

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНА *Rf1* – ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ ЦМС РЕТ1 ПОДСОЛНЕЧНИКА

Маркин Н.В.¹, Усатенко Т.В.², Усатов А.В.¹, Тихобаева В.Е.¹, Горбаченко О.Ф.², Кулишова Г.А.¹, Азарин К.В.¹

¹Южный федеральный университет, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, e-mail: nmarkin@mail.ru

²Донская опытная станция им. Л.А. Жданова ВНИИМК, Россия, Ростовская область, п. Опорный

В работе на селекционном материале (17 материнских ЦМС-линий и 29 отцовских *Rf*-линий) Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИМК изучены 9 ДНК-маркеров – ORS 511, ORS 224, ORS 317, ORS 630, ORS 799, ORS 1030, HRG01, HRG02 и STS-115, которые, по данным литературы, составляют общую с геном *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 группу сцепления. Из исследованных 9 маркеров отобраны три – HRG01, HRG02 и STS-115 для идентификации гена *Rf1*, высокая информативность которых была подтверждена полевыми испытаниями. На основе полученных результатов разработана мультиплексная ПЦР тест-система, эффективная для идентификации маркера ядерного гена *Rf1* и митохондриального локуса *orfH522* (ЦМС РЕТ1), которая может быть использована в практике маркерной селекции подсолнечника.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, гены *Rf*, ЦМС, тест-система, подсолнечник (*Helianthus annuus* L.).

INFORMATIVE DNA MARKERS OF GENE *Rf1* - POLLEN FERTILITY RESTORER CMS PET1 IN SUNFLOWER

Markin N.V.¹, Usatenko T.V.², Usatov A.V.¹, Tikhobaeva V.E.¹, Gorbachenko O.F.², Kulishova G.A.¹, Azarin K.V.¹

Southern Federal University, Russia, 344090, Rostov-on-Don, av. Stachki 194/1, e-mail: nmarkin@mail.ru
Don Experimental Station L.A. Zhdanov VNIIMK, Russia

On the breeding material – 17 CMS lines and 29 *Rf*-lines Don Experiment Station LA Zhdanov VNIIMK was study 9 DNA markers - ORS 511, ORS 224, ORS 317, ORS 630, ORS 799, ORS, 1030, HRG01, HRG02 and STS-115, which with the gene *Rf1* – pollen fertility restorer CMS PET1 form a common linkage group. Three markers – HRG01, HRG02 and STS-115 were highly informative for identifying gene *Rf1*. Based on these results, it was to develop a multiplex PCR test-system for the detection of nuclear marker of gene *Rf1* and mitochondrial locus *orfH522* (CMS PET1). This test-system can be used in sunflower breeding.

Keywords: DNA markers, *Rf* genes, CMS, test-system, sunflower (*Helianthus annuus* L.).

Введение

Подсолнечник - одна из основных масличных сельскохозяйственных культур, востребованных в народном хозяйстве. Одним из главных направлений селекции подсолнечника является получение гетерозисных гибридов. В коммерческом производстве доминируют гетерозисные гибриды, полученные на основе цитоплазматической мужской стерильности ЦМС РЕТ1. В восстановлении фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 участвуют два доминантных ядерных гена. Один из них присутствует в генотипах большинства линий-закрепителей стерильности, а другой – *Rf1* – должен быть введен в генотип гибридного потомства [5]. Поиск новых генотипов, несущих ген *Rf1*, актуально для получения родительских форм. В связи с этим остро стоит проблема быстрого и точного определения носителей генов *Rf1* в генофонде этой культуры. В настоящее время процесс идентификации *Rf1* – генотипов проводят классическим гибридологическим анализом, который длителен и

трудоемок. Он включает проведение в поле скрещиваний и оценку фертильности пыльцы растений F_1 на стадии цветения.

