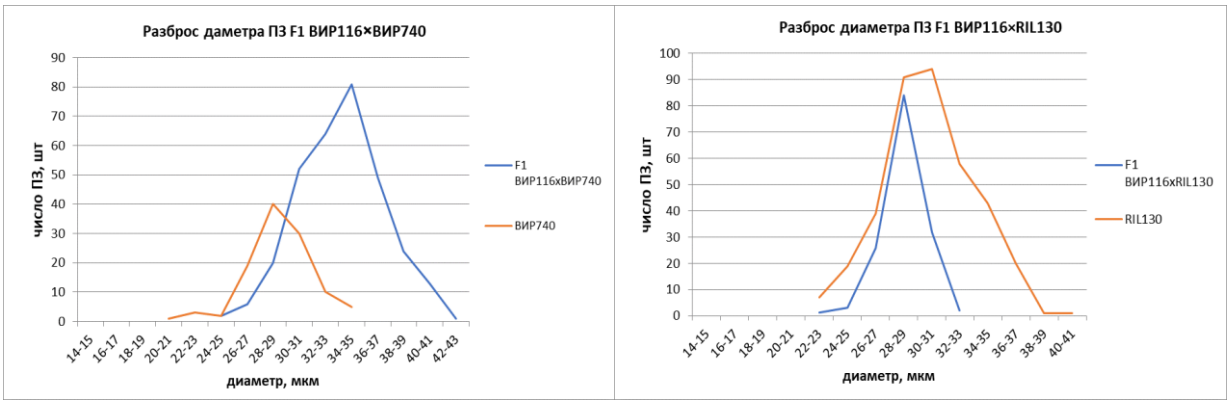


Рисунок 19 – Вариационные кривые диаметра ПЗ растений F_1 гибридов ВИР 116А × RIL 130 и ВИР 116А × ВИР 740 (ППЛ ВИР, 2015-2016 гг.)

Примечание: пик – наибольшая частота ПЗ определенного диаметра

Мы также провели цитологический анализ пыльцы растений гибрида F_1 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) (табл. 19). Важно отметить, что в обоих случаях материалом исследования служило потомство одного и того же материнского растения (корзинки). Фертильность пыльцы растений F_1 гибрида ВИР 365 × RIL 130 на КОС ВИР не превышала 61%, в то время как в ППЛ ВИР она составила более 97%.

Таблица 19 – Характеристика пыльцы растений F_1 (ВИР 365 × RIL 130) и F_a [ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)]

Гибрид	**Проанализировано фертильных растений, шт**	**Характеристика пыльцы**					
		Доля фертильных ПЗ, %	***Cv*, %**	**Диаметр ПЗ, мкм**			**Наличие желтого вещества**
				min	**max**	$\bar{x}$	
F_1 (ВИР 365 × RIL 130) (ППЛ ВИР, 2015)	3	97,8	1	21,07	35,57	26,85	+
F_1 (ВИР 365 × RIL 130) (КОС ВИР, 2015)	3	60,3	22,6	19,42	38,3	27,58	+
F_a [ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)] (ППЛ ВИР, 2016)	14	94,1	5,7	20,79	33,65	27,9	-

Вариационные кривые иллюстрируют неоднородность ПЗ по диаметру у гибрида, выращенного на КОС ВИР: на графике (рис. 20а) кривая с пологим пиком свидетельствует о более высоком уровне изменчивости ПЗ по диаметру (от 19,42 мкм до 38,3 мкм) в сравнении с ПЗ гибрида в ППЛ ВИР (рис. 20б). Качество такой пыльцы очень низкое и, как следствие, у нее может быть низкая оплодотворяющая способность. На рис. 20а, где отражена изменчивость диаметра ПЗ у гибрида F_1, отмечается один четкий пик и нормальное распределение.

У растений, полученных в результате анализирующего скрещивания Fa ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130), пыльца растений характеризовалась высокой фертильностью (94,1%) и сравнительно небольшим варьированием по диаметру (12,86 мкм) в отличие от F_1 ВИР 365 × RIL 130 (14,5 мкм – ППЛ ВИР; 18,88 мкм – КОС ВИР).

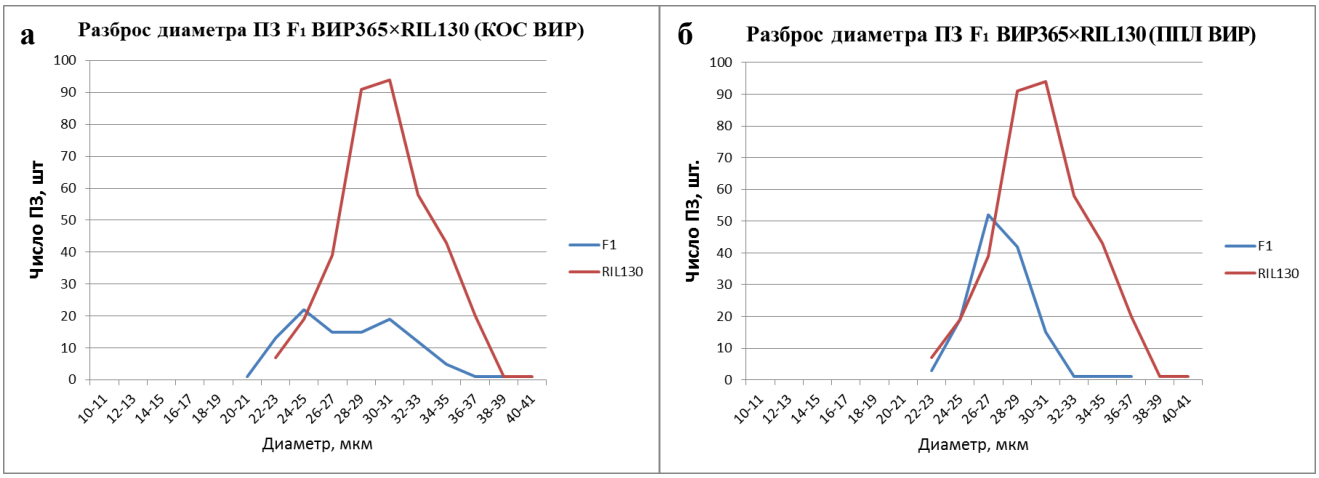


Рисунок 20 – Вариационные кривые диаметра ПЗ гибрида F_1 (ВИР 365 × RIL 130), выращенного в 2016 г. на: а) КОС ВИР; б) ППЛ ВИР.

Выявленные различия между гибридными растениями одной и той же популяции, выращенными в разных климатических зонах, могут быть обусловлены различными условиями 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 F_1 ВИР 365 × RIL 130

выявлены различия по степени восстановления фертильности и по качеству пыльцы в зависимости от условий выращивания.

3.3.3. Изменчивость признака восстановления фертильности пыльцы в расщепляющихся гибридных популяциях

Анализировали растения расщепляющихся гибридных популяций F_2 ВИР 116А × RIL 130, F_2 ВИР 116А × ВИР 210 и F_2 ВИР 116А × ВИР 740. Каждый из трех F_2 гибридов являлся потомством одного растения и расщеплялся по признаку фертильности пыльцы на фертильный (продуцировавшие пыльцу) и стерильный (без пыльцы) фенотипические классы в соотношении 3:1, что соответствовало теоретически ожидаемому при моногенных различиях родительских линий (табл. 20). Кроме того, в каждой из популяций F_2 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 цветущей корзинке (рис. 21).

Таблица 20 – Расщепление F_2 гибридов по признаку восстановления фертильности пыльцы

Гибрид	**Фенотипический класс**			**Общее число растений**	**Фактическое расщепление (F+F/S):S**	χ^2	***p***
	F	**F/S**	**S**				
ВИР 116А × RIL 130	83	11	31	125	3:1	0,003	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 740	85	12	36	133	3:1	0,303	$p > 0,05$
ВИР 116А × ВИР 210	67	9	25	101	3:1	0,003	$p > 0,05$

Примечание: F – высокофертильные растения, F/S – малопыльцовые растения, S – стерильные растения

Рисунок 21 – Растения комбинации F_2 ВИР 116А × ВИР 740: а) стерильное растение, б) фертильное, 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 нами ранее и при анализе межлинейных гибридов, полученных с участием другой материнской линии с ЦМС PET1-типа – ВИР109А (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% (табл. 21). Процент фертильных ПЗ у растений с высоким уровнем фертильности пыльцы

варьировал незначительно (*Cv* 4,1-5,7%), тогда как у «малопыльцовых» коэффициент вариации колебался 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. 22). 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 зерен 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».

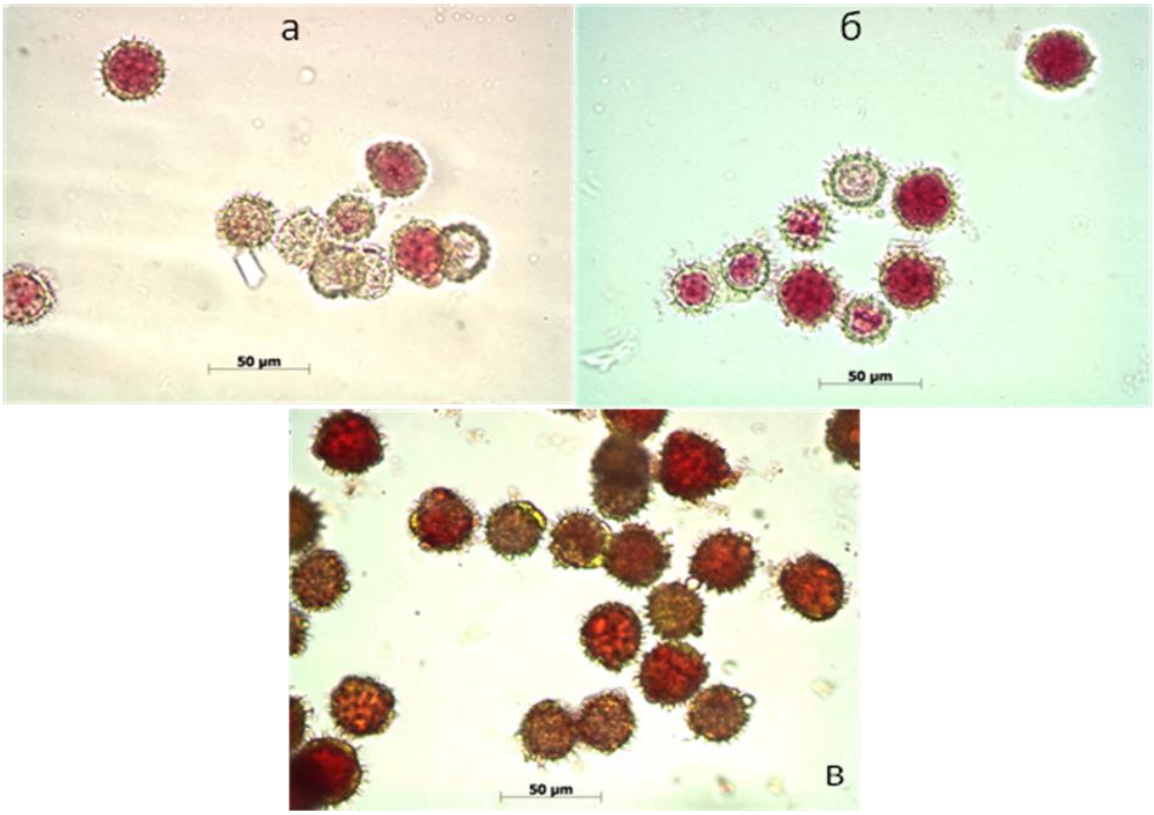


Рисунок 22 – Цитологические препараты пыльцы «малопыльцовых» растений F_2 а) ВИР 116А × ВИР 740, б) ВИР 116А × ВИР 210, в) ВИР 116А × RIL 130 (ППЛ ВИР, 2015-2016 гг.)

Таблица 21 – Сравнительная характеристика ПЗ растений F_2, различающихся по показателям фертильности

Характеристика ПЗ		**Комбинация и фенотипический класс**					
		ВИР 116А × RIL 130		**ВИР 116А × ВИР 210**		**ВИР 116А × ВИР 740**	
		F	**F/S**	**F**	**F/S**	**F**	**F/S**
По типу							
Окрашенные, %	min	83,5	11	79,8	50,2	81,9	34,7
	max	100	78	98,1	77,3	99,3	76,3
Cv, %		4,1	38,6	5,7	12,8	4,9	27,8
Неокрашенные, %	min	0	0,5	0	2,4	0	0,7
	max	12,6	16,9	18,2	22,8	11,7	34,4
Cv, %		71,3	66,0	109,2	78,8	78,1	105,6
Аномальные, %	min	0	8,5	0	1,9	0	10,4
	max	9,2	88,5	17,6	42,5	17,4	58,2
Cv, %		67,8	70,3	80,7	57,9	77,8	32,1
По диаметру							
Диаметр фертильных ПЗ, мкм	min	20,52	18,33	20,52	21,89	21,34	22,43
	max	30,91	33,92	31,74	32,56	31,46	33,11
Диаметр стерильных ПЗ, мкм	min	18,33	8,48	9,85	19,15	17,24	17,24
	max	31,74	31,46	32,01	29,82	28,73	36,66
Среднее, мкм		25,99	24,80	27,36	26,81	26,98	25,72
Число проанализированных растений, шт		83	11	67	9	85	12

Примечание: F – растения с высоким уровнем фертильности пыльцы, F/S – «малопыльцовые» растения

Для проверки гипотезы нормальности распределения растений F_2 гибридов по фертильности использовали критерий Шапиро-Уилка. Значение критерия трех комбинаций варьировало от 0,58 до 0,82 при уровне значимости $p < 0{,}05$, что свидетельствует о ненормальности распределения растений. С помощью программы Statistica 6.0. были построены гистограммы распределений (рис. 23). Профили распределения групп растений с различным уровнем фертильности пыльцы у трех комбинаций совпадали (и значительно смещены от центра), что может свидетельствовать об участии сходных генетических механизмов в контроле признака в разных комбинациях скрещиваний.

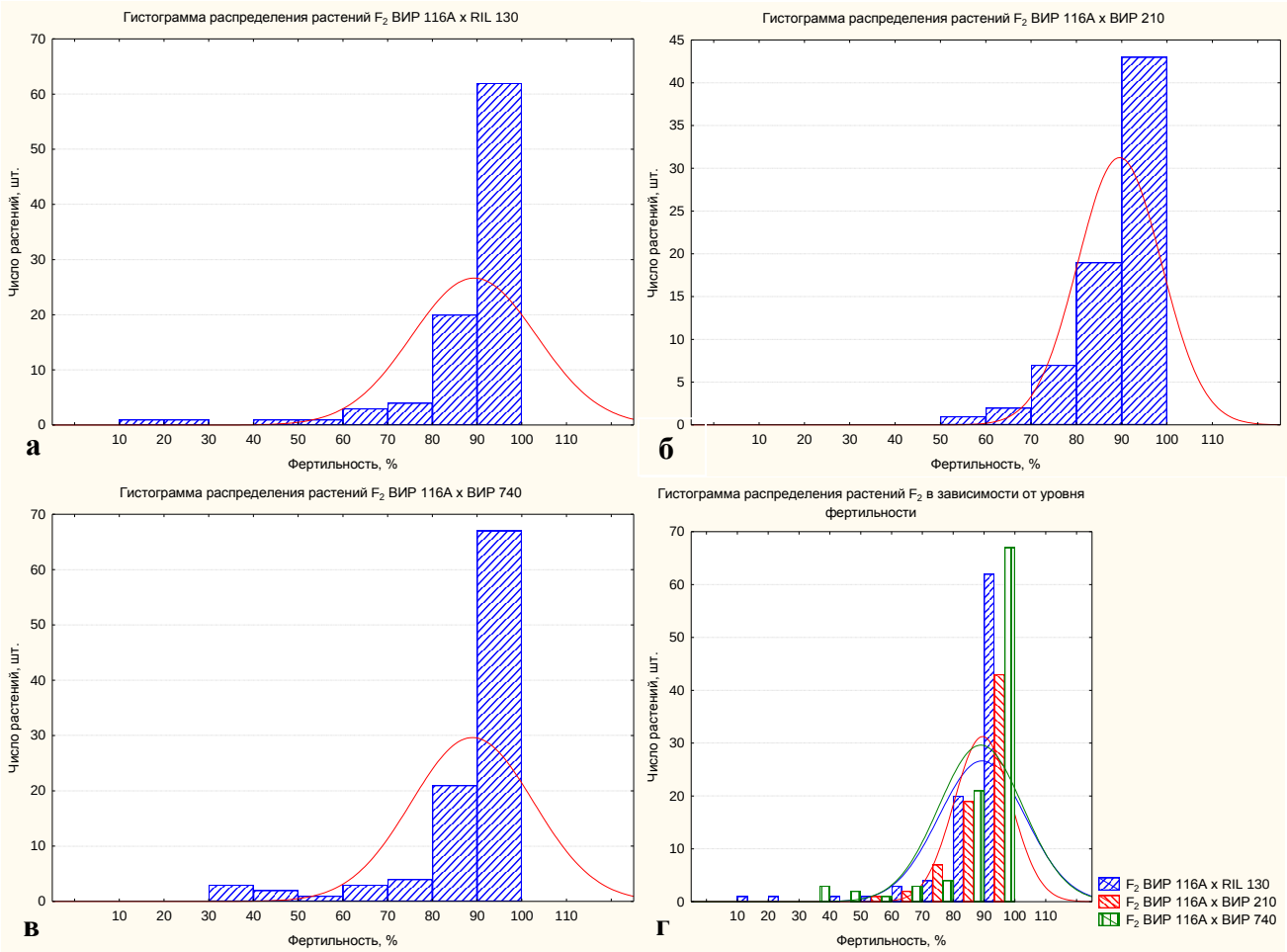


Рисунок 23 – Распределение растений F_2 в зависимости от уровня фертильности в трех различных комбинациях F_2: а) ВИР 116А × RIL 130, б) ВИР 116А × ВИР 210, в) ВИР 116А × ВИР 740, г) F_2 всех трех комбинаций (критерий Шапиро-Уилка, $p < 0{,}05$).

