

Молекулярные маркеры в селекции лука репчатого

Р.Р. Алижанова, С.Г. Монахос, Г.Ф. Монахос

Исследования проведены в 2016–2018 годах в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Целью исследования являлась оценка эффективности известных молекулярных маркеров различных типов цитоплазмы CMS-S, CMS-T и N, гена закрепителя стерильности и восстановителя фертильности и гена, контролирующего устойчивость к переноспорозу. Рекомендованные в научной литературе молекулярные маркеры *orfA501* и *5» sob* позволяют дифференцировать растения лука репчатого по трем типам цитоплазмы – CMS-S, CMS-T и N-цитоплазма. В нашем исследовании с использованием этих двух маркерных систем установлены типы цитоплазмы всех проанализированных растений с мужской стерильностью. У шести образцов выявлена CMS-S цитоплазма, у четырех образцов CMS-T и два образца обладали нормальной (N) цитоплазмой. Для создания линий закрепителей стерильности необходимо использование образцов с N-цитоплазмой, так как они должны обладать генотипом *Nmsms*. При классическом способе используют анализирующие скрещивания, где в качестве тестера берут стерильные растения с генотипом *Smsms* или *Tmsms*. И по потомству полученных F_1 гибридов судят о генотипе опылителя. Это требует как минимум 4 года работы. С помощью маркера *Jnurf 13* проводят генотипирование на аллельное состояние локуса закрепления стерильности (*msms*) у растений с N-цитоплазмой, что сокращает процесс создания закрепителей стерильности в 4 раза. Доказано, что полная устойчивость *Allium roylei* к переноспорозу контролируется одним доминантным геном *Pd1*. Маркер *DMR1* выявляет наличие гена устойчивости *Pd1* к ложной мучнистой росе. ПЦП-анализ с маркером *DMR1* показал, что у устойчивого гибрида F_1 *Santero* ген устойчивости находится в гетерозиготном состоянии, у восприимчивых сортов *Денсити* и *Кенди* – в рецессивной гомозиготы. В потомствах растений *Sx* (*SxДенс*) и *Sx* (*SxКенди*) наблюдали расщепление на устойчивые и восприимчивые, а среди устойчивых выявлены гомо- и гетерозиготные по гену *Pd1*.

Ключевые слова: лук репчатый, ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность, молекулярно-генетическое маркирование, ядерный ген, переноспороз, ген устойчивости *Pd1*.

Лук сегодня одна из важнейших овощных культур во всем мире. В РФ площадь под луком в товарном производстве в 2017 году составила 25,3 тыс. га, а валовой сбор – 1134,8 тыс. т при урожайности 44,8 т/га. За период с 2001 года урожайность выросла в 6,2 раза. Это связано с использованием современных технологий, в основе которых лежит переход от сортов к F_1 гибридам. Работа по созданию современных гибридов проводится с использованием линий, обладающих ядерно-цитоплазматической мужской стерильностью (ЯЦМС), необходимой для гибридного семеноводства лука.

Мужскую стерильность классифицируют на два типа: CMS-S Clark, Jones (1943), CMS-T Beringer (1965) [1, 2].

Сначала в 1925 году стерильное растение с CMS-S цитоплазмой было выявлено у сорта *Italian Red* [3], у которого она контролировалась взаимодействием, вызывающей стерильность цитоплазмы и ядерного гена восстановителя *Ms/ms* в рецессивном состоянии (*msms*). Позже в 1960 году во французском сорте *Jaune Paillede Vertus* выявили CMS-T цитоплазму [2]. Фертильность растений с такой цитоплазмой восстанавливается двумя независимыми системами восстановителей. Первая состоит из одного локуса *A* с двумя аллелями, а вторая из двух комплексно действующих локусов *B* и *C*. Доминантные аллели во всех системах являются восстановителями фертильности, а рецессивные –

закрепителями стерильности [4]. Фенотипически стерильные растения с S- и T- цитоплазмой различить невозможно, что затрудняет их использование в селекции.

Для идентификации типа ЦМС у лука репчатого зарубежными исследователями разработана система молекулярных маркеров [5].

Sunggil Kim в 2013 году разработал молекулярные маркеры для определения гена закрепителя стерильности/восстановителя фертильности [6, 7]. Он обнаружил, что маркер *Jnurf-13* сцепленный с локусом *Ms* для системы CMS-S идеально маркировал этот же локус у системы CMS-T. Эти результаты исследования противоречат предыдущей модели восстановления фертильности в системе CMS-T.

