

## ОБЛАСТЬ ПОНИЖЕННОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ГРУППЫ СЦЕПЛЕНИЯ 13 ПОДСОЛНЕЧНИКА (*Helianthus annuus* L.) ВКЛЮЧАЕТ КЛАСТЕРЫ ГЕНОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ (*Rf1*) И УСТОЙЧИВОСТИ (*Pl*) К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

© 2023 г. И. Н. Анисимова<sup>1</sup> \*, Н. В. Алпатьева<sup>1</sup>, О. Н. Воронова<sup>2</sup>, В. А. Гаврилова<sup>1</sup>,  
Ю. И. Карабицина<sup>1</sup>, Е. Б. Кузнецова<sup>1</sup>, Е. Е. Радченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: irina\_anisimova@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.09.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 26.12.2022 г.

В группе сцепления 13 генома культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. картирован ряд генов, контролируемых ценные для селекции признаки: восстановление фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности, устойчивость к грибным болезням (ложной мучнистой росе, ржавчине), которые были интрогрессированы от диких видов. Известно, что у подсолнечника и других растений частота рекомбинации в районах хромосом, содержащих интрогрессированные гены устойчивости, может быть подавлена, что благоприятно для проведения отбора с помощью сцепленных с ними молекулярных маркеров. В F<sub>2</sub> гибридов от скрещиваний стерильной линии подсолнечника ВИР 116А (ЦМС РЕТ1) с линиями — восстановителями фертильности пыльцы из коллекции ВИР изучили характер совместного наследования локуса *Rf1* (фенотипический маркер — признак восстановления фертильности) и *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>*, контролирующего устойчивость к большому числу рас *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni (STS-маркер На-Р1). В скрещивании ВИР 116А × ВИР 740 частота рекомбинации между локусами *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* и *Rf1* составила 8.61, а в скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 195 и ВИР 116А × RIL 80 оказалась почти вдвое выше. Во всех изученных популяциях F<sub>2</sub> отмечено отсутствие рекомбинантного фенотипического класса стерильных растений с отцовским вариантом маркера На-Р1. При цитологическом анализе установлено, что показатели фертильности пыльцы растений с разными аллелями маркера, скорее всего, определяются генотипом растения, а не аллельным составом мужского гаметофита. Предположили, что нехватка одного из рекомбинантных классов F<sub>2</sub> может быть связана с эмбриональной летальностью, т.е. гибелью зигот, несущих рецессивный аллель гена восстановления фертильности пыльцы *rf1* и аллельный вариант STS-маркера На-Р1 гена устойчивости (чувствительности) в локусе *Pl<sub>5</sub>Pl<sub>8</sub>*, полученный от отцовского родителя.

**Ключевые слова:** гибриды, наследование, локусы, аллели, молекулярные маркеры, фенотипические классы, фертильность пыльцы, зиготическая летальность.

**DOI:** 10.31857/S0016675823050028, **EDN:** FNMMXS

Подсолнечник *Helianthus annuus* L. — одна из ведущих масличных культур в мире и основная — в Российской Федерации. В настоящее время для получения семян подсолнечника наряду с сортами возделывают высокопродуктивные гетерозисные гибриды, характеризующиеся устойчивостью к болезням и вредителям. При создании гибридов используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) РЕТ1-типа, полученная на основе однолетнего дикого вида *H. petiolaris* Nutt. [1]; для восстановления фертильности гибридов F<sub>1</sub> необходимо присутствие в генотипе ядерного гена *Rf1*, источником которого послужила линия Т66006-

2-1-В *H. annuus* [2]. Ген *Rf1* картирован в группе сцепления 13. В этой же группе сцепления *H. annuus* находятся гены, детерминирующие устойчивость к большому числу рас фитопатогенного гриба *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni, вызывающего опасное заболевание — ложную мучнистую росу (локус *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>*), а также гены устойчивости к возбудителю ржавчины *Puccinia helianthii* Schw. (локусы *R<sub>4</sub>*, *R<sub>HAR6</sub>*, *R<sub>adv</sub>*, *R<sub>13b</sub>*, *R<sub>13b</sub>*) [3]. Установлено, что белки, кодируемые генами устойчивости к возбудителю ложной мучнистой росы, принадлежат к суперсемейству NBS-LRR. Они содержат сайт связывания нуклеотидов (Nu-

cleotide Binding Site – NBS) и обогащенные лейцином повторы (Leucine-Rich Repeat – LRR), т.е. имеют структуру, характерную для продуктов большинства *R*-генов [4]. Результаты недавних исследований показали, что гены-кандидаты в локусе *Rf1*, контролирующем признак восстановления фертильности пыльцы, кодируют PPR-белки, содержащие повторяющиеся элементы из 35 аминокислотных остатков (PentatrικοPeptide Repeats), т.е. сходны по структуре с продуктами большинства идентифицированных к настоящему времени генов *Rf* растений [5–7].

