

Оригинальная статья / Original article

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-15-19>
УДК 635.25:581.16:577.215

Домблидес А.С.

ФГБНУ «Федеральный научный центр
овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО)
143072, Россия, Московская обл., Одинцовский
р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: arthurdom@inbox.ru

Конфликт интересов: Автор заявляет
об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Домблидес А.С.
Поиск генисточников признака стерильности у
образцов лука репчатого с использованием ДНК
маркеров. Овощи России. 2019;(5):15-19.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-15-19>

Поступила в редакцию: 22.09.2019

Принята к печати: 12.10.2019

Опубликована: 25.10.2019

Artur S. Domblides

FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
Selectionaya St. 14, VNISSOK, Odintsovo region,
Moscow oblast, 143080, Russia
E-mail: arthurdom@inbox.ru

Conflict of interest: The author declare
no conflict of interest.

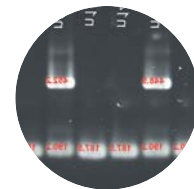
For citation: Domblides A.S. Searching for sterility
genes in bulb onion breeding accessions with the
use of DNA markers. Vegetable crops of Russia.
2019;(5):15-19 (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-15-19>

Received: 22.09.2019

Accepted for publication: 12.10.2019

Accepted: 25.10.2019

Поиск генисточников признака стерильности у образцов лука репчатого с использованием ДНК маркеров



РЕЗЮМЕ

Актуальность. Стерильность является важнейшим качественным признаком, который крайне необходим при получении коммерческих гибридов. Генетические факторы, отвечающие за проявление стерильности, сегодня могут быть определены с использованием ДНК маркеров, где при оценке больших популяций необходима их надежность и эффективность. Оценка существующих систем маркирования позволит определить их возможности при оценке селекционного материала.

Материал и методы. Из литературных источников были взяты наиболее используемые маркеры для определения стерильности и проанализирована их эффективность на 19 селекционных образцах лука репчатого (*Allium cepa* L.).

Результаты. Гены цитоплазмы 5'cob, orf725 and orfA501, влияющие на проявление признака стерильности были идентифицированы у ряда образцов. Аллели локуса восстановителя фертильности Ms были также обнаружены. Четыре селекционных образца имели S тип цитоплазмы, девять образцов показали T тип и шесть образцов были с нормальной цитоплазмой по причине отсутствия генов стерильности. В результате использования набора этих маркеров были выявлены все варианты сочетания аллелей цитоплазмы и ядра: один закрепитель стерильности, стерильная форма, и два восстановителя фертильности. Однако необходимо отметить, что не все маркеры были удобными для поиска генов стерильности. Так, маркеры, разработанные на основе полиморфизма хлоропластной ДНК стерильных растений не дали сходных результатов с анализом митохондриальных генов стерильности. В итоге, показана практическая возможность оценки селекционного материала на наличие генов, отвечающих за проявление признака стерильности с целью поиска линий необходимых для получения гибридов у лука репчатого.

Ключевые слова: *Allium cepa* L., цитоплазматическая мужская стерильность, селекция лука репчатого, ДНК маркеры.

Searching for sterility genes in bulb onion breeding accessions with the use of DNA markers

ABSTRACT

Relevance. Sterility is a very important trait that is indispensable for hybrid production. Genetic factor underlying in plant sterility can be now identified in large plant populations by DNA markers with high effectiveness and reliability. The evaluation of such markers enables to define their current applicability in breeding program.

Methods. The markers from different publications that had been successfully used were taken to test their effectiveness on 19 accessions of bulb onion (*Allium cepa* L.).

Results. Mitochondrial genes 5'cob, orf725 and orfA501 and alleles of fertility restoring locus Ms were also identified. Four breeding accessions had S-cytoplasm, nine accessions were with T-cytoplasm and six shared normal cytoplasm not showing any sterility gene in the analysis. As a result of marker testing, the all compositions of the genes in cytoplasm and Ms alleles in nucleus affecting the sterility had been revealed, such as one sterility maintainer, one male sterile accession, and two fertility restorers. However, it should be noted that not all markers tested were in accordance with each other, where the markers originated from chloroplast DNA of did not confirmed the results obtained with those cytoplasm-origins. As it was shown the practical use of the set of markers makes it possible to reveal necessary accessions with required gene composition for hybrid production in bulb onion.