Предложенная система маркеров позволяет существенно снизить число индивидуальных скрещиваний со стерильным тестером из тесткроссов и облегчить отбор желаемых растений с генотипом закрепителя стерильности *Nmsms*.

Цель нашего исследования: оценка эффективности известных молекулярных маркеров различных типов цитоплазмы CMS-S, CMS-T и N, гена закрепителя стерильности/восстановителя фертильности и гена, контролирующего устойчивость к переноспорозу.

Условия, материалы и методы исследований. Исследования проведены в 2016–2018 годах в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. В работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа растений лука репчатого из коллекции ООО «Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева», а также современные F_1 гибридов зарубежной селекции – *Сантеро*, *Медуза*, *Роухай*, *Ятоба*, *Барита* и др. Для анализа растений использовали маркеры, предложенные Т. Engelke с соавторами (2002) для дифференциации типов цитоплазмы, S. Kim (2013) – на ген закрепитель стерильности, а также

Таблица 1. Дифференциация (N) -, (T) -, и (S) -типов цитоплазм при сочетании маркеров 5» cob и orfA501

Тип цитоплазмы	5» cob		orfA501 473 п.н.
	180 п.н.	414 п.н.	
(N)	+	-	-
(T)	+	-	+
(S)	(+)	+	+

Примечание: + есть целевой фрагмент, - нет целевого фрагмента

Таблица 2. Результаты молекулярно-генетического и фенотипического анализа растений коллекции лука репчатого, Москва, 2018 год

Генотип	Число растений	Число растений по фенотипу		Тип цитоплазмы согласно молекулярно-генетическому анализу
		стерильные	фертильные	
Сантеро	6	6		T
Ятоба	6	4	2	S
Барита	11	11		T
Роухай	4	4		S
ЛФК	3	1	2	S
Брекстоун	2	2		S
Шлт	5		5	N
МсБн	3	3		T
Медуза	2	2		S
Олоросо	3	3		S
[Бн1-12xВал 1-8] 1	7		7	N
Снайпер	2		2	S
Салатный	5	5		T

маркеры DMR на ген устойчивости к пероноспорозу Pd1.

Лук репчатый выращивали в условиях открытого грунта или пле-

ночной теплицы, соблюдая традиционные методы ухода с применением общепринятых агротехнических мероприятий, луковицы хранили



Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации и дифференциация образцов по типу цитоплазмы (CMS-S, CMS-T и N) с использованием маркеров orfA501 и 5»cob

при пониженной температуре, затем растения высаживали в теплицу, где они стрелковались и цвели. Из отрастающих молодых листьев выделяли ДНК согласно СТАВ-методу Murray&Thompson [8]. ПЦР проводили по методикам, описанным в публикациях авторами молекулярных маркеров.

МаркерorfA501T-цитоплазмы (ожидаемый фрагмент 473 п.н.) амплифицировали с праймерами 5'-ATGGCTCGCCTTGAAGAGAGAC-3» и 5'-CCAAGCATTTGGCGCTGAC-3»при температуре отжига 60 °С. Маркер5»cobS-цитоплазмы амплифицировали с использованием прямого праймера 5'-GTCCAGTTCSTATAGAACSTATCACT-3», (ожидаемый фрагмент 414 п.н.), маркер нормальнойN-цитоплазма, характеризующийся длиной фрагмента180 п.н.,- с прямым праймером5'-TCTAGATGTCGCATCAGTGGAAATCC-3» и использованием общего обратного праймера5'-CTTTTCTATGGTGACAACCTCCTCTT-3»при температуре отжига 53 °С.

Для определения гена закрепителя стерильности нами был выбран маркер Jnurf-13 [7]. Праймеры для Jnurf-13 это 5'-TTGCCAAAGTTGCAATACA-3» и 5'-TGCAAGCTTGGAACTTACG-3», температура отжига 57 °С, ожидаемый для доминантного аллеля Ms фрагмент - 241 п.н., рецессивного ms- 229 п.н.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, визуализировали в проходящем УФ свете при окрашивании красителем GelRed.

Результаты исследований. Engelke et al. (2003) предложили систему дифференциации (N) -, (T) -, и (S) -типов цитоплазм при сочетании маркеров 5» cob и orfA501.

По результатам ПЦР-анализа нормальная цитоплазма выявилась у растений образцов Шлт и [Бн1-12xВал 1-8] 1. У них присутствовал только один целевой фрагмент длиной 180 п.н. (рис. 1). Наличие маркера S-типа цитоплазмы обнаружено у гибридов ЛФК, Ятоба, Роухай, Олоросо, Медуза, Снайпер. У перечисленных образцов выявлены все три фрагмента длиной 180 п.н., 414 п.н. и 473 п.н.

