УДК 575.581.167:633.854.78

ПОИСК НОВЫХ ИСТОЧНИКОВ ГЕНОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Чепурная А. Л., аспирант, Першин А. Ф., к.б.н., зав. лаб. генетики

Институт масличных культур УААН (г. Запорожье)

ВВЕДЕНИЕ

Основной задачей селекции подсолнечника сегодня является выведение новых гетерозисных коммерческих гибридов из-за их очевидного преимущества перед сортами как в биологическом, так и в экономическом аспектах. Интенсивному развитию селекции и семеноводства гибридов подсолнечника способствовало, в первую очередь, открытие явления цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Первый стабильный источник ЦМС был получен Леклерком П. (1969) в результате межвидовой гибридизации *H. petiolaris Nutt.* с культурным подсолнечником [1]. Кинман М. (1970) первым сообщил о гене – восстановителе фертильности (Rf) ЦМС подсолнечника линии Т66006-2-1 [2]. Именно эта система ЦМС – Rf стала основой бурного прогресса гибридов подсолнечника в мире [3].

Широкое использование только одного источника ЦМС на плазме *H. petiolaris* несет потенциальную угрозу аграрной экономике стран, возделывающих гибриды подсолнечника. Унификация плазменных генов значительно увеличивает их уязвимость в отношении патогенов и может привести к массовому поражению - эпифитотии, как в случае с южным гельминтоспориозом кукурузы на ЦМС техасского типа [4].

Для предотвращения таких негативных последствий в мире ведется активный поиск новых источников ЦМС подсолнечника. Организация продовольствия и сельского хозяйства при ООН – FAO – финансирует международный проект по поиску и мобилизации новых типов ЦМС [5]. К настоящему времени открыто 62 типа ЦМС [6].

Однако, использование в производстве гибридов на новых цитоплазматических геномах невозможно без разработки системы восстановления их фертильности. Поэтому, параллельно с поиском и идентификацией новых типов ЦМС ученые разных стран ведут исследования по обнаружению источников восстановления их фертильности [7, 8, 9, 10]. Создание новых ЦМС – Rf систем, альтернативных PET-1, и внедрение их в производство позволит избежать проблем, возникающих при глобальном использовании единственного источника ЦМС PET-1.

В связи с этим, целью нашего исследования является изучение восстановительной способности новых источников Rf-генов к различным цитоплазмам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов использовали 9 фертильных линий, имеющих различные Rf-гены, полученные в лаборатории генетики ИМК УААН в течение 1994 - 1999 гг.: RHA-274, JUG-Rf, RFT-1, DCF-1, DCF-2, DCF-4, RCMG-2, RPEF-1, RARG-1. Для получения тест – гибридов F1 нами были взяты 17 типов ЦМС на базе следующих диких видов: *H. petiolaris* (PET-1), *H. argophyllus* (ARG-1, ARG-3), *H. giganteus* (GIG-1), *H. debilis* (DEB-1), *H. texanus* (ANT-1), *H. praecox* (PRR-1, PRH-1), *H. fallax* (PEF-1), *H. annuus (wild)* (ANN-5), *H. rigidus* (RIG-1, RIG-2, RIG-L). Также использовали неидентифицированные источники ЦМС: DCS-1, DCS-2, DCS-3, DCS-4 (Double color sterile), полученные ранее на декоративном материале.

Эксперименты проводили в полевых условиях в 1997-2000 гг. Основным методом исследования служил гибридологический анализ по схеме топ-кроссов: каждый источник ЦМС опыляли пыльцой каждого восстановителя фертильности.

Скрещивания проводили вручную с использованием бумажных пергаментных изоляторов. Получили всего 170 комбинаций, каждую из которых выполнили в двукратной повторности. Растения поколения F_1 высевали на отдельной делянке и описывали индивидуально по признаку фертильности-стерильности. Количество растений на каждой делянке составляло по 40-60.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение линий – восстановителей фертильности

Работа по получению новых линий – доноров Rf-генов была начата еще в 1994 г. Изначально в генетическую коллекцию подсолнечника входили только три восстановителя фертильности – RHA-274, JUG-Rf и RFT-1, семена которых получены ранее из ВНИИМК (г. Краснодар, Россия). Фертильная линия RHA-274 представляет собой международный эталон – восстановитель источника ЦМС PET-1.