Keywords: *Allium cepa* L., cytoplasmic male sterility, bulb onion breeding, DNA markers.

Введение

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), заключающаяся в неспособности производить зрелые пыльцевые зерна в силу нарушений в функциях митохондриального генома, уже известна у более 140 видов растений [1]. Мужская стерильность у лука была впервые обнаружена в 1925 году у сорта Italian Red. Jones и Mann в 1963 году [2] определили, что стерильность лука определяется взаимодействиями между цитоплазмой и ядром, где в ядре присутствует ген восстановитель, имеющий две аллели Ms и ms, тогда как в цитоплазме находятся факторы N (норма) или S (стерильность) [3, 4]. Данный тип цитоплазмы рассматривался как ЦМС-S типа. У лука была также обнаружена еще цитоплазма Т типа во французском сорте Jaune paille de Vertus в [5]. Генетический анализ этого типа цитоплазмы показал, что мужская стерильность проявляется при доминантной аллели локуса А или доминантными аллелями локусов В и С, функционирующими комплементарно. Два типа мужской стерильности сегодня используют для получения гибридов F₁, хотя стерильность S типа используют шире, потому что цитоплазма Т типа найдена только в японских и голландских сортах [6]. В итоге, с помощью молекулярных исследований были выявлены две группы типов цитоплазмы: S и М [7]. М группа также включает в себя две группы N и Т. Внутри этих групп наблюдали большую изменчивость, что затрудняло разработку ДНК маркеров для их идентификации. В дальнейшем с использованием метода рестрикционного анализа было показано, что S тип цитоплазмы может отличаться в значительной мере среди популяций лука по всему миру [8]. S тип цитоплазмы настолько отличается от других типов, что вызвало предположение о том, что именно этот тип цитоплазмы образовался в результате межвидового скрещивания, тогда как цитоплазма Т типа образовывалась в результате мутации N цитоплазмы [9]. Однако в группе S типов цитоплазмы изменчивость оказалась незначительной, что дало возможность разработать ДНК маркеры на ПЦР основе, позволяющие отличить S цитоплазму от других типов цитоплазмы [10].

Процесс микроспорогенеза при обеих цитоплазмах протекает по-разному, в цитоплазме S типа мейоз проходит нормально, в типе Т имеются нарушения. При развитии цитоплазмы S типа наблюдается рост незрелой ткани тапетума на стадии тетрад, гипертрофия тапетума на стадии диад, и затем полная задержка развития тапетума [11]. Определение типа цитоплазмы гибридологическим анализом может занять 4-8 лет при тестировании расщепляющихся популяций. ДНК маркеры могут ускорить время идентификации растений, и уже ряд соответствующих молекулярных систем разработан для определения S типа на основе изменчивости митохондриальной [12] и хлоропластной ДНК [10]. В результате были получены ДНК маркеры для определения N, Т и S типов цитоплазмы с использованием последовательности *orfA501*, специфичной для ЦМС лука шнитта [13]. Дополнительное изучение локуса *orfA501* выявило генетическую химерную структуру, включающую ген *sox1* (цитохром с оксидаза субъединица 1) и саму последовательность *orfA501*, которая была определена как химерная последовательность *orf725*. Было показано, что эта последовательность амплифицируется у типов Т и S в отличие от растений с N цитоплазмой [14].

Для поиска локуса Ms в ядерной ДНК, восстанавливающего фертильность, также были разработаны системы маркеров. Локус AOB272, разработанный на основе (RFLP) маркеров, располагался 0.9 cM от Ms локуса на хромосоме 2 [15], другой локус AGF136 занимал противоположное положение [16]. Маркеры OPT и PsAO были разработаны отдельно от вышеупомянутых и также располагались противоположно друг другу на расстоянии 1.5 cM и 6.4 cM от Ms локуса, соответственно [17]. Маркер ACms.1100, выявленный вначале с использованием RAPD анализа, где затем был создан CAPS маркер, располагающийся ближе к Ms локусу, чем OPT маркер [18]. Два других CAPS маркера jnurf05 и jnurf17 были найдены также на основе резуль-