Ряд авторов отмечают, что гены растений, вовлеченные в контроль восстановления фертильности пыльцы (*Rf*), и гены устойчивости к фитопатогенам (*R*) характеризуются сходством структуры (наличием повторяющихся мотивов), имеют кластерную организацию и часто находятся в смежных районах хромосом [8–10]. Обнаружено, что частоты рекомбинации между молекулярными маркерами и локусами генов устойчивости могут значительно отличаться от значений, предсказанных на основании физической карты [11]. Это явление получило название подавления (супрессии) рекомбинации. Так, эффект пониженной рекомбинации наблюдался в группе сцепления 1 *H. annuus*, в районе локуса *Pl<sub>arg</sub>*, определяющего устойчивость к болезням известным рас *P. halstedii* [12]. Снижение частоты рекомбинации отмечали и в районе группы сцепления 13, несущем гены устойчивости к ржавчине [13]. При анализе расщепляющихся популяций от скрещиваний генетически разнородных линий у подсолнечника [14] и других растений [15] были получены различные оценки величины рекомбинации в гомологичных районах хромосом, содержащих гены устойчивости.

Сложный локус *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* первоначально был картирован в группе сцепления 6 [16, 17], а позднее был отнесен к группе сцепления 13 [18]. Известно, что гены локуса *Pl<sub>5</sub>* интрогрессированы из многолетнего гексаплоидного вида *H. tuberosus* L., а *Pl<sub>8</sub>* – из однолетнего диплоидного вида *H. argophyllus* L. [19]. Кластер *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* содержит ряд гомологичных генов, отвечающих за устойчивость к большому числу рас *P. halstedii* [20, 21]. O. Radwan et al. [21] определили полные нуклеотидные последовательности двух аналогов генов устойчивости (RGA) кластера *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* и показали, что кодируемые ими белки относятся к подсемейству CC-NBS-LRR и содержат на N-конце скрученный спиральный домен (Coiled Coil). Авторы разработали серию специфичных внутрислокусных STS-маркеров для идентификации генотипов, несущих аллели устойчивости/чувствительности. Профили маркеров, полученных с каждой из шести пар праймеров, четко различались у устойчивых и неустойчивых генотипов. При использовании праймеров на-Р1 диагностическими фрагментами для идентифика-

ции аллелей устойчивости в разных частях сложного локуса *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* могут служить ампликоны длиной около 2000 пн, тогда как маркеры аллелей чувствительности характеризуются другим профилем с фрагментами в интервале 1150–1600 пн. В ряде работ маркеры апробированы для поиска аллелей устойчивости среди селекционного материала [22, 23] и линий генетической коллекции ВИР [24].

Локусы *Rf1* и *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* находятся в одном плече хромосомы 13. Точных данных о генетическом расстоянии между данными локусами в литературе нет. Опубликованные генетические карты группы сцепления 13 в основном фрагментарны, показывают расстояния только между молекулярными маркерами внутри группы, либо определяют расстояние между каждым из локусов *Rf1* или *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* и сцепленными с ними молекулярными маркерами [21]. На первой генетической карте сцепления “CARTISOL”, построенной на основе RFLP-маркеров, локус *Pl<sub>5</sub>* был картирован на расстоянии 15 сМ от *Rf1* [16]. Источниками разработанных к настоящему времени карт служили расщепляющиеся популяции, полученные от скрещиваний различных родительских линий. Возможно, этим объясняются различия в оценках генетических расстояний между молекулярными маркерами в пределах карты (либо между геном интереса – *Rf1*, *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* и маркерным локусом), которые были опубликованы в разных источниках. Более точные данные по оценке величины сцепления может дать анализ расщепления гибридов, полученных с участием одной и той же материнской формы и генетически различных отцовских линий. В настоящей работе мы изучили характер совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы (фенотипический маркер локуса *Rf1*) и молекулярных маркеров локуса *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* в потомствах от скрещиваний стерильной линии ЦМС ВИР 116А с линиями – восстановителями фертильности пыльцы, оценили величину рекомбинации между локусами *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* и *Rf1* в каждом из скрещиваний и показали, что относительно низкие значения рекомбинации в исследованном районе обусловлены нехваткой одного из рекомбинантных классов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для исследования служили 35 линий коллекции подсолнечника ВИР, среди которых – пять стерильных линий с ЦМС РЕТ1-типа (НА89, ВИР 114А, ВИР 215А, ВИР 434А, ВИР 471А), линия ВИР 151А на основе ЦМС RIG0, а также 29 фертильных линий, различавшихся по способности к восстановлению фертильности пыльцы [25]. По результатам молекулярного скрининга четыре линии были отобраны

**Таблица 1.** Характеристика родительских линий

Линия	Номер по каталогу ВИР	Происхождение	Тип цитоплазмы (по [25])	Наличие диагностических маркеров гена <i>Rf1</i> (по [25])
ВИР 116А	к-3455	Из сорта Вымпел, Россия	S	Отсутствуют
ВИР 740	к-3528	Из скрещивания ВИР 113 × источник <i>Rf</i> , Россия	F	HRG01, HRG02, ORS511
ВИР 195	к-3285	Отбор из линии SL 3336, Болгария	S	ORS511
RIL 80	к-3598	Из скрещивания I1083HR4 × RHA 345, Франция	S	HRG01, HRG02, ORS511

Примечание. S – стерильный, F – фертильный.

для скрещиваний. Использованные в скрещиваниях родительские формы – линии коллекции подсолнечника ВИР – были высокогомозиготными и насчитывали не менее 10 поколений инбридинга. В качестве материнского родителя для скрещиваний была взята линия ВИР 116А (к-3455, выделена из сорта Вымпел). Отцовскими линиями служили линии: ВИР 740 (к-3528, выделена из скрещивания ВИР 113 × источник *Rf*, Россия), ВИР 195 (к-3285, отбор из линии SL 3336, Болгария) и RIL 80 (к-3598, выделена из скрещивания I1083HR4 × RHA 345, Франция). Отцовские линии различались по типу цитоплазмы (фертильный тип у ВИР 740, стерильный РЕТ1 – у ВИР 195 и RIL 80), а также наличию–отсутствию диагностических маркеров гена *Rf1* (табл. 1) [25].

#### Гибридологический анализ

Скрещивания были выполнены на Кубанской опытной станции ВИР (Краснодарский край, Гулькевичский район) в 2011 г. От самоопыления гибридных растений  $F_1$  получены семена гибридов  $F_2$ . Гибриды  $F_1$  выращены на полях научно-производственной базы “Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР” (С.-Петербург, Пушкин) в 2013 г., популяции  $F_2$  – в 2015, 2019 и 2020 г. Посев проводили в одни и те же сроки (конец мая), схема расположения растений – 40 × 40 см. Каждая из изученных семей  $F_2$  (по одной гибридов от скрещивания ВИР 116А с ВИР 740 и RIL 80 и две – от скрещивания ВИР 116А × ВИР 195) – являлась потомством одного гибридного растения  $F_1$ .

Оценивали расщепление гибридов  $F_2$  по признакам фертильности/стерильности, а также по вариантам STS-маркера Ha-P1, специфичного для гена *Pl<sub>8</sub>* в кластере *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* [21]. Для определения частоты рекомбинации по данным анализа  $F_2$  использовали формулы П.Ф. Рокицкого [26].

#### Молекулярно-генетический анализ

Фракции тотальной ДНК были выделены из листьев молодых растений с использованием модифицированного протокола [27]. Для амплификации внутригенного STS-маркера Ha-P1 использовали пару праймеров (F-GCCCAAATGAAAGAAAGGTGTG, R-GGCGAAATGGTTCCCGTGTGAGTCCG) [21]. При проведении ПЦР пользовались протоколом, рекомендованным разработчиками праймеров. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Для определения нуклеотидных последовательностей фрагментов, амплифицированных с помощью пары праймеров Ha-P1, продукты очищали от посторонних примесей с помощью набора Cleanup Standard фирмы “Евроген” (Москва). Для лигирования ампликонов в вектор pAL2-T использовали набор Quick-TA kit (Евроген), а для трансформации – компетентные клетки, приготовленные на основе штамма DH5α *E. coli*, по протоколу, предложенному [28], с модификациями [29]. По пять белых колоний каждого образца проверяли на наличие вставки методом ПЦР с праймерами M13. По два ампликона нужного размера анализировали на секвенаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems) в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Полученные сиквенсы сравнивали с гомологичными последовательностями с использованием алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### Цитологический анализ пыльцы

Для оценки фертильности пыльцы использовался модифицированный ацетокарминовый метод окрашивания в сочетании с методом анализа данных путем построения вариационных кривых [30]. В каждой из двух проанализированных семей  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195) было выделено по шесть фертильных растений, характеризующихся разными профилями маркера Ha-P1. Таким обра-

**Таблица 2.** Расщепление в семьях F<sub>2</sub> гибридов от межлинейных скрещиваний по фертильности/стерильности и вариантам маркера На-Р1

Комбинация скрещивания	Число растений с фенотипом			$\chi^2$ для теоретического соотношения 3 : 1*	P	Число растений с вариантами маркера На-Р1				$\chi^2$ для теоретического соотношения 1 : 2 : 1**	P
	F	S	всего			m	m/p	p	всего		
ВИР 116А × ВИР 740	91	30	121	0.002	0.975–0.99	29	65	27	121	0.74	0.10–0.90
ВИР 116А × ВИР 195, семья 1	74	24	98	0.01	0.90–0.95	31	51	16	98	4.81	0.05–0.10
ВИР 116А × ВИР 195, семья 2	77	18	95	1.86	0.10–0.90	27	50	18	95	1.97	0.10–0.90
ВИР 116А × RIL 80	106	35	141	0.002	0.975–0.99	25	77	39	141	3.98	0.10–0.90

Примечание. F – фертильные растения, S – стерильные растения; m, p и m/p – растения соответственно с материнским, отцовским и гибридным профилем маркера На-Р1. \*  $d.f. = 1$ ,  $\chi_{0.05}^2 = 3.84$ ; \*\*  $d.f. = 2$ ,  $\chi_{0.05}^2 = 6.0$ .

зом, из каждой семьи была собрана пыльца у 18 растений, а всего обследовано 36 растений.

На постоянных препаратах пыльцы, окрашенной ацетокармином, анализировали по 10–15 полей зрения для каждого образца. Фертильными мы считали пыльцевые зерна нормального и увеличенного размера с равномерно окрашенной цитоплазмой, к стерильным были отнесены неокрашенные и неоднородно окрашенные пыльцевые зерна всех размеров, а также окрашенные зерна значительно меньшего размера (микрорпыльца). Оценивали отношение фертильных пыльцевых зерен к общему числу учтенных пыльцевых зерен данного препарата (в %), измеряли диаметр пыльцевых зерен. Математическая обработка полученных данных заключалась в построении вариационных кривых по встречаемости пыльцевых зерен определенного диаметра.

Пыльцевые зерна у подсолнечника слегка эллипсоидные, однако максимальный и минимальный диаметры различаются незначительно и на уровне светового микроскопа их форма близка к шарообразной. Для расчетов мы использовали диаметр в наиболее широкой части пыльцевого зерна. Ранжирование в группы проводили с шагом 2 мкм. Подробное цитологическое исследование, фотографирование и измерение пыльцы осуществляли с помощью микроскопа Axio Imager Z1, входящего в ЦКП “Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов” Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург), оснащенного цифровой фотокамерой, в программе ZEN 3.5 (blue edition). Расчеты, построение вариационных кривых и представление этих результатов в виде графиков осуществляли с помощью пакета программ MS Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Расщепление по фертильности/стерильности во втором поколении каждой из трех изученных гибридных комбинаций было близко к соотношению 3 (фертильные) : 1 (стерильные) (табл. 2), что свидетельствует о моногенном характере наследования признака. Такой же характер наследования признака восстановления фертильности пыльцы наблюдали у F<sub>2</sub> гибридов от скрещивания линии ВИР 116А с другими линиями – восстановителями фертильности пыльцы из коллекции ВИР: ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, RIL 130 (данные не показаны). Используемые в скрещиваниях отцовские линии ВИР 195 и RIL 80 имеют стерильный тип цитоплазмы и диагностические молекулярные маркеры гена *Rf1* (ORS511 – у ВИР 195; ORS511, HRG01, HRG02 – у RIL 80). Линия ВИР 740 характеризуется фертильным типом цитоплазмы и также имеет три диагностических маркера гена *Rf1* – ORS511, HRG01, HRG02 (табл. 1) [25]. Эти данные и сходный характер наследования признака восстановления фертильности пыльцы позволили предположить, что использованные в качестве отцовских родителей линии являются носителями доминантного аллеля одного и того же гена восстановления фертильности *Rf1*.

Родительские линии характеризовались различными профилями STS-маркера На-Р1, специфичного для локуса *Pl<sub>3</sub>/Pl<sub>8</sub>*. У стерильной линии ВИР 116А амплифицировался только один фрагмент длиной около 1250 пн. Такой же профиль продуктов амплификации наблюдался и у других стерильных линий с цитоплазмой PET1: НА89, ВИР 114А, ВИР 215А, ВИР 434А, ВИР 471А, а также у линии ВИР 151А с цитоплазмой RIG0. У линии ВИР 740 продукты амплификации были представ-

лены двумя четко различающимися по длине фрагментами 1100 и 1450 пн, у линии ВИР 195 — двумя фрагментами длиной около 1450 и 1650 пн, у линии RIL 80 — тремя фрагментами длиной 1500, 1750 и 2000 пн (рис. 1). У других линий генетической коллекции подсолнечника ВИР профили амплифицированных фрагментов также были гетерогенными и полиморфными (данные не показаны).

Для того чтобы подтвердить локализацию изучаемых фрагментов в районе кластера  $Pl_5/Pl_8$ , мы клонировали и секвенировали продукты амплификации, полученные у линий ВИР 740 и ВИР 116А. Нуклеотидные последовательности ампликонов оказались сходными с нуклеотидной последовательностью клона Ha-NTIR11g, депонированной в базу NCBI в качестве идентифицированного у устойчивой линии QIR8 *H. annuus* аналога гена устойчивости. Последовательность Ha-NTIR11g, кодирующая белок CC-NBS-LRR, находится в локусе  $Pl_5/Pl_8$  (образец AY490793.2) [21, 31]. В последовательности хромосомы 13 из аннотированного генома инбредной линии XRQ (MNCJ02000328.1) сайт отжига прямого праймера находится в положении 165737987, а в последовательности AY490793.2 — в позиции 4298. Сайт отжига обратного праймера локализован в межгенном участке. Ампликоны, полученные у образцов ВИР 116А и RIL 80, высокополиморфны, они включают небольшой фрагмент кодирующей последовательности гена длиной 125 и 89 пн соответственно (рис. 2) и протяженную фланкирующую, некодирующую последовательность. У линии ВИР 740 обнаружены различающиеся по длине фрагменты, содержащие сайты отжига праймеров. У линии ВИР 116А клонирован один фрагмент, длина которого (1246 пн) соответствовала оценке размера ампликона, полученной при электрофорезе в агарозном геле. Таким образом, подтверждено предположение о локализации изученных STS-фрагментов в последовательности одного из генов устойчивости в сложном локусе  $Pl_5/Pl_8$ .

В каждой из изученных семей  $F_2$  от трех комбинаций скрещиваний наблюдали три варианта профилей STS-маркера Ha-P1: материнский (как у линии ВИР 116А, обозначен m), отцовский (обозначен p) и гибридный (m/p), включавший фрагменты обеих родительских форм (рис. 1). Наблюдаемое расщепление было близко к теоретическому ожидаемому 1(m) : 2(m/p) : 1(p) при кодоминантном наследовании признака (табл. 2).

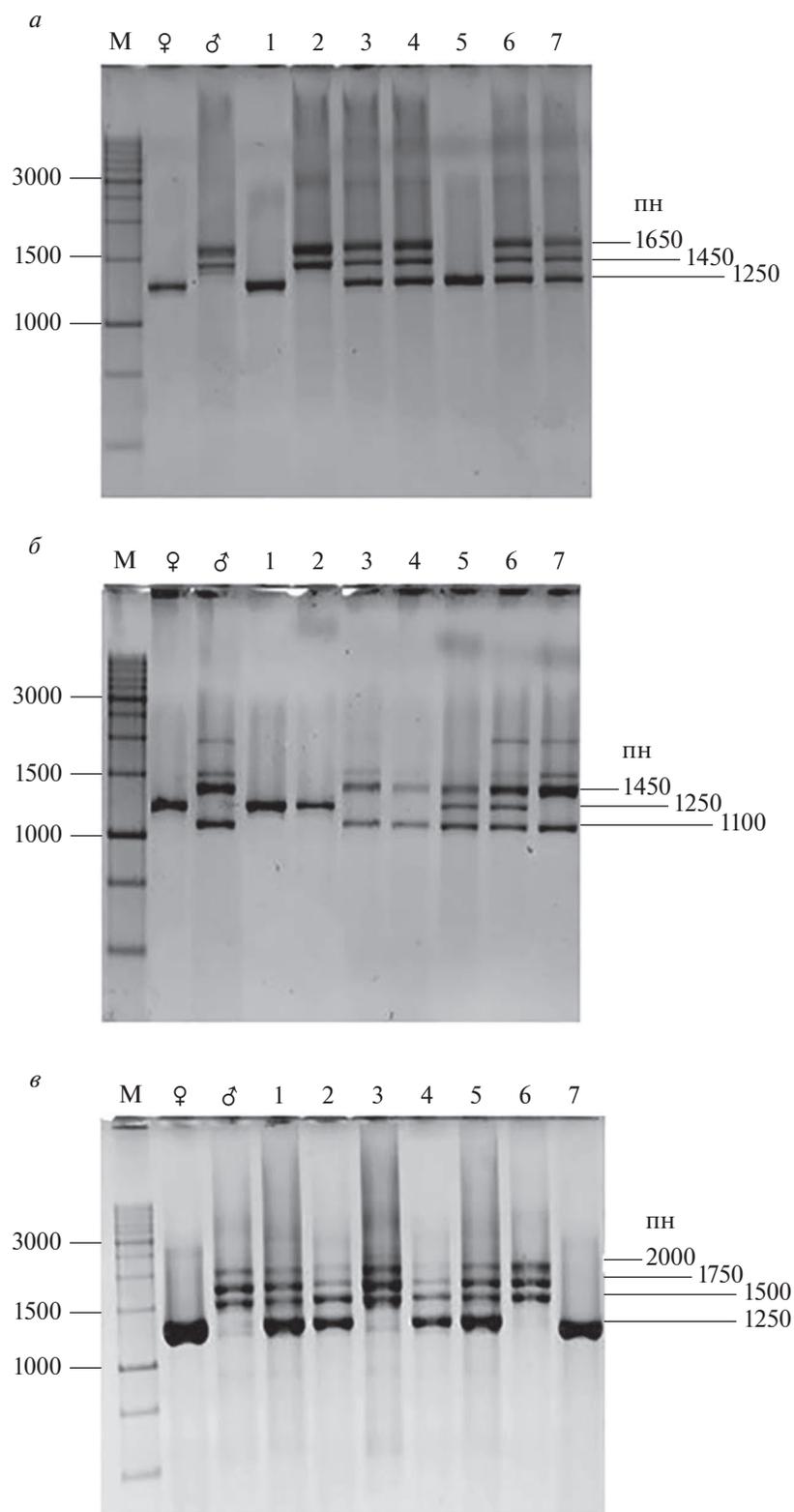
В скрещивании ВИР 116А × ВИР 740 частота рекомбинации между локусами Ha-P1 и *Rf1* составила 8.61, что указывает на довольно тесное сцепление. В скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 195 и ВИР 116А × RIL 80 частота рекомбинации между двумя локусами была немного выше — от 14.66 до 20.4% (табл. 3). Теоретически, при данных значениях генетического расстояния в  $F_2$  ожидали

появление шести фенотипических классов (табл. 3), однако ни в одной из проанализированных комбинаций (всего было оценено 455 растений  $F_2$ ) стерильные растения с отцовским вариантом маркера, т.е. относящиеся к рекомбинантному гомозиготному классу, не обнаружены, и наблюдали по пять фенотипических классов. Нехватка рекомбинантного фенотипического класса могла быть вызвана либо очень тесным сцеплением варианта “m” маркера Ha-P1 с рецессивным аллелем *rf1*, либо их расположением в одном и том же локусе. Однако в случае отсутствия рекомбинации при полном сцеплении двух локусов должна быть нехватка и другого фенотипического класса — стерильных растений с гетерозиготным профилем маркера. Тем не менее гетерозиготные рекомбинантные генотипы с высокой частотой наблюдались во всех проанализированных популяциях.