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, и микросателлитного маркера ORS511.

Популяция F_2 ВИР 116А × ВИР 210 не расщеплялась по наличию молекулярных маркеров HRG01 и HRG02, поскольку эти маркеры отсутствовали у родительских форм. Фертильные растения гибридов ВИР 116А × RIL 130 и ВИР 116А × ВИР 740, в том числе и относившиеся к фенотипическому классу «малопыльцовых», за единичными исключениями, характеризовались наличием всех трех маркеров, что подтверждает присутствие в их генотипах доминантного аллеля гена *Rf1* в гомо- или гетерозиготном состоянии (табл. 22). У большинства стерильных растений (предполагаемых гомозигот по рецессивному аллелю *rf1*) маркеры отсутствовали. В каждой из комбинаций в фенотипических классах – «малопыльцовых» и растений с высоким уровнем фертильности – выявлены единичные генотипы, не имеющие маркеров, а также стерильные растения, у которых маркеры присутствовали. Среди «малопыльцовых» растений выявлены генотипы, у которых отсутствовал только один из маркеров – HRG01 или HRG01. Отсутствие одного из маркеров у фертильных растений F_2 или появление маркеров у стерильных сегрегантов можно объяснить результатом рекомбинации между локусом *Rf1* и маркерным фрагментом.

Таблица 22 – Распределение маркеров гена *Rf1* у растений из различных фенотипических классов в расщепляющихся гибридных популяциях F_2

Гибрид	**Наличие/отсутствие маркера**			**Число растений с фенотипом, шт.**		
	HRG02	**HRG01**	**ORS511**	**F**	**F/S**	**S**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
ВИР 116А×ВИР 740	+	+	+	75	11	0
	+	–	+	**4**	**1**	0
	–	+	+	**5**	0	**1**
	–	–	+	**1**	0	0
	+	–	–	0	0	**1**
	–	+	–	0	0	**2**
	–	–	–	0	0	32
Всего растений				85	12	36

(Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
ВИР 116А×RIL 130	+	+	+	78	10	**1**
	+	–	+	**2**	0	**1**
	–	+	+	0	**1**	0
	+	–	–	**1**	0	**1**
	–	–	–	**1**	0	27
Всего растений				82	11	30
ВИР 116А×ВИР 210	–	–	+	66	9	**6**
	–	–	–	**1**	0	19
Всего растений				67	9	25

Примечание: предположительно рекомбинантные генотипы обозначены полужирным шрифтом

Таким образом, с помощью молекулярного анализа подтверждено присутствие доминантного аллеля *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 других гибридных комбинаций (Анисимова и др., 2014). Известно, что при наличии в генотипе одного доминантного аллеля *Rf1* фертильность пыльцы гибридов F_1 подсолнечника восстанавливается почти полностью (Маркин и др., 2009). 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 (Эльконин, 2005; Jordan et al., 2010; Sinha et al., 2013). Так, в F_2 от скрещивания линии ЦМС пшеницы с линией-восстановителем Sinha et al. (2013)

наблюдали выщепление полуфертильных и полустерильных форм наряду с нормальными фертильными растениями. Такие растения характеризовались пониженной фертильностью пыльцы и, следовательно, пониженной завязываемостью семян. У растений сорго, характеризующихся низкой озерненностью, фертильность пыльцы также понижена (Jordan et al. 2010, Анисимова и др. 2017). Пониженную фертильность на фоне ЦМС объясняют действием полимерных генов, модификаторов, эффектами QTL либо влиянием генетического фона (Эльконин, 2005; Gabay-Laudhnan et al., 2009; Jordan et al., 2010; Meyer et al., 2011).

Предложенные рядом авторов схемы дигенного контроля признака восстановления фертильности пыльцы подсолнечника при ЦМС PET1 основывались на предположении о независимом наследовании генов (Reddy, Thammiraju, 1977; Sujatha et al., 2011) и их возможное сцепление не обсуждалось. Однако вполне вероятно, что локус гена *Rf1* сцеплен с локусом еще одного гена-восстановителя, влияющего на проявление признака мужской фертильности, а их доминантные аллели у отцовских родителей и рецессивные у материнской линии ВИР 116А находились в фазе притяжения. Необходимо отметить, что, согласно современным представлениям, большинство идентифицированных к настоящему времени генов восстановления фертильности различных растений принадлежат к подклассу *RFL-PPR* (*Restoration of Fertility Like Pentatricopeptide Repeats*) и организованы в кластеры, включающие тандемно организованные копии (Gaborieau et al., 2016). Показано, что у *Brassica* один и тот же локус *Rf* включает несколько генов-кандидатов, восстанавливающих пыльцу при различных типах ЦМС (Gaborieau et al., 2016). Недавно в результате GWAS-анализа в обширном районе хромосомы 13 подсолнечника (7,72 Mb) идентифицирован 21 ген-кандидат *Rf1*, из которых 20 генов относились к семейству *PPR* и один представлял ген альдегиддегидрогеназы (Goryunov et al., 2019). Все эти данные позволяют предполагать наличие более одного гена *Rf*, восстанавливающего фертильность пыльцы при ЦМС PET1, а также их возможное сцепление.

Кроме того, для объяснения появления в расщепляющихся популяциях у подсолнечника «малопыльцовых» растений можно предположить эпистатическое взаимодействие между *Rf*-генами. В работе J. K. Xie с соавторами (2002) у риса (*Oryza sativa*) в линиях с ЦМС DA-типа наблюдали эпистатическое взаимодействие генов-восстановителей. Кроме того, в работе B. Wei (2019) у сладкого перца (*Capsicum annuum*) наблюдали восстановление фертильности под влиянием аддитивно-доминантных эффектов двух главных генов.

Результаты молекулярного анализа показали, что фертильные растения F_2 изученных нами гибридов несут доминантный аллель *Rf1* в гомо- или гетерозиготном состоянии. Следовательно, можно предположить, что за появление фенотипического класса «малопыльцовых» растений отвечает еще один ген – *Rf**. Его рецессивный аллель в гомозиготном состоянии частично подавляет эффект доминантного аллеля *Rf1* у гетерозигот по данному локусу (генотип *Rf1rf1rf*rf**) и, как следствие, наблюдается эффект неполного восстановления фертильности пыльцы. Еще одна из возможных причин появления «малопыльцовых» растений – участие генов-ингибиторов, снижающих уровень фертильности пыльцы. Например, у кукурузы с ЦМС C-типа в восстановлении участвуют два доминантных гена *Rf4* и *Rf5* (Hu et al., 2006). Однако, ген *Rf5* восстанавливает фертильность только в случае отсутствия у линий гена-ингибитора *Rf-I,* в то время как ген *Rf4* восстанавливает фертильность любых линий при ЦМС C-типа, независимо от наличия/отсутствия гена *Rf-I*. В более ранней работе A. Kovacik и V. Skaloud (1973) предположили существование рецессивного гена-ингибитора *p*, который снижает фертильность у подсолнечника. Влияние инбридинга на экспрессию ядерных генов – еще одна возможная причина снижения фертильности в F_2, как, например, у кукурузы с ЦМС S-типа. Признак восстановления фертильности при данном типе ЦМС контролируется генами *Rf3* и *Rf9*. Последний менее эффективен как восстановитель, т.к. зависим он генетического фона, и является термочувствительным (работает только при благоприятной температуре окружающей среды) (Gabay-Laudhnan et al., 2009). При ЦМС T-типа у кукурузы

наблюдали снижение фертильности с каждым последующим поколением в некоторых комбинациях скрещиваний, что тоже объясняют влиянием генетического фона и различными типами взаимодействия между *Rf2a* и одним из трех других генов: *Rf1*, *Rf8* и *Rf** (Meyer et al., 2011).

3.4. Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rf1*

Эффективность (надежность) молекулярных маркеров для идентификации генотипов, несущих целевой ген (диагностическая ценность маркера), определяется многими факторами. Идеальными являются так называемые функциональные маркеры, разработанные на основе нуклеотидной последовательности конкретного гена. Такие маркеры позволяют идентифицировать также и аллельные варианты гена (Леонова, 2013). Полагают также, что чем ближе друг к другу находятся ген и маркер на генетической карте, тем выше вероятность того, что при рекомбинации в мейозе гибрида F_1 ген и маркерный фрагмент будут одновременно переданы потомству. Это значительно облегчает процесс отбора желаемых генотипов в расщепляющихся гибридных популяциях. Существуют два подхода для определения диагностической ценности молекулярных маркеров. Наиболее широко используемый подход – апробация на широком наборе генотипов маркера, разработанного для конкретной расщепляющейся популяции. Другой подход заключается в валидации маркеров, разработанных для одной гибридной комбинации, на материале других гибридных популяций.

В литературе опубликован целый ряд молекулярных маркеров для идентификации гена *Rf1* подсолнечника: STS115 (Yue et al., 2010), HRG01 и HRG02 (Horn et al., 2003), ORS224, ORS511, ORS799 (Yue et al., 2010). Все они, согласно данным литературы, сцеплены с локусом *Rf1*. В ряде работ приводятся данные об их диагностической ценности. Первые данные о диагностической ценности SCAR-маркеров HRG01 и HRG02 были опубликованы R. Horn et al. (2003). Авторы изучили распределение маркеров среди 9 закрепителей

стерильности и 11 восстановителей фертильности. Маркеры отсутствовали у всех закрепителей стерильности (носителей рецессивного аллеля гена *rf1*) и двух линий-восстановителей. В работе Н. В. Маркина с соавторами (2013) выполнена оценка диагностической ценности 9 молекулярных маркеров (6 SSR-, STS115, 2 SCAR) на материале 17 ЦМС-линий и 29 *Rf*-линий подсолнечника. Согласно полученным данным, более информативными оказались три из них – SCAR-маркеры HRG01 и HRG02 и маркер STS115. На этой же выборке линий авторы апробировали мультиплексную систему, разработанную на основе маркеров HRG01 и HRG02 и маркера ЦМС-гена orfH522 (Markin et al., 2017). Линии ЦМС, восстановители и закрепители стерильности из генетической коллекции ВИР были маркированы в работе И. Н. Анисимовой с соавторами (2011) с помощью SCAR-маркеров HRG01 и HRG02, а также STS-маркера митохондриального гена orfH522. Авторы показали, что SCAR-маркеры HRG01 и HRG02 гена *Rf1* могут отсутствовать у линий-восстановителей и самым информативным для идентификации гена *Rf1* является маркер ЦМС-гена *orfH522*. Позднее маркеры orfH522, HRG02 и Rf (разработан Н. В. Маркиным на основе последовательности маркерного фрагмента HRG01 (Маркин и др., 2014)) были рекомендованы Т. А. Челюстниковой с соавторами (2017) для использования в селекционной и семеноводческой практике для оценки аллельного состояния гена *Rf1*.

Ген-кандидат *Rf1* подсолнечника до сих пор не идентифицирован, что ограничивает возможности по разработке аллель-специфичных маркеров. Недавно группой R. Horn et al. (2019) была ре-секвенирована область группы сцепления 13, включающая локус *Rf1*, и обнаружены два района локализации предполагаемых генов-кандидатов. На основе PPR-последовательностей авторами разработаны и валидированы два SCAR-маркера – для идентификации доминантного и рецессивного аллелей. Кроме того, авторами на панели из 59 генотипов проведена оценка диагностической ценности SCAR-маркеров HRG01 и HRG02.

В табл. 23 представлены результаты анализа ассоциаций между наличием молекулярных маркеров гена *Rf1* у изученных линий генетической коллекции и

способностью линии восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность при скрещивании с линией ЦМС PET1. Определяли диагностическую ценность четырех молекулярных маркеров гена *Rf1* и микросателлитного маркера HA4011, который сцеплен с находящимся в той же группе сцепления локусом *Pl5/Pl8*, контролирующим устойчивость к широкому кругу рас возбудителя ЛМР (Şahin et al., 2018). Результаты анализа показали, что 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 *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 23 – 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 orfH522)	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

Для выяснения возможных причин различий диагностической ценности маркеров для идентификации гена *Rf1* мы изучили совместное наследование признака восстановления фертильности пыльцы и ряда молекулярных маркеров, локализованных в группе сцепления 13: STS115, HRG01, HRG02, ORS511 (молекулярные маркеры гена *Rf1*), HA4011 (SSR-маркер локуса *Pl5/Pl8*, контролирующего устойчивость к возбудителю ЛМР) и SCX20, SCT06 (SCAR-маркеры гена R_{adv}, определяющего устойчивость к возбудителю ржавчины). Исследование выполнено на материале трех расщепляющихся гибридных популяций F_2 от скрещиваний стерильной линии ВИР 116А (ЦМС PET1) с линиями-восстановителями фертильности (носителями гена *Rf1*) ВИР 740, RIL 130 и ВИР 210 и молекулярными маркерами.

Результаты анализа совместного наследования изучаемых локусов представлены в таблицах 23-25. Результаты анализа совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы (ген *Rf1*) и ряда маркерных локусов представлены в таблицах 24-26. Лишь локусы 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 F_2 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.

Результаты оценки сцепления в комбинациях ВИР 116А × ВИР 740 и ВИР 116А × RIL 130, показали. что среди изученных маркерных локусов ближе всех к *Rf1* расположен маркер ORS511 (2,2 и 3,3 сМ соответственно). Это расстояние меньше значения 5,5 сМ, полученного B. 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. Расстояние между локусом

Rf1 и маркерными локусами HRG01 и HRG02 оказались несколько выше полученных в работе R. Horn et al. (2003).

