

УДК 575.11

## **АНАЛІЗ ЗЧЕПЛЕННЯ МАРКЕРІВ HRG01, HRG02 ТА ГЕНА ВІДНОВЛЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ ПИЛКУ СОНЯШНИКУ**

© 2014 р. **В. М. Попов<sup>1</sup>, Г. Є. Акініна<sup>1</sup>,  
Ю. М. Тереняк<sup>1</sup>, В. В. Кириченко<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва  
Національної академії аграрних наук України  
(Харків, Україна)*

<sup>2</sup>*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

За ознакою відновлення фертильності пилку соняшнику в  $F_2$  відбувається розщеплення на фертильні та стерильні рослини у співвідношенні фенотипічних класів 3:1. Показано, що маркери HRG01 та HRG02 в  $F_2$  також розщеплюються із співвідношенням класів 3:1. Аналіз зчеплення між маркерами HRG01, HRG02 та геном  $Rf_1$  показав, що вони розташовані в одній групі зчеплення на відстані  $9,0 \pm 2,7$  (Mx1829B×Mx1091) та  $7,0 \pm 2,3$  % рекомбінації (Mx1829B×Mx2122) для пари HRG01- $Rf_1$ , а також  $5,0 \pm 1,9$  (Mx1829B×Mx1091) та  $10,0 \pm 2,8$  % рекомбінації (Mx1829B×Mx2122) для пари HRG02- $Rf_1$ .

**Ключові слова:** *Helianthus annuus L.,  $Rf_1$ , SCAR маркери, рекомбінація*

Ключовим геном у відновленні фертильності пилку соняшнику є  $Rf_1$ , який залежно від генотипу та типу цитоплазми, взаємодіє щонайменше ще з двома або трьома генами. Наразі усі комерційні гібриди соняшнику створюються на основі взаємодії класичної цитоплазми PET1 та гена  $Rf_1$ . Особливості генетичного контролю відновлення фертильності пилку зведені у монографіях та оглядових статтях (Гаврилова, Анисимова, 2003; Ведмедева, Толмачев, 2008; Попов, Кириченко, 2010). Через те, що у соняшнику система PET1- $Rf_1$  є найпоширеною, основні наукові роботи з маркування генів цінних ознак спрямовані саме на ідентифікацію ДНК маркерів до гена  $Rf_1$  (Horn et al., 2003; Jan et al., 1998; Kusterer et al., 2005; Schnabel et al., 2008), а також з'ясування молекулярних механізмів взаємодії мітохондріальних генів з ядерними (Moneger et al., 1994; Horn & Fried, 1999).

Для маркування гена  $Rf_1$  залучаються різні типи ДНК маркерів: RAPD, AFLP, SSR тощо.

*Адреса для кореспонденції:* Попов Віталій Миколайович, Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, пр. Московський, 142, Харків, 61060;  
e-mail: vnpor@ukr.net

Так, на основі двох зчеплених RAPD локусів (OPK13\_454 та OPY10\_740) з геном  $Rf_1$  були розроблені два SCAR маркери, позначені як HRG01 та HRG02. Розробка детальної генетичної карти соняшнику на основі мікросателітних локусів дала змогу встановити, що ген  $Rf_1$  розшифрований в 13-й групі зчеплення (Horn et al., 2003). В роботі V.Yue et al. (2010) один з тісно зчеплених TRAP маркерів був конвертований у STS маркер. Відстань між STS та  $Rf_1$  склала 0,4 cM.

Для ефективного використання ДНК маркерів в селекційних програмах необхідно проводити їх валідацію на різноманітному вихідному матеріалі з генетичним аналізом на популяціях, що розщеплюються, за ДНК маркерами та цінними морфологічними й агрономічними ознаками. Тому метою роботи було проведення аналізу сумісного успадкування маркерів HRG01, HRG02 та гена відновлення фертильності пилку в популяціях  $F_2$ .

### **МЕТОДИКА**

Для отримання  $F_1$  та  $F_2$  було залучено три інбредних лінії соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва – Mx1829B, Mx1091 та Mx2122. Як материнський компо-

## АНАЛІЗ ЗЧЕПЛЕННЯ МАРКЕРІВ HRG01, HRG02

нент схрещування використовували лінію Mx1829B, на який попередньо видаляли пиляки у ранкові години з 6.00 до 8.00. Через два-три дні проводили запилення батьківськими формами – Mx1091 та Mx2122. У результаті було створено дві гібридні комбінації – Mx1829B×Mx1091 та Mx1829B×Mx2122.

