## ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ №3 2016 СЕРЫЯ АГРАРНЫХ НАВУК

УДК 635.25:[631.527.56:577.21]

 $\mathit{U.B.}$  ПАВЛОВА $^1$ , Н. П. КУПРЕЕНКО $^1$ , К. Б. ЗВЯГИНЦЕВА $^2$ , М. В. ИВАНОВСКАЯ $^1$ , А. В. ЛАГОДИЧ $^2$ , С. В. ГЛУШЕН $^2$ 

## ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.) БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ

<sup>1</sup>Институт овощеводства, аг. Самохваловичи, Беларусь, e-mail: hakuroshya@yahoo.com, belonion@tut.by, belniio@mail.ru,

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, e-mail: klava-zv@tut.by, lagodich@yahoo.com, sglush@mail.ru

Изучены два ДНК-маркера митохондриального гена соb, характеризующие S- и N-типы цитоплазмы, маркер митохондриального региона orfA501, выделяющий S- и T-стерильные типы цитоплазмы и два маркера, косегрегирующие с *М*s или *m*s, ядерными генами, контролирующими фертильность фенотипов с S-цитоплазмой, лука репчатого (*Allium cepa* L.) на примере сортов белорусской селекции.

Ключевые слова: мужская стерильность, поддерживающая линия, ДНК-маркер, лук репчатый.

I. V. PAVLOVA<sup>1</sup>, N. P. KUPREENKO<sup>1</sup>, K. B. ZVYAGINTSEVA<sup>2</sup>, M. V. IVANOVSKAYA<sup>1</sup>, A. V. LAGODICH<sup>2</sup>, S. V. GLUSHEN<sup>2</sup>

## POLYPHORMISM OF LOCI OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF THE ONION (ALLIUM CEPA L.) VARIETIES OF BELARUSIAN BREEDING

<sup>1</sup>Institute of Vegetable Growing , Samokhvalovichi, Belarus, e-mail: hakuroshya@yahoo.com, belonion@tut.by, belniio@mail.ru,

 ${\it ^2} Belarusian \ State \ University, \ Minsk, \ Belarus, \ e-mail: \ klava-zv@tut.by, \ lagodich@yahoo.com, \ sglush@mail.ru$ 

Studied are two DNA-markers of mitochondrial gene cob characterizing S- and N-cytoplasm, marker of mitochondrial region orfA501 with S- and T-cytoplasm, and two markers co-segregating with *Ms* or *ms*, nuclear genes which control the fertility of phenotypes with S-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.) varieties developed in the Institute of Vegetable Growing. *Keywords:* male sterility, maintainer line, DNA-marker, onion.

Введение. Первый гибридный сорт лука репчатого на основе сорта Italian Red вышел на рынок после Второй мировой войны. Современные гибриды  $F_1$  лука репчатого получают с использованием цитоплазматической мужской стерильности. Коммерчески значимые цитоплазмы мужской стерильности гибридных сортов из Голландии, Японии, Индии являются независимо выделенными цитоплазмами сходного или одинакового типа — ЦМС-S и ЦМС-Т [1]. ЦМС-S система стерильности, открытая у лука репчатого сорта Italian Red, наиболее широко распространена в сортах гибридного лука благодаря стабильности в различных условиях. Мужская фертильность этого типа восстанавливается доминантным аллелем ядерного локуса Ms [2, 3] или N-цитоплазмой. Размножение ЦМС-S линий проводят с помощью поддерживающей мужски фертильной линии, имеющей нормальную (N-) цитоплазму и гомозиготный рецессивный генотип ядерного восстанавливающего локуса msms. ЦМС-Т тип открыт на сорте Jaune paille des Vertus [4, 5] и обусловлен тремя независимо сегрегирующими локусами в ядерном геноме. Фертильность восстанавливается доминантным аллелем в одном локусе A/a или в двух комплементарных локусах B/b и C/c [6]. Описано существование других типов цитоплазмы, которые не охарактеризованы [1, 4].