Таблица 24 – Расщепление по признакам фертильность/стерильность пыльцы и наличие/отсутствие доминантных маркеров гена *Rf1* во втором поколении гибридов ВИР 116А × ВИР 740 (1), ВИР 116А × RIL 130 (2) и ВИР 116А × ВИР 210 (3)

Расщепляющиеся локусы	**Комбинация**	**Всего растений**	**Фенотипические классы F2**				**Теоретически ожидаемое соотношение**	χ^2	**r**	S_p
			F/M(+)	**F/M(-)**	**S/M(+)**	**S/(M(-)**				
Rf1, STS115	1	133	90	7	16	20	9:3:3:1	35,6	0,354	0,02
	2	123	91	2	24	6	9:3:3:1	26,5	0,311	0,02
Rf1, HRG01	1	133	91	6	3	33	9:3:3:1	110,5	0,067	0,01
	2	123	89	4	1	29	9:3:3:1	101,6	0,041	0,00
Rf1, HRG02	1	133	91	6	1	35	9:3:3:1	126,5	0,051	0,00
	2	123	91	2	3	27	9:3:3:1	92,1	0,042	0,00
Rf1, ORS511	1	133	95	2	1	35	9:3:3:1	135,2	0,022	0,00
	2	123	91	2	2	28	9:3:3:1	99,0	0,033	0,00
	3	101	75	1	6	19	9:3:3:1	57,2	0,075	0,01

Примечание: F/M(+) – фертильное, с маркером; F/M(+) – фертильное, без маркера; S/M(+) – стерильное, с маркером; S/M(-) – стерильное, без маркера

Таблица 25 – Расщепление по признакам фертильность/стерильность пыльцы и наличие/отсутствие доминантных маркеров генов устойчивости к ржавчине и ложной мучнистой росе во втором поколении гибридов ВИР 116А × ВИР 740 (1), ВИР 116А × RIL 130 (2) и ВИР 116А × ВИР 210 (3)

Расщепляющиеся локусы	**Комбинация**	**Всего растений**	**Фенотипические классы F2**				**Теоретически ожидаемое соотношение**	χ^2	**r**	S_p
			F/M(+)	**F/M(-)**	**S/M(+)**	**S/(M(-)**				
Rf1, SCX20	1	133	87	10	31	5	9:3:3:1	13,7	0,476	0,03
	2	123	92	1	30	0	9:3:3:1	38,4	0,506	0,03
Rf1, SCT06	1	127	59	32	27	9	9:3:3:1	5,5	0,559	0,03
	2	123	73	20	22	8	9:3:3:1	0,7	0,460	0,03
	3	101	32	44	9	16	9:3:3:1	64,1	0,461	0,03
Rf1, HA4011	1	132	78	18	14	22	9:3:3:1	29,6	0,260	0,02
	2	101	69	8	7	17	9:3:3:1	34,6	0,164	0,01

Примечание: F/M(+) – фертильное, с маркером; F/M(+) – фертильное, без маркера; S/M(+) – стерильное, с маркером; S/M(-) – стерильное, без маркера

Таблица 26 – Расщепление по маркерным локусам во втором поколении гибридов ВИР 116А × ВИР 740 (1) и ВИР 116А × RIL 130 (2)

Расщепляющиеся локусы	**Комбинация**	**Всего растений**	**Фенотипические классы F2**				**Теоретически ожидаемое соотношение**	χ^2	**r**	S_p
			M1(+)/M2(+)	**M1(+)/M2(-)**	**M1(-)/M2(+)**	**M1(-)/M2(-)**				
STS115, HRG02	1	135	88	20	6	21	9:3:3:1	36,5	0,215	0,02
	2	125	93	24	2	6	9:3:3:1	27,4	0,307	0,02
STS115, HRG01	1	135	90	18	6	21	9:3:3:1	38,2	0,148	0,01
	2	125	89	28	2	6	9:3:3:1	25,9	0,426	0,03
STS115, ORS511	1	135	91	17	7	20	9:3:3:1	34,8	0,202	0,02
	2	125	92	25	2	6	9:3:3:1	26,8	0,319	0,02
HRG01, HRG02	1	135	88	6	8	33	9:3:3:1	100,0	0,102	0,01
	2	125	90	5	1	29	9:3:3:1	99,0	0,025	0,00
HRG01, ORS511	1	135	92	4	6	33	9:3:3:1	107,6	0,076	0,01
	2	125	91	0	3	31	9:3:3:1	116,2	0,024	0,00
HRG02, ORS511	1	135	91	3	7	34	9:3:3:1	113,3	0,025	0,00
	2	125	93	2	1	29	9:3:3:1	105,9	0,025	0,00
SCX20, SCT06	1	135	83	37	4	11	9:3:3:1	24,8	0,393	0,03
	2	125	95	29	1	0	9:3:3:1	39,3	0,552	0,03
ORS511, Ha4011	1	134	80	17	14	23	9:3:3:1	33,4	0,247	0,02
	2	102	68	9	9	16	9:3:3:1	27,2	0,197	0,02

Обнаружено сцепление SSR-маркера HA4011 с признаком восстановления фертильности пыльцы. Коэффициент рекомбинации между локусами HA4011 и *Rf1* в двух популяциях F_2: 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 *Rf1*. Это особенно актуально для линий, у которых отсутствуют диагностические маркеры гена *Rf1*. 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 единственным диагностическим маркером гена *Rf1* 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 (MAS) для выявления гомозиготных генотипов в расщепляющихся гибридных популяциях F_2, что позволит ускорить процесс создания родительских линий гибридов.

На рис. 21 представлены схемы взаимной локализации маркерных фрагментов и гена *Rf1*, построенные на основании данных гибридологического анализа трех расщепляющихся гибридных популяций. В комбинации F_2 ВИР 116А × ВИР 210 у родительских линий отсутствовали диагностические маркеры гена *Rf1* (STS115, HRG01, HRG02), поэтому данных по расщеплению с участием этих маркеров для этой комбинации нет. Самым близким к гену *Rf1* во всех трех комбинациях оказался микросателлитный маркер ORS511 (рис. 24). Для сравнения на рис. 25 представлены фрагменты генетических карт, построенных ранее другими авторами.

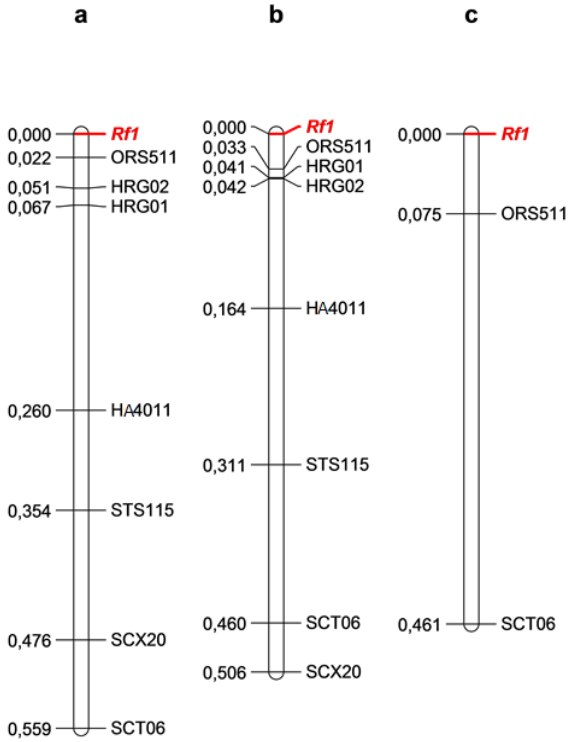


Рисунок 24 – Схемы взаимного расположения диагностических маркеров и локуса *Rf1*, построенные по данным анализа расщепляющихся гибридных популяций a) F_2 ВИР 116A × ВИР 740, b) F_2 ВИР 116A × RIL 130, c) F_2 ВИР 116A × ВИР 210

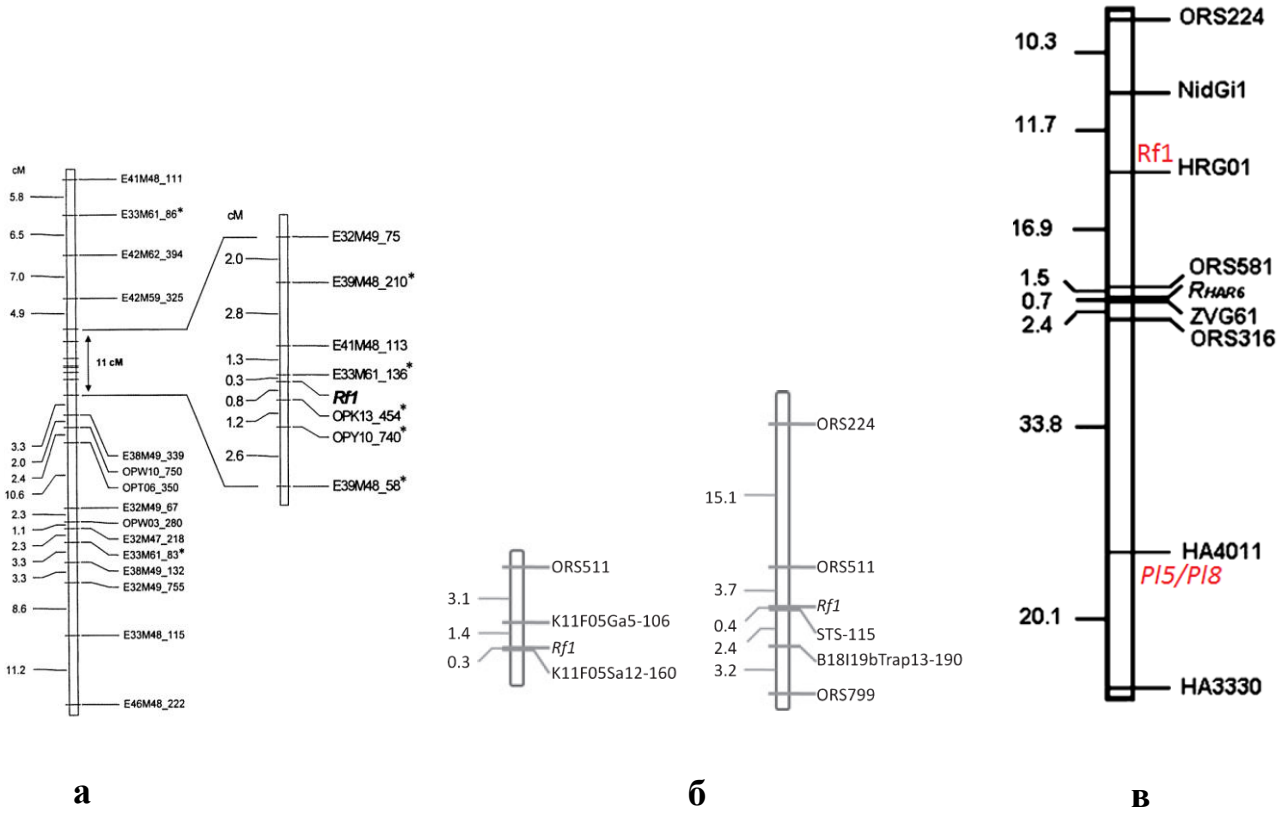


Рисунок 25 – Фрагменты генетических карт подсолнечника: а) R. Horn et al., (2003), б) Yue et al., (2010), в) Bulos et al., (2003)

Согласно полученным результатам, в качестве наиболее эффективных для маркер-опосредованного отбора 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 ВИРе 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 PET1-типа. В результате молекулярного скрининга сформирована выборка из 75 фертильных линий и линий ЦМС. По результатам генотипирования на основе 15 ядерных и митохондриального маркерных локусов 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 F_2 от скрещивания этих линий со стерильной линией ВИР 116А (PET1) восстановление фертильности наследуется как моногенный признак. Гены восстановления линии ВИР 365, не имеющей большинства диагностических маркеров гена *Rf1*, и линии RIL 130 – аллельны.

Генетическое расстояние между локусом *Rf1* и маркерами в зависимости от комбинации скрещивания составило от 2,2 до 7,5 сМ. Пыльцевые зерна (ПЗ) гибридов F_1 от скрещиваний линии ЦМС с линиями-восстановителями выравнены по диаметру и обладают высокой (более 90%) фертильностью. Уровень фертильности пыльцы растений F_2 составляет более 80%; морфометрические параметры ПЗ варьируют в более широких пределах, чем у растений F_1. Около 9% растений F_2 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 локус ORS511 и SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, а также митохондриальный ген *orfH522*.

Список сокращений

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность

Rf – Restoration of fertility

RFL-PPR – Restoration-of Fertility-Like-PPR

ППЛ ВИР – научно-производственная база «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», Санкт-Петербург, г. Пушкин

КОС ВИР – Кубанская опытная станция, Гулькевичский район Краснодарского края

ЛМР – ложная мучнистая роса

ПЗ – пыльцевое зерно

СПЗ – стерильное пыльцевое зерно

ФПЗ – фертильное пыльцевое зерно

ДПЗ – дефектное пыльцевое зерно

Список литературы

1. Александров, И. Н. Инвазии карантинных фитопатогенных организмов и пути их предотвращения / И. Н. Александров // Защита и карантин растений. – 2009. – № 2. – С. 36–40.
2. Алтухов, Ю. П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38. – С. 1173–1195.
3. Анащенко, А. В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) Сообщ. II. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМС / А. В. Анащенко, М. В. Дука // Генетика. – 1985. – Т. 21. – №12. – С. 1999–2004.
4. Анащенко, А. В. Химическая кастрация подсолнечника / А. В. Анащенко // Доклады ВАСНИЛ. – 1967. – № 2. – С. 17–18.
5. Анисимова, И. Н. Молекулярные маркеры в идентификации генов восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника / И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, В. Т. Рожкова, Г. И. Тимофеева, М. А. Тихонова // Доклады РАСХН. – 2009. – № 6. – С. 6–9.
6. Анисимова, И. Н. Генетическое разнообразие источников генов восстановления фертильности пыльцы подсолнечника / И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, В. Т. Рожкова, А. И. Порт, Г. И. Тимофеева, М. В. Дука // Доклады РАСХН. – 2011. – № 3. – С. 6–11.
7. Анисимова, И. Н. Молекулярное маркирование генов восстановления фертильности пыльцы подсолнечника / И. Н. Анисимова, В. А. Гаврилова, Н. В. Алпатьева, И. А. Малков, А. Г. Пинаев, В. Т. Рожкова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2013. – Т. 174. – С. 33–44.
8. 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 // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – 2014. – Т. 175. – № 4. – С. 72–82.

9. 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. – Год: 2015. – Т. 29. – № 7. – С. 39–42.
10. Анисимова, И. Н. Полиморфизм по признакам, ассоциированным с генетической системой ЦМС-*Rf*, у зернового сорго из коллекции ВИР / И. Н. Анисимова, Д. Н. Рябова, Е. В. Малиновская, Н. В. Алпатьева, Ю. И. Карабицина, Е. Е. Радченко // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 5. – С. 952–963. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.952rus.
11. Анисимова, И. Н. Цитоплазматическая мужская стерильность и перспективы ее использования в селекционно-генетических исследованиях и семеноводстве картофеля / И. Н. Анисимова, Т. А. Гавриленко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21 – № 1. – С. 83–95. DOI: 10.18699/VJ17.226.
12. Анисимова, И. Н. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, Р. А. Абдуллаев, Ю. И. Карабицина, Е. Б. Кузнецова // Методические указания, СПб: ВИР, 2018. – 48 с. DOI: 10.30901/978-5-905954-81-8.
13. Анисимова, И. Н. Структурно-функциональная организация генов, индуцирующих и супрессирующих цитоплазматическую мужскую стерильность у растений / И. Н. Анисимова // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 11. – С. 1239–1249. DOI: 10.31857/S0016675820110028.
14. Барыкина, Р. П. Основы микротехнических исследований в ботанике / Р. П. Барыкина, Т. Д. Веселова, А. Г. Девятов, Х. Х. Джалилова, Г. М. Ильина, Н. В. Чубатова // Справочное руководство, М.: МГУ, 2000. – 127 с.

15. Бочковой, А. Д. Типы гибридов подсолнечника и особенности их использования в условиях Российской Федерации / А. Д. Бочковой В. И Хатнянский, В. А. Камардин // Масличные культуры. – 2019. Т. – 177. – №1. – С. 110–123.
16. Бухарова, А. Р. Отдаленная гибридизация овощных пасленовых культур / А. Р. Бухарова, А. Ф. Бухаров – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2008. – 274 с.
17. Воронова, О. Н. Определение фертильности пыльцы у ряда диких многолетних видов и образцов подсолнечника из коллекции, произрастающей на Кубанской станции ВИР / О. Н. Воронова, Т. Т. Толстая, В. Т. Рожкова, В. А. Гаврилова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2011. – Т. 167. – С. 145–158.
18. Воронова, О. Н. Некоторые особенности формирования семязячатка у подсолнечника и топинамбура (*Helianthus annuus* L. и *H. tuberosus* L., *Asteraceae*) / О. Н. Воронова // В сборнике: Ботаника: история, теория, практика. К 300-летию основания Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН. – 2014. – С. 66–71. DOI: 10.13140/2.1.1207.8405.
19. Воронова, О. Н. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе / О. Н. Воронова, В. А. Гаврилова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 180. – № 1. – С. 95–104. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-95-104.
20. Гаврилова, В. А. Генетика культурных растений. Подсолнечник / В. А. Гаврилова, И. Н. Анисимова // Монография. СПБ: ВИР, 2003. – 209 с.
21. Гаврилова, В. А. Доноры восстановления фертильности пыльцы линий ЦМС подсолнечника для гетерозисной селекции / В. А. Гаврилова, В. Т. Рожкова // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – 2005. – С. 377–379.
22. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. «Сорта растений» (офиц. издание). – М.: ФГБНУ «Росинформагротех». – Т. 1. – 2019. – 516 с.