У F₁ гибридов Сантеро, Барита, МсБанко и Салатный анализ показал присутствие двух фрагментов длиной 180 п.н. и 473 п.н., что свидетельствует о наличии у них T-цитоплазмы.



Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации и дифференциация растений потомства [Бн1–12хВал 1–8] 1 с использованием маркера Jnurf 13

Одновременное использование этих двух систем маркирования дифференцировало типы цитоплазм всех проанализированных образцов с мужской стерильностью. Вместе с тем в некоторых образцах со стерильной цитоплазмой наблюдалось расщепление по фенотипу на стерильные и фертильные, что связано с использованием различных по локусу Ms/ms генотипов отцовских линий.

По результатам анализа был сделан вывод о пригодности данного метода для оценки растений лука репчатого, показана высокая эффективность двух систем маркирования orfA501 и 5» sob для выявления фактора стерильности в цитоплазме типа CMS-S, CMS-T и они могут быть использованы в селекции. Для создания линий закрепителей стерильности необходимо выявление образцов с N-цитоплазмой, так как они должны обладать генотипом

Nmsms. Для выявления таких растений при классическом способе проводят анализирующие скрещивания, где в качестве тестера используют стерильные растения с генотипом Smsms или Tmsms. И по потомству полученных F₁ гибридов судят о генотипе опылителя. Если все потомство стерильное, то отцовские растения с нормальной цитоплазмой являются закрепителями стерильности с генотипом Nmsms. Это требует, как минимум, четыре года работы. При использовании маркеров orfA501 и 5» sob на тип цитоплазмы выявляют растения с N-цитоплазмой и у этих растений с помощью маркера Jnurf 13 проводят генотипирование на аллельное состояние локуса закрепления стерильности (msms), что сокращает процесс создания закрепителей стерильности в четыре раза.

В результате ПЦР-анализа по маркеру Jnurf 13 растений потомства [Бн1–12хВал 1–8] 1 с нормальной ци-

топлазмой показано, что шесть растений под номерами 8,13,14,15,17,25 обладали генотипом закрепителя стерильности msms (рис. 2). Растения 6,7,9,16 – гетерозиготы, а 10,11,26-доминантные гомозиготы восстановители фертильности. Таким образом, по результатам анализа без использования трудоемких анализирующих скрещиваний, выделены и вовлечены в селекционный процесс растения с генотипом закрепителя стерильности.

Высокая вредоносность пероноспороза (возбудитель – оомицет *Peronospora destructor*) делает актуальным поиск источников и доноров устойчивости. Показано, что *Allium roylei* полностью устойчив к этому заболеванию, и устойчивость контролируется одним доминантным геном Pd1 [9]. В 2015 году корейскими учеными S.Kimet с сотрудниками были разработаны четыре молекулярных маркера сцепленных с геном устойчивости Pd1. В 2016 году мы провели анализ популяций лука репчатого, полученных гибридизацией восприимчивых линий и устойчивым к ложной мучнистой росе F₁-гибридом Santeroc использованием трех молекулярных маркеров DMR1, DMR2 и DMR3 (Kim et al., 2016). Для дальнейших исследований был отобран DMR1-маркер как наиболее тесно сцепленный с Pd1-геном устойчивости к пероноспорозу. Маркер доминантного Pd-аллеля устойчивости при амплификации с парой праймеров DMR1-R5'-TTCTAGCAGCATCAAGGTG-3» и D M R 1 - F - 5'-TGAGGCTCAAGTTGACATG-3» дает фрагмент размером 505 п.н., а ре-

