

УДК: 575.11

Валідація SCAR-маркера, зчепленого з геном відновлення фертильності пилку соняшнику
В.М.Попов*Інститут рослинництва імені В.Я.Юр'єва (Харків, Україна)*

Проаналізовано селекційні лінії, лінії мутантного походження та зразки міжвидових гібридів соняшнику на наявність локусу HRG01, який зчеплений з геном *Rf₁*. За наявності гена *Rf₁* в рослинному матеріалі завжди ідентифікувався локус HRG01. В результаті ампліфікації відбувався синтез амплікона розміром 426 п.н. За відсутності гена *Rf₁* в зразках соняшнику специфічний амплікон не синтезувався. Через те у материнських ліній соняшнику продукт ампліфікації не синтезувався, а у батьківських ліній (відновники фертильності пилку) відбувався його синтез. У міжвидових гібридів частка зразків з локусом HRG01 становила 0,62.

Ключові слова: соняшник, SCAR-маркер, ген відновлення фертильності пилку.

Валидация SCAR-маркера, сцепленного с геном восстановления фертильности пыльцы подсолнечника
В.Н.Попов

Проанализированы селекционные линии, линии мутантного происхождения и образцы межвидовых гибридов подсолнечника на наличие локуса HRG01, который сцеплен с геном *Rf₁*. При наличии гена *Rf₁* в растительном материале всегда идентифицировался локус HRG01. В результате амплификации происходил синтез ампликона размером 426 п.н. При отсутствии гена *Rf₁* в образцах подсолнечника специфический ампликон не синтезировался. Поэтому у материнских линий подсолнечника продукт амплификации не синтезировался, а у отцовских линий (восстановители фертильности пыльцы) происходил его синтез. У межвидовых гибридов доля образцов с локусом HRG01 составила 0,62.

Ключевые слова: подсолнечник, SCAR-маркер, ген восстановления фертильности пыльцы.

Validation of SCAR marker linked with the gene of pollen fertility restorer in sunflower
V.M.Popov

The breeding lines, lines of mutant origins and samples of interspecific hybrids of sunflower have been analyzed for the presence of locus HRG01, which is linked with the gene *Rf₁*. The locus HRG01 has always identified when this gene is present in the plant material. In the result of amplification the amplicon with the size of 426 bp has been synthesized. In the absence of the *Rf₁* gene the specific amplicon has not been synthesized in the samples of sunflower. Therefore, amplification product was not synthesized in female sunflower lines, while its synthesis was in male lines (pollen fertility restorer). In interspecific hybrids percentage of samples with HRG01 locus was 0.62.

Key words: sunflower, SCAR marker, gene of pollen fertility restorer.

Вступ

Згідно класифікації P.Gupta (Gupta et al., 1999) усі ДНК-маркери можна розділити на три групи: 1) ДНК-маркери, що основані на поліморфізмі довжини рестрикційних фрагментів; 2) ДНК-маркери, що ідентифікуються різними методами ПЛР-аналізу; 3) ДНК-маркери, що детектують шляхом секвенування та використання ДНК-чипів. В генетико-селекційних дослідженнях соняшнику широко використовуються усі три групи ДНК-маркерів. Значна кількість інформації щодо мінливості маркерів накопичена за RAPD, AFLP, SSR та SNP, і нині побудовані детальні генетичні карти соняшнику з розташуванням генів стійкості до фітопатогенів, морфологічних та біохімічних ознак відносно певного типу молекулярних маркерів (Jan et al., 1998; Tang et al., 2002; Lai et al., 2005; Heesacker et al., 2008). Це стало можливим не тільки з розробкою методів ПЛР, але й завдяки детальним дослідженням генетики стійкості, морфологічних та біохімічних ознак соняшнику, а також вивченню ефектів більшості генів (Шарыпина и др., 2008). Тому інформацію щодо зчеплення маркера та гена можна

використовувати у маркерній селекції (MAS – marker-assisted selection), яка широко застосовується в багатьох країнах світу для інтенсифікації селекційного процесу (Попов, Кириченко, 2010).