23. Даниленко, Н. Г. Миры геномов органелл / Н. Г. Даниленко, О. Г. Давыденко // Монография. Минск: Тэхналогія, 2003. – С. 121–226.
24. Дьяков, Ю. Т. Пятьдесят лет теории «ген-на-ген» / Ю. Т. Дьяков // Усп. современной биологии. – 1996. – Т. 116. – № 3. С. 291–305.
25. Жуков, В. А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями / В. А. Жуков, Т. С. Рычагова, О. Ю. Штарк, А. Ю. Борисов, И. А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2008. – Т. 6. – № 4. – С. 12–19. DOI: 10.17816/ecogen64.
26. Иванов, М. К. Цитоплазматическая мужская стерильность и восстановление фертильности пыльцы у высших растений / М. К. Иванов, Г. М. Дымшиц // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 4. – С. 437–476.
27. 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.
28. Леонова, И. Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / И. Н. Леонова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 2. – С. 314–325.
29. Маркин, Н. В. SCAR-маркер гена *Rf1* подсолнечника у линий восстановителей фертильности пыльцы растений с различными типами ЦМС / Н. В. Маркин, М. А. Тихонова, И. Н. Анисимова, В. Т. Рожкова, В. А. Гаврилова, А. В. Усатов // Масличные культуры. – 2009. – Т. 2. – № 141. – С. 3–6.
30. Маркин, Н. В. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС PET1 подсолнечника / Н. В. Маркин, Т. В. Усатенко, А. В. Усатов, В. Е. Тихобаева,

О. Ф. Горбаченко, Г. А. Кулишова, К. В. Азарин // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 110–122.

31. Маркин, Н. В. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rf1* - восстановителя фертильности пыльцы ЦМС PET1 подсолнечника / Н. В. Маркин, Т. В. Усатенко, А. В. Усатов, В. Е. Тихобаева, О. Ф. Горбаченко, Г. А. Кулишова, К. В. Азарин // Научное обозрение. Биологические науки. – 2014. – № 1. – С. 85–85.
32. Навашин, С. Г. Избранные труды / С. Г. Навашин // М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951. – Т. 1. – 401 с.
33. Орел, Л. И. Цитоэмбриологическое изучение цитоплазматической мужской стерильности лука / Л. И. Орел // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1968. – Т. 40. – № 1. – С. 163–176.
34. Орел, Л. И. Ультраструктура и онтогенез тапетальной пленки пыльников некоторых культурных растений / Л. И. Орел, В. Ф. Огородникова, Е. А. Голубева, К. Г. Эфендиева // Бюллетень ВИР. – 1978. – Т. 83. – С. 72.
35. Паспорта доноров селекционно ценных признаков сельскохозяйственных культур (пшеница, овес, рожь, ячмень, сорго, подсолнечник, лен, картофель, груша, вишня) // СПб: ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2012. – № 21 – 28 с.
36. Рокицкий, П. Ф. Введение в статистическую генетику / П. Ф. Рокицкий // Учеб. пособие для биол. спец. ун-тов. Минск, Вышейшая школа, 1974. – 447 с.
37. Усатов, А. В. SSR-анализ геномной ДНК ЦМС-линий подсолнечника / А. В. Усатов, Н. В. Маркин, Ф. И. Горбаченко, М. А. Федорова, В. Е. Тихобаева, О. Ф. Горбаченко, К. В. Азарин // Масличные культуры. – 2011. – Т. 1. – № 146-147 – С. 15–20.
38. Усатов, А. В. Ультраструктурные особенности микроспорогенеза у подсолнечника *Helianthus annuus* L. с цитоплазматической мужской стерильностью типа RIG0 / А. В. Усатов, А. Г. Федоренко, М. А. Тихонова, В. А. Гаврилова, Н. В. Маркин // Масличные культуры. – 2012. – Т. 2. – № 151-152. – С. 29–35.

39. Усатов, А. В. ДНК-маркеры гетерозиса у гибридов подсолнечника отечественной селекции / А. В. Усатов, М. С. Макаренко, О. Ф. Горбаченко, К. В. Азарин, А. А. Ковалевич, П. И. Костылев, Н. В. Маркин // Зерновое хозяйство России. – 2017 – № 3. – С. 54–59.

40. Устинова, Е. Н. Изменчивость женского гаметофита у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / Е. Н. Устинова // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол. – 1964. – Т. 69. – № 4. – С. 111–117.

41. Хаджинов, М. И. Селекция самоопыленных линий кукурузы со стерильной пыльцой и линий восстановителей фертильности / М. И. Хаджинов // Селекция и семеноводство. – 1957. – № 1. – С. 8–13.

42. Хаджинов, М. И. Селекция линий-восстановителей фертильности / М. И. Хаджинов // Кукуруза. – 1961. – № 1. – С. 19–22

43. Челюстникова, Т. А. Применение молекулярных маркеров для идентификации ЦМС-*Rf* системы в родительских линиях гибридов подсолнечника / Т. А. Челюстникова, С. З. Гучетль, Т. С. Антонова // Масличные культуры. – 2017. – Т. 4. – № 172. – С. 3–9.

44. Эльконин, Л. А. Генетический контроль цитоплазматической мужской стерильности растений: состояние проблемы и современные подходы для ее исследования / Л. А. Эльконин, В. С. Тырнов // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 4. – С. 437–450.

45. Эльконин Л. А. Спорофитный тип восстановления фертильности в ЦМС-индуцирующей цитоплазме сорго типа А3 и его модификация условиями влагообеспеченности растений / Л. А. Эльконин, В. В. Кожемякин, М. И. Цветова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – № 4. – С. 412–421. DOI: 10.18699/VJ19.510.

46. Юрина, Н. П. Сигнальные системы митохондрий растений: ретроградная регуляция / Н. П. Юрина, М. С. Одинцова // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – № 1. – С. 9–22.

47. Abratti, G. Mapping a novel fertility restoration gene in sunflower / G. Abratti, M. E. Bazzalo, A. León // In: 17th International Sunflower Conference. – 2008. – Córdoba, Spain. – Pp. 617–621.

48. Anandhan, T. Single marker analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / T. Anandhan, N. Manivannan, P. Vindhiyavarman, P. Jeyakumar // Electronic Journal of Plant Breeding. – 2010. – Vol. 1. – № 4. – Pp. 1227–1234.

49. Anisimova, I. N. Polymorphism among RFL-PPR homologs in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with varying ability for the suppression of the cytoplasmic male sterility phenotype / I. N. Anisimova, N. V. Alpatieva, V. T. Rozhkova, E. B. Kuznetsova, A. G. Pinaev, V. A. Gavrilova // Rus. J. Genet. – 2014. – Vol. 50. – № 7. – Pp. 712–721. DOI: 10.1134/S1022795414070023.

50. Ardila, F. Structural features of a cytoplasmic male sterility source from *Helianthus resinosus*, CMS RES1 / F. Ardila, M. M. Echeverría, R. Rios, R. H. Rodríguez // Journal of Plant Breeding and Crop Science. – 2010. – Vol. 2. – № 7. – Pp. 168–172.

51. Arrieta-Montiel, M. Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean / M. Arrieta-Montiel, A. Lyznik, M. Woloszynska, H. Janska, J. Tohme, S. Mackenzie // Genetics. – 2001. – Vol. 158. – № 2. – Pp. 851–864.

52. Badouin, H. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution / H. Badouin, J. Gouzy, C. J. Grassa, F. Murat, S. E. Staton, L. Cottret, C. Lelandais-Brière, G. L. Owens, S. Carrère, B. Mayjonade, L. Legrand, N. Gill, N. C. Kane, J. E. Bowers, S. Hubner, A. Bellec, A. Bérard, H. Bergès, N. Blanchet, M. C. Boniface, D. Brunel, O. Catrice, N. Chaidir, C. Claudel, C. Donnadieu, T. Faraut, G. Fievet, N. Helmstetter, M. King, S. J. Knapp, Z. Lai, M. C. Le Paslier, Y. Lippi, L. Lorenzon, J. R. Mandel, G. Marage, G. Marchand, E. Marquand, E. Bret-Mestries, E. Morien, S. Nambeesan, T. Nguyen, P. Pegot-Espagnet, N. Pouilly, F. Raftis, E. Sallet, T. Schiex, J. Thomas, C. Vandecasteele, D. Varès, F. Vear,

S. Vautrin, M. Crespi, B. Mangin, J. M. Burke, J. Salse, S. Muños, P. Vincourt, L. H. Rieseberg, N. B. Langlade // Nature. – 2017. – Vol. 546. – № 7656. – Pp. 148–152. DOI: 10.1038/nature22380.

53. Bentolila, S. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants / S. Bentolila, A. A. Alfonso, M. R. Hanson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – № 16. – Pp. 10887–10892. DOI: 10.1073/pnas.102301599.

54. Bernhard, T. Undesired fertility restoration in *msm1* barley associates with two mTERF genes / T. Bernhard, M. Koch, R. J. Snowdon, W. Friedt, B. Wittkop // Theor. Appl. Genet. – 2019. – Vol. 132. – Pp. 1335–1350. DOI: 10.1007/s00122-019-03281-9.

55. Berry, S. T. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower / S. T. Berry, A. J. Leon, C. C. Hanfrey, P. Challis, A. Burkholz, S. Barnes, Stephen, G. K. Rufener, M. Lee, P. Caligari // Theoret. Appl. Genetics. – 1995. – Vol. 91. – № 2. – Pp. 195–199. DOI: 10.1007/BF00220877.

56. Berry, S. T. Presentation of the Advanta sunflower RFLP linkage map for public research / S. T. Berry, A. J. León, R. Peerbolte, P. Challis, C. Livini, R. Jones, S. Feingold // In: Proceedings of the 19th Sunflower Research Workshop. – 1997. – Fargo, North Dakota, USA. – Pp. 113–118.

57. Budar, F. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use / F. Budar, G. Pelletier // C. R. Acad. Sci. Paris. – 2001. – Vol. 324. – № 6. – Pp. 543–550. DOI: 10.1016/S0764-4469(01)01324-5.

58. Bulos, M. Molecular mapping of a sunflower rust resistance gene from HAR6. M. Bulos, M. L. Ramos, E. Altieri, C. A. Sala // Breed. Sci. – 2013. –Vol. 63. – № 1. – Pp. 141–146. DOI: 10.1270/jsbbs.63.141.

59. Çabuk Şahin, E. SSR markers suitable for marker assisted selection in sunflower for downy mildew resistance / E. Çabuk Şahin, A. Kalenderoğlu, Y. Aydin, G. Evci, A. Altınkut Uncuoğlu // Open Life Sciences. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – Pp. 319–326. DOI: 10.1515/biol-2018-0039.

60. Carlsson, J. Mitochondrial regulation of flower development / J. Carlsson, M. Leino, J. Sohlberg, J. F. Sundstrom, K. Glimelius // Mitochondrion. –2008. – Vol. 8. – № 1. – Pp. 74–86. DOI: 10.1016/j.mito.2007.09.006.

61. Chamer, A. M. Impact of pollination on sunflower yield: Is pollen amount or pollen quality what matters? / A. M. Chamer, D. Medan, A. Mantese, N. Bartoloni // Field Crops Research. – 2015. – Vol. 176. – Pp. 61–70. DOI: 10.1016/j.fcr.2015.02.001.

62. Chase, C. D. Cytoplasmic male sterility: A window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions / C. D. Chase // Trends Genetics. – 2007. – Vol. 23. – №2. – Pp. 81–90. DOI: 10.1016/j.tig.2006.12.004.

63. Chen, L. Male sterility and fertility restoration in crops / L. Chen, Y. G. Liu // Annual Review of Plant Biology. – 2014. – Vol. 65. – Pp. 579–606. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040119.a

64. Chen, Z. Plant mitochondrial genome evolution and cytoplasmic male sterility / Z. Chen, N. Zhao, S. Li, C. E. Grover, H. Nie, J. F. Wendel, J. Hua // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2017. – Vol. 36. – № 1. – Pp. 55–69. DOI: 10.1080/07352689.2017.1327762.

65. Choumane, W. Structure and variability of nuclear ribosomal genes in the genus *Helianthus* / W. Choumane, P. Heizmann // Theor. Appl. Genet. – 1988. – Vol. 76. – № 4. – Pp. 481–489. DOI: 10.1007/BF00260896.

66. Christov, M. New type of cytoplasmic male sterility in sunflower / M. Christov // Helia. – 2003. – Vol. 26. – № 38. – Pp. 51–58. DOI: 10.2298/HEL0338051C.

67. Cui, X. The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize / X. Cui, R. P. Wise, P. S. Schnable // Science. – 1996. – Vol. 272. – № 5266. – Pp. 1334–1336. DOI: 10.1126/science.272.5266.1334.

68. Dahan, J. The *Rf* and *Rf*-like *PPR* in higher plants, a fast-evolving subclass of *PPR* genes / J. Dahan, H. Mireau // RNA Biol. – 2013. – Vol. 10. – № 9. – Pp. 1469-1476. DOI: 10.4161/rna.25568.

69. Doyle, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // Focus. – 1990. – Vol. 12. – № 1. – Pp. 13–15.

70. Echeverria, M. M. Characterization for agronomic use of cytoplasmic male-sterility in sunflower (*Helianthus annuus* L.) introduced from *H. resinosus* Small / M. M. Echeverria, M. T. Salaberry, R. H. Rodríguez // Plant Breed. – 2003. – Vol. 122. – № 4 – Pp. 357– 361. DOI: 10.1046/j.1439-0523.2003.00870.x.

71. Elkonin, L. A. Dominant male sterility in sorghum: effect of nuclear background on inheritance of tissue-culture-induced mutation / L. A. Elkonin // Theor. and Appl. Genet. – 2005. – Vol. 111. – № 7. – Pp. 1377 – 1384. DOI: 10.1007/s00122-005-0069-1.

72. Enns, H. Sunflower research, a progress report / H. Enns, D. G. Dorrell, J. A. Hoes, W. O. Chubb // In: Proc. 4th Int. Sunflower Conf. – 1970. Memphis, Tennessee, USA. – Pp. 162–167.

73. Feng, J. Introgression and molecular tagging of Rf_4, a new male fertility restoration gene from wild sunflower *Helianthus maximiliani* L. / J. Feng, C. Jan // Theor. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 117. – № 2. – Pp. 241–249. DOI: 10.1007/s00122-008-0769-4.

74. Feng, J. Physical localization and genetic mapping of the fertility restoration gene *Rfo* in canola (*Brassica napus* L.) / J. Feng, V. Primomo, Z. Li, Y. Zhang, C. C. Jan, L. Tulsieram, S. S. Xu // Genome. – 2009. – Vol. 52. – № 4. – Pp. 401–407. DOI: 10.1139/g09-016.

75. Fick, G. N. Fertility restoration in confectionary sunflowers // G. N. Fick, D. E. Zimmer // Crop Sci. – 1974. – Vol. 14. – № 4. – Pp. 603–604. DOI: 10.2135/cropsci1974.0011183X001400040036x.

76. Fick, G. N. Sunflower breeding / G. N. Fick, J. F. Miller // Sunflower Technology and Production. – 1997. – Vol. 35 – Pp. 395–439. DOI: 10.2134/agronmonogr35.c8.

77. Fujii, S. Suppressed expression of retrograde-regulated male sterility restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants / S. Fujii, K. Toriyama // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – Vol. 106. – № 23. – Pp. 9513–9518. DOI: 10.1073/pnas.0901860106.

78. Fujii, S. Selection patterns on restorer-like genes reveals a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution / S. Fujii, Ch. S. Bond, I. D. Small // PNAS. – 2011. – Vol. 108 – № 4. – Pp. 1723–1728. DOI: 10.1073/pnas.1007667108.

79. Gabay-Laughnan, S. Characterization of a novel thermosensitive restorer of fertility for cytoplasmic male sterility in maize / S. Gabay-Laughnan, E. V. Kuzmin, J. Monroe, L. Roark, K. J. Newton // Genetics. – 2009. – Vol. 182. – № 1. – Pp. 91–103. DOI: 10.1534/genetics.108.099895.

80. Gaborieau, L. The propensity of pentatricopeptide repeat genes to evolve into restorers of cytoplasmic male sterility / L. Gaborieau, G. G. Brown, H. Mireau // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – Pp. 1816. DOI: 10.3389/fpls.2016.01816.

81. Garcia, L. Male sterility and somatic hybridization in plant breeding / L. Garcia, A. Edera, C. Marfil, M. Sanchez-Puerta // Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. – 2019. – Vol. 51. – № 2. – Pp. 475–486. DOI: 10.20944/preprints201907.0330.v1.