В связи с тем что данные о точной локализации гена *Rf1* на генетической карте подсолнечника и его нуклеотидной последовательности в литературе не приведены, то одним из возможных способов его идентификации является использование ДНК-маркеров, ассоциированных с признаком восстановления фертильности пыльцы. Ранее для определения гена *Rf1* подсолнечника у линий восстановителей фертильности пыльцы растений с различными типами ЦМС нами была исследована диагностическая ценность маркера HRG01 [2]. Также была изучена особенность амплификации и последовательность нуклеотидов этого маркера - HRG01 [3]. В настоящей работе мы расширили выборку тестируемых селекционных линий и увеличили количество ДНК-маркеров гена *Rf1* с целью выбора наиболее информативных для их дальнейшего использования в гибридной селекции подсолнечника.

Материалы и методы исследований

Объектами исследования служили 17 ЦМС-линий и 29 Rf-линий подсолнечника селекции Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИМК.

Поиск информативных ДНК-маркеров гена-восстановителя фертильности пыльцы (*Rf1*) проводили по 9 ДНК-мишеням, которые, исходя из данных литературы, на генетической карте подсолнечника находятся вблизи *Rf1*-гена (табл. 1).

Таблица 1

Маркеры, использованные для идентификации гена *Rf1*

Название маркера	Последовательность нуклеотидов праймеров	Источник	Размер фрагментов, п.н.
ORS 511	f- TGGCTCAGATTAAGTTCACACAG r- CGGGTTGCGAGTAACAGGTA	[7]	155, 180
ORS 224	f- AACCAAAGCGCTGAAGAAATC r- TGGACTAACTACCAGAAGCTAC		134, 110
ORS 317	f- TTTGGCAGTTTGGTGGCTTA r- GGTCGTATGCTTAAATCTTTCTCT		160
ORS 630	f- GCACGACCCGGATATGTAAC r- TGTGCTGAGGATGATATGCAG		346
ORS 799	f- ACTCCCTCCCATCTCTCGTCT r- TCCAGCAAGTCAGCAACAAC		142
ORS 1030	f- CCTTTGATGTAGTTAAGGAAGTTGTG r- CGATCAATTTATATGACCGAATTACC		430
HRG01	f- TATGCATAATTAGTTATACCC r- ACATAAGGATTATGTACGGG	[4]	454

HRG02	f- AAACGTGGGAGAGAGGTGG r- AAACGTGGGCTGAAGAАСТА		740
STS-115	f- CGAАСТААТСАТСАТАСААССА r- TCGGCTCTTATGTATGTTСАС	[8]	115, 370

Выделение геномной ДНК и ПЦР-анализ проводили согласно описанным методикам [1; 3]. Реакцию амплификации проводили в термоциклере Palm Cyclер (Corbett Research, Австралия) по четырем программам: 1) один цикл: 10 мин. 94 °С; 35 циклов: 45 сек. 94 °С, 45 сек. 65 °С, 1 мин. 72 °С, один цикл: 6 мин. 72 °С (для HRG02), 2) один цикл: 5 мин. 95 °С; 35 циклов: 15 сек. 95 °С, 30 сек. 58 °С, 25 сек. 72 °С один цикл: 1 мин. 72 °С (для HRG01), 3). один цикл: 2 мин. 96 °С; 30 циклов: 30 сек. 94 °С, 40 сек. 55 °С, 1 мин. 72 °С, один цикл: 2 мин. 72 °С (для STS-115), 4) один цикл: 2 мин. 96 °С; 30 циклов: 30 сек. 94 °С, 40 сек. 58 °С, 1 мин. 72 °С, один цикл: 2 мин. 72 °С (для остальных маркеров).