Відновлення фертильності пилку у соняшнику контролюється ключовим геном *Rf₁* з можливою взаємодією як мінімум двох-трьох генів *Rf*. Особливості генетичного контролю відновлення фертильності пилку зведені у монографіях та оглядових статтях (Гаврилова, Анисимова, 2003; Ведмедева, Толмачев, 2008; Попов, Кириченко, 2010). У селекції ліній – відновників фертильності пилку обов'язковим етапом є з'ясування здатності цих ліній повністю відновлювати фертильність пилку при схрещуванні їх зі стерильними лініями (Попов, Кириченко, 2010). Такий селекційний процес є трудомістким та потребує багато часу. Тому при створенні інбредних ліній соняшнику необхідно залучати різні ДНК-маркери для скринінгу наявності генів *Rf* у різноманітному вихідному матеріалі, що оптимізує селекційний процес.

На теперішній час накопичена детальна інформація щодо картування гена відновлення фертильності пилку *Rf₁* (Jan et al., 1998; Horn et al., 2003; Kusterer et al., 2005; Schnabel et al., 2008). Так, на основі поліморфних RAPD фрагментів розроблено два SCAR маркери – HRG01 та HRG02 (Horn et al., 2003). У роботі Yue та ін. (2010) один з тісно зчеплених TRAP маркерів був конвертований у STS маркер. Відстань між STS та *Rf₁* складала 0,4 сМ. Побудова генетичної карти на основі SSR-маркерів дозволила встановити, що ген *Rf₁* розташований у 13 групі зчеплення (Tang et al., 2002). Також з'ясовані молекулярні механізми взаємодії мітохондріальних генів з ядерними (Moneger et al., 1994; Horn, Fried, 1999).

Для результативного використання молекулярних маркерів в селекційному процесі необхідно проводити їх валідацію на вихідному матеріалі різного походження. Тому метою роботи було встановлення наявності SCAR-маркера – HRG01, зчепленого з геном *Rf₁*, на різноманітному селекційному вихідному матеріалі соняшнику.

Методика

Для молекулярно-генетичних досліджень як вихідний матеріал було залучено 37 інбредних ліній соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва, серед яких 11 ліній – стерильні аналоги (Сх908А, Сх1010А, Сх1008А, Сх2111А, Сх2552А, Сх503А, Сх2122А, Сх1012А, Сх4021А, Сх1006А, Сх1002А), 19 – відновники фертильності пилку (ХСу10-063, ХО41ОВ, ХСу1001В, Х843В, Х0821В, Х3210В, Х0901В, Х16-10В, Х720В, Х113В, Х135В, Х0903В, Х526В, Х785В, Х134В, Х114В, Х12-10В, Х729-07В, Х204-10В) та 6 ліній мутантного походження (Мх1829В, Мх4В, Мх2122, Мх108, Мх1091, Мх42В). Також аналізували 29 міжвидових гібридів соняшнику, створених із залученням однорічних дикорослих видів соняшнику.

Ідентифікацію SCAR-маркера проводили за допомогою ПЛП з парою праймерів, які фланкують певні ділянки геномної ДНК соняшнику. Нуклеотидна послідовність праймерів до локусу HRG01 була такою: F: 5'-TATGCATAATTAGTTATACCC-3' та R: 5'-ACATAAGGATTATGTACGGG-3' (Horn et al., 2003).

Для проведення ПЛП використовували набори реагентів GenePak PCR Core виробництва фірми «Ізоген» (Росія). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл та містив 20 нг геномної ДНК з додаванням по 0,2 мкМ кожного праймера. У пробірці з реакційною сумішшю додавали по 20 мкл мінеральної олії. ПЛП проводили у термоциклері «Терцик» (Росія) при температурі гібридизації праймерів 60°C для виявлення маркера HRG01.

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 2% агарозному гелі з високою роздільною здатністю і додаванням бромистого етидію в буфері з низькою іонною силою та послідуочим фотографуванням в УФ світлі фотосистемою NikonD50. Як маркер довжини фрагментів ДНК використовували "Mcombi".

Результати та обговорення

Для отримання гетерозисних гібридів соняшнику використовують цитоплазматичну чоловічу стерильність (ЦЧС), на основі якої створюють лінії трьох типів – стерильний аналог, закріплювач стерильності та відновник фертильності пилку, генотипи яких з урахуванням цитоплазми можна записати як цит^S*rfrf*, цит^N*rfrf*, цит^N*RfRf* відповідно. Селекційний процес по створенню інбредних ліній соняшнику ґрунтується на взаємодії класичної цитоплазми PET1 з геном *Rf*. Селекцію материнських ліній (стерильні аналоги та їх закріплювачі) ведуть окремо від відновників фертильності пилку. При створенні материнських ліній здійснюють контроль на здатність повною мірою підтримувати та

закріплювати стерильність, а при створенні батьківських ліній контролюють 100% відновлювання фертильності пилку.