82. Gavrilova, V. A. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry / V. A. Gavrilova, V. T. Rozhkova, I. N. Anisimova // Helia. – 2014. – Vol. 37. – № 60. – Pp. 1–16. DOI: 10.1515/helia-2014-0001.

83. Gentzbittel, L. RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunfower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools / L. Gentzbittel, X.-Y. Zhang, F. Vear, B. Griveau, P. Nicolas // Theor. Appl. Genet. – 1994. – Vol. 89. – Pp. 419–425. DOI: 10.1007/BF00225376.

84. Gentzbittel, L. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. Gentzbittel, F. Vear, Y.-X. Zhang, A. Bervillé, P. Nicolas // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – Pp. 1079–1086. DOI: 10.1007/BF00222925.

85. Gentzbittel, L. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome / L. Gentzbittel, E. Bret-Mestries,

S. Mouzeyar, F. Mazeyrat, S. Badaoui, F. Vear, D. de Labrouhe, P. Nicolas // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 99. – Pp. 218–234. DOI: 10.1007/s001220051228.

86. Gillman, J. Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration in Petunia / J. Gillman, S. Bentolila, M. Hanson // Petunia. – 2008. – Pp. 107–129. DOI: 10.1007/978-0-387-84796-2_6.

87. Goryunov, D. V. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower / D. V. Goryunov, I. N. Anisimova, V. A. Gavrilova, A. I. Chernova, E. A. Sotnikova, E. U. Martynova, S. V. Boldyrev, A. F. Ayupova, R. F. Gubaev, P. V. Mazin, E. A. Gurchenko, A. A. Shumskiy, D. A. Petrova, S. V. Garkusha, Z. M. Mukhina, N. I. Benko, Y. N. Demurin, P. E. Khaitovich, S. V. Goryunova *// Agronomy*. – 2019. – *Vol.* 9. – № 2. – Pp. 49. DOI: 10.3390/agronomy9020049.

88. Guzman, C. D. Genetics and breeding system for cytoplasmic and genetic male sterility in rice / C. D. Guzman, J. Oard // In book: Protecting rice grains in the post-genomic era. – 2019. DOI: 10.5772/intechopen.85191.

89. Hackauf, B. Fine mapping of the restorer gene *Rfp3* from an Iranian primitive rye (*Secale cereale* L.) / B. Hackauf, E. Bauer, V. Korzun, T. Miedaner // Theor. Appl. Genet. – 2017. – Vol. 130. – № 6. – Pp. 1179–1189. DOI: 10.1007/s00122-017-2879-3.

90. Han, Z. Expression profiles of a cytoplasmic male sterile line of *Gossypium harknessii* and its fertility restorer and maintainer lines revealed by RNA- Seq / Z. Han, Y. Qin, Y. Deng, F. Kong, Z. Wang, G. Shen, J. Wang, B. Duan, R. Li // Plant Physiology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 116. – Pp. 106–115. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.04.018.

91. Hanson, M. R. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development / H. R. Hanson, S. Bentolila // Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – № 1. – Pp. 154–169. DOI: 10.1105/tpc.015966.

92. Horn, R. Fertility restoration of new CMS sources in sunflower (*Helianthus annum* L.) / R. Horn, W. Friedt // Plant breeding. – 1997. – Vol. 116. – № 4. – Pp. 317–322. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb01005.x.

93. Horn, R. Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / R. Horn, B. Kusterer, E. Lazarescu, M. Prüfe, W. Friedt // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – № 4. – Pp. 599–606. DOI: 10.1007/s00122-002-1078-y.

94. Horn, R. Gene cloning and characterization / R. Horn, S. Hamrit // Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. – 2010. – Pp. 173–219. DOI: 10.1201/b10192-7.

95. Horn, R. Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility / R. Horn, J. K. Gupta, N. Colombo // *Mitochondrion. – 2014. – Vol.* 19. – Pp. 198–205. DOI: 10.1016/j.mito.2014.04.004.

96. Horn, R. Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rf1* in sunflower / R. Horn, A. Radanovic, L. Fuhrmann, Y. Sprycha, S. Hamrit, M. Jockovic, D. Miladinovic, C. Jansen // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20. – № 6. – Pp. 1260. DOI: 10.3390/ijms20061260.

97. Hu, J. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162 / J. Hu, K. Wang, W. Huang, G. Liu, Y. Gao, J. Wang, Q. Huang, Y. Ji, X. Qin, L. Wan, R. Zhu, S. Li, D. Yang, Y. Zhu // The Plant Cell. – 2012. – Vol. 24. – № 1. – Pp. 109–122. DOI: 10.1105/tpc.111.093211.

98. Hu, Y. M. Identification and mapping of *Rf-I* an inhibitor of the *Rf5* restorer gene for CMS-C in maize (*Zea mays* L.) / Y. M. Hu, J. H. Tang, H. Yang, H. L. Xie, X. M. Lu, J. H. Niu, W. C. Chen // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 113. – № 2. – Pp. 357–360. DOI: 10.1007/s00122-006-0302-6.

99. Huang, F. Genetically characterizing a new indica cytoplasmic male sterility with *Oryza glaberrima* cytoplasm for its potential use in hybrid rice production / F. Huang, X. Fu, A. Efisue, S. Zhang, G. Xie, W. He, A. Y. M. Nevame, D. Jin // Crop science. – 2013. – V. 53. – Pp. 132–140. DOI: 10.2135/cropsci2012.07.0444.

100. Huang, W. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility / W. Huang, C. Yu, J. Hu,

L. Wang, Z. Dan, W. Zhou, C. He, Y. Zeng, G. Yao, J. Qi, Z. Zhang, R. Zhu, X. Chen, Y. Zhu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112. – № 48. – Pp.14984–14989. DOI: 10.1073/pnas.1511748112.

101. Itabashi, E. The fertility restorer gene, *Rf2*, for lead rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein / E. Itabashi, N. Iwata, F. Sota, T. Kazama, K. Toriyama // Plant J. – 2011. – Vol. 65. – № 3. – Pp. 359–367. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04427.x.

102. Jan, C. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower / C. C. Jan, B. A. Vick, J. F. Miller, A. L. Kahler, E. T. Butler // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 96. – Pp. 15–22. DOI: 10.1007/s001220050703.

103. Jan, C. C. Cytoplasmic male sterility in two wild *Helianthus annuus* L. accessions and their fertility restoration / C. C. Jan // Crop Breeding, Genetics and Cytology. – 2000. – Vol. 40. – № 6. – Pp. 1535–1538. DOI: 10.2135/cropsci2000.4061535x.

104. Jan, C. C. Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower / C. C. Jan, B. A. Vick // Plant Breed. – 2007. – Vol. 126. – № 2. – Pp. 213–217. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01350.x.

105. Jaqueth, J. S. Fertility restoration of maize CMS-C altered by a single amino acid substitution within the *Rf4* bHLH transcription factor / J. S. Jaqueth, Z. Hou, P. Zheng, R. Ren, B. A. Nagel, G. Cutter, X. Niu, E. Vollbrecht, T. W. Greene, S. P. Kumpatla // Plant J. – 2020. – Vol. 101. – № 1. – Pp. 101–111. DOI: 10.1111/tpj.14521.

106. Jordan, D. R. Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] / D. R. Jordan, E. Mace, R. Henzell, P. Klein, R. Klein // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – № 7. – Pp. 1279–1287. DOI: 10.1007/s00122-009-1255-3.

107. Jordan, D. R. Mapping and characterization of Rf_5: a new gene conditioning pollen fertility restoration in A_1 and A_2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum*

bicolor (L.) Moench) / D. R. Jordan, R. R. Klein, K. G. Sakrewski, R. G. Henzell, P. E. Klein, E. S. Mace // Theor. Appl. Genet. – 2011. – Vol. 123. – Pp. 383–396. DOI: 10.1007/s00122-011-1591-y.

108. Kalia, P. Morphological and molecular changes on cytoplasmic male sterility (CMS) introgression in Asiatic carrot (*Daucus carota* L.) / P. Kalia, M. Mangal, S. Singh, C. Chugh, S. Mishra, S. Chaudhary, Shivpratap // Planta. – 2019. – Vol. 250. – № 2. – Pp. 507–518. DOI: 10.1007/s00425-019-03185-4.
109. 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. – Vol. 55. – № 11. – Pp. 1375–1382. DOI: 10.1134/S1022795419110073.
110. Kaul, M. L. H. Genic Male Sterility / M. L. H. Kaul // In: Male Sterility in Higher Plants. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. – 1988. – Springer, Heidelberg, Berlin. – Vol. 10. DOI: 10.1007/978-3-642-83139-3_2.
111. Kim, Y. J. Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding / Y. J. Kim, D. Zhang // Trends Plant Sci. – 2018. – Vol. 23. – № 1. – Pp. 53–65. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.10.001.
112. Kinman, M. L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs / M. L. Kinman // In: Proc. 4th Int. Sunflower Conf. – 1970. – Memphis, USA. – Pp. 181–183.
113. Klein, R. R. Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12 / R. R. Klein, P. Klein, J. Mullet, P. Minx, W. Rooney, K. Schertz // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 111. – № 6. – Pp. 994–1012. DOI: 10.1007/s00122-005-2011-y.
114. Kohler, R. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene / R. Kohler, R. Horn, A. Lossl, K. Zetsche // Mol. Gen. Gen. – 1991. – Vol. 227. – № 3. – Pp. 369–376. DOI: 10.1007/BF00273925.

115. Koizuka, N. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile *Kosena radish* / N. Koizuka, R. Imai, H. Fujimoto, T. Hayakawa, Y. Kimura, J. Kohno-Murase, S. Sakai, J. Imamura // Plant J. – 2003. – Vol. 34. – № 4. – Pp. 407–415. DOI: 10.1046/j.1365313X.2003.01735.x.

116. Komori, T. Fine genetic mapping of the nuclear gene, *Rf-1*, that restores the BT-type cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) by PCR-based markers / T. Komori, T. Yamamoto, N. Takemori, M. Kashihara, H. Matsushima, N. Nitta // Euphytica. – 2003. – Vol. 129. – № 2. – Pp. 241–247. DOI: 10.1023/A:1021915611210.

117. Kováčik, A. The pollen sterility in sunflower, *Helianthus annuus* L. / A. Kováčik, V. Škaloud // Genetika a Šlechtění. – 1973. – Vol. 9. – Pp. 173–180.

118. Kubo, T. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations / T. Kubo, K. J. Newton // Mitochondrion. – 2008. – Vol. 8. – № 1. – Pp. 5–14. DOI: 10.1016/j.mito.2007.10.006.

119. Kumar, S. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*. – 2016. – Vol. 33. – № 7. – Pp. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

120. Kusterer, B. Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf1* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene / B. Kusterer, R. Horn, W. Friedt // Euphytica. – 2005. – Vol. 143. – № 1. – Pp. 35–42. DOI: 10.1007/s10681-005-1795-9.

121. Laveau, J. H. Microsporogenesis abortion in cytoplasmic male sterile plants from *H. petiolaris* or *H. petiolaris fallax* crossed by sunflower (*Helianthus annuus*) / J. H. Laveau, C. Schneider, A. Berville // *Annals of Botany*. – 1989. – Vol. 64. – № 2. – Pp. 137–148, DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087817.

122. Lawson, W. R. Marker-assisted selection for two rust genes in sunflower / W. R. Lawson, K. C. Goulter, R. J. Henry, G. A. Kong, J. K. Kochman // Mol. Breed. – 1998. – Vol. 4. – № 3. – Pp. 227–234. DOI: 10.1023/A:1009667112088.

123. Leclerq, P. Une sterilite cytoplasmique chez le tournesol / P. Leclerq // Ann. Amelior. Plant. – 1969. – Vol. 19. – № 2. – Pp. 99–106.

124. Li, J. J. Reduced activity of ATP synthase in mitochondria causes cytoplasmic male sterility in chili pepper / J. J. Li, D. Pandeya, Y. D. Jo, W. Y. Liu, B. C. Kang // Planta. – 2013. – Vol. 237. – № 4. – Pp. 1097–1099. DOI: 10.1007/s00425-012-1824-6.

125. Li, J. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) / J. Li, S. Han, X. Ding, T. He, J. Dai, S. Yang, J. Gai // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – Pp. e0126771. DOI: 10.1371/journal.pone.0126771.

126. Liu, Z. Molecular mapping of the Rf_3 fertility restoration gene to facilitate its utilization in breeding confection sunflower / Z. Liu, S. Mulpuri, J. Feng, B. A. Vick, C. C. Jan // Mol. Breeding. – 2012. – Vol. 29. – № 2. – Pp. 275–284. DOI: 10.1007/s11032-011-9563-0.

127. Liu, Z. Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene / Z. Liu, D. Wang, J. Feng, G. J. Seiler, X. Cai, C.-C. Jan. // Genetics. – 2013. – Vol. 193. – № 3. – Pp. 727–737. DOI: 10.1534/genetics.112.146092.

128. Liu, Z. Molecular mapping of an *Rf* gene from RCMG1 for cmsANN3 derived from wild *Helianthus annuus* PI 413180 [poster] / Z. Liu, L. Zhang, L. Gong, C. C. Jan // In: 37 th Sunflower Res. Workshop, Nat. Sunflower Association. – 2015. – January 7-8. – Fargo, ND.

129. Liu, Z. A mitochondria-targeted PPR protein restores Pol cytoplasmic male sterility by reducing orf224 transcript levels in oilseed rape / Z. Liu, Z. Yang, X. Wang, K. Li, H. An, J. Liu, G. Yang, T. Fu, B. Yi, D. Hong // Mol Plant. – 2016. – Vol. 9. – № 7. –1082–1084. DOI: 10.1016/j.molp.2016.04.004.

130. Liu, Z. Additional *Rf* genes for CMS GIG2 and their molecular mapping [poster] / Z. Liu, H. Wang, C. C. Jan., 2016. https://www.sunflowernsa.com/uploads/59/Additional.Rf.genes_Liu.etal_Poster-2016.pdf

131. Liu, Z. A pentatricopeptide repeat protein restores *nap* cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* / Z. Liu, F. Dong, X. Wang, T. Wang, R. Su, D. Hong, G. Yang // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 15. – Pp. 4115–4123. DOI: 10.1093/jxb/erx239.

132. Ma, Y. Maintaining and restoring cytoplasmic male sterility systems in pepper (*Capsicum annuum* L.) / Y. Ma, W. Huang, J. J. Ji, Z. H. Gong, C. C. Yin, S. S. Ahmed, Z. L. Zhao // Genet. Mol. Res. – 2013. – Vol. 12. – № 3. – Pp. 2320–2331. DOI: 10.4238/2013.

133. Mackenzie, S. A. The influence of mitochondrial genetics in crop breeding strategies / S. A. Mackenzie // Plant Breed. Rev. – 2010. – Vol. 25. – № 24. – Pp. 115–138. DOI: 0.1002/9780470650301.ch5.

134. Makarenko, M. S. Mitochondrial genomes organization in alloplasmic lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) with various types of cytoplasmic male sterility / M. Makarenko, I. Kornienko, K. Azarin, A. Usatov, M. Logacheva, N. Markin, V. Gavrilova // Peer J. – 2018. – Vol. 6. – № 8. – Pp. e5266. DOI: 10.7717/peerj.5266.

135. Makarenko, M. S. Characterization of the mitochondrial genome of the MAX1 type of cytoplasmic male-sterile sunflower / M. Makarenko, A. Usatov, T. Tatarinova, K. Azarin, M. Logacheva, V. Gavrilova, R. Horn // BMC Plant Biol. – 2019. – Vol. 19. – Pp. 51. DOI: 10.1186/s12870-019-1637-x.

136. Mangelsdorf, P. Hybrid corn / P. Mangelsdorf // Sci. Am. – 1951. – V. 185. – Pp. 39–47.

137. Markin, N. Study of informative DNA markers of the *Rf1* gene in sunflower for breeding practice / N. Markin, A. Usatov, M. Makarenko, K. Azarin, O. Gorbachenko, N. Kolokolova, T. Usatenko, O. Markina, V. Gavrilova // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2017. – Vol. 53. – № 2. – Pp. 69–75. DOI: 10.17221/108/2016-CJGPB.

138. Matsuhira, H. Unusual and typical features of a novel restorer-of-fertility gene of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / H. Matsuhira, H. Kagami, M. Kurata, K. Kitazaki, M. Matsunaga, Y. Hamaguchi, E. Hagihara, M. Ueda, M. Harada, A. Muramatsu,

R. Yui-Kurino, K. Taguchi, H. Tamagake, T. Mikami, T. Kubo // Genetics. – 2012. – Vol. 192. – № 4. – Pp. 1347–1358. DOI: 10.1534/genetics.112.145409.

