

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM SERA* L.) СЕЛЕКЦИИ ВНИИССОК С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

**Супрунова Т.П.** – канд.с.-х. наук, с.н.с. лаб. биотехнологии

**Логунов А.Н.** – м.н.с. лаб. генетики и цитологии

**Логунова В.В.** – канд. с.-х. наук, с.н.с. лаб. селекции и семеноводства луковых культур

**Агафонов А.Ф.** – канд. с.-х. наук, зав. лаб. селекции и семеноводства луковых культур

ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур Россельхозакадемии

Россия, 143080, Московская область, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14

Тел.: +7(495)599-24-42

E-mail: vniissok@mail.ru

**Впервые проведена оценка отечественных сортообразцов лука репчатого с помощью молекулярных маркеров на признак ЦМС. Выявлен полиморфизм по митохондриальным генам *orfA501* и *cob*. Определены типы цитоплазмы у всех изученных образцов, что в дальнейшем позволит селекционерам сократить время, необходимое для отбора генотипов с определенным типом цитоплазмы и проведения скрещиваний.**

**Ключевые слова:** лук репчатый, цитоплазматическая мужская стерильность, молекулярные маркеры.

## Введение

За последние десятилетия, наряду с традиционными методами селекции, все чаще используется так называемая маркер-вспомогательная селекция (MAS – marker-assisted selection), в основе которой лежит использование молекулярных маркеров. Косвенный отбор на основе методов молекулярного генотипирования делает возможным детектирование желаемых аллелей и генотипов уже на ранних стадиях развития растения, что существенно сокращает и упрощает селекционный процесс.

На сегодняшний день известно два типа цитоплазматической мужской стерильности у лука – CMS-S (Jones and Emsweller, 1963) и CMS-T (Berninger, 1965), которые фенотипически практически неотличимы. Система CMS-S является результатом взаимодействия цитоплазматического фактора S и единичного ядерного гена-восстановителя фертильности (Jones and Clarke, 1943), в то время как CMS-T – более сложно наследуемая система, контролируемая тремя независимо сегрегированными локусами ядерного генома (Berninger, 1965). Благодаря своей устойчивости и стабильности в различных усло-

виях окружающей среды, система CMS-S широко используется селекционерами во всем мире для получения гибридных семян лука (Havey, 2000). Поскольку лук – двулетняя культура, идентификация CMS фактора (или типа цитоплазмы) занимает длительное время (от 4 до 8 лет) при использовании селекционерами традиционных методов генетики и селекции. Поэтому использование ДНК-маркеров, позволяющих различать типы цитоплазмы, является крайне важным для эффективного получения гибридных семян лука на основе мужской стерильности. Зарубежными учеными было разработано несколько молекулярных маркеров на митохондриальные и хлоропластные гены (*orf*, *cob*, *psbA*), обуславливающие ЦМС у лука репчатого и шнитт-лука (Sato, 1998; Engelke et al., 2003; Cho et al., 2006; Kim et al., 2009; Yamashita et al., 2010).

Целью данного исследования было определение типа ЦМС лука репчатого селекции ВНИИССОК с помощью молекулярных маркеров.

## Материалы и методы

В работе было использовано 14 коллекционных образцов лука репчатого (сте-

рильных и фертильных), предоставленных лабораторией селекции и семеноводства луковых культур и лабораторией генетики и цитологии ВНИИССОК. Геномную ДНК выделяли из молодых листьев согласно методике Edwards и др. (1991). Полимеразную цепную реакцию и электрофорез проводили по стандартной процедуре.

## Результаты исследования

Для скрининга образцов лука репчатого селекции ВНИИССОК с целью определения у них типов ЦМС (CMS-S или CMS-T) и отличия их от нормальной, фертильной цитоплазмы (N) нами были использованы праймеры, разработанные учеными ранее (Engelke et al., 2003; Cho et al., 2006; Kim et al., 2009), на гены цитоплазматического генома (*orf725*, *orfA501*, *cob*, и *psbA*). В результате амплификации ПЦР-маркеров полиморфизм между 14-ю образцами лука был выявлен только по митохондриальным генам *orfA501* и *cob* (рис.1). При этом, анализируя комбинацию полученных маркеров, можно определить тип цитоплазмы образцов лука репчатого. Согласно авторам, разработавшим данные ПЦР-маркеры (Sato, 1998; Engelke et al., 2003), если в образце амплифицируется либо