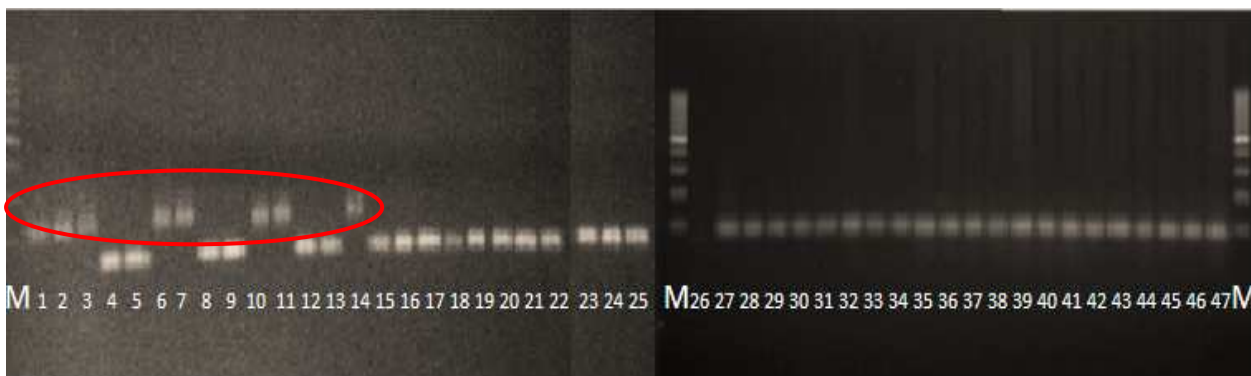
Для разработки дизайна праймеров использовали программу PrimerQuestSM от Integrated DNA Technologies, Inc.

Результаты исследования и их обсуждение

В полевых условиях все отобранные 17 ЦМС-линий и 29 Rf-линий были исследованы на наличие/отсутствие гена *Rfl*. Было подтверждено, что все ЦМС-линии характеризуются мужски стерильной цитоплазмой и рецессивным гомозиготным (*rflrfl*) состоянием гена-восстановителя фертильности пыльцы, а все Rf-линии по результатам тест-кроссов – стерильным цитоплазмой и доминантным гомозиготным (*RfRf1*) состоянием гена-восстановителя фертильности пыльцы.

Результаты ПЦР анализа продемонстрировали, что SSR-маркеры – ORS 317, ORS 630, ORS 799, ORS 1030 одинаково представлены как у линий-восстановителей фертильности пыльцы (*RfRf1*), так и у ЦМС-линий (*rflrfl*). Следовательно, данные SSR-маркеры не ассоциированы с признаком мужской фертильности, т.е. не информативны для идентификации гена *Rfl* в генотипе подсолнечника.

В электрофоретических спектрах продуктов амплификации маркера – ORS 511 у ЦМС-линий ВД 1448, ЭД 169, ВД 344, ВД 151, ЭД 236, ВД 354, ВД 255, ВД 149 был визуализирован фрагмент размером около 180 п.н., который не встречается у других изученных линий. У ЦМС-линий: ВД 22, ЭД 869, ЭД 77, ЭД 95, ВД 350, ВД 356, ЭД 73; ЭД 931, J-¹⁰/544 и всех изученных линий-восстановителей детектирован фрагмент размером около 155 п.н. (рис. 1).