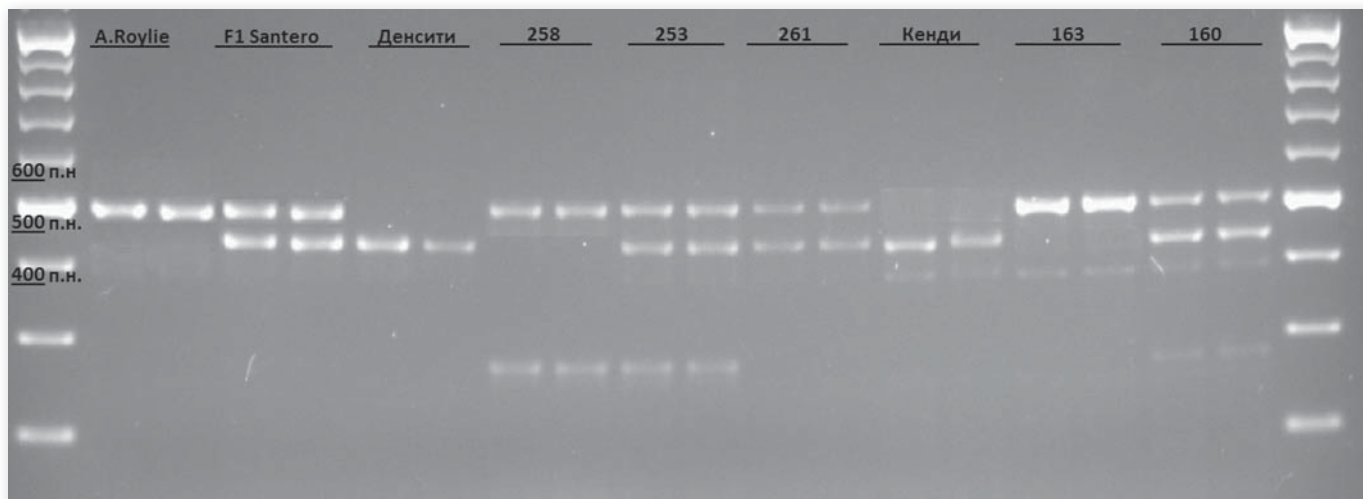


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации и дифференциация образцов лука репчатого по наличию/отсутствию гена устойчивости Pd1 с использованием маркера DMR1. Каждый образец представлен двумя дорожками

рецессивному аллелю *pd* соответствует фрагмент размером 438 п.н. Условия ПЦР были следующими: 95 °С – 4 мин; 10 циклов денатурация при 95 °С – 30 сек; отжиг при 65 °С с уменьшением в каждом цикле на 0,8 °С – 30 сек, синтез при 72 °С – 1 мин; 35 циклов 95 °С – 30 сек; 57 °С – 30 сек; 72 °С – 1 мин; 10 мин – 72 °С. ПЦР-продукты разделяли в 1,5% агарозном геле и визуализировали при окрашивании GelRed в проходящем УФ-излучении.

ПЦР с маркером DMR1 показал, что у гибрида F₁ Santero ген устойчивости находится в гетерозиготном состоянии, у сортов Денсити и Кенди присутствует фрагмент длиной 438 п.н., что соответствует рецессивному аллелю в гомозиготном состоянии. В потомствах растений Sx (SxДенс) (258, 253, 261) и Sx (SxКенди) (163, 160) наблюдалось расщепление на устойчивые и восприимчивые (рис. 3). Среди устойчивых растений в потомстве Sx (SxДенс) присутствовали растения (253 и 260) с двумя фрагментами 505 п.н. и 437 п.н., что свидетельствует об их гетерозиготности, и растение № 258 с фрагментом длиной 505 п.н. – гомозиготности по доминантному аллелю. В потомстве Sx (SxКенди) выявлено, что растение № 163 является доминантной гомозиготой, а растение № 160 – гетерозиготой.

Таким образом, показано, что ген устойчивости *Pd1* стабильно передается гибриднему потомству, а маркер DMR1 четко выявляет его гомо- или гетерозиготное состояние и может быть эффективно использован в селекции для отбора устойчивых к пероноспорозу растений.

Библиографический список

1. Clarke, A.E., H.A. Jones, and T.M. Little. Inheritance of bulb color in onion. *Genetics*. 1944. No 29: Pp. 569–575.
2. Berninger E. Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). *Ann. Amelior. Plant* (Paris). 1965. No 23. Pp. 183–199.
3. Jones H., S. Emsweller. A male sterile onion. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1936. No 34. Pp. 582–585.
4. Schweisguth B.. Etude d'un nouveau type de stérilité mâle chez l'oignon, *Allium cepa* L. *Ann. Amelior. Plant*. 1973. No 23. Pp. 221–233.
5. 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. No 107 Pp. 162–167.
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 Breeding*. 2014. No 34. Pp. 769–778.
7. Seongjun Kim, Cheol-Woo Kim, M Choi, Sunggil Kim. Development of a simple PCR marker tagging the *Allium roylei* fragment harboring resistance to downy mildew (*Peronospora destructor*) in onion (*Allium cepa* L.) // *Euphytica*. 2015. DOI: 10.1007/s10681-015-1601-2.
8. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA // *Nucleic Acids Res.* 1980.