Новые источники доноров восстановления – Rf получали по специальной, разработанной схеме. Семена различных источников ЦМС высевали на опытном поле для получения гибридных комбинаций. Параллельно с этим на каждой делянке отбирали несколько растений для свободного опыления таким образом, чтобы максимальное количество отцовских форм могло принять участие в опылении. Семенной материал массово высевали на следующий год и индивидуально оценивали наличие эффекта восстановления. Выщепившиеся фертильные растения были нами самоопылены. В течение последующих полевых сезонов эту процедуру многократно повторяли с целью достижения однородности материала. Таким образом были получены линии – восстановители RARG-1, RPEF-1, RCMG-2. Восстановители фертильности DCF -1, DCF-2 и DCF-4, также как и источники ЦМС DCS-1, DCS-2, DCS-3, DCS-4, выведены на декоративном материале, который интродуцирован из рыночных семян без какой-либо идентификации таксономической принадлежности. Наименование источников Rf-генов производили в соответствии с типом плазмы ЦМС, на которой они были впервые обнаружены.

В результате работы мы увеличили количество линий – восстановителей фертильности с трех до девяти. Следующим этапом нашего эксперимента было изучение восстановительной способности новых источников Rf – генов.

2. Исследование эффектов восстановления фертильности

Для получения гибридов ЦМС-Rf растения каждого типа цитоплазмы опыляли пыльцой девяти восстановителей ЦМС. Сущность эксперимента заключалась в сравнении спектров восстановительной способности новых Rf-линий и выявлении их особенностей. Результаты описания тест - гибридов ЦМС-Rf представлены в таблице 1.

Прежде всего, мы изучили гибридные комбинации F1 с эталонным донором PET-1 Rf-генов RHA-274. Результаты анализа позволили выделить среди исследуемых типов ЦМС группу плазм, система восстановления которых подобна таковой у *H. petiolaris*. Согласно литературным данным, восстановление ЦМС типа PET-1 контролируется двумя независимыми доминантными комплементарными генами, названными *Rf-1* и *Rf-2* [11].Однако существует также мнение, что в ряде случаев возможен механизм взаимодействия генов по типу некумулятивной полимерии, когда доминантный аллель любого гена обеспечивает восстановление фертильности пыльцы [12].

Так как эффект восстановления фертильности обусловлен действием различных Rf-генов, то для их отличия и для более удобного обсуждения результатов экспериментов нам представляется здесь необходимым ввести дополнительные обозначения для Rf-генов к плазме PET-1: *Rfpet-1, Rfpet-2*. Тогда обозначение генов - восстановителей фертильности к другим плазмам будет сопровождаться соответствующими индексами.

Группу PET-подобных ЦМС составили DCS-2, DCS-3, ARG-1, ARG-3, PRR-1, PRH-1, RIG-2 и DEB-1. Их гибриды с RHA-274 оказались полностью фертильными (табл. 1). Тест - гибриды остальных типов ЦМС с RHA-274 были стерильными. Это свидетельствует о наличии иной системы ЦМС-Rf у этих источников.

Линия RFT-1 получена из ВНИИМК как возможный донор генов восстановления фертильности к ЦМС типа ANT-1 (*H. texanus*). Действительно, в комбинации ANT-1×RFT-1 мы зафиксировали восстановление фертильности. Кроме того, линия RFT-1 восстанавливала, за исключением PRH-1, всю группу PET-1 – подобных цитоплазм: фертильность восстановленных тест – гибридов доходила до 100 %. Эти данные подтверждают наличие у этой линии комплекса генов *Rfpet.* Фертильные растения также наблюдали в комбинации ANN - 5×RFT-1. Это позволяет предположить, что стабильные эффекты восстановления цитоплазм ANN-5 и ANT-1 могут быть взаимосвязанными: ген, восстанавливающий фертильность ANT-1 (предварительное обозначение *Rftex*), действенен и для ЦМС типа ANN-5.

Изучение комбинаций различных типов ЦМС с линией JUG-Rf выявило чрезвычайно низкую активность этого восстановителя фертильности. В группе PET- подобных ЦМС только в комбинации DCS-2×JUG-Rf зарегистрировали фертильные растения. Фертильной оказалась, кроме ожидаемой ANN-5×JUG-Rf, и комбинация PEF-1×JUG-Rf, причем на ее делянках наблюдали только фертильные растения.