Выделение поддерживающих линий из популяции лука является трудоемким и продолжительным процессом [7, 8]. В связи с этим вспомогательный маркер-опосредованный отбор может стать немаловажным фактором. Типы цитоплазмы могут быть определены исходя из полиморфизма

митохондриальных генов orfA501 и cob [9]. Маркер orfA501 дает фрагмент молекулярной массой 473 п. о. у цитоплазм, индуцирующих стерильность, в отличие от N-цитоплазмы [10]. S-цитоплазма отличается от Т-цитоплазмы с помощью маркера cobS, дающего фрагмент массой 414 п. о. у S-цитоплазмы [11]. N-цитоплазма отличается от стерильных по cobN маркеру наличием продукта амплификации 180 п. о. Исходные поддерживающие растения могут быть прямо отобраны с помощью двух маркеров, косегрегирующих с Ms или ms [12].

При выборе для гибридной селекции за основу мужски-стерильной линии с S-типом цитоплазмы молекулярная идентификация может существенно снизить число индивидуальных скрещиваний со стерильным тестером для идентификации поддерживающего генотипа за счет исключения растений с S-цитоплазмами и доминантными Ms-аллелями перед тесткроссами [11, 12].

Цель исследования — оценить с помощью ДНК-маркеров полиморфизм N-, S-, Ms, ms локусов у сортов лука репчатого белорусской селекции. Задачи — молекулярно-генетический анализ локусов S-, T- и N-цитоплазмы, Ms/ms-локуса ядра и наблюдение фенотипических характеристик фертильности установленных генотипов.

Объекты и методы исследования. Для исследования использовали два острых сорта лука репчатого белорусской селекции. Сорт Ветразь для двулетней культуры, выращивается через севок, сорт скороспелый, среднегнездный, образует 2−5 луковиц. Сорт Скарб литвинов для выращивания в однолетней культуре из семян, сорт среднеспелый, одногнездный, образует 1−2 луковицы. Использовали луковицы маточника селекционного материала, по 24 шт. для каждого сорта. ДНК выделяли из 1−2 высечек Ø 0,5 см запасающей чешуи маточной луковицы, наборами ИБОХ НАН Беларуси, связыванием на мембране.

ПЦР-амплификация нуклеотидных последовательностей, специфических для стерильных цитоплазм. Праймеры для оrfA501-5°-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3° и 5°-CCAAGCATTTGGCGCTGAC-3°, соответствующая температура отжига 60 °C [11]. Праймеры для региона митохондриального гена cob для S-цитоплазмы – 5°-GTCCAGTTCCTATAGAACCT ATCACT-3°; для N-цитоплазмы – 5°TCTAGATGTCGCATCAGTGGAATCC-3°. Общий праймер – 5°-CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT-3°, соответствующая температура отжига – 53 °C [12]. Олигонуклеотиды синтезированы ОДО «Праймтех». Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 ml содержала 50 ng матричной ДНК, 1 × «АМ» буфер для Таg-полимеразы «Праймтех, 0,2 mM каждого из dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 ед. Таg полимеразы и 10 гМ каждого праймера. После периода начальной денатурации 94 °C, 2 мин., выполняли 25 циклов: 94 °C – 30 c, 60 (53) °C – 1 мин., 72 °C – 2 мин. Терминальная элонгация 72 °C – 5 мин.

Праймеры для идентификации Ms/ms аллелей синтезированы согласно [9]. Для детекции доминантной ядерной фертильности: MsF - 5'-TACAGATTTGTTTATCTTCTTCTTCTTCT-3', MsR - 5'-TCAGTATCAATAGAAGGAATCAC-3', msR - 5'-GTATACCATTGGTACTTGATGCA-3'. Реакционная смесь общим объемом 25 ml содержала 50 ng матричной ДНК,  $1 \times (AM)$  буфер для Тад-полимеразы «Праймтех», 0,2 mM каждого из dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 ед. Тад-полимеразы и 10 rM каждого праймера. Условия ПЦР следующие: начальная денатурация 95 °C - 6 мин., 35 циклов 95 °C - 30 c, 58 °C - 45 c, 72 °C - 45 c. Терминальная элонгация 72 °C - 5 мин. Амплифицированные продукты ПЦР анализировали в 1%-ном агарозном геле, визуализировали в 1%-свете после окрашивания бромистым этидием.