татов RAPD анализа и занимали тесную позицию с Ms локусом на дистанции 0.05 cM [19]. Указанные маркеры показали высокую эффективность в идентификации аллелей локуса Ms в расщепляющихся популяциях, однако нет упоминаний об использовании этих маркеров на большом разнообразии селекционного материала [17, 18, 15, 13]. С помощью cDNA-SRAP анализа был получен маркер WHR240, который позволял идентифицировать ядерные гены восстановители фертильности [20]. Уже с помощью AFLP метода были разработаны еще SCAR маркеры (DNF-566 и RNS-357), соответственно сцепленные с доминантной Ms и рецессивной ms аллелями [21]. Позднее, также на основе этих последовательностей был получен маркер jnurf13, выявляющий замены и вставки в изучаемой последовательности стерильных генотипов [22]. Однако в некоторых случаях были ограничения по широкому использованию разработанных маркеров на разнообразных популяциях лука. На основе нуклеотидной последовательности F1752 [21] были получены маркер AcSKP1 для мультиплексной ПЦР, где в одной реакции можно было различить аллельное состояние Ms гена [23]. Работа по определению типа цитоплазматической мужской стерильности с помощью молекулярных маркеров была уже проведена на ряде образцов селекции ВНИИССОК (ФГБНУ ФНЦО), но в проведенных исследованиях не было оценено аллельное состояние ядерных генов [24]. Все типы цитоплазмы и аллели локуса восстановителя фертильности были также выявлены сортах белорусской селекции, но были рассмотрены не все возможные для использования комбинации маркеров [25]. В нашей работе мы, продолжая изучение стерильности, использовали дополнительные маркеры для гена цитоплазмы *orf725* и для ядерных генов с целью более полной оценки исходного селекционного материала лука репчатого.

Материалы и методы

Для исследования были взяты 19 селекционных образцов лука репчатого (*Allium cepa* L.) лаборатории генетики и цитологии с целью выявления генетических факторов стерильности цитоплазмы и аллелей восстановления фертильности.

Выделение ДНК.

Выделение ДНК проводили из молодых листьев с использованием набора реагентов Сорб-ГМО-Б (Синтол, Россия). ДНК выделяли из индивидуальных растений, от трех до пяти согласно протоколу производителя. Конечную чистоту и концентрацию тотальной ДНК определяли на спектрофотометре Smart Spec Plus (BioRad, USA).

Амплификация ДНК.

Исследование осуществляли с использованием метода стандартной ПЦР с отобранными из литературных источников праймерами для амплификации генов стерильности и восстановления фертильности (табл. 1). Все праймеры были синтезированы компанией Синтол (Россия).

ПЦР проводили в объеме 25 µl, включая 1 x ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого dNTP, 0,3 µM каждого праймера, 1,5 единиц SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия) и 3 µl ДНК. Первоначально ПЦР выполняли при условиях, описанных в литературных источниках, в амплификаторе BioRad C1000 Touch (BioRad, США). В некоторых случаях подбирали более подходящую температуру отжига праймеров для получения более четких фрагментов ДНК.

Продукты амплификации разделяли в 1.7% агарозном геле в 1 x TBE-буфере. Полученные гели окрашивали раствором бромистого этидия и документировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc XRS+ (BioRad, США) с последующей обработкой изображений в программе ImageLab (BioRad, США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс GeneRuler100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

Таблица 1. Гены и маркеры стерильности, использованные в исследовании
Table 1. Genes and markers of sterility used in the study

Маркеры генов стерильности	Цитоплазма		Ядро		
	Стерильная	Нормальная	Гомозигота MsMs	Гетерозигота Msms	Гомозигота msms
<i>orf725</i>	628 п.н.	833 п.н.	-	-	-
<i>5' cob</i>	414 п.н.	180 п.н.	-	-	-
<i>orfA501</i>	473 п.н.	-	-	-	-
<i>AcSKP1</i>	-	-	898 п.н.	898 п.н. и 628 п.н.	628 п.н.
<i>DNF-566, RNS-357</i>	-	-	566 п.н.	566 п.н. и 357 п.н.	357 п.н.