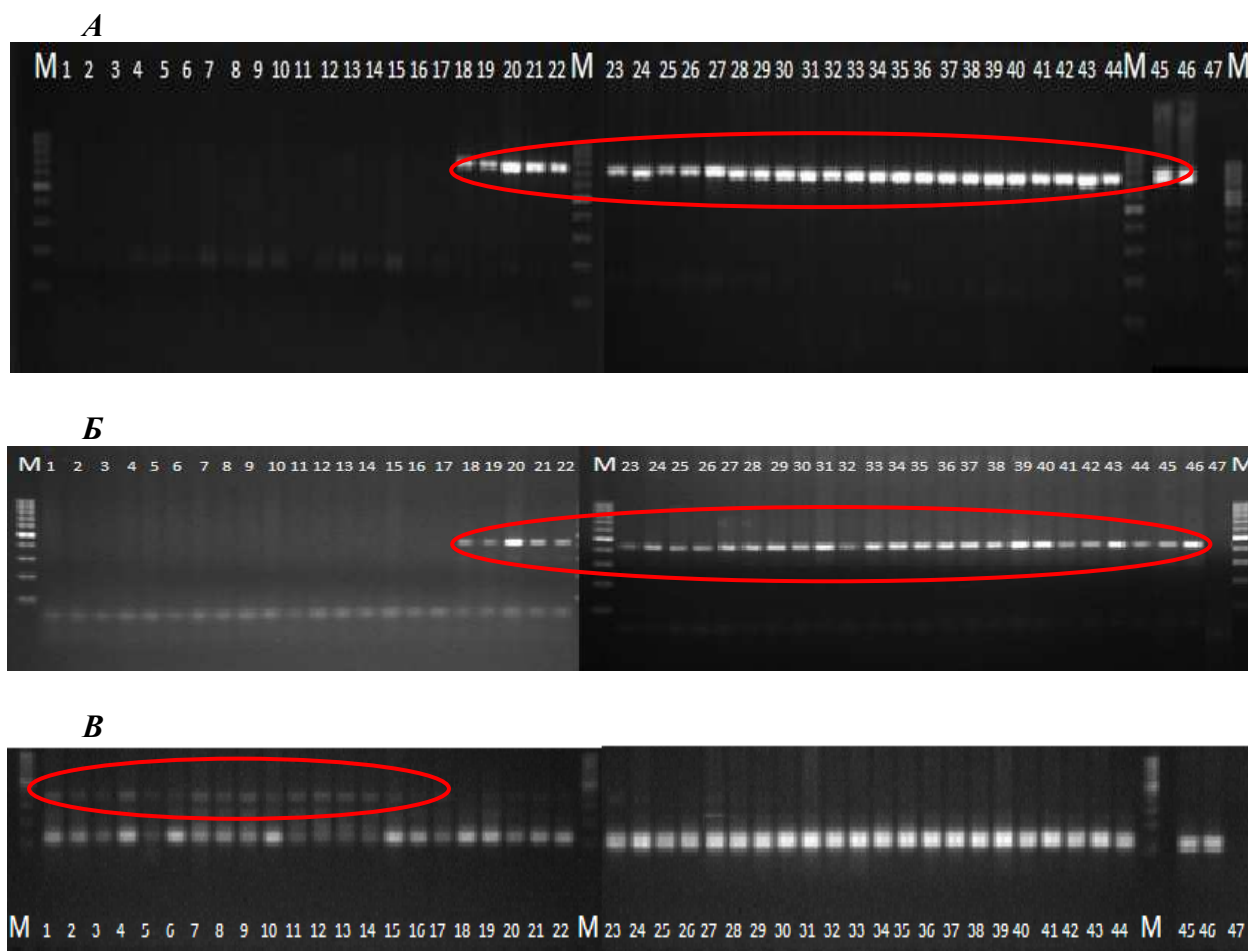


Примечание: 1-17 – ЦМС-линии (*rf1rf1*): 1- ВД 1448; 2 - ЭД 169; 3 - ВД 344; 4 - ВД 22; 5 - ЭД 869; 6 - ВД 151; 7 - ЭД 236; 8 - ЭД 77; 9 - ЭД 95; 10 - ВД 354; 11 - ВД 255; 12 - ВД 350; 13 - ВД 356; 14 - ВД 149; 15 - ЭД 73; 16 - ЭД 931; 17 – J⁻¹⁰/544; **18-47 - линии-восстановители фертильности пыльцы (*Rf1Rf1*):** 18 – J⁻⁷/0306; 19 – J⁻⁸/361; 20 – J⁻⁸/7307; 21 – J⁻⁸/515; 22 – J⁻⁸/543; 23 – J⁻⁹/1228; 24 – J⁻⁹/1671; 25 - ВД 541; 27 - ВД 62; 28 - ВД 110; 29 – J⁻⁸/991; 30 - ЭД 788; 31 - ЭД 195; 32 - ЭД 114; 33 - ЭД 538; 34 – J⁻⁹/941152; 35 – J⁻⁸/0123; 36 – J⁻⁸/843; 37 – J⁻⁸/2288; 38 – J⁻⁷/40181; 39 – J⁻⁶/1854; 40 – J⁻⁷/90592; 41 – J⁻⁶/3867; 42 – J⁻⁶/70165; 43 – J⁻⁶/507; 44 – J⁻⁸/0211; 45 – J⁻⁷/698; 46 – J⁻⁹/4917; 47 – J⁻⁹/99017. 26 – отрицательный контроль. М – маркер молекулярной массы 1 Кб DNA Ladder (Fermentas), На рисунке отмечены фрагменты (около 180 п.н), амплифицированные у некоторых линий ЦМС.

Рисунок 1. Электрофоретические спектры продуктов амплификации маркера ORS 511

Другой электрофоретический спектр получен после амплификации маркера ORS 224. Так, у ЦМС-линий: ЭД 169, ВД 22, ЭД 869, ВД 151, ЭД 77, ЭД 95, ВД 354 амплифицирован фрагмент размером около 110 п.н., а у ЦМС-линий: ВД 1448, ВД 344, ЭД 236, ВД 255, ВД 350, ВД 356, ВД 149, ЭД 73, ЭД 931, J⁻¹⁰/544 и всех изученных Rf-линий – фрагмент размером около 134 п.н. Следовательно, маркеры ORS 511 и ORS 224 также не информативны для идентификации гена *Rf1*. Однако эти два маркера могут быть использованы для генотипирования и генетической паспортизации ЦМС-линий, так как демонстрируют полиморфный электрофоретический спектр продуктов их амплификации.

Высокоинформативными в идентификации *Rf1*-генотипов явились маркеры – HRG01, HRG02 и STS-115 (рис. 2).