В ходе селекционной работы [9] показано, что доминантный *М*s аллель имеет ограниченное проявление в фенотипе, благодаря чему растения с различными генотипами могут иметь одинаковый фенотип, поэтому имеется возможность ложной классификации отдельных мужски-фертильных растений как мужски-стерильных. Однако оба фенотипа (мужски-фертильный и мужски-стерильный) в расщепляющейся популяции соответствуют ожидаемому соотношению 1:1 для модели одиночного гена в ВС1. В связи с этим визуально-тактильное определение стерильности растений лука проводили на основании наличия или отсутствия пыльцы в течение цветения всего растения. Цветки проверяли ежедневно на наличие пыльцы прикладыванием к зрелым пыльникам тыльной стороны ладони. Если пыльца обнаруживалась хоть однажды, стебель помечали биркой и не проверяли снова. Цветки непомеченных зонтиков повторно проверяли в течение всего периода цветения.

Многочисленные зонтики на индивидуальных растениях проверяли независимо. После цветения растения помечали как мужски-фертильные, если хоть один зонтик имел метку.

Результаты и их обсуждение. В ходе молекулярно-генетического анализа установлено, что маркер митохондриального гена *cobS* ожидаемого размера 414 п. о. [12] был выявлен в реакции амплификации при использовании в качестве матрицы препаратов тотальной ДНК отдельных луковиц Скарб литвинов. Фрагмент амплифицировался в количествах, позволяющих однозначно интерпретировать результаты (рис. 1). Для маркера *cobS* (S-цитоплазмы) выявлен межсортовой полиморфизм. У сорта Скарб литвинов выявлено 33,3 % растений с *cobS* маркером S-цитоплазмы. У сорта Ветразь *cobS* не детектирован (табл. 1). По результатам Ү. Ү. Үап et al. [12], у сорта Sapporoki, происходящего из сорта США Yellow Globe Danvers, интродуцированного в Японии в 1871 г., встречаемость S-цитоплазмы у производных сортопопуляций варьирует. У сортопопуляции Yamamoto 19 растений из 20 имели S-цитоплазму, одно растение — N-цитоплазму. В другой популяции Науаshi все растения имели N-цитоплазму, а S-тип отсутствовал. Автор указывает, что для создания поддерживающей линии нужно использовать такую сортопопуляцию, как Науаshi, а для создания мужски-стерильной, как Yamamoto.

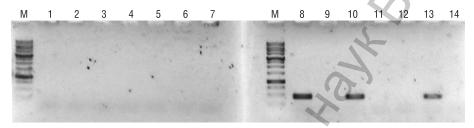


Рис. 1. Оценка cobS маркера у индивидуальных маточных луковиц лука репчатого: сорт Ветразь — дорожки 1—7; сорт Скарб литвинов — дорожки 8—14. Молекулярная масса ожидаемого продукта составляет 414 п. о. М — маркер молекулярного веса 1Кb, масса полосок снизу вверх 250, 500, 750, 1000 (более яркая полоса), 1500 п. о. и далее вверх

В наших исследованиях наблюдались количественные различия в амплифицированных продуктах маркеров orfA501, Ms и ms. Если продукт амплификации наблюдался в любом количестве, он учитывался. В результате применения маркеров orfA501, Ms, ms установлен внутрисортовой полиморфизм по соответствующим аллелям. Количество растений с Т-цитоплазмой у сорта Ветразь составляет 33,3 %, у сорта Скарб литвинов — 25,0 %. Наличие фрагмента orfA501 одновременно с фрагментом cobS у некоторых индивидуальных растений Скарб литвинов свидетельствует о возможности сосуществования S- и Т-цитоплазм.

Маркер cobN обнаруживает фрагмент 180 п. о. мономорфно у всех изученных генотипов сходно с результатами [11] в отличие от [12]. Это значит, что на данном этапе исследований судить о наличии у растения N-цитоплазмы можно косвенно — по отсутствию аллелей для маркеров cobS и orfA501.