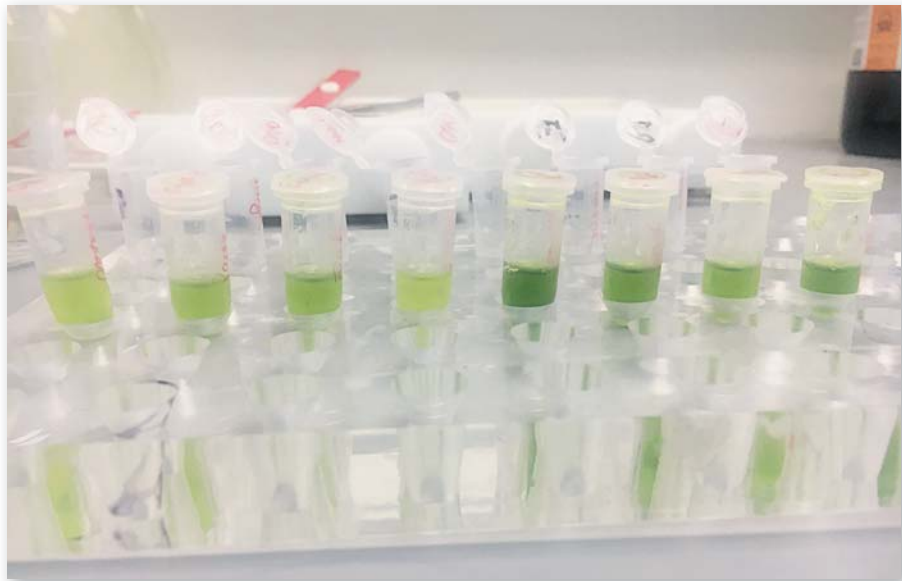


Рис 4. Выделение ДНК стандартным методом СТАВ

No 8. Pp. 4321–4325.

9. Kofoet A., Zinkernagel V. (1990) Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. // *J. Plant Dis Prot.* 97 (1) Pp. 13–23.

Об авторах

Алижанова Рада Расимовна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. +7 (915) 425–63–29. E-mail: rada.aliz@mail.ru.

Монахос Сокрыт Григорьевич, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, доктор с. – х. наук, тел. +7 (499) 976–41–71. E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru.

Монахос Григорий Федорович, генеральный директор ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева», канд. с. – х. наук; тел. +7 (499) 977–11–74. E-mail: breedst@mail.ru.

Molecular markers in onion breeding
R.R. Alizhanova, postgraduate, Department Botany, Plant Breeding and Seed Technology, RSAU-MTAA; tel. 8–915–425–63–29. E-mail: rada.aliz@mail.ru.

S.G. Monakhos, Head of the Department Botany, Plant Breeding and Seed Technology, RSAU-MTAA, Dr. Sci. in Agricultural sciences; tel. +7 (499) 976–41–71. E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru.

G.F. Monakhos, PhD, General Director, Limited company «Breeding station after N.N. Timofeev»; tel. +7 (499) 977–11–74. E-mail: breedst@mail.ru.

Summary. The studies were conducted in 2016–2018 in the laboratory of genetics, breeding and biotechnology of vegetable crops of the RSAU – MTAA. The aim of the research is to assess the efficiency of known molecular markers *orfA501* и *5» cob* to genotype a type of onion (*Allium cepa* L.) male sterility inducing cytoplasm's, CMS- (S) and CMS- (T) and normal (N) cytoplasm, to genotype restorer fertility and maintainer sterility alleles *Ms/ms* of a nuclear gene, marker of onion downy mildew resistance gene. The use of these two marker systems (*orfA501* и *5» cob*) confirmed the type of cytoplasm of all screened male sterility onion plants. Six onion accessions had CMS-S type of cytoplasm, four accessions – CMS-T and two accessions had normal N-cytoplasm. The efficiency of recommended DNA-marker *JnurF₃* to genotype restorer fertility (*Ms*) allele and maintainer sterility (*ms*) allele of a nuclear gene was confirmed using a set of different onion accessions. The use of molecular marker *JnurF₁₃* helps to genotype the onion plant in relation to allelic state of the sterility maintainer allele (*ms*) in plants with N-cytoplasm and shortens the process of developing sterility maintainer lines. *Allium roylei* is completely resistant to downy mildew which is controlled by a single dominant *Pd1* gene. Marker DMR1 of onion downy mildew resistance gene was studied using an accessions of Timofeev's plant breeding station (RSAU – MTAA) involved in a breeding programs and commercial cultivars of foreign companies.

Keywords: onion (*Allium cepa* L.), cytoplasmic male sterility, DNA markers, downy mildew, resistance gene, restorer fertility, maintainer sterility