Примечание: 1-17 – ЦМС-линии (*rf1rf1*); 18-46 - линии-восстановители фертильности пыльцы (*Rf1Rf1*) (названия линий приведены выше, рис. 1). 47 – отрицательный контроль. М – маркер молекулярной массы 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). На рисунке выделены фрагменты, информативные для идентификации Rf- и ЦМС-линий.

**Рисунок 2. Электрофоретические спектры продуктов амплификации маркеров:
А – HRG01, Б – HRG02 и В – STS-115**

В результате амплификации HRG01 и HRG02 у всех исследованных Rf-линий обнаружены фрагменты размером около 454 п.н. и 740 п.н. соответственно, тогда как у ЦМС-линий эти ПЦР-маркеры отсутствуют. Праймеры маркера STS-115 у всех изученных 36 линий подсолнечника инициировали синтез фрагмента размером около 115 п.н., и, кроме этого, у всех ЦМС-линий дополнительно визуализируется еще один фрагмент размером около 370 п.н.

Таким образом, результаты ПЦР-анализа свидетельствуют об идентификационной ценности маркеров HRG01, HRG02 и STS-115 для определения гена *Rf1* в генотипе подсолнечника.

Одной из практических задач маркерной селекции является создание информативных и простых в использовании диагностических тест-систем. В связи с этим нами была разработана мультиплексная ПЦР тест-система, позволяющая в одной реакционной смеси идентифицировать наличие/отсутствие маркера гена-восстановителя фертильности пыльцы – *Rf1*, так и митохондриального локуса – *orfH522*. Так как известно, что митохондриальная ДНК стерильных растений с ЦМС РЕТ1 отличается от митохондриальной ДНК фертильных форм наличием инверсии 11 т.н. и инсерции 5 т.н., приводящих к появлению новой открытой рамки считывания *orfH522*, которая транскрибируется вместе с геном *atpA* и кодирует белок 16 кДа [6].