Частота выявления аллеля ядерной доминантной фертильности Ms у сорта Ветразь составляет 37,5 %, аллеля ядерной рецессивной стерильности ms-33,3 %; у сорта Скарб литвинов Ms и ms-37,5 и 54,1 % соответственно. В том числе среди исследованной выборки Скарб литвинов обнаружено 16,6 % гетерозигот Msms.

Самосовместимость индивидуальных семенных растений лука репчатого, у которых установлен генотип, определяли по количеству семян на соцветии при отсутствии свободного опыления (рис. 2). Изоляцию соцветий проводили под индивидуальным изолятором из полиэстера. У изученных растений сорта Ветразь самосовместимость проявилась завязыванием от 10 до 100 семян на соцветие в зависимости от растения, но независимо от комбинаций изучаемых аллелей. У 70 % изученных растений сорта Скарб литвинов самосовместимость слабо выражена, под изолятором завязывается от 2–3 до 100 семян. У растений Скарб литвинов № 17 и № 18 (Ск17 и Ск18), у которых детектирована S-цитоплазма и гетерозиготное состояние ядерного аллеля Msms, можно было наблюдать ограниченное проявление Ms, выражавшееся в скудном количестве пыльцы и уровне самосовместимости — 2–3 семени на соцветие. У 30 % растений сорта Скарб литвинов наблюдался высокий уровень самосовместимости, при самоопылении на соцветии образовывалось

Таблица 1. Распределение типов цитоплазмы и ядерных аллелей закрепителей-восстановителей стерильности у индивидуальных растений лука репчатого

№ растения	еры					
л∘ растения	Фенотип	Ms	ms	cobS	orfA501	CobN
		(	Сорт Ветрази	<b>b</b>		
		Экспериме	нт с анализом	фенотипа		
1	Мужская	-	+	_	_	+
6	фертильность	+	_	_	_	+
8		+	_	_	_	+
9		-	+	_	_	+
12		+	_	_	-	+
15		-	+	_	±*	+
16		+	_	_	7	+
17		-	+	_		+
21		+	_	_	_	+
		Без на	блюдения фен	omuna	1/-	
2		_	±	- 4	<b>1</b> -	+
3		-	_	- (7	±	+
4		-	±	- >	±	+
5		_	_	-	±	+
7		+	-		±	+
10		+	-	VI	±	+
11		_	±	<b>)</b> -	±	+
13		_	- (	-	_	+
14		-	-(7)	_	_	+
18		_	(-),	_	_	+
19		_	+	_	_	+
20		(	<b>U</b> -	_	_	+
22		±	-	_	_	+
23		- 0	_	_	_	+
24		/±	_	-	±	+
		Copi	п Скарб литв	инов		
		Экспериме	нт с анализом	фенотипа		
1	Мужская	+	_	+	+	+
7	фертильность	_	+	-	±	+
8		+	-	+	±	+
10		_	+	_	_	+
14	20	_	+	_	_	+
17		+	+	+	_	+
18		+	+	+	_	+
20		+	_	_	_	+
21		±	+	+	±	+
23		±	+	_	±	+
24		_	+	_	_	+
2	Мужская	_	+	_	±	+
16	стерильность	_	+	+	±	+

№ растения	Фенотип	Детектированные маркеры									
		Ms	ms	cobS	orfA501	CobN					
Без наблюдения фенотипа											
3		_	_	+	+	+					
4		_	±	_	±	+					
5		_	±	_	_	+					
6		_	_	+	±	+					
9		_	_	-	_	+					
11		±	_	+	+	*					
12		±	_	_	_	+					
13		_	±	_	- 4	+					
15		_	_	_	+	+					
19		_	_	_	<u>/</u> ±	+					
22		±	_	_	<b>(-/)</b>	+					

 $\Pi$  р и м е ч а н и е. Более яркие фрагменты отмечены знаком «+», менее яркие – знаком « $\pm$ », отсутствие фрагмента – знаком « $\rightarrow$ ».