Таблица 2. Результаты исследований, полученные при использовании пяти маркеров для определения стерильности у лука репчатого.
Table 2. Results obtained with the use of five markers for determination of sterility in bulb onion

Образец	<i>orf725</i>	<i>5'cob</i>	<i>orfA501</i>	Цитоплазма	<i>AcSKP1</i>	<i>DNF-566, RNS-357</i>
	Показания маркеров цитоплазмы				Показания маркеров ядра	
№1 образец_5 msx3f	F	F	S	Цит. Т-тип	MsMs	MsMs
№2 образец_3f	F	F	F	Фертильная	Msms	Msms
№3 образец_7 msx16f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№4 образец_16f	S	S	S	Цит. S-тип	MsMs восстановитель	MsMs
№5 образец_10msx30f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№6 образец_30f	F	F	F	Фертильная	Msms	Msms
№7 образец_19 msx24f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№8 образец_24 f	F	F	F	Фертильная	Msms	Msms
№9 образец_33 ms x26f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№10 образец_26f	F	F	F	Фертильная	Msms	Msms
№11 образец_34msx31f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№12 образец_31f	F	F	F	Фертильная	Msms	Msms
№13 образец_39стер x 8f	S	S	S	Цит. S-тип	ms ms стерильная	msms
№14 образец_8f	F	F	F	Фертильная	ms ms закрепитель	msms
№15 образец_51 msx11f	F	F	S	Цит. Т-тип	MsMs	MsMs
№16 образец_11f	S	S	S	Цит. S-тип	MsMs восстановитель	MsMs
№17 образец_65msx52f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms
№18 образец_52f	S	S	S	Цит. S-тип	Msms	Msms
№19 образец_115ms x139f	F	F	S	Цит. Т-тип	Msms	Msms

Результаты и обсуждения

Проявление стерильности и фертильности растения зависит от сочетания факторов фертильности и стерильности цитоплазмы и ядерных аллелей *Ms* и *ms*. Так, ген в доминантном состоянии *Ms* восстанавливает фертильность растения, даже если в цитоплазме присутствует фактор стерильности. Два маркера, разработанные на последовательности генов *5'cob* и *orfA501*, позволили разделить растения с Т типом и S типом цитоплазмы на наших образцах, где размер ПЦР продукта полностью соответствовал полученным с использованием этих маркеров предыдущих результатов. Маркеры для гена *sox1*, где один прямой праймер и два обратных праймера для химерного гена *orf725*, вызывающего стерильность и последовательности нормального *sox1* гена, показали при амплификации полное соответствие с другими использованными маркерами. Данные маркеры позволили определить типы цитоплазмы у образцов лука. Продукты амплификации, полученные в результате анализа, полностью совпадали с ранее опубликованными в литературных источниках (Табл. 1). Так, у 9 образцов наблюдали цитоплазму Т типа, при которой амплифицировался только локус *orfA501*, у четырех образцов цитоплазму S типа, где наблюдали совместную амплификацию продуктов последовательности *orf725*, *5'cob* и *orfA501* генов (Рисунок 1 А, Б, В), и у шести образцов N цитоплазмы, в которой не было обнаружено митохондриальных генов стерильности. Недавними исследованиями по расшифровке последовательностей митохондриальной ДНК показано, что химерный ген *orf725* является отличительной особенностью стерильной цитоплазмы, где последовательности, отвечающие за цитоплазму S

типа, оказались генетически очень изменчивыми, в то время как цитоплазма Т типа была генетически очень сходна с нормальной [26].

Для определения ядерных генов – восстановителей фертильности наиболее удобной системой оказался маркер *AcSKP1* по сравнению с другими (данные не представлены), где в ходе мультиплексной ПЦР (определение двух последовательностей в одной реакции) были выявлены рецессивные и доминантные аллели гена *Ms* (Рисунок 2А). Еще один маркер также успешно выявлял аллели локуса восстановителя фертильности (*Ms*), где фрагмент размером 566 п.н. был связан с *Ms* аллелью, а фрагмент размером 357 п.н. амплифицировался при наличии *ms* аллели (Рисунок 2Б). Растения под номерами 4 (16f), 16 (11f), 18 (52f) имели фертильную пыльцу, а ДНК маркеры подтверждали в них наличие генов стерильности цитоплазмы, но в ядре, как показал ДНК анализ, у них присутствовал как минимум один аллель восстановитель фертильности в доминантном состоянии, который восстанавливал фертильность растений. Все растения с предполагаемой цитоплазмой Т типа, также имели доминантную аллель *Ms* в ядре, что вело к нормальному развитию пыльцы при наличии фактора стерильности в цитоплазме. Таким образом, были выявлены: один образец закрепитель стерильности с нормальной цитоплазмой и генами ядра в рецессивном состоянии (N-цит, *msms*); один стерильный образец (S-цит, *msms*); и два образца восстановителя фертильности (S-цит, *MsMs*) (Таблица 2). Эти селекционные образцы могут быть рекомендованы для дальнейшей селекции при получении гибридных форм. В исследованиях по изучению нуклеотидной последовательностей хлоропластного генома стерильных и фертильных растений лука репчатого были най-