На першому етапі для тестування маркера HRG01 були залучені селекційні інбредні лінії соняшнику з робочої колекції лабораторії селекції та генетики соняшнику Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва – стерильні аналоги та відновники фертильності пилку. Ці лінії є селекційним матеріалом, які залучають для створення простих або трилінійних гібридів соняшнику (Кириченко та ін., 2014). Згідно даних джерел літератури, про наявність локусу HRG01 у генотипах соняшнику свідчить продукт ПЛР розміром 426 п.н. Це вказує на те, що у вихідному матеріалі є ген *Rf₁*. Залучення інбредних ліній харківської селекції дозволило нам провести валідацію маркерів HRG01. Так, за допомогою цього маркера у всіх стерильних ліній спостерігали відсутність амплікону, тоді як у відновників фертильності пилку ідентифікувався продукт ПЛР довжиною 426 п.н. (рис.). Отримані результати підтверджують діагностичну здатність цього маркера ідентифікувати в генотипах рослин ген *Rf₁*.

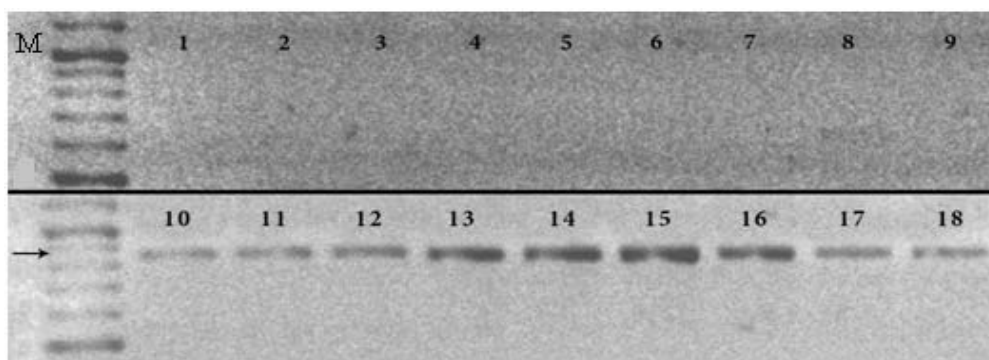


Рис. Електрофореграма розділення SCAR-маркера (HRG01). 1–9 – материнські лінії соняшнику; 10–18 – батьківські лінії соняшнику. Стрілкою показано продукт ПЛР розміром 426 п.н.; M – маркер “Mcombi”

За допомогою пари праймерів до HRG01 тестували шість ліній мутантного походження. У трьох лініях соняшнику – Mx1829B, Mx4B та Mx42B виявили продукт ампліфікації розміром 426 п.н., а у лінії Mx2122, Mx108, Mx1091 він був відсутній.

До молекулярного аналізу нами було залучено зразки міжвидових гібридів різного походження. Вони були створені за участю однорічних дикорослих видів соняшнику *H. annuus*, *H. argophyllus* та *H. debilis*. Залучений матеріал не аналізувався на наявність генів *Rf* класичними селекційними методами. В результаті молекулярного аналізу було з'ясовано, що 18 зразків мали специфічний продукт ПЛР. Розмір цього продукту становив 426 п.н., що співпадає з селекційними лініями батьківського типу, у яких наявність гена *Rf₁* була чітко визначена методом гібридизації із стерильними аналогами. Частка таких ліній становила 0,62. У 11 зразках міжвидових гібридів не спостерігали продукт ПЛР розміром 426 п.н. (частка 0,38). Отримані результати для проведення подальшої селекції дозволяють розбити експериментальний матеріал на дві групи – зразки материнського (перша група – відсутність амплікона розміром 426 п.н.) та батьківського типу (друга група – наявність амплікона розміром 426 п.н.). До першої групи увійшли зразки з селекційними номерами – 2/1, 22/2, 24/3, 36/1, 38/1, 40/3, 28/3, 30/1, 32/1, 48/2, 42/2, а до другої – 4/1, 8/2, 26/1, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 82, 94, 96, 97, 99. Так, наприклад, зразки першої групи були створені за участю видів *H. annuus*, *H. debilis* та *H. argophyllus*. Друга група зразків була створена тільки за участю дикорослого виду *H. annuus*. Можна констатувати, що зразки міжвидових гібридів, створені на основі виду *H. annuus*, слід залучати для створення ліній материнського та батьківського типів.