139. Mei, S. Comparative transcriptome profile of the cytoplasmic male sterile and fertile floral buds of radish (*Raphanus sativus* L.) / S. Mei, T. Liu, Z. Wang // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – Pp. 42. DOI: 10.3390/ijms17010042.
140. Melonek, J. High intraspecific diversity of Restorer-of-fertility-like genes in barley / J. Melonek, R. Zhou, P. Bayer, D. Edwards, N. Stein, I. Small // Plant J. – 2019. – Vol. 97. – № 2. – Pp. 281–295. DOI: 10.1111/tpj.14115.
141. Mestries, E. Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to shape Sclerotinia sclerotiorum in sunflowers (shape *Helianthus annuus* L.) using molecular markers / E. Mestries, L. Gentzbittel, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas, F. Vear // Molecular Breeding. – 1998. – Vol. 4. – Pp. 215–226. DOI: 10.1023/A:1009694626992.
142. Meyer, J. Rf8-mediated T-urf13 transcript accumulation coincides with a pentatricopeptide repeat cluster on maize chromosome 2L / J. Meyer, D. Pei, R. P. Wise // The plant genome. – 2011. – Vol. 4. – № 3. – Pp. 283. DOI: 10.3835/plantgenome2011.05.0017.
143. Miller, J. F. Update on inheritance of sunflower characteristics / J. F. Miller // In Proc. Intl. Sunflower Conf. 13th, Pisa, Italy. – 1992. – 7-11 Sept. International Sunflower Association, Paris. – Pp. 905–945.
144. Mindaye, T. T. Heterosis in locally adapted sorghum genotypes and potential of hybrids for increased productivity in contrasting environments in Ethiopia / T. T. Mindaye, E. S. Mace, I. D. Godwin, D. R. Jordan // Crop Journal. – 2016. – Vol. 4. – № 6. – Pp. 479–489. DOI: 10.1016/j.cj.2016.06.020.
145. Moneger, F. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene / F. Moneger, C. J. Smart, C. J. Leaver // EMBO J. – 1994. – Vol. 13. – № 1. – Pp. 8–17.
146. National Center for Biotechnology Information: URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

147. Nizampatnam, N. R. Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, orfH522 induces male sterility in transgenic tobacco plants / N. R. Nizampatnam, H. Doodhi, Y. K. Narasimhan, S. Mulpuri, D. K. Viswanathaswamy // Planta. – 2009. – Vol. 4. – № 229. – Pp. 987-1001. DOI: 10.1007/s00425-009-0888-4.

148. O'Toole, N. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants / N. O'Toole, M. Hattori, C. Andres, K. Iida, C. Lurin, C. Schmitz-Linneweber, M. Sugita, I. Small // Mol. Biol. Evol. – 2008. – Vol. 25. – № 6. – Pp. 1120–1128. DOI: 10.1093/molbev/msn057.

149. Owens, G. L. Genomic sequence and copy number evolution during hybrid crop development in sunflowers / G. L. Owens, G. J. Baute, S. Hubner, L. H. Rieseberg // Evol Appl. – 2018. – Vol. 12. – № 1. – Pp. 54–65. DOI: 10.1111/eva.12603.

150. Paniego, N. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / N. Paniego, M. Echaide, M. Munoz, L. Fernandez, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E. Y. Suarez, H. E. Hopp // Genome. – 2002. – Vol. 45. – № 1. – Pp. 34–43. DOI: 10.1139/g01-120.

151. Paniego, N. Sunflower. Genome mapping and molecular breeding in plants. N. Paniego, R. Heinz, P. Fernandez, P. Talia, V. Nishinakamasu, H. E. Hopp // (ed) C. Kole. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 2007. – Vol. 2. – Pp. 153–177.

152. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – № 19. – Pp. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.

153. Piffanelli, P. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. P. Piffanelli, J. H. E. Ross, D. J. Murphy // Sex plant reprod. – 1998. – Vol. 11. – № 2. – Pp. 65–80. DOI: 10.1007/s004970050122.

154. Port, A. Usefulness of the diagnostic markers for the restorer gene Rf_1 in inheritance studies at sunflower / A. Port, V. Nechifor, A. Midoni, M. Duca // *Anal. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – Pp. 11–17.

155. Qi, L. L. Genetics and mapping of the R_{11} gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. L. Qi, G. J. Seiler, B. A. Vick, T. J. Gulya // Theor. Appl. Genet. – 2012. – Vol. 125. – № 5. – Pp. 921–932. DOI: 10.1007/s00122-012-1883-x.

156. Qi, L. L. Map and sequence-based candidate gene analysis of the male fertility restoration gene *Rf5* in sunflower / L. L. Qi, Y. M. Long, Z. I. Talukder, G. J. Ma, Q. J. Song, G. J. Seiler // In: Proceedings of the International Symposium "Sunflower and Climate Change". – 2018. – Paris, France. – Pp. 32.

157. Qin, X. In vivo functional analysis of a nuclear restorer PPR protein / X. Qin, R. Warguchuk, N. Arnal, L. Gaborieau, H. Mireau, G. G. Brown // BMC Plant Biology. – 2014. – Vol. 14. – № 1. – Pp. 313. DOI: 10.1186/s12870-014-0313-4.

158. Radwan, O. Development of PCR markers for the *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences / O. Radwan, M. F. Bouzidi, P. Nicolas, S. Mouzeyar // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – № 1. – Pp. 176-185. DOI: 10.1007/s00122-004-1613-0.

159. Reddemann, A. Recombination events involving the *atp9* gene are associated with male sterility of CMS PET2 in sunflower / A. Reddemann, R. Horn // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – № 3. – Pp. 806. DOI: 10.3390/ijms19030806.

160. Reddy, P. S. Inheritance of fertility restoration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / P. S. Reddy, B. Thammiraju // Euphytica. – 1977. – Vol. 26. – № 2. – Pp. 409–412. DOI: 10.1007/BF00027002.

161. Rhee, S. Transcriptome profiling of differentially expressed genes in floral buds and flowers of male sterile and fertile lines in watermelon / S. Rhee, M. Seo, Y. J. Jang, S. Cho, G. Lee // BMC Genomics. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – Pp. 914. DOI: 10.1186/s12864-015-2186-9.

162. Rhoades, M. M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* / M. M. Rhoades // Science. – 1931. – Vol. 73. – № 1891. – Pp. 340–341. DOI: 10.1126/science.73.1891.340.

163. Rieseberg, L. Genomic map of a diploid hybrid species / L. Rieseberg, H. Choi, R. Chan, C. Spore // Heredity. – 1993. – Vol. 70. – Pp. 285–293 (1993). DOI: 10.1038/hdy.1993.41.

164. Rukmini Devi K. Investigation on maintainer/restorer reaction, stability and gene action in diverse CMS sources in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Ph.D. Dissertation // K. Rukmini Devi. Hyderabad, India, 2002. – 337 p.

165. Saghai-Maroof, M. A. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley. Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics / M. A. Saghai-Maroof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R. W. Allard // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1984. – Vol. 81. – Pp. 8014–8018. DOI: 10.1073/pnas.81.24.8014.

166. Şahin, E. SSR markers suitable for marker assisted selection in sunflower for downy mildew resistance / E. Şahin, A. Kalenderoğlu, Y. Aydın, G. Evci, A. Uncuoğlu / Open Life Sciences. – 2018. – V. 13. – № 1. – Pp. 319–326. DOI: https://doi.org/10.1515/biol-2018-0039.

167. Sajer, O. Mapping of the new fertility restorer gene *Rf-PET2* close to *Rf1* on linkage group 13 in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / O. Sajer, U. Schirmak, S. Hamrit, R. Horn // Genes. – 2020. – Vol. 11. – № 3. – Pp. 269. DOI: 10.3390/genes11030269.

168. Satoh, M. The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs / M. Satoh, T. Kubo, S. Nishizawa, A. Estiati, N. Itchoda, T. Mikami // Mol. Gen. Genomics. –2004. – Vol. 272. – Pp. 247–256. DOI: 10.1007/s00438-004-1058-9.

169. Schmitz-Linneweber, C. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression / C. Schmitz-Linneweber, I. Small // Trends Plant Sci. – 2008. – Vol. 13. – № 12. – Pp. 663–670. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.001.

170. Schnabel, U. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding / U. Schnabel, U. Engelmann, R. Horn // Plant Breeding. – 2008. – Vol. 127. – № 6. – Pp. 587–591. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01516.x.

171. Seilar, G. J. New fertility restoration genes from wild sunflower PET1 male sterile cytoplasm / G. J. Seilar, C. C. Jan // Crop Science. – 1994. – Vol. 34. – № 6. – Pp. 1526–1528. DOI: 10.2135/cropsci1994.0011183X003400060021x

172. Serieys, H. Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources / H. Serieys // In: IX FAO technical Consultation of the ECRN on Sunflower. – 1999. – Dobrich, Bulgaria. – July 27-30. – Pp. 71–116.

173. Serieys, H. Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources in the FAO Subnetwork / H. Serieys // In: Proceedings of the Sunflower Subnetwork Progress Report. – 2005. – Rome, Italy. – July 17-20. – Pp. 47–53.

174. Singh, M. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region / M. Singh, G. G. Brown // Plant Cell. – 1991. – Vol. 3. – № 12. – Pp. 1349–1362. DOI: 10.1105/tpc.3.12.1349.

175. Sinha P. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevi* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers / P. Sinha, S. M. Tomar, Vinod, V. K. Singh, H. S. Balyan // Genetica. – 2013. – Vol. 141. – № 10 – 12. Pp. 431–441. DOI: 10.1007/s10709-013-9742-5.

176. Sofi, P. A. Genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility in maize / P. A. Sofi, A. G. Rather, S. A. Wani // Communications in Biometry and Crop Science. – 2007. – Vol. 2. – № 1. – Pp. 49–60.

177. Sujatha, M. Genetics of fertility restoration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / M. Sujatha, A. V. Reddy, A. S. Shankar // Current Biotica. – 2011. – Vol. 5. – № 1. – Pp. 56–63.

178. Sykes, T. *In silico* identification of candidate genes for fertility restoration in cytoplasmic male sterile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / T. Sykes, S. Yates, I. Nagy, T. Asp, I. Small, B. Studer // Genome Biol. Evol. – 2017. – Vol. 9. – № 2. – Pp. 351–362. DOI: 10.1093/gbe/evw047.

179. Talukder, Z. Linkage mapping and genome-wide association studies of the *Rf* gene cluster in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their distribution in world sunflower collections / Z. Talukder, G. Ma, B. S. Hulke, C. C. Jan, L. Qi // Front Genet. – 2019. – Vol. 10 – Pp. 216. DOI: 10.3389/fgene.2019.00216.

180. Tan, Y. Molecular characterization and application of a novel cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial sequence in rice / Y. Tan, X. Xu, C. Wang, G. Cheng, S. Li, X. Liu // BMC Genet. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – Pp. 45. DOI: 10.1186/s12863-015-0205-0.

181. Tang, H. The rice restorer *Rf4* for Wild-Abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts / H. Tang, D. Luo, D. Zhou, Q. Zhang, D. Tian, X. Zheng, L. Chen, Y. G. Liu // Mol. Plant. – 2014. – Vol. 7. – № 9. – Pp. 1497–1500. DOI: 10.1093/mp/ssu047.

182. Tang, S. Simple sequence repeat map of the sunflower genome / S. Tang, J.-K. Yu, M. B. Slabaugh, D. K. Shintani, S. J. Knapp // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 105. – Pp. 1124 – 1136. DOI: 10.1007/s00122-002-0989-y.

183. Tang, S. PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower / S. Tang, V. Kishore, S. Knapp // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 107. – Pp. 6–19. DOI: 10.1007/s00122-003-1233-0.

184. Tippmann, H. F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis / H. F. Tippmann // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – V. 5. – Pp. 82–87. DOI: 10.1093/bib/5.1.82.

185. Touzet, P. Cytoplasmic male sterility and mitochondrial metabolism in plants. P. Touzet, E. H. Meyer // Mitochondrion. – 2014. – Vol. 19. – Pp. 166–171. DOI: 10.1016/j.mito.2014.04.009.

186. Uyttewaal, M. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility / M. Uyttewaal, N. Arnal, M. Quadrado, A. Martin-Canadell, N. Vrielynck, S. Hiard, H. Gherbi, A. Bendahmane, F. Budar, H. Mireau // Plant

Cell. – 2008. – Vol. 20. – № 12. – Pp. 3331–3345. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.11.011.

187. Vassilevska-Ivanova, R. Evaluation and genetics studies of F1 sunflower hybrids / R. Vassilevska-Ivanova, Z. Tcekova // Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. – 2003. – Vol. 56. – №56. – Pp. 81–86.
188. Vesselina, N. Cytological particularities in nuclear and nuclear-cytoplasmic male sterile pepper lines // N. Vesselina, V. Todorova, Y. Stefanova, N. Tomlekova // Caryologia. – 2010. – Vol. 63. – № 3. – Pp. 262–268. DOI: 10.1080/00087114.2010.10589736.
189. Voorrips, R. E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs / R. E. Voorrips // The Journal of Heredity. – 2002. – Vol. 93. – № 1. – Pp. 77–78. DOI: 10.1093/jhered/93.1.77.
190. Vranceanu, A. V. Inheritance of pollen fertility restoration in sunflower / A. V. Vranceanu, F. M. Stoenescu // Analele Institutulei de Cercetari pentru Cereale si Plante technice. –1978. – Vol. 43. – Pp. 15–25.
191. Wang, Z. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing / Z. Wang, Y. Zou, X. Li, Q. Zhang, L. Chen, H. Wu, D. Su, Y. Chen, J. Guo, D. Luo // Plant Cell. – 2006. – Vol. 18. – № 3. – Pp. 676–687. DOI: 10.1105/tpc.105.038240.
192. Wang, F. Molecular markers linked to the *Rf2* fertility restorer gene in cotton / F. Wang, J. M. Stewart, J. Zhang // Genome. – 2007. – Vol. 50. – № 9. – Pp. 818–824. DOI: 10.1139/g07-061. PMID: 17893722.
193. Wang, Y. Molecular mapping of a fertility restorer gene for cytoplasmic male sterility in soybean / Y. Wang, L. Zhao, X. Wang, H. Sun // Plant Breeding. – 2010. – Vol. 129. – № 1. – Pp. 9–12. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01626.x.
194. Wang, Y. Mitochondrial genome sequencing reveals *orf463a* may induce male sterility in NWB cytoplasm of radish / Y. Wang, Q. Wang, W. Hao, J. Li, M. Qi, L. Zhang // Genes. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – Pp. 74. DOI: 10.3390/genes11010074.

195. Wei, B. A joint segregation analysis of the inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in pepper / B. Wei, L. Wang, P. W. Bosland, G. Zhang, R. Zhang // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2020. – Vol. 145. – № 1. – Pp. 3–11. DOI: 10.21273/JASHS04756-19.

196. Whelan, E. D. P. A new source of cytoplasmic male sterility in sunflower / E. D. P. Whelan // Euphytica. – 1980. – Vol. 29. – № 1. – Pp. 33–46.

197. Woloszynska, M. Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes-though this be madness, yet there's method in't / M. Woloszynska // *Journal of Experimental Botany*. – 2010. – Vol. 61. – № 3. – Pp. 657–671. DOI: 10.1093/jxb/erp361.

198. Wu, Z. Mitochondrial genome and transcriptome analysis of five alloplasmic male-sterile lines in *Brassica juncea* / Z. Wu, K. Hu, M. Yan, L. Song, J. Wen, C. Ma, J. Shen, T. Fu, B. Yi, J. Tu // BMC Genomics. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – Pp. 348. DOI: 10.1186/s12864-019-5721-2.

199. Xie, J. K. Mapping of fertility-restoring genes with main effects and epistatic effects for CMS-DA in rice / J. K. Xie, J. Y. Zhuang, Y. Y. Fan, G. Q. Tu, Y. W. Xia, K. L. Zheng // Yi Chuan Xue Bao. – 2002. – Vol. 29. – № 7. – Pp. 616–621.

200. Yu, J. K. Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower / J. K. Yu, J. Mangor, L. Thompson, K. J. Edwards, M. B. Slabaugh, S. J. Knapp // Genome. – 2002. – Vol. 45. – № 4. – Pp. 652–660. DOI: 10.1139/g02-025.