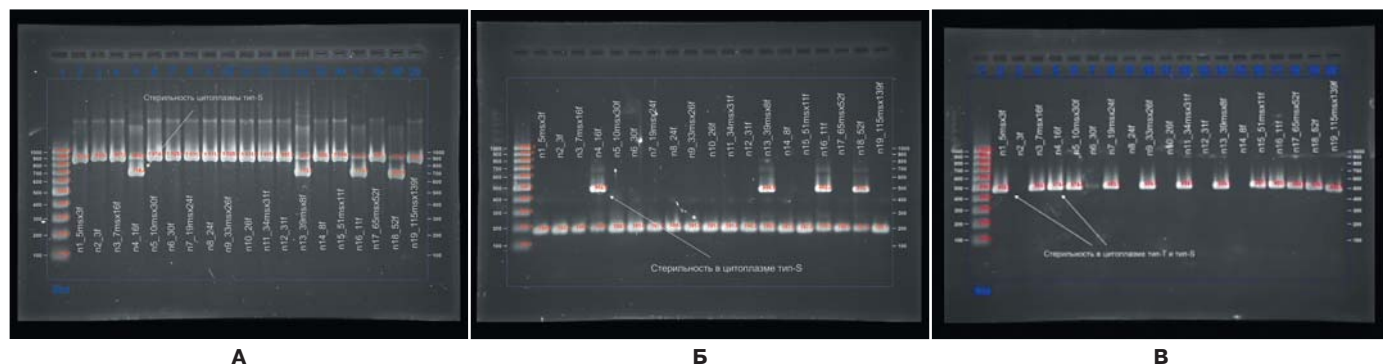


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации митохондриальных генов, отвечающих за проявление стерильности у лука репчатого: А-*orf725* [14], Б – *5'cob* [12], В – *orfA501* [13]
Fig. 1. Electrophoregrams of PCR fragments of amplification of mitochondrial genes, responsible for sterility in onion А-*orf725* [14], Б – *5'cob* [12], В – *orfA501* [13]