Таким чином, SCAR-маркер (локус HRG01) чітко ідентифікується у селекційних лініях, в яких вже відомо про наявність або відсутність гена *Rf₁*. Використання зразків соняшнику, що створені із залученням однорічних дикорослих видів, дозволило встановити наявність в їх генотипах продуктів ПЛР розміром 426 п.н., що свідчить також про присутність гена *Rf₁*. Отримані результати дають можливість цілеспрямовано проводити селекцію материнських та батьківських ліній на основі міжвидових гібридів.

Список літератури

- Ведмедева Е.В., Толмачев В.В. Генетика морфологических признаков: состояние и перспективы // Генетические ресурсы растений. – 2006. – №3. – С. 7–22. /Vedmedeva Ye.V., Tolmachev V.V. Genetika morfologicheskikh priznakov: sostoyaniye i perspektivy // Geneticheskiye resursy rasteniy. – 2006. – №3. – S. 7–22./
- Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. – СПб., 2003. – 204с. /Gavrilova V.A., Anisimova I.N. Genetika kul'turnyyh rasteniy. Podsolnechnik. – SPb., 2003. – 204s./
- Кириченко В.В., Сивенко В.І., Макляк К.М. та ін. Вирощування насіння гібридів соняшнику (методичні рекомендації). – Харків, 2014. – 28с. /Kirichenko V.V., Sivenko V.I., Maklyak K.M. ta in. Vyroshchuvannya nasinnya gibrydiv sonyashnyku (metodychni rekomendatsiyi). – Kharkiv, 2014. – 28s./
- Попов В.Н., Кириченко В.В. Мужская стерильность подсолнечника. – Харьков: ИП, 2010. – 156с. /Popov V.N., Kirichenko V.V. Muzhskaya steril'nost' podsolnechnika. – Khar'kov: IR, 2010. – 156s./
- Шарыпина Я.Ю., Попов В.Н., Долгова Т.А., Кириченко В.В. Изучение наследования морфологических признаков подсолнечника. I. Генетический контроль окраски ложноязычковых цветков, ветвистости и фертильности пыльцы // Цитология и генетика. – 2008. – Т.42, №5. – С. 47–53. /Sharypina Ya.Yu., Popov V.N., Dolgova T.A., Kirichenko V.V. Izucheniye nasledovaniya morfologicheskikh priznakov podsolnechnika. I. Geneticheskiy kontrol' okraski lozhnoyazychkovykh tsvetkov, vetvistosti i fertil'nosti pyl'tsy // Tsitologiya i genetika. – 2008. – T.42, №5. – S. 47–53./
- Gupta P., Varshney R., Sharma P., Ramesh B. Molecular markers and their application in wheat breeding // Plant Breeding. – 1999. – Vol.118. – P. 369–390.
- Heesacker A., Kishore V., Gao W. et al. SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphism and cross-taxa utility // Theor. Appl. Genet. – 2008. – Vol.117. – P. 1021–1029.
- Horn R., Friedt W. CMS sources in sunflower: different origin but same mechanism? // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol.98. – P. 195–201.
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E. et al. Molecular mapping of the Rf1 gene restoring pollen fertility in PET1-based F₁ hybrids in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol.106. – P. 599–606.
- Jan C-C., Vick B., Miller J. et al. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol.96. – P. 15–22.
- Lai Z., Livingstone K., Zou Y. et al. Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol.111. – P. 1532–1544.
- Kusterer B., Horn R., Friedt W. Molecular mapping of the fertility restoration locus Rf1 in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene // Euphytica. – 2005. – Vol.143. – P. 35–42.
- Moneger F., Smart C.J., Leaver C.J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene // EMBO Journal. – 1994. – Vol.13. – P. 8–17.
- Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding // Plant Breed. – 2008. – Vol.127. – P. 582–591.
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B. et al. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol.105. – P. 1124–1136.
- Yue B., Vick B., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the Rf₁ (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // Plant Breeding. – 2010. – Vol.129. – P. 24–28.

Представлено: Р.В.Рожков / Presented by: R.V.Rozhkov

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 07.02.2015