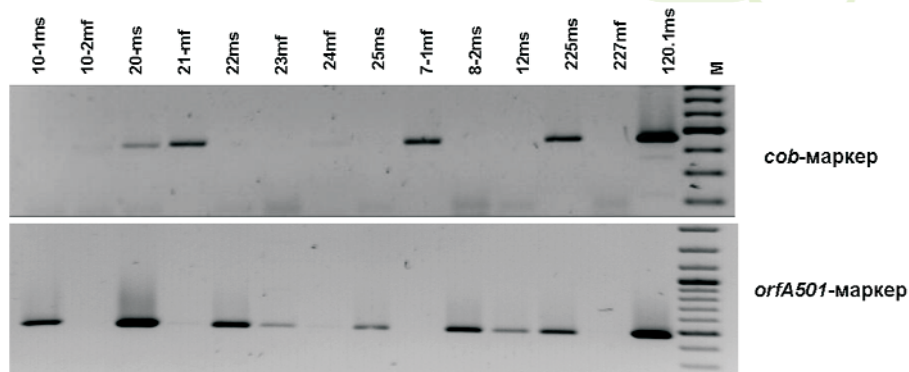


Рис. 1. Результаты амплификации молекулярных ПЦР-маркеров для *cob* и *orfA501* генов у селекционных образцов лука репчатого. Образцы 10-1ms, 20-ms, 22ms, 25ms, 8-2ms, 12ms, 225ms, 120.1ms с фенотипическими признаками мужской стерильности. Образцы 10-2mf, 21-mf, 23mf, 24mf, 7-1mf, 227mf фенотипически фертильны. М – маркер молекулярных весов 100 bp Ladder (Fermentas).

#### Результаты амплификации молекулярных маркеров *cob* и *orfA501* и определение типа ЦМС в образцах лука репчатого

Образцы	<i>cob</i> -маркер	<i>orfA501</i> -маркер	Тип цитоплазмы, согласно молекулярному анализу	Определение стерильности, согласно фенотипическому анализу
10-1ms	–	+	CMS-T	стерильный
10-2mf	–	–	N	фертильный
20ms	–	+	CMS-S	стерильный
21mf	+	–	CMS-S	фертильный
22ms	–	+	CMS-T	стерильный
23mf	–	+	CMS-T	фертильный
24mf	–	–	N	фертильный
25ms	–	+	CMS-T	стерильный
7-1mf	+	–	CMS-S	фертильный
8-2ms	–	+	CMS-T	стерильный
12ms	–	+	CMS-T	стерильный
225ms	+	+	CMS-S	стерильный
227mf	–	–	N	фертильный
120.1ms	+	+	CMS-S	стерильный

Знак «–» означает отсутствие амплификации соответствующего маркера;  
Знак «+» означает наличие амплификации соответствующего маркера.

один *cob*-маркер либо оба маркера на гены *orfA501* и *cob*, то данный генотип стерильный и имеет CMS-S тип цитоплазмы.

Если в образце амплифицируется только маркер на *orfA501*-ген, то данный генотип также стерильный, однако имеет CMS-T тип цитоплазмы. Если в образце отсутствует амплификация обоих маркеров, то данный генотип фертилен и имеет N-цитоплазму.

В таблице представлены суммированные результаты амплификации *cob* и *orfA501*-маркеров, а также анализ комбинаций полученных маркеров и сопоставление их с данными фенотипического анализа стерильности изученных образцов, проведенного сотрудниками лаборатории селекции и семеноводства луковых культур и лаборатории генетики и цитологии ВНИИССОК.

В результате проведенного исследования были установлены типы ЦМС у изученных образцов лука репчатого. При этом, у 11-ти из 14-ти изученных генотипов, результаты молекулярного анализа совпали с результатами фенотипического описания данных образцов по признаку стерильности/фертильности (Таб.1). Оставшиеся три образца – 21mf, 23mf и 7-1mf, согласно молекулярному анализу, имеют CMS-S или CMS-T цитоплазму, но при этом, фенотипически они были фертильными. Мы можем сделать предположение, что данные образцы несут ядерные гены-восстановители фертильности, однако это требует дальнейших исследований.

По результатам молекулярного анализа три образца – 20ms, 225ms и 120.1ms, могут быть рекомендованы для использования их в скрещивании для получения гибридов на основе ЦМС, поскольку они имеют CMS-S тип цитоплазмы, являющейся более простой в наследовании и устойчивой в различных условиях окружающей среды системой мужской стерильности у луков.

#### Литература

- 1) Berninger E. Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). // Ann. Amélior. Plant. – 1965. – V. 15. – P. 183-199.
- 2) Cho K-S., Yang T-J., Hong S-Y., Kwon Y-S., Woo J-G., Park H-G. Determination of cytoplasmic male sterile factors in onion plants (*Allium cepa* L.) using PCR-RFLP and SNP markers. // Mol.Cells. – 2006. – V. 21. – No.3. – P. 411-417.
- 3) Engelke T., Terefe D., Tatlioglu T. A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 107. P. 162-167.
- 4) Edwards K., Johnstone C., and Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19. – P. 1349.
- 5) Havey M.J. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cyto-

plasms of onion. // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 101. – P. 778-782.

6) Jones H.A., Emsweller S.L. A male-sterile onion. // Proc.Amer.Soc.Hort.Sci. – 1963. – V.34. – P. 582-585.

7) Jones H.A. and Clarke A. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. // Proc.Amer.Soc.Hort.Sci. – 1943. – V. 43. – P. 189-194.

8) Kim S., Lee E.T., Cho D.Y., Han T., Bang H., Patil B.S., Ahn Y.K., Yoon M.K. Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing among three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). // Theor. Appl. Genet. – 2009. – V. 118. – P. 433-441.

9) Sato Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 96. – P. 367-370.

10) Yamashita K., Tsukazaki H., Kojima A., Ohara T., Wako T. Inheritance mode of male sterility in bunching onion (*Allium fistulosum* L.) accessions. // Euphytica. – 2010. – V. 173. – P. 357-367.