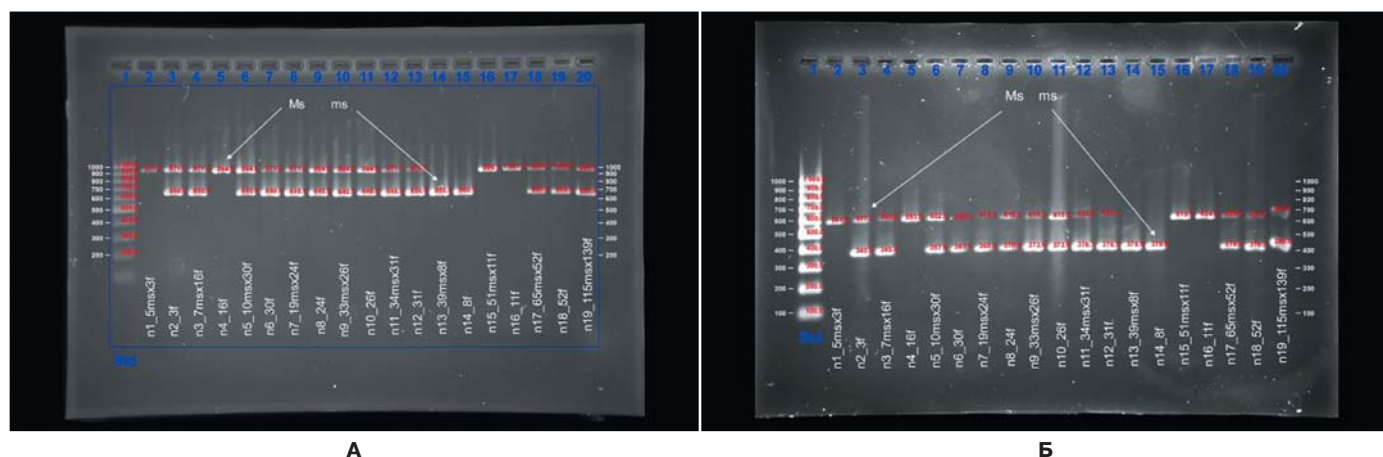


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов мультиплексной амплификации ядерных генов, восстановителей фертильности у образцов лука: А- маркер *AcSKP1* [23]; Б – маркеры *DNF-566* и *RNS-357* [21]
Fig. 2. Electrophoregrams of multiplex PCR of nuclear gene restoring fertility in onion А- marker *AcSKP1* [23]; Б – marker *DNF-566* and *RNS-357* [21]

дены различия, которые легли в основу создания дополнительных ДНК маркеров [27]. Так, маркер *accD* хлоропластной ДНК, позволяющий идентифицировать цитоплазму S и T типов, как было уже показано ранее [28], в наших исследованиях выявил различия между стерильными и фертильными образцами, которые не совпадали с результатами, полученными с уже протестированными маркерами для цитоплазмы этих же образцов.

В результате проведенных исследований удалось выявить необходимые для получения гибридов селекционные образцы на основе данных молекулярного анализа с использованием относительно небольшого набора ДНК маркеров митохондриальных и ядерных генов, отвечающих за проявление признака стерильности у лука репчатого.

Об авторе:

Домблидес А.С. – кандидат с.-х. наук, зав. лабораторией генетики и цитологии
<https://orcid.org/0000-0002-5617-9498>

About the author:

Artur S. Domblides – Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Genetics and Cytology
<https://orcid.org/0000-0002-5617-9498>