201. Yu, J. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower / J. Yu, S. Tang, M. Slabaugh, A. Heesacker, G. Cole, M. Herring, J. F. Soper, F. Han, W. Chu, D. M. Webb, L. Thompson, K. Edwards, S. Berry, A. León, M. Grondona, C. Olungu, N. Maes, S. Knapp // *Crop Science*. – 2003. – Vol. *43. – № 1. – Pp.* 367–387. DOI: 10.2135/cropsci2003.0367.

202. Yue, B. Genetic mapping for the *Rf1* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers / B. Yue, B. A. Vick, X. Cai,

J. Hu // Plant Breed. – 2010. – Vol. 129. – № 1. – Pp. 24–28. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01661.x.

203. Zeinalzadeh-Tabrizi, H. Genetic diversity of sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) using TRAP markers / H. Zeinalzadeh-Tabrizi, K. Haliloglu, H. A. Razban // Journal of Crop Biotechnology. – 2016. – Vol. 4. – № 12. – Pp. 39–53.

204. Zhang, H. Ability of *Rf5* and *Rf6* to restore fertility of Chinsurah Boro II-type cytoplasmic male sterile *Oryza Sativa* (ssp. *japonica*) lines / H. Zhang, J. Che, Y. Ge, Y. Pei, L. Zhang, Q. Liu, M. Gu, S. Tang // Rice. – 2017. – Vol. 10. – Pp. 2. DOI: 10.1186/s12284-017-0142-9.

205. Zhang, J. Morphological and cytological study in a new type of cytoplasmic male-sterile line CMS-GIG2 in sunflower (*Helianthus annuus*) / J. Zhang, L. Wang, A. Zhao, H. Liu, C.-C. Jan, D. Qi, G. Liu // Plant Breeding. – 2010. – 129. – № 1. – Pp. 19–23. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01667.x.

206. Zhao, C. Physical mapping and candidate gene prediction of fertility restorer gene of cytoplasmic male sterility in cotton / C. Zhao, G. Zhao, Z. Geng, Z. Wang, K. Wang, S. Liu, H. Zhang, B. Guo, J. Geng // BMC Genomics. – 2018. – Vol. 19. – Pp. 6. DOI: 10.1186/s12864-017-4406-y.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1. Характеристика линий, использованных в работе

Линия	Происхождение	Маркеры												
		orfH522	STS 115	HRG01	HRG02	B20M13/ *RsaI**	L12D20/ *HaeIII***	SSR 224	SSR 511	ORS799	SCO04	SCX20	SCT06	HA4011
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RIL 130	и-598221 I_{10} (83HR4×RHA 345), Франция	516	115	454	740	2	1	144	158	143	950	600	950	200
ВИР 114А	Спутник, Россия	516	–	–	–	2	2	–	–	143	850	–	950	240
ВИР 116А	Вымпел, Россия	516	–	–	–	2	–	–	–	–	850	–	–	240
ВИР 130Б	к-2266, Германия	–	115	454	740	2	2	–	198	143	950	600	950	240
ВИР 151А	к-2184, ЮАР	516	115	–	–	2	1	–	–	143	850	–	–	240
ВИР 160 *rf*	к-2227 НА 61-1, США	–	115	–	–	2	1	–	–	–	850	600	950	200
ВИР 183	и-473670, Армения	516	–	–	740	1	–	141	161	–	–	–	–	200
ВИР 200	нет данных	516	–	–	–	2	–	–	161	–	–	–	–	200
ВИР 210 *Rf*	нет данных	516	–	–	–	2	2	105	210-214	–	850	600	950	–
ВИР 220 *Rf*	VPBS-211, Югославия	516	115	454	740	1	–	143	161	–	850	600	–	–
ВИР 234 *Rf*	ЖС-17 × *Rf*, Россия	516	115	454	740	1	1	145	161	–	850	600	950	240
ВИР 249	Прогресс × к-2699, Россия	516	115	454	740	2	1	144	161	143	850	600	950	200
ВИР 263 *Rf*	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	516	115	–	740	1	2	144	162	–	950	–		240
ВИР 343	из линии ЖС 17М, Россия	516	–	–	–	2	1	–	210	–	850	600	950	200
ВИР 349 *Rf*	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	–	115	454	740	1	2	144	160	–	950	600	950	200
ВИР 361	нет данных	516	115	454	740	2	1	145	154	143	850	600	950	200
ВИР 365	Прогресс × к-2699, Россия	516	–	–	–	2	1	–	161 и 240	–	850	–	950	–
ВИР 369 *Rf*	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	–	115	454	740	1	2	144	160	–	950	600	950	200
ВИР 370 *Rf*	из линии ВИР 161-5, Россия	516	–	–	–	2	2	106	244	–	850	600	950	200
ВИР 376 *Rf*	из линии ВИР 104, Россия	516	115	454	740	1	2	124	161	143	–	–	950	240

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ВИР 377	из линии ВИР 104, Россия	–	–	–	–	1	2	–	161 и 240	–	850	600	950	200
ВИР 378 *Rf*	из линии ВИР 104, Россия	516	115	454	740	1	1	124	162	143	850	600	950	200
ВИР 381 *Rf*	из линии ВИР 161-5, Россия	516	115	–	–	2	2	–	212	–	850	600	950	200
ВИР 386 *Rf*	Питомник ЦМС-83, КОС ВИР	516	115	454	740	2	2	–	160	143	850	600	–	240
ВИР 387 *rf*	Питомник ЦМС-83, КОС ВИР	–	115	–	740	1	1	145	163	143	950	600	950	200
ВИР 388 *Rf*	SL3372, Болгария	516	115	–	–	2	2	–	161	–	850	600	–	240
ВИР 394	к-3398, США	–	115	–	–	2	1	–	нет данных	нет данных	–	600	950	240
ВИР 395 *Rf*	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	516	115	454	740	1	2	144	–	143	850	600	950	200
ВИР 397 *Rf*	Sl432 × ВИР 130	516	115	454	740	2	2	–	160	–	850	600	950	200
ВИР 412 *Rf*	Питомник ЦМС-80, КОС ВИР	516	–	–	–	2	–	–	160	–	–	–	950	240
ВИР 437 *Rf*	RHA340, США	516	115	454	740	1	1	144	159	143	850	–	950	240
ВИР 438 *Rf*	OR-30, США	516	115	454	740	2	1	143	161	–	850	600	950	240
ВИР 449 *rf*	Возможно гибрид, Румыния	–	–	–	–	2	–	–	160	–	850	600	950	200
ВИР 480 *Rf*	*Rf*-1231, Румыния	516	115	454	740	2	2	143	161	–	950	600	950	200
ВИР 490	к-1034, Италия	516	115	454	740	1	–	144	162	143	850	–	950	240
ВИР 558	459886, Австралия	516	115	–	–	1	1	–	158	–	950	600	950	–
ВИР 582 *Rf*	и-546513, США	516	115	454	740	1	–	144	160	143	850	600	950	240
ВИР 583 *Rf*	и-545789 RHA340, США	516	–	–	740	1	1	144	162	–	–	–	950	240
ВИР 584 *Rf*	CM611, Канада	516	115	454	740	1	1	144	160	–	950/850	–	950	240
ВИР 632 *Rf*	SW536 × R5E, Франция	516	115	454	740	1	–	145	159	143	850	600	950	240
ВИР 633 *Rf*	Sunbred 265, Франция	516	115	454	740	1	–	144	161	143	850	600	950	240
ВИР 634 *Rf*	Sunbred 265, Франция	516	115	–	740	1	–	–	161	143	950	600	950	200
ВИР 637	SW509×RW637, Франция	516	115	454	740	1	2	–	нет данных	нет данных	850	–	950	240
ВИР 650 *Rf*	и-535131 гибрид Video, Франция	516	115	454	740	1/2	–	143	159	143	850	–	–	240

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ВИР 652 *Rf*	RHA 265, США	516	115	–	740	1	1	140	–	143	850	600	950	240
ВИР 656 *Rf*	и-473692, Аргентина	516	115	454	740	1	1	142	160	143	950	–	950	240
ВИР 658 *Rf*	и-441354	516	115	454	740	1	1	144	159	143	850	–	950	240
ВИР 684 *Rf*	нет данных	516	115	454	740	1	1	144	160	143	850	600	–	240
ВИР 697 *Rf*	и-459880, Австралия	516	115	454	740	1	1	–	161	–	950	–	950	240
ВИР 699 *Rf*	467063, США	516	115	454	740	1	1	143	161	143	850	600	950	240
ВИР 700	гибрид SW × W635, Франция	516	115	454	740	1	2	144	159	143	850	600	950	240
ВИР 702	генколлекция-89 (RHA-274), США	516	115	454	740	1	1	–	159	143	850	600	950	–
ВИР 703 *Rf*	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	516	115	454	740	1	2	144	158	143	950	600	950	200
ВИР 704 *Rf*	Солдор, Франция	516	115	454	740	2	1	144	159	143	850	600	950	–
ВИР 705 *Rf*	генколлекция-89, Россия	516	–	–	740	2	1	–	161 и 240	–	850	600	950	200
ВИР 709 *Rf*	к-266 Россия, Саратовская обл.	516	115	–	740	1	1	145	161	143	850	–	950	240
ВИР 710	нет данных	516	115	454	740	2		146	159	–	950	600	950	200
ВИР 726 *Rf*	и-440628 BC3I5	516	–	454	–	1	1	–	159	–	950	–	950	–
ВИР 729	*H. annuus* L. × *H. petiolaris* Hort. ex DC	516	–	454	–	2	2	144	160	–	–	–	950	200
ВИР 735	нет данных	516	115	454	740	1	1	146	161	143	850	–	950	240
ВИР 740	ВИР 113 × *Rf*, *Pl*, Россия	–	115	454	740	2	1	146	161	–	950	600	950	200
ВИР 743 *Rf*	гибрид SW 540 × R5E, Франция	–	115	454	740	1	1	–	160	–	950	–	950	200
ВИР 751 *Rf*	к-1857, Россия, Краснодарский кр.	516	115	454	–	1	1	146	158	143	850	–	950	240
ВИР 752 *Rf*	к-1857, Россия, Краснодарский кр.	516	–	–	740	1	–	144	–	143	–	–	950	240
ВИР 758	I_{12} (HA 232 × *H. maximilliani* Schrad.)	516	115	454	740	1	1	141	160	143	850	600	950	200
ВИР 759	I_{12} (ВИР 129 × *H. floridanus* A.Gray ex Chapm.)	516	115	454	740	1	2	–	159	–	850	600	950	240
ВИР 761 *Rf*	и-576410, США	516	115	454	740	2	1	–	160	143	950	–	–	200
ВИР 762 *Rf*	и-576410, США	516	115	454	740	2	2	–	159	–	950	–	950	200

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ВИР 764 *Rf*	и-463834, Франция	516	115	454	740	1	1	144	159	143	850	600	950	240
ВИР 766 *Rf*	к-3411, Финляндия	516	115	–	740	1	1	–	161	143	–	–	950	240
ВИР 767 *Rf*	I_{12} (ВИР 151 × *H. trachelifolius*)	516	115	–	740	1	1	144	160	–	850	–	–	240
ВИР 768 *Rf*	I_{12} (НА232 × *H. maximilliani* Mill.)	516	115	454	740	1	2	141	159	143	850	–	950	200
ВИР 772 *Rf*	SAM462, Финляндия	516	115	454	740	1	1	–	159	143	–	600	950	200
ВИР 776 *Rf*	L3446, Болгария	516	115	454	740	1	2	–	161	143	950	600	–	200
ВИР 801 *Rf*	Sunbred 265, Франция	516	115	–	–	2	1	–	160	143	950	600	950	200

Примечание:

* Варианты маркера B20M13 после обработки рестриктазой *RsaI*: 1 вар. – 140 и 300 пн; 2 вар. – 100, 140, 220 пн

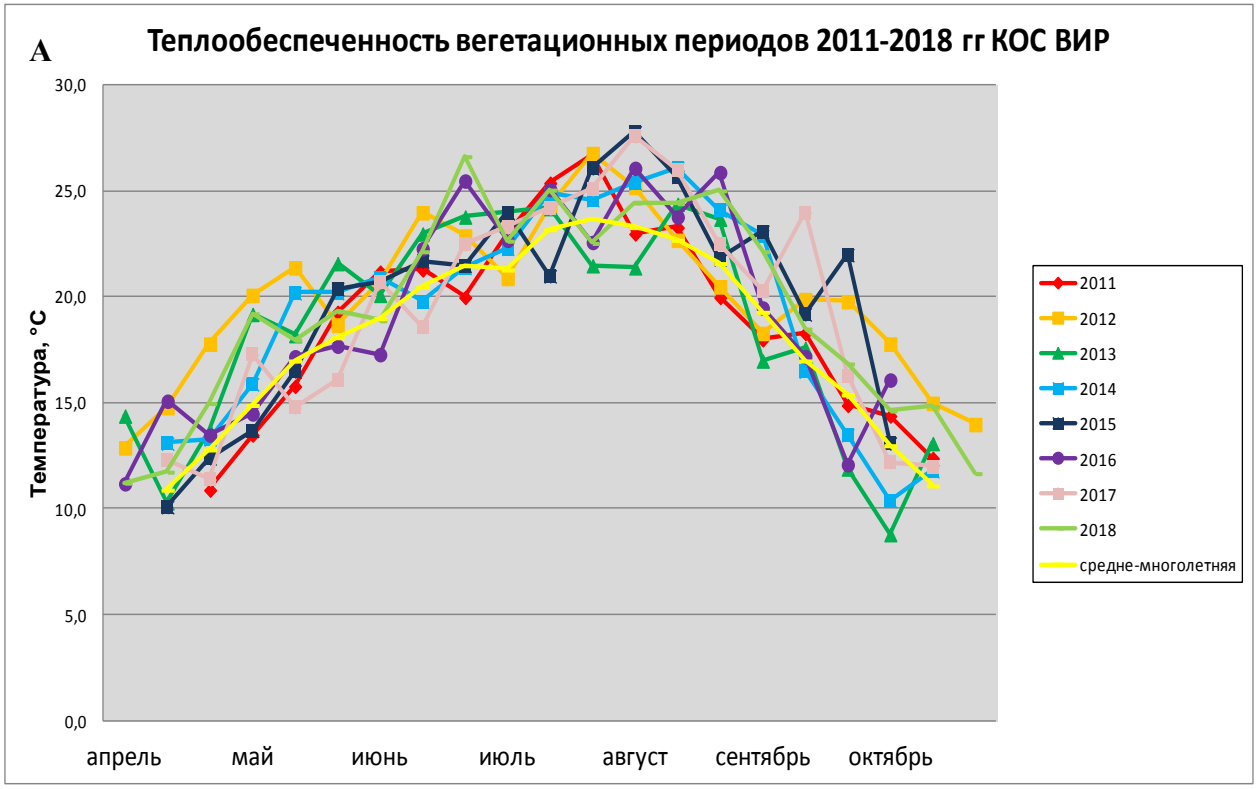
** Варианты маркера L12D20 после обработки рестриктазой *HaeIII*: 1 вар. – 110, 150, 210, 360 и 400 пн; 2 вар. – 110, 150, 360 и 610 пн.