Геномну ДНК інбредних ліній соняшнику виділяли із суміші 10 насінин. Виділення ДНК з окремих рослин F<sub>1</sub> та F<sub>2</sub> здійснювали із зелених листків. Для виділення ДНК використовували набір Diatom Prep100 (Росія).

Ідентифікацію SCAR маркерів проводили за допомогою ПЛР з парами праймерів, які фланкують певні ділянки геномної ДНК соняшнику. Нуклеотидна послідовність праймерів до локусу HRG01 була такою: F: TATGCATAATTAGTTATACCC та R: ACATAAGGATTATGTACGGG, а для локусу HRG02: F: AAACGTGGGAGAGAGGTG та R: AAACGTGGGCTGAAGAАСТА (Horn et al., 2003).

Для проведення ПЛР 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. ПЛР проводили у термоциклері «Терцик» (Росія) за температури гібридизації праймерів 60°C для виявлення маркера HRG01 та 62°C для HRG02.

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 2% агарозному гелі з високою роздільною здатністю і додаванням бромистого етидію в буфері з низькою іонною силою та наступним фотографуванням в УФ світлі фотосистемою NikonD50. Як маркер довжини фрагментів ДНК використовували DNA ladders 50 bp.

Перевірку відповідності дослідного та теоретично розрахованого розщеплення оцінювали методом  $\chi^2$ . Відсоток кросинговеру між маркерами HRG01, HRG02 та геном *Rf<sub>1</sub>* визначали методом добутку за наявності у розщепленні чотирьох класів (Орлова, 1991).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Залучені інбредні лінії соняшнику були фертильними, але за генотипом з урахуванням цитоплазми відрізнялися: цит<sup>S</sup>*Rf<sub>1</sub>Rf<sub>1</sub>* (Mx1829B) і цит<sup>N</sup>*rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>* (Mx1091 та Mx2122). Генотипи цих ліній були з'ясовані у попередніх дослідженнях з вивчення генетики морфологічних ознак (Шарыпина и др., 2008). Гібриди F<sub>1</sub>, отримані

від схрещування фертильних рослин, також були фертильними, тобто спостерігали одноманітність за ознакою відновлення фертильності пилку. Слід відзначити, що прояв цитоплазматичної чоловічої стерильності пов'язаний не тільки із станом генів відновлення фертильності пилку, але й з наявністю специфічних ЦЧС-локусів в мітохондріальному геномі соняшнику, які успадковуються за материнським типом. Розбіжності в структурі ЦЧС-локусів та наявність певних алелей генів *Rf* й зумовлює формування стерильного або фертильного пилку. Тому генотип гібридів F<sub>1</sub>, отриманих в усіх комбінаціях схрещування, можна записати як цит<sup>S</sup>*Rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>*. В F<sub>2</sub> ми спостерігали розщеплення на фертильні та стерильні рослини. В комбінації схрещування Mx1829B×Mx1091 фертильних рослин було виявлено 45, а стерильних – 14. В іншій комбінації схрещування Mx1829B×Mx2122 відбувалося розщеплення: 46 фертильних і 12 стерильних рослин. Співвідношення фенотипічних класів у обох комбінаціях схрещування збігалось з розщепленням 3:1, що відповідає теоретично очікуваному розщепленню при моногенному успадкуванні (табл. 1).

Згідно з даними, опублікованими в статті Horn et al. (2003), два RAPD амплікони (OPK13\_454 та OPY10\_740) виявили зчеплення з геном *Rf<sub>1</sub>* на відстані 0,8 та 2,0 сМ. Ці амплікони були конвертовані у два SCAR маркери – HRG01 та HRG02, відповідно, про наявність яких в рослинному матеріалі свідчить ампліфікація фрагментів розміром 426 та 738 п.н., відповідно.

У наших дослідженнях при ПЛР ДНК інбредних ліній для виявлення маркерів HRG01 (426 п.н.) та HRG02 (738 п.н.) фрагменти ампліфікації спостерігали у лінії Mx1829B, а їх відсутність – у лінії Mx1091 та Mx2122, що може підтверджувати наявність домінантного або рецесивного алеля гена *Rf<sub>1</sub>*, відповідно.