Линия JUG-Rf не содержит гены *Rfpet*, но являетя эффективным восстановителем к ЦМС PEF-1, то есть можно предположить наличие у него нового гена *Rffal*. Линии DCF-1, DCF-2 и RARG-1 по эффекту

восстановления PET-1 подобной группы цитоплазм сходны с RHA-274: во всех комбинациях нами были зарегистрированы фертильные растения. Неодинаковая реакция восстановления внутри ЦМС-группы может свидетельствовать о гетерозиготности генов *Rfpet*, присутствующих в линиях DCF-1, DCF-2 и RARG-1. Кроме того, все три линии восстанавливали фертильность цитоплазмы PEF-1, а DCF-2 и ARG-1 оказались действенны также и для GIG-1. Анализируемые данные могут свидетельствовать о наличии у обоих генов *Rfpet, Rffal, Rfgig.*

Хотя линия DCF-1 по спектру восстановления максимально близка к DCF-2 и RARG-1, однако имеет принципиальное отличие от них. Анализ тест - гибридов, полученных от скрещивания трудновосстанавливаемых источников ЦМС (RIG-L, DCS-1) с этой линией выявил наличие стабильного эффекта восстановления фертильности. Кроме DCF-1 из всех изученных Rf-линий только DCF-4 была эффективна для этих источников ЦМС: фертильные растения наблюдали в комбинациях с RIG-1 и RIG-L. Поэтому линии DCF-1 и DCF-4 представляют наибольшую ценность, так как, вероятно, имеют уникальные специфичные Rf-гены к плазме *H. rigidus* (*Rfrig*).

Линия DCF-4 также восстанавливала фертильность PEF-1. Реакция восстановления этой линией PET-подобной группы источников ЦМС отлична от RHA-274: комбинации DCS-2×DCF-4 и ARG-1×DCF-4 оказались стерильными, что может быть следствием присутствия неполного комплекса генов *Rfpet* у этой линии.

Спектр восстановительной активности RPEF-1 существенно отличался от остальных. Описание тест - гибридов с PET-подобными источниками ЦМС выявило отсутствие эффекта восстановления в комбинациях с *H. praecox, H. debilis* и *H. argophyllus.* Линия RPEF-1 восстанавливала фертильность типов ЦМС ANT-1 и ANN-5, что могло бы подтвердить взаимосвязь эффектов восстановления этих плазм, отмеченную для линии RFT-1. Однако ген, восстанавливающий фертильность *H. texanus* (*Rftex*), который содержат линии RARG-1 и RCMG-2, оказался неэффективным для плазмы ANN-5. Полученные данные могут быть объяснены так: линия RPEF-1 содержит либо другой аллель гена *Rftex,* либо восстановление фертильности ANN-5 контролируется отдельным геном *Rfann*.

Таблица 1. Восстановление фертильности типов ЦМС подсолнечника в поколении F1

Источник ЦМС	Линии - восстановители фертильности																	
	RHA-274		**RFT-1**		**DCF-1**		**DCF-2**		**DCF-4**		**RARG-1**		**RPEF-1**		**RCMG-2**		**JUG-1**	
	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф	С	Ф
PET-1	0	32	7	8	11	11	0	26	-		19	19	4	12	7	6	23	0
DCS-2	0	60	0	24	18	20	3	6	20	0	-		9	9	-		26	20
ARG-1	0	41	13	26	4	7	11	9	16	0	22	8	57	79	21	8	85	0
PRR-1	0	29	0	33	0	45	0	24	21	49	16	15	39	31	58	0	34	0
RIG-2	0	31	0	60	22	33	10	39	16	19	2	2	14	16	73	0	33	0
DCS-3	0	14	11	13	55	10	6	34	-		20	9	7	41	62	0	41	0
DEB-1	0	33	0	30	0	37	12	3	55	51	13	26	48	0	58	0	38	0
ARG-3	0	33	32	36	22	53	21	52	63	30	48	59	22	0	34	0	48	0
PRH-1	0	48	0	10	0	17	-		30	23	19	25	30	0	10	4	30	0
PEF-1	34	0	23	0	21	9	40	32	59	3	1	1	39	42	46	0	0	40
GIG-1	36	0	41	0	58	0	53	4	39	0	7	3	0	28	21	11	-	
ANT-1	91	0	2	7	-		99	0	92	0	2	3	20	25	0	20	-	
ANN-5	60	0	25	39	104	5	18	0	-		5	0	29	17	67	0	46	27
RIGL	36	0	40	0			60	0	56	18	10	0	29	0	10	0	26	0
RIG-1	21	0	38	0	27	0	10	0	13	34	41	0	86	0	30	0	46	0
DCS-1	126	0	33	0	68	30	29	0	52	0	43	0	35	0	58	0	45	0
DCS-4	69	0	25	0	66	0	25	0	42	0	63	0	54	0	27	0	42	0

Примечание: С - количество стерильных растений, Ф - фертильных растений;

■ - полное, ▣ - частичное восстановление фертильности; □ - отсутствие восстановления