Таблица 2. Теплообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг. КОС ВИР

Год	Среднедекадная температура воздуха, °С																				
	апрель			май			июнь			июль			август			сентябрь			октябрь		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2011			10,9	13,5	15,8	19,3	21,2	21,3	20,0	23,0	25,4	26,7	23,0	23,3	20,0	18,0	18,3	14,9	14,4	12,4	
2012	12,9	14,8	17,8	20,1	21,4	18,7	20,7	24,0	22,9	20,9	24,3	26,8	25,2	22,7	20,5	18,3	19,9	19,8	17,8	15,0	14,0
2013	14,4	10,3	13,7	19,2	18,2	21,6	20,1	23,0	23,8	24,0	24,2	21,5	21,4	24,4	23,7	17,0	17,6	11,9	8,8	13,1	
2014		13,1	13,3	15,9	20,2	20,2	20,9	19,8	21,4	22,3	24,9	24,6	25,4	26,1	24,1	22,9	16,5	13,5	10,4	11,8	
2015		10,1	12,4	13,7	16,5	20,4	20,7	21,7	21,5	24,0	21,0	26,1	27,8	25,7	21,8	23,1	19,2	22,0	13,1		
2016	11,2	15,1	13,5	14,5	17,2	17,7	17,3	22,3	25,5	22,7	25,1	22,6	26,1	23,8	25,9	19,5	17,2	12,1	16,1		
2017		12,3	11,4	17,3	14,8	16,1	20,7	18,6	22,5	23,3	24,2	25,1	27,6	26,0	22,5	20,3	24,0	16,3	12,2	12,0	
2018	11,2	11,8	15,0	19,2	18,0	19,3	18,9	22,2	26,7	22,7	25,1	22,6	24,5	24,4	25,0	22,2	18,5	16,9	14,6	14,8	11,7
средне-многолетняя		10,9	12,8	14,9	17,0	18,1	19,0	20,5	21,5	21,3	23,2	23,7	23,3	22,7	21,6	19,3	17,0	15,4	13,0	11,1	

Таблица 3. Теплообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг. ППЛ ВИР

Год	Среднедекадная температура воздуха, °С																				
	апрель			май			июнь			июль			август			сентябрь			октябрь		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2011					11,8	13,0	19,6	17,7	18,8	23,7	22,9	24,2	18,5	17,4	17,3	14,3	13,3	11,9			
2012			10,8	11,2	14,5	14,6	14,1	17,9	16,8	21,8	18,3	21,8	18,4	17,7	15,9	14,0	14,9	11,3	11,2		
2013				14,2	17,4	17,3	22,0	18,7	24,1	22,8	19,8	19,7	21,9	19,0	17,5	14,9	13,7				
2014			13,4	9,3	17,3	18,6	20,1	15,1	4,6	19,5	23,2	24,3	24,7	19,3	15,0	16,9	15,5	11,7			
2015				13,3	12,0	16,5	17,3	17,3	19,4	18,8	17,7	18,6	20,6	19,1	20,1	14,8	15,6	12,9			
2016				18,0	15,7	18,0	16,0	17,7	20,4	17,8	19,2	21,7	19,7	17,0	18,0	16,3	13,8	11,1			
2017					11,5	12,7	12,9	17,4	16,1	16,8	17,7	18,6	19,1	20,2	15,6	13,0	12,6	11,3			
2018				10,2	15,7	14,2	12,5	16,9	15,9	14,6	21,9	20,9	21,3	16,0	13,1	18,0	13,1	10,8			
средне-многолетняя			5,2	7,4	9,2	11,1	12,8	14,1	15,4	16,4	17,0	17,0	16,3	15,2	13,7	11,9	10,0	8,2	6,0		



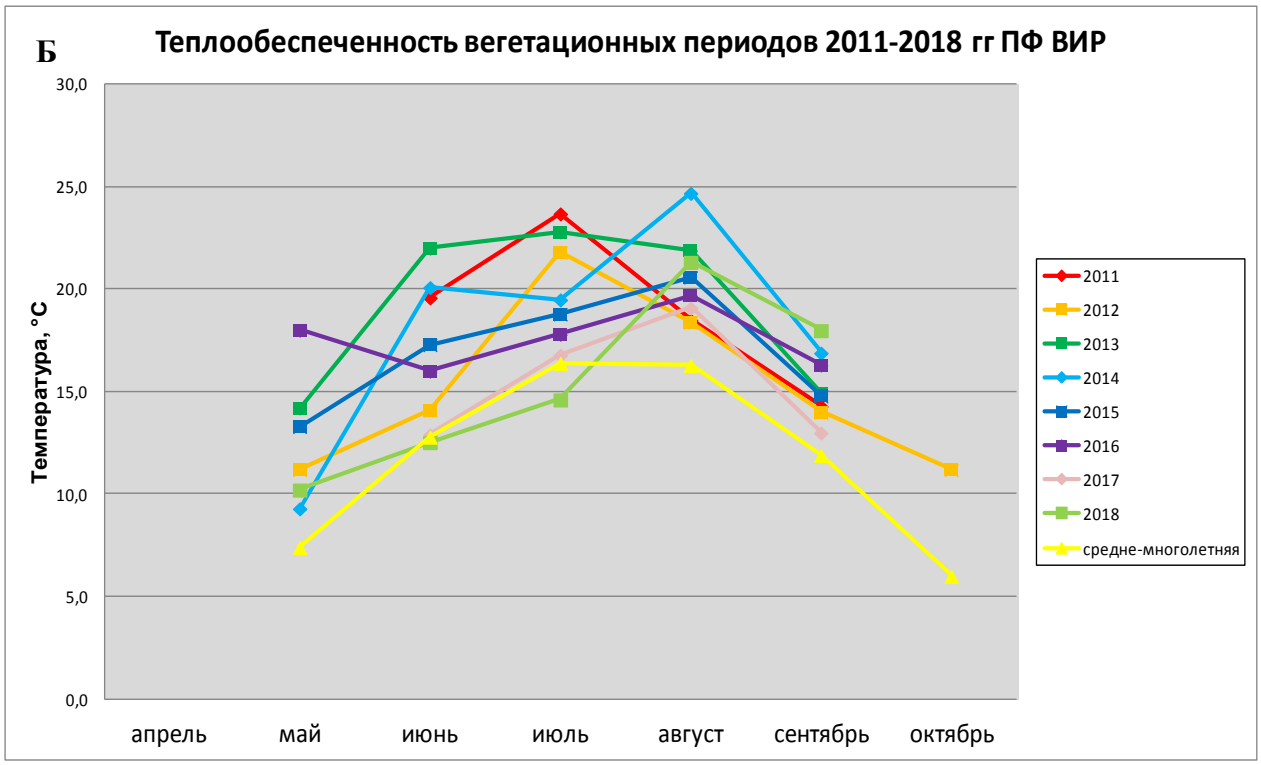


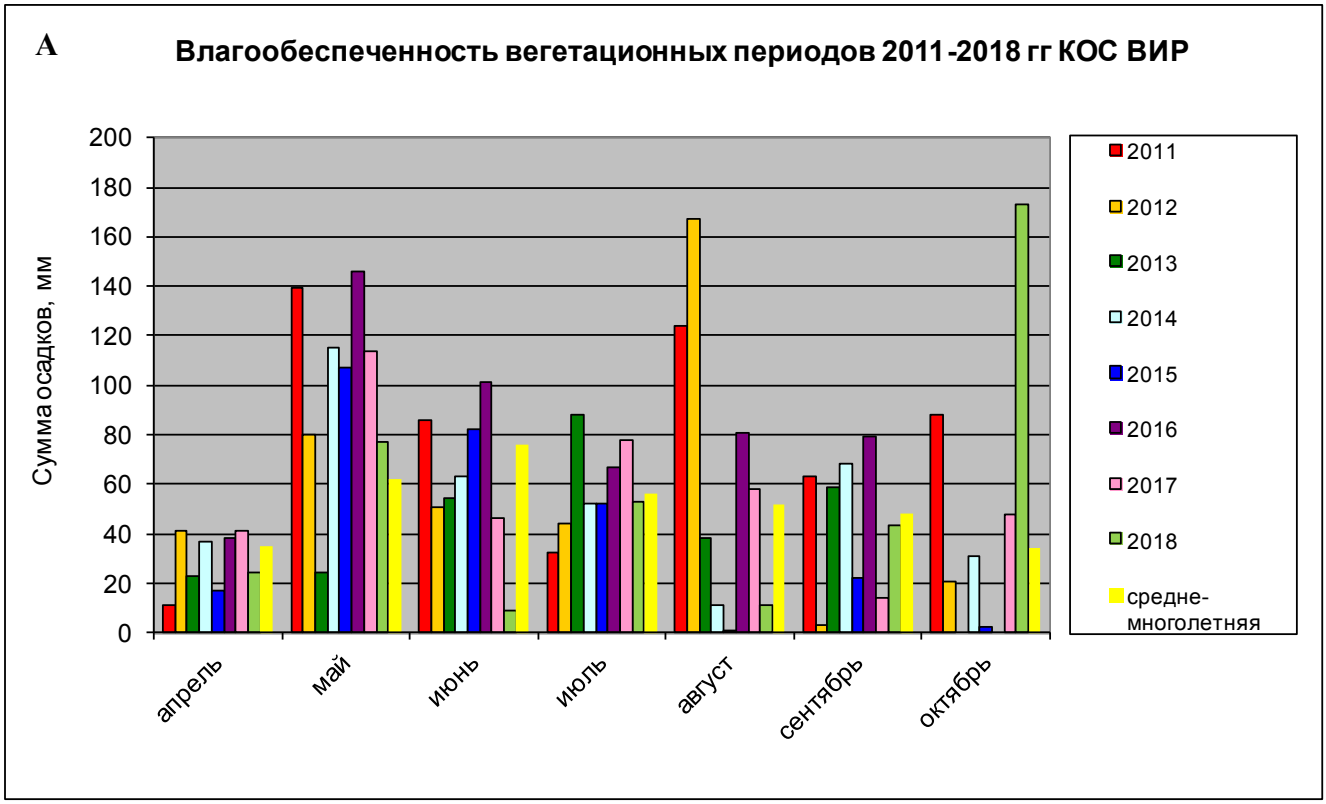
Рисунок 1. Теплообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг: А) КОС ВИР, Б) ППЛ ВИР

Таблица 4. Влагообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг. КОС ВИР

Год	Сумма осадков за декаду, мм																				
	апрель			май			июнь			июль			август			сентябрь			октябрь		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2011			11	76	50	13	6	15	65	2	0	30	106	9	9	41	1	21	12	76	
2012	20	18	3	1	24	55	21	13	17	44	0	0	54	83	30	0	0	3	16	5	0
2013	2	10	11	0	23	1	33	6	15	62	14	12	30	0	8	31	28				
2014		22	15	32	64	19	15	38	10	35	17	0	4	7	0	31	16	21	0	31	
2015		12	5	31	2	74	3	28	51	10	11	31	0	1	0	12	10	0	2		
2016	0	22	16	17	40	89	66	4	31	15	23	29	5	57	19	0	13	66	0		
2017		10	31	49	18	47	27	12	7	4	33	41	0	0	58	14	0	0	8	40	
2018	6	12	6	39	15	23	0	0	9	18	8	27	9	1	1	18	21	4	22		151
средне-много-летняя		17	18	18	20	24	22	29	25	23	16	17	21	16	15	20	14	14	16	18	

Таблица 5. Влагообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг. ППЛ ВИР

Год	Сумма осадков за декаду, мм																				
	апрель			май			июнь			июль			август			сентябрь			октябрь		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2011					11	28	0	27	15	2	51	45	8	41	22	33	25	29			
2012			22	5	8	31	6	32	30	4	22	13	51	27	85	38	8	40	19		
2013				3	58	20	12	25	19	18	40	33	23	40	31	5	0				
2014			1	4	19	45	27	33	27	7	11	3	1	24	44	9	0	20			
2015				13	12	31	1	3	21	52	37	28	9	14	13	8	2	23			
2016				0	5	13	15	28	21	80	42	52	31	107	37	7	1	27			
2017					3	4	29	46	45	10	92	76	60	33	145	12	61	1			
2018				19	8	0	0	9	0	43	0	34	4	22	17	27	26	6			
средне-многолетняя			13	17	17	17	24	25	25	25	24	24	30	30	30	23	23	23	19		



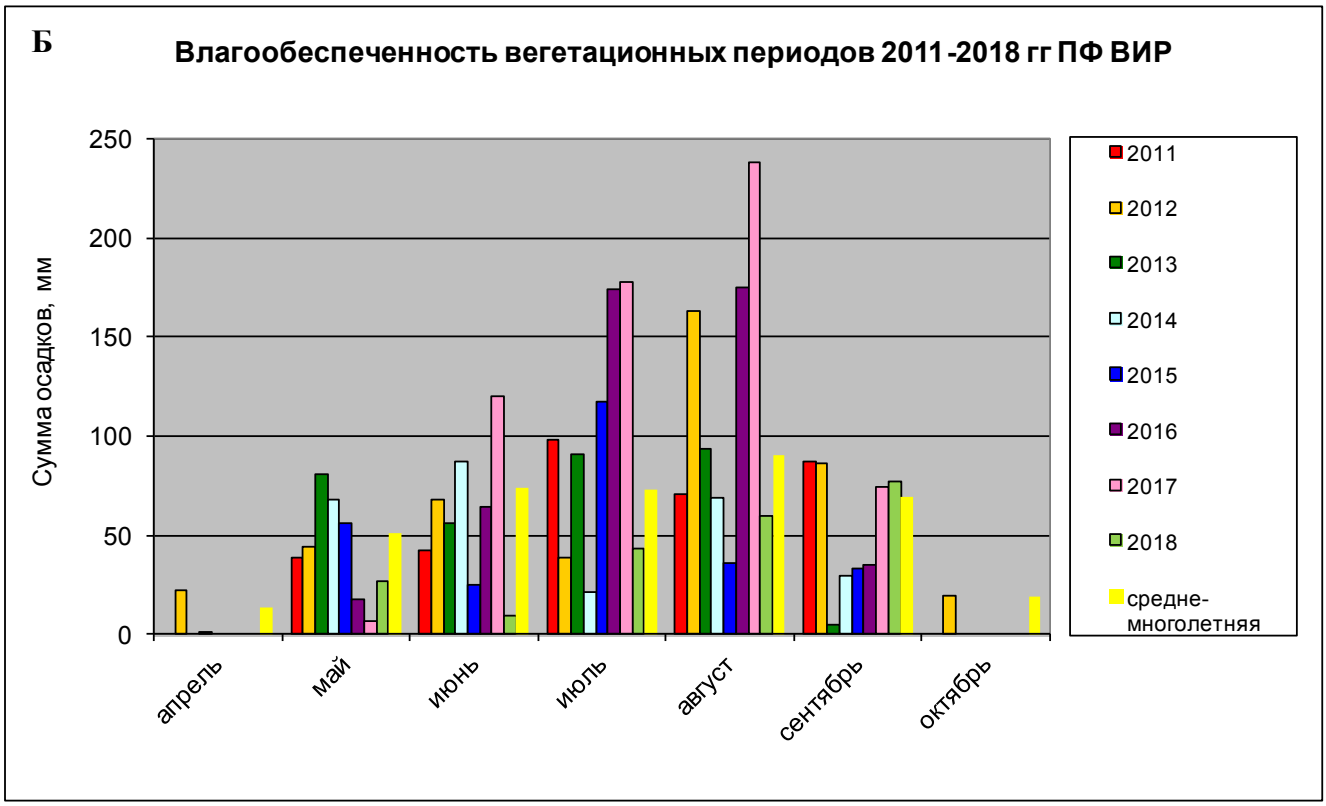


Рисунок 2. Влагообеспеченность вегетационных периодов 2011-2018 гг.: А) КОС ВИР, Б) ППЛ ВИР

Таблица 6. Гидротермический коэффициент за 2011-2018 гг.

Показатель	Год	Месяц с t>10°С													
		апрель		май		июнь		июль		август		сентябрь		октябрь	
		КОС	ППЛ	КОС	ППЛ	КОС	ППЛ	КОС	ППЛ	КОС	ППЛ	КОС	ППЛ	КОС	ППЛ
ГТК	2011	1,0		2,8	1,5	1,4	0,8	0,4	1,3	1,8	1,3	1,2	2,2	3,1	
	2012	0,9	2,0	1,3	1,0	0,7	1,4	0,6	0,6	2,3	3,0	0,1	2,1	0,4	1,5
	2013	0,6		0,4	1,6	0,8	0,9	1,2	1,4	0,5	1,6	3,1	0,2	2,4	
	2014	1,4	0,1	2,0	1,5	1,0	1,7	0,7	0,3	0,1	1,1	1,3	0,7	1,3	
	2015	0,8		2,0	1,3	1,3	0,5	0,7	2,0	0,0	0,6	0,3	0,7	0,1	
	2016	0,9		2,9	0,3	1,5	1,2	0,9	2,9	1,0	3,1	1,6	0,8	0,0	
	2017	1,8		2,3	0,3	0,7	2,6	1,0	3,2	0,7	4,2	0,2	2,0	1,9	
	2018	0,6		1,3	0,6	0,1	0,2	0,7	1,3	0,1	0,8	0,7	1,4	4,1	
ГТК по средне-многолетним данным		1,5	2,5	1,2	1,8	1,2	1,7	0,8	1,4	0,7	1,9	0,9	2,3	1,3	

Примечание: ГТК в пределах 1-2 – условия естественного увлажнения удовлетворительные;

2,0 < избыточно влажная;

1,6 – 1,3 – влажная;

1,3 – 1,0 – слабо засушливая;

1,0 – 0,7 – засушливая;

0,7 – 0,4 – очень засушливая;

< 0,4 – сухая.