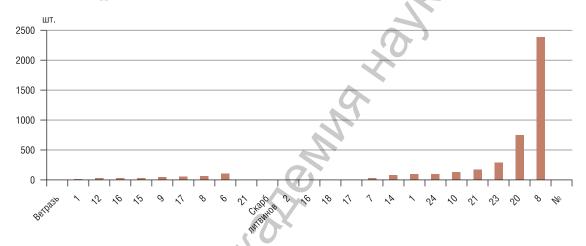


Рис. 2. Количество семян на соцветии при отсутствии свободного опыления ( $HCP_{05} = 8$ )

до 300 семян и более. У образца Скарб литвинов №8 (Ск8) при самоопылении получено 6,1 г семян, что составляет половину массы семян при свободном опылении на другом соцветии этого же растения. Образец имеет генотип MsMs и S-цитоплазму.

При анализе фенотипа среди ДНК-маркированных растений Скарб литвинов обнаружены растения с фенотипическими признаками мужской стерильности: отсутствие пыльцы на раскрывшихся цветках, дегенеративные пыльники (рис. 3, b). Одно растение из них Скарб литвинов № 16 (Ск16) с генотипом msms S-, orfA501 имело ожидаемый при таком генотипе фенотип мужской стерильности. У второго фенотипически стерильного растения Скарб литвинов №2 (Ск2) отсутствует маркер cobS и детектируется orfA501. В проанализированной выборке было еще одно растение с генотипом, как у Ск2, — Скарб литвинов № 7 (Ск7), имевшее фертильный фенотип и образовавшее выполненные семена при скрещивании со Ск2 и Ск16.

Среди отобранных для фенотипического наблюдения растений сорта Ветразь не выявлено фенотипов мужской стерильности. Растение сорта Ветразь № 15 (В15) с генотипом msms, orfA501 было внешне фертильным, образовывало обильную пыльцу, однако отличалось от других растений зеленым цветом пыльников (рис. 3, c). Растение завязывало семена при самоопылении, в комбинации со стерильным растением Ск16 давало 3 шт. невыполненных семян (см. табл. 2).

Основываясь на данных молекулярно-генетического анализа, применяемого для производства линий лука репчатого с генетической мужской стерильностью на основе S-типа цитоплазмы, из проведенных нами 11 комбинаций скрещиваний с использованием мужски стерильных



Рис. 3. Полиморфизм пыльников в соцветиях маточных растений лука репчатого различных генотипов: a — сорт Скарб литвинов, S-цитоплазма, MsMs, мужски-фертильные цветки — пыльники развиты, желтого цвета, высыпание пыльцы обильное; b — сорт Скарб литвинов, S-цитоплазма, msms, мужскистерильные цветки — пыльники недоразвиты, салатного цвета или дегенерировавшие, сморщенные, пыльца не высыпается; c — сорт Веразь, T-цитоплазма, msms, мужски-фертильные цветки — пыльники развиты, темно-зеленого цвета, высыпание пыльцы обильное

растений Скарб литвинов (см. табл. 2) только две (Ск16ЧВ9, Ск16ЧВ15) могут привести к получению желаемого генотипа. Поскольку только у материнского растения Ск16 детектирована S-цитоплазма и msms генотип ядра, а у Ветразь №9 (В9) и В15 – msms генотип ядерных аллелей закрепителей стерильности и N-цитоплазма. Однако остается выяснить будет ли помехой в этих комбинациях аллель orfA501 (Т-цитоплазмы) у материнского Ск16 и отцовского В15 растений и низкая выполненность гибридных семян обеих комбинаций.

Вариант опыления Количество семян, шт. Масса семян, г Особенности семян Ск2, количество соцветий – 5 шт. 0 Щуплые  $\times$ B8 7  $\times$ B1 0,01 7 + 160.04 + 0.01 $\times$ B17 Выполненные + щуплые 0,051  $\times$  C $\kappa$ 7 20 Выполненные 0,082  $\times$ B9 Ск16, количество соцветий – 5 шт. Щуплые  $\times$  C $\kappa$ 14 0,01  $\times$ B9 3 0,008  $\times$ B15 0,015 Выполненные  $\times$  C $\kappa$ 7  $\times B8$ 0,018