• Литература / References

- Hanson M.R. Phylogenetic relationship among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. *Theor. Appl. Genet.* 1991;81:752-757. DOI: 10.1007/BF00224985
- Jones, H.A., and Mann, L.K. *Onion and their Allies*. Leonard Hill Ltd, 1963, London, pp 286.
- Jones H.A., Clarke A.E. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 1943;43:189-194.
- Kaul, M.L.Y. Male sterility in higher plants, *Monogr in Theor. Appl. Genet*, 1988, Vol. 9, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1005. DOI: 10.1007/978-3-642-83139-3
- Berninger E. Contribution a l'etude de la sterilité de male de l'oignon (*Allium cepa* L.). *Ann. Amélior. Plant (Paris)* - 1965. – V.23. – P. 183-199.
- Havey M. J. Diversity among male-sterility inducing and male-fertile cytoplasms of onion. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:778-782. DOI: 10.1007/s001220051543
- De Courcel A.G.L., Vedel F., Boussac J. M. DNA polymorphism in *Allium cepa* cytoplasms and its implications concerning the origin of onions. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77:793-798. DOI: 10.1007/BF00268328
- Havey M.J. A putative donor of S-cytoplasm and its distribution among open-pollinated population of onion. *Theor. Appl. Genet.* 1993;86:128-134. DOI: 10.1007/BF00223817
- Holford P., Croft J.H., Newbury H.J. Differences between, and possible origins of the cytoplasms found in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1991a;82:737-744. DOI: 10.1007/BF00227319
- Havey M.J. Identification of cytoplasms using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.* 1995;90:263-268. DOI: 10.1007/BF00222212
- Holford P., Croft J.H., Newbury, H.J. Structural studies of microspogenesis in fertile and male sterile onions (*Allium cepa* L.) containing the CMS-S cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 1996b;82:745-755. DOI: 10.1007/BF00227320
- Sato Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:367-370. DOI: 10.1007/s00122-003-1230-3
- 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;107:162-167. DOI: 10.1007/s00122-003-1230-3
- Kim S., Lee E., Cho D. Y., Han T., Bang H., Patil B. S., Ahn Y. K., and Yoon M. Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:433-441. DOI: 10.1007/s00122-008-0909-x
- Gökçe A.F., Havey M.J. Linkage equilibrium among tightly linked RFLPs and the Ms locus in open-pollinated onion populations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2002;127:944-946. DOI: 10.21273/JASHS.127.6.944
- Martin W.J., McCallum J., Shigyo M., Jakse J., Kuhl J.C., Yamane N., Pither-Joyce M., Gökçe A.F., Sink K.C., Town C.D., Havey M.J. Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Mol. Genet. Genomics.* 2005;274:197-204. DOI: 10.1007/s00438-005-0007
- Bang H., Cho D.Y., Yoo K.S., Yoon M.K., Patil B.S., Kim S. Development of simple PCR-based markers linked to the Ms locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 2011a;179:439-449. DOI: 10.1007/s10681-010-0342-5
- Bang H., Kim S., Park S.O., Yoo K.S., Patil B.S. Development of a codominant CAPS marker linked to the Ms locus controlling fertility restoration in onion (*Allium cepa* L.). *Sci. Hortic.* 2013;153:42-49. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.01.020
- Park J., Bang H., Cho D., Yoon M.-K., Patil B., Kim S. Construction of high-resolution linkage map of the Ms locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*. 2013;192:267-278. DOI: 10.1007/s10681-012-0851-5
- Huo Y.M., Miao J., Liu B.J., Yang Y.Y., Zhang Y.H., Wu X. The expression of pectin methylesterase in onion flower buds is associated with the dominant male-fertility restoration allele. *Plant. Breed.* 2012;131:211-216. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2011.01907.x
- Yang Y.Y., Huo Y.M., Miao J., Liu B.J., Kong S.P., Gao L.M., Liu C., Wang Z.B., Tahara Y., Kitano H., Wu X. Identification of two SCAR markers co-segregated with the dominant Ms and recessive ms alleles in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*. 2013;190:267-277. DOI: 10.1007/s10681-012-0842-6.
- Kim S. A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (Ms) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. *Mol. Breed.* 2014;34:769-778. DOI: 10.1007/s11032-014-0073-8
- Huo, Y.M., Liu, B.J., Yang, Y.Y., Miao J., Gao L.M., Kong S.P., Wang Z.B., Kitano H., Wu X. AcSKP1, a multiplex PCR-based co-dominant marker in complete linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (Ms) locus, and its application in open-pollinated populations of onion. *Euphytica*. 2015;204:711. DOI: 10.1007/s10681-015-1374-7
- Супрунова Т.П., Логунов А.Н., Логунова В.В., Агафонов А.Ф. Определения типа цитоплазматической мужской стерильности лука репчатого (*Allium cepa* L.) селекции ВНИИССОК с помощью молекулярных маркеров. *Овощи России*. 2011;(4):20-21. [Suprunova T.P., Logunov A.N., Logunova V.V., Agafonov A.F. Determination of cytoplasmic male sterile factors in onion plants (*Allium cepa* L.) of VNIISOK's breeding. *Vegetable crops of Russia*, 2011;(4):20-21. (In Russ.)]
- Павлова И.В., Купреенко Н.П., Булахова А.С. Использование ДНК маркеров для изучения цитоплазматической мужской стерильности лука репчатого (*Allium cepa* L.). *Овощи России*. 2018;(4):16-19. DOI: 10.18619/2072-9146-2018-4-16-19. [Pavlova I.V., Kupreenko N.P., Bulahova A.S. DNA markers in onion (*Allium cepa* L.) cytoplasmic male sterility study. *Vegetable crops of Russia*. 2018;(4):16-19. (In Russ.) DOI: 10.18619/2072-9146-2018-4-16-19]
- Kim, B., Yang, T.J. & Kim, S. Identification of a gene responsible for cytoplasmic male-sterility in onions (*Allium cepa* L.) using comparative analysis of mitochondrial genome sequences of two recently diverged cytoplasms. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132:313. DOI: 10.1007/s00122-018-3218-z
- Von Kohn C., Kielkowska A., Havey M.J. Sequencing and annotation of the chloroplast DNAs and identification of polymorphisms distinguishing normal male-fertile and male-sterile cytoplasms of onion. *Genome*. 2013;56:737-742. DOI: 10.1139/gen-2013-0182
- Khar A., Saini N. Limitations of PCR-based molecular markers to identify male-sterile and maintainer plants from Indian onion (*Allium cepa* L.) populations. *Plant. Breed.* 2016;135(4):519-524. DOI: 10.1111/pbr.12373