Самой низкой из всех исследованных Rf - линий восстановительной активностью обладает RCMG-2. Среди PET-1 подобных цитоплазм только в комбинациях PET-1×RCMG-2, ARG-1×RCMG-2 и PRH-1×RCMG-2 наблюдали фертильные растения. Однако, несмотря на несовместимость большинства исследованных плазм с Rf-генами RCMG-2, эта линия оказалась эффективным донором гена *Rftex:* растения тест - гибрида ANT-1×RCMG-2 полностью фертильны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно экспериментальным данным, все новые Rf – линии имеют различные спектры восстановления фертильности источников ЦМС. Однако полученные результаты лишь в общих чертах характеризуют их восстановительную активность. В ходе исследований мы проводили только качественную оценку признака фертильности – стерильности растений в комбинациях F1. Такие результаты являются предварительными и позволяют лишь предположить присутствие следующих Rf -генов:

DCF-1	*Rfpet*	*Rftex*	*(Rfann)*	*Rffal*	-	*Rfrig*
RPEF-1	*Rfpet?*	*Rftex*	*(Rfann)*	*Rffal*	*Rfgig*	-
RARG-1	*Rfpet*	*Rftex*	-	*Rffal*	*Rfgig*	-
DCF-2	*Rfpet*	-	-	*Rffal*	*Rfgig*	-
DCF-4	*Rfpet?*	-	-	*Rffal*	-	*Rfrig*
RCMG-2	-	*Rftex*	-	-	*Rfgig*	-

Исходные линии RHA-274, RFT-1 и JUG-Rf содержат только гены *Rfpet, Rfann* и *Rftex.* Спектр восстановления новых Rf-линий значительно шире: помимо этих трех генов, в их геномах выявлены *Rffal, Rfgig* и *Rfrig.* Поскольку восстановление плазмы *H. annuus (wild)* – ANN5 – окончательно не выяснено, гипотетический ген *Rfann* взят нами в скобки.

Самую высокую восстановительную активность проявляет линия DCF-1: она содержит гены для большинства источников ЦМС, включая и трудновосстанавливаемые: DSC-1 и RIG-L. Линия RCMG-2 обладает наиболее узким спектром восстановительной способности, т. к. содержит Rf - гены только к некоторым плазмам.

Наименьшую практическую ценность представляют восстановители фертильности DCF-2, ARG-1 и RCMG-2. Их спектр восстановительной активности полностью перекрывается спектрами более эффективных Rf – линий. Однако DCF-2, ARG-1 и RCMG-2 представляют научный интерес для последующего исследования генетической природы новых линий – восстановителей фертильности.

Проведенная нами предварительная оценка новых Rf – линий является лишь начальным этапом работы по исследованию наследования их восстановительной способности. Нами проводится получение поколений F2 для более детального изучения эффектов восстановления фертильности различных источников ЦМС и окончательной идентификации Rf-генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. V. Vranceanu, M. Iuoras, F. M. Stoenescu, 1986. A contribution to the diversification of cytoplasmic male sterility sources in sunflower. Helia 9, p. 21-25.
2. Kinman M. L., New development in the USDA and State Expriment Station sunflower breeding programs. Proc. 4th Sunfl. Conf., Memphis, Tenn. 1970, P. 181-183.
3. Jerry F. Miler, 1997. The genetics of sunflower (Sunflower technology & production), Agronomy monograph # 35, p. 441- 495.
4. Tatum L. A., 1971. The southern corn leaf blight epidemic. Science, 1971, p. 1113-1116.
5. Herve Series, 1996. Indentification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources. Helia, 19, Special issue, p. 144-157.
6. Herve Series, 1999. Indentification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources. Helia, 22, Special issue, p. 71-84.
7. Christov M., Shindrova P., Encheva V., Venkov V., Nikolova L., Piskov A., Nikolova V. Development of fertility restorer lines originating from interspecific hybrids of genus Helianthus. Helia. 1996, 19:24, 65-71.
8. Leclercq P. Identification of genes for restoring fertility to sterile cytoplasms in sunflower. Agronomie. 1984, 4:6, 573-576.

9. V. Vranceanu, F. M. Stoenescu, 1971. Pollen fertility restores gene from cultivated sunflower (*H. annuus L.)*. Euphytica 20, p. 536-541.

10. V. Vranceanu, F. M. Stoenescu. Sources of restorer genes for pollen fertility in sunflower. Analele Institutului de Certari pentru Cereale si Plante Tehnice. 1973, 39:253-260.

11. Анащенко А. В., Кукош М. В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus L.).* Сообщение 4. Идентификация Rf-генов из разных источников восстановителей фертильности // Генетика. -1986.- Т. 22. - № 1. - С. 80 – 85.

12. Анащенко А. В., Кукош М. В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus L.).* Сообщение 2. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМСр // Генетика. – 1985. - Т. 21. - № 12. - С. 1999-2004.