Для разработки такой тест-системы была использована нуклеотидная последовательность маркера гена *Rf1* – HRG01, определенная нами ранее [3], и последовательность нуклеотидов митохондриальной открытой рамки считывания – *orfH522* (база данных NCBI GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X55963.1>).

На основании данных последовательностей нуклеотидов были созданы специфические праймеры для проведения мультиплексной ПЦР. Праймеры конструировали таким образом, чтобы амплификация маркеров системы ЦМС РЕТ1-*Rf1* осуществлялась с равной эффективностью. Испытания мультиплексной тест-системы показали, что она информативна для амплификации как маркера гена *Rf1* – восстановителя фертильности, так и *orfH522* ЦМС РЕТ1.

Спектром практического применения разработанной мультиплексной ПЦР тест-системы может быть: а) идентификация генотипов на этапах получения родительских линий для гетерозисной селекции подсолнечника, б) оценка генетической чистоты линейного материала по признаку фертильности/стерильности пыльцы (уменьшение объема полевых работ), в) поиск новых доноров гена *Rf1* восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 у сортов, а также диких видов.

Заключение

Таким образом, из 9 испытанных ДНК-маркеров – ORS 511, ORS 224, ORS 317, ORS 630, ORS 799, ORS 1030, HRG01, HRG02 и STS-115, которые, по данным литературы, составляют общую с геном *Rf1* группу сцепления, отобраны три маркера - HRG01, HRG02 и STS-115 информативные для идентификации гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1. Разработана мультиплексная ПЦР тест-система, эффективная для определения маркера ядерного гена *Rf1* и митохондриального локуса *orfH522* (ЦМС РЕТ1), которая может быть использована в маркерной селекции подсолнечника.

Исследование выполнено в рамках темы Министерства образования и науки РФ (№ 4.5642.2011) и при финансовой поддержке ФЦП Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.740.11.0485).

Список литературы

1. Маркин Н.В., Усатов А.В., Федоренко М.Г. RAPD-анализ генотипов солеустойчивых форм горчицы (*Brassica juncea* L.) // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. - 2006. - № 3. - С. 99-102.
2. Маркин Н.В., Тихонова М.А., Анисимова И.Н., Рожкова В.Т., Гаврилова В.А., Усатов А.В. SCAR маркер гена *Rf1* подсолнечника у линий восстановителей фертильности пыльцы растений с различными типами ЦМС // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. - Краснодар. - 2009. - Вып. 2 (141). - С. 3-5.
3. Маркин Н.В., Горбаченко О.Ф., Тихонова М.А., Усатов А.В. Кодоминантные маркеры гена *Rf1* культурного подсолнечника // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. - Краснодар. - 2010. - Вып. 1 (142-143). - С. 3-8.
4. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prufe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring pollen fertility in PET1-based F₁ hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. - 2003. - Vol. 106. - P. 599-606.
5. Horn R. Recombination: Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants // Progress in Botany. - 2006. - Vol. 67. - P. 31-52.
6. Kohler T., Horn R., Lossl A., Zetsche K. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene // Mol. Gen. Gen. - 1991. - Vol. 262. - № 2. - P. 283-290.
7. Yu J. K., Tang S., Slabaugh M. B., Heesacker A., Cole G., Herring M., Soper J., Ham F., Chu W. C., Webb D. M., Thompson L., Edwards K. J., Berry S., Leon A. J., Olungu C., Maes N. and Knapp S. J. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // Crop Sci. - 2003. - V. 43. - P. 367-387.
8. Yue B., Vick B.A., 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.

Рецензенты:

Михайлов Н.В., д-р с-х наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и биотехнологии НИИ биоинформатики, биотехнологии и живых систем ДГАУ, п. Персиановский, Ростовская область.

Шкурат Т.П., д-р биол. наук, профессор, директор НИИ биологии ЮФУ, г. Ростов-на-Дону.