

Применение метода молекулярно-генетического анализа для выявления растений моркови с цитоплазмой типа «петалоид»



А.В. Чистова

Метод молекулярно-генетического маркирования позволяет проводить скрининг коллекции исходного материала по типу цитоплазмы. Дифференциация растений моркови по типу цитоплазмы имеет большое практическое значение при выборе растительного материала для создания новых линий-закрепителей стерильности. Мужская стерильность моркови контролируется ядерно-цитоплазматически, и растения с «петалоидной» цитоплазмой могут иметь фертильный фенотип за счет генов ядра. Однако попытка получить закрепитель стерильности из такого растения обречена на неудачу, при том что будет потрачено много времени и труда. В связи с этим целесообразно на ранних этапах селекции проводить молекулярно-генетический анализ коллекции растений с помощью рекомендованных в научной литературе праймеров, и отобрать образцы с нормальной цитоплазмой. Для этого использовали праймеры, разработанные Inga C. Bach с соавторами (2002). Эффективным оказалось применение трех пар праймеров *smt-1* и *smt-2* (длины амплифицированных фрагментов 320 и 390 п.н.), *atr1-d1* и *smt-3* (размер ПЦР продуктов 1630 п.н.), *atr1-d1* и *smt-4* (1608 п.н.). С их помощью был проведен скрининг коллекции ООО «Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева» и отобраны растения для дальнейшей селекционной работы. Среди изученных F_1 гибридов были выявлены стерильные растения с цитоплазмой типа «петалоид», фертильные растения с петалоидной цитоплазмой и фертильные растения с нормальной цитоплазмой. Чрезвычайно полезной была бы возможность с помощью молекулярно-генетического маркирования определять наличие ядерных генов стерильности моркови и гомозиготность. Однако при проведении данной работы применение соответствующих праймеров было не результативно. Так что традиционные методы селекции для решения этой задачи остаются незаменимыми.

Ключевые слова: морковь, ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность, петалоид, молекулярно-генетическое маркирование.

Гибридное семеноводство моркови ведут на трехлинейной основе, которая предполагает наличие мужски стерильной материнской линии и фертильной отцовской линии [1]. Такая схема позволяет получать с растений мужски стерильной материнской линии F_1 -гибридные семена без примеси семян от самоопыления. Часто используют ядерно-цитоплазматическую мужскую стерильность моркови типа «петалоид», при которой у цветков вместо тычинок формируется дополнительный круг лепестков. Для размножения мужски стерильной линии необ-

ходима линия-закрепитель стерильности. Процесс создания изогенной пары «мужски стерильная линия – закрепитель стерильности» представляет большую сложность.

Механизм наследования ядерно-цитоплазматической мужской стерильности моркови изучали неоднократно, однако исследователи не пришли к общему мнению. В различных публикациях показано, что она контролируется фактором стерильности в цитоплазме и двумя или тремя генами ядра [2], причем минимум один из них доминантный. M.S. Alessandro с соавторами (2012) [3]

пишут, что мужская стерильность моркови типа «петалоид» контролируется одним доминантным геном ядра, расположенным на девятой хромосоме, и предлагают кодоминантный маркер для дифференциации растений.

В качестве закрепителя стерильности необходимо использовать только растение – гомозиготу по обеспечивающим стерильность генам ядра, но с нормальной цитоплазмой. При выборе исходного материала для поиска таких растений полезно было бы сразу исключать растения со стерильной цитоплазмой, так как такие растения могут быть фертильными за счет генов ядра, но получить на их основе фертильный аналог материнской линии не получится. Для анализа качества цитоплазмы моркови Inga C. Bach с соавторами (2002) [4] разработали ряд праймеров.

В данной работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа растений моркови из коллекции ООО «Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева». Цель работы состояла в оценке эффективности применения метода молекулярно-генетического маркирования для отбора исходного материала для создания новых линий-закрепителей стерильности моркови.

Материалы и методы. Морковь выращивали в поле с применением общепринятых агротехнических мероприятий, корнеплоды хранили при пониженной температуре, затем высадили в теплицу для цветения. Из отрастающих листьев выделили ДНК согласно СТАВ-методу Murray & Thompson (1980) [5]. Чтобы проверить работу праймеров, в качестве образцов выбрали два растения мужски-стерильной линии (образцы № 1 и 3), два растения линии-закрепителя стерильности (образцы № 2 и 4) и четыре растения с неизвестными-