Таблица 2. Анализ фертильности гибридных комбинаций семенных растений

**Заключение.** Использованы ДНК-маркеры Ms, ms [9], cobS, cobN [12], orfA501 [11], с помощью которых охарактеризован полиморфизм соответствующих аллелей сортов лука репчатого селекции Института овощеводства. На примере выборок из 24 маточных растений выявлены межсортовые отличия при выявлении маркера cobS (S-цитоплазмы). У сорта Ветразь аллель cobS S-цитоплазмы не обнаружен, у сорта Скарб литвинов выявлено 33,3 % таких растений. Количество растений с маркером orfA501 Т-цитоплазмы у сорта Ветразь составляет 33,3 %, у сорта Скарб литвинов – 25 %. У сорта Ветразь встречаемость маркера доминантного ядерного аллеля Ms составляет 37,5 %, рецессивного ms – 33,3 %, у сорта Скарб литвинов: Ms –37,5 %, ms – 54,1 %. У сорта Скарб литвинов в выборке установлено 16,6 % гетерозигот Msms. Маркер cobN N-цитоплазмы обнаружен мономорфно у всех изученных генотипов.

×Ск10

0,051

Все семенные растения сорта Ветразь и 70 % растений сорта Скарб литвинов с аллелями Ms или ms слабо самосовместимы, однако некоторые дают достаточное количество семян для размножения отцовских линий на их основе. Высокая самосовместимость у 30 % растений сорта Скарб литвинов с аллелями Ms и S- или T-цитоплазмой может отражать повышенную семенную продуктивность гибридных растений на основе стерильной цитоплазмы.

## Список использованных источников

- 1. *Havey M.J.* Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasms of onion / M. J. Havey // Theor. and Appl. Genet. 2000. Vol. 101. Is. 5–6. P. 778–782.
- 2. Jones, H.A. A male sterile onion / H.A. Jones, S.L. Emsweller // Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 1936. N 34. P. 582–585.
- 3. *Jones*, *H.A.* Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed / H. A. Jones, A. E. Clarke // Hort. Sci. 1943. N 43. P. 189–194.
- 4. Berninger, E. Contribution a l'étude de la sterilite male de l'oignon (Allium cepa L.) / E. Berninger // Ann. Amelior. Plant. 1965. N 15. P. 183–199.
- 5. Pathak, C. Breeding for the development of onion hybrids in India: problems and prospects / C. Pathak, R. Gowda // Acta Hortic. 1993. N 358. P. 239–242.
- 6. *Schweisguth, B.* Etude d'un nouveau type de sterilite male chez l'oignnon (*Allium cepa* L.) / B. Schweisguth // Ann. Amelion. Plant. 1973. N 23. P. 221–233.
- 7. Havey, M. J. Molecular confirmation that sterile cytoplasm has been introduced into open pollinated cultivars of grano onions / M. J. Havey, O. J. Bark // Am. Soc. Hortic. Sci. 1994. N 119. P. 90–93.
- 8. *Havey, M. J.* Combining abilities for yield and bulb quality among long- and intermediate-day open pollinated onion populations / M. J. Havey, W. M. Randle // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1996. N 121. P. 604–608.
- 9. Определение типа цитоплазматической мужской стерильности лука репчатого (*Allium cepa* L.) селекции ВНИИССОК с помощью молекулярных маркеров / Т.П. Супрунова [и др.] // Овощи России. 2011. N 4 (13). C. 20—21.
- 10. *Enkle, T.* PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.) / T. Enkle, D. Terefe, A. Tatlioglu // Theor. Appl. Genet. 2003. N 107. P. 162–167.
- 11. *Sato, Y.* PCR amplificacion of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes in onion (*Allium cepa* L.) / Y. Sato // Theor. Appl. Genet. 1998. N 96. P. 367–370.
- 12. Identification of two SCAR markers co-segregated with the dominant Ms and recessive ms alleles in onion (*Allium cepa* L.) / Y. Y. Yan [et al.] // Euphytica. Apr. 2013. Vol. 190, Is. 2. P. 267–277.

Поступила в редакцию 19.01.2016