У F<sub>1</sub> в усіх гібридних комбінаціях спостерігали одноманітність за продуктами ампліфікації. У результаті ампліфікації геномної ДНК рослин F<sub>1</sub> утворюються фрагменти розміром 426 п.н. (HRG01) або 738 п.н. (HRG02).

Для виявлення зчеплення між локусами HRG01, HRG02 та геном *Rf<sub>1</sub>* нами було отримано дві комбінації схрещування F<sub>2</sub>. Компоненти схрещування розрізнялися за генотипом з урахуванням типу цитоплазми, а також за продуктами ампліфікації із парами праймерів до маркерів HRG01 та HRG02.

Таблиця 1. Розщеплення в F<sub>2</sub> за ознакою відновлення фертильності пилку

Комбінація схрещування	Фенотипові класи, шт.		Розщеплення	$\chi^2$	P
	фертильні	стерильні			
Мх1829В×Мх1091	45	14	3:1	0,05	0,9 – 0,8
Мх1829В×Мх2122	46	12	3:1	0,57	0,5 – 0,3

Таблиця 2. Розщеплення в F<sub>2</sub> за маркером HRG01

Комбінація схрещування	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	$\chi^2$	P
	всього	з локусом HRG01			
Мх1829В×Мх1091	59	41	3:1	0,96	0,5 – 0,3
Мх1829В×Мх2122	59	42	3:1	0,48	0,5 – 0,3

Таблиця 3. Розщеплення в F<sub>2</sub> за маркером HRG02

Комбінація схрещування	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	$\chi^2$	P
	всього	з локусом HRG02			
Мх1829В×Мх1091	59	39	3:1	2,48	0,2 – 0,1
Мх1829В×Мх2122	58	44	3:1	0,02	0,9 – 0,8

Таблиця 4. Оцінка зчеплення між маркерами HRG01, HRG02 та геном Rf<sub>1</sub> у соняшнику

Маркер-ген	Всього рослин F <sub>2</sub>	Комбінація схрещування	Кількість класів в F <sub>2</sub> , шт.				$\chi^2$	Рекомбінація, %
			ферт./+	ферт./-	стер./+	стер./-		
HRG01-Rf <sub>1</sub>	58	Мх1829В×Мх1091	41	5	0	12	35,5	9,0±2,7
HRG02-Rf <sub>1</sub>			42	2	0	14	50,5	5,0±1,9
HRG01-Rf <sub>1</sub>	59	Мх1829В×Мх2122	40	5	0	14	46,2	7,0±2,3
HRG02-Rf <sub>1</sub>			37	8	0	14	41,2	10,0±2,8

**Примітка.** + та - означає наявність чи відсутність SCAR маркерів у фертильних і стерильних генотипах.

У F<sub>2</sub> від схрещування ліній, які розрізнялися наявністю або відсутністю фрагментів ампліфікації за маркерами HRG01 та HRG02, спостерігали два класи, частота яких відповідала теоретично очікуваному співвідношенню 3:1 при розщепленні за домінантним алелем одного локусу (табл. 2, 3).

Також був проведений тест на зчеплення між маркерами HRG01, HRG02 та геном Rf<sub>1</sub> (табл. 4).

Перевірка гіпотези про незалежне успадкування цих ДНК маркерів та гена Rf<sub>1</sub> при теоретично очікуваному розщепленні 9:3:3:1 дозволила встановити, що дослідні маркери та

ген Rf<sub>1</sub> тісно зчеплені. За методом добутку відсоток кросинговеру у комбінації схрещування Мх1829В×Мх1091 між HRG01 та геном Rf<sub>1</sub> становив 9,0±2,7, а між HRG02 та геном Rf<sub>1</sub> 5,0±1,9. В комбінації схрещування Мх1829В×Мх2122 цей показник дорівнював 7,0±2,3 та 10,0±2,8 % для пар HRG01-Rf<sub>1</sub> та HRG02-Rf<sub>1</sub>, відповідно.

Таким чином, генетичний аналіз дозволив підтвердити наявність зчеплення між маркерами HRG01, HRG02 та геном Rf<sub>1</sub> на спеціально створених популяціях F<sub>2</sub>, які були отримані в результаті схрещування інбредних ліній соняшнику харківської селекції. Сумісне успадкування SCAR маркерів та гена Rf<sub>1</sub> вказує

## АНАЛІЗ ЗЧЕПЛЕННЯ МАРКЕРІВ HRG01, HRG02

на доцільність залучення HRG01 та HRG02 маркерів у селекційні програми із розмежування вихідного матеріалу з присутністю або відсутністю цільового гена *Rf<sub>1</sub>*.

### ЛІТЕРАТУРА

- Ведмедева Е.В., Толмачев В.В. Генетика морфологических признаков: состояние и перспективы // Генетические ресурсы растений. – 2006. – №3. – С. 7-22.
- Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. – СПб., 2003. – 204 с.
- Орлова Н.Н. Генетический анализ. – М., 1991. – 318 с.
- Попов В.Н., Кириченко В.В. Мужская стерильность подсолнечника. – Харьков: ИП, 2010. – 156 с.
- 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.
- Horn R., Fried W. CMS sources in sunflower: different origin but same mechanism? // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 98. – P. 195-201.
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prufe M., Fried W. Molecular mapping of the *Rf<sub>1</sub>* gene restoring pollen fertility in PET1-based F<sub>1</sub> hybrids in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 106. – P. 599-606.
- Jan C.C., Vick B., Miller J., Kahler A., Burtler E. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 96. – P. 15-22.
- Kusterer B., Horn R., Friedt W. Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf<sub>1</sub>* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene // Euphytica. – 2005. – V. 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. – V. 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. – V. 127. – P. 582-591.
- Yue B., Vick B., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rf<sub>1</sub>* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // Plant Breed. – 2010. – V. 129. – P. 24-28.

Надійшла до редакції  
15.10.2014 р.

## LINKAGE ANALYSIS BETWEEN MARKERS HRG01, HRG02 AND GENE OF RESTORER FERTILITY OF POLLEN IN SUNFLOWER

V. N. Popov<sup>1</sup>, G. E. Akinina<sup>1</sup>, Yu. N. Terenyak<sup>1</sup>, V. V. Kirichenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>V. Ya. Yuriev Plant Production Institute  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Kharkiv, Ukraine)  
e-mail: vnpop@ukr.net

<sup>2</sup>V. V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)

On the restorer fertility of pollen in the F<sub>2</sub> was occurred segregation on the fertile and sterile plants in the ratio of phenotypic classes of 3:1. It is shown that the markers HRG01, HRG02 in F<sub>2</sub> also segregation in ratio class 3:1. Linkage analysis between markers HRG01, HRG02 and gene *Rf<sub>1</sub>* showed that they are in the same linkage group at a distance of 9,0±2,7 (Mh102 × Mh121) that 7,0±2,3 % recombination (Mh102×Mh113) for the pair HRG01-Rf<sub>1</sub>, and 5,0±1,9 (Mh102×Mh121) and 10,0±2,8 % recombination (Mh102×Mh113) for the pair HRG02-Rf<sub>1</sub>.

**Key words:** *Helianthus annuus* L., *Rf<sub>1</sub>*, SCAR markers, recombination

## **АНАЛІЗ ЗЧЕПЛЕННЯ МАРКЕРІВ HRG01, HRG02**

### **АНАЛИЗ СЦЕПЛЕНИЯ МАРКЕРОВ HRG01, HRG02 И ГЕНА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЦЫ У ПОДСОЛНЕЧНИКА**

В. Н. Попов<sup>1</sup>, Г. Е. Акинина<sup>1</sup>, Ю. Н. Тереняк<sup>1</sup>, В. В. Кириченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт растениеводства им В.Я. Юрьева  
Национальной академии аграрных наук Украины  
e-mail: vnpop@ukr.net*

<sup>2</sup>*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
(Харьков, Украина)*

По признаку восстановления фертильности пыльцы в  $F_2$  происходит расщепление на фертильные и стерильные растения в соотношении фенотипических классов 3:1. Показано, что маркеры HRG01 и HRG02, в  $F_2$  также расщепляются с соотношением классов 3:1. Анализ сцепления между маркерами HRG01, HRG02 и геном  $Rf_1$ , показал что они расположены в одной группе сцепления на расстоянии  $9,0 \pm 2,7$  (Mx1829B×Mx1091) та  $7,0 \pm 2,3$  % рекомбинации (Mx1829B×Mx2122) для пары HRG01- $Rf_1$ , а также  $5,0 \pm 1,9$  (Mx1829B×Mx1091) и  $10,0 \pm 2,8$  % рекомбинации (Mx1829B×Mx2122) для пары HRG02- $Rf_1$ .

**Ключевые слова:** *Helianthus annuus L.,  $Rf_1$ , SCAR маркеры, рекомбинация*