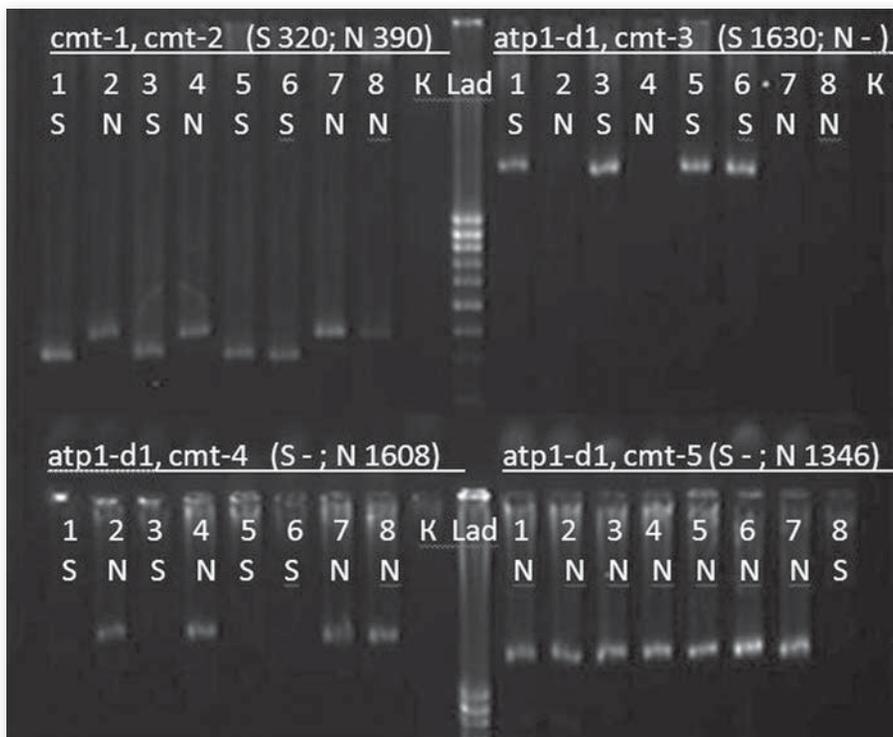


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации: 1, 3 – мужски стерильные линии; 2, 4 – линии – закрепители стерильности; 5–8 – растения с неизвестным статусом; К – отрицательный контроль (вода); Lad – маркер молекулярного веса; S – стерильная, N – нормальная цитоплазма согласно показаниям праймеров; над чертой указаны наименования пар праймеров, в скобках – ожидаемая длина амплифицированных фрагментов

ми генотипом и качеством цитоплазмы. ПЦР проводили по стандартной методике с использованием опубликованных пар праймеров при условиях, описанных в тех же публикациях.

Результаты. При использовании праймеров, рекомендованных M.S.

Alessandro с соавторами (2012), к сожалению, не происходило накопления амплифицированных фрагментов. Так что выявить растения-гомозиготы по ядерным генам стерильности с помощью молекулярно-генетического анализа не удалось.



Рис. 2. Соцветия мужски стерильного (слева) и фертильного (справа) растений моркови

Праймеры, рекомендованные Inga C. Vach с соавторами (2002) позволили успешно дифференцировать растения по типу цитоплазмы. На фотографии (**рис. 1**) представлены результаты электрофореза. Пары праймеров cmt-1 и cmt-2, atp1-d1 и cmt-3, atp1-d1 и cmt-4 показали аналогичные результаты: образцы 1, 3, 5, 6 имеют стерильную цитоплазму, образцы 2, 4, 7, 8 обладают нормальной цитоплазмой. Пара праймеров atp1-d1 и cmt-5 показала другой результат, ложный для образцов с известным типом цитоплазмы № 1, 2, 3, 4 и не подходит для скрининга коллекций моркови. Пары праймеров cmt-1 и cmt-2, atp1-d1 и cmt-3, atp1-d1 и cmt-4 в дальнейшем были использованы для скрининга коллекции селекционной станции (**табл.**).

Использование этих трех пар праймеров подтвердило тип цитоплазмы всех проанализированных растений мужски стерильной линии и растений линии-закрепителя стерильности. По результатам анализа этих растений был сделан вывод о пригодности данного метода для оценки растений моркови.

У всех растений F₁-гибрида Намибия была выявлена стерильная цитоплазма, и в дальнейшем наблюдали проявление мужской стерильности типа «петалоид». Все проанализированные растения гибридов F₁ Волкано, F₁ Меркури, F₁ Аурантина, и популяции Идеал показали нормальную цитоплазму и фертильность.

Большой интерес представляют растения популяции Санта Круз. Те растения, в которых выявлена нормальная цитоплазма, ожидаемо оказались фертильными, а растения со стерильной цитоплазмой были мужски стерильными по типу «петалоид».

Среди растений F₁ Норвегия также были фертильные и стерильные формы (**рис. 2**). Однако все они обладают стерильной цитоплазмой, т.е. пытаться получить из фертильных растений закрепитель стерильности нет смысла, гомозиготы по генам стерильности будут петалоидными.

При анализе растений F₁ гибрида Нактон выявлено три типа генотипов: 1) фертильные растения со стерильной цитоплазмой; 2) стерильные растения со стерильной цитоплазмой и 3) фертильные растения с нормальной цитоплазмой, которые могут служить исходным материалом для создания новой линии-закрепителя стерильности.

Результаты молекулярно-генетического анализа и фенотип растений коллекции моркови. Москва, 2018 год

Генотип	Число растений	Тип цитоплазмы согласно молекулярно-генетическому анализу	Фенотип растения
Линия МС	6	Петалоид	Петалоид
Линия Зс	6	Фертильная	Фертильные
F ₁ Намибия	11	Петалоид	Петалоид
F ₁ Волкано	4	Фертильная	Фертильные
F ₁ Меркурио	3	Фертильная	Фертильные
F ₁ Аурантина	2	Фертильная	Фертильные
Идеал	5	Фертильная	Фертильные
Санта Круз	3	Фертильная	Фертильные
	2	Петалоид	Петалоид
F ₁ Норвегия	3	Петалоид	Фертильные
	7	Петалоид	Петалоид
F ₁ Нактон	3	Петалоид	Петалоид
	7	Петалоид	Фертильные
	2	Фертильная	Фертильные

Выводы. Таким образом три пары праймеров *cmt-1* и *cmt-2*, *atp1-d1* и *cmt-3*, *atp1-d1* и *cmt-4*, предложенных I.C. Bach с соавторами (2002) показали высокую эффективность для выявления фактора стерильности в цитоплазме типа «петалоид» и могут быть использованы в селекции.

Библиографический список

1. Леунов В.И., Ховрин А.Н., Корнев А.В., Михеев Ю.Г. Производство, селекция и семеноводство моркови // Картофель и овощи. 2014. № 3. С. 34–36.
2. Селянин И.Г. Исходный материал для селекции четырехлинейных гибридов F₁ столовой моркови в условиях Западной Сибири: дис. ... канд. с.-х. наук. М., 2002. 165 с.
3. Alessandro M.S., Galmarini C.R., Iorizzo M., Simon P.W. Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot // Theor. Appl. Genet. 2012. No 2. P. 126.
4. Bach I.C., Olesen A., Simon P.W. PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.) // Euphytica. 2002. No 127. Pp. 353–365.
5. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. No 8. Pp. 4321–4325.

Об авторе

Чистова Анастасия Викторовна – канд. с.-х. наук, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 8–977–870–55–34. E-mail: chistovan@mail.ru.

Identification of carrot plants with «petaloid» cytoplasm by molecular markers

A.V. Chistova, PhD, assistant of the department botany, plant breeding and seed technology, RSAU-MAA; tel. 8–977–870–55–34; e-mail: chistovan@mail.ru.

Summary. The method of molecular genetic marking can be used to differentiate car-

rot plants by the type of cytoplasm. It has a great practical importance for the plant material selection for new sterility fixers creation. Carrots male sterility has a nuclear-cytoplasmic control, plants with a «petaloid» cytoplasm can be fertile due to nuclear genes. But the attempt of using such plants to obtain a fixer of sterility is doomed to failure, and a lot of time and labor will be lost. One can select plants with normal cytoplasm at the early stages of breeding by the molecular-genetic primers using. To achieve this aim, primers developed by Inga C. Bach et al. (2002) were applied. The application of three pairs of primers was effective. These primers are: 1) *cmt-1* and *cmt-2* (lengths of amplified fragments 320 and 390 bp), 2) *atp1-d1* and *cmt-3* (size of PCR products 1630 bp), 3) *atp1-d1* and *cmt-4* (1608 bp). Through the application of these primers, the collection of carrots of Breeding station after N.N. Timofeev was screened. The application of this method allowed to select plants for subsequent breeding process. Carrot plants of F₁-hybrids were examined. Among them were found: 1) sterile plants with a cytoplasm of the «petaloid» type, 2) fertile plants with a «petaloid» cytoplasm and 3) fertile plants with a normal cytoplasm. It would be incredibly useful to determine the presence of nuclear carrot sterility genes and homozygosity by the instrumentality of molecular-genetic marking. However, traditional methods of plant breeding remain indispensable. Howbeit, carrot plants with petaloid or normal cytoplasm can be detected by primers using.

Keywords: carrot, petaloid male sterility, molecular-genetic marking.

Пётр Фёдорович Кононков



Исполнилось 90 лет Петру Фёдоровичу Кононкову – известному ученому в области овощеводства, семеноведения и интродукции овощных культур. Его работы посвящены физиолого-селекционным исследованиям по интродукции культур, нетрадиционных для России, но отличающихся высоким содержанием биологически активных веществ. Он вывел первые отечественные сорта салата спаржевого, стахиса, креса водяного, дайкона, амаранта и многих других.

Пётр Фёдорович – один из ведущих соавторов активно развивающегося сегодня направления – селекции овощных культур на повышенное содержание биологически активных веществ и антиоксидантов.

Многогранная деятельность П.Ф. Кононкова в развитии овощеводческой науки по достоинству оценена высокими правительственными наградами СССР, России, Монголии, а также медалями и почетными грамотами.

Коллектив Федерального научного центра овощеводства, редакция журнала «Картофель и овощи», ученые и практики АПК России сердечно поздравляют Петра Фёдоровича с юбилеем, желают крепкого здоровья, неиссякаемой жизненной энергии, дальнейших успехов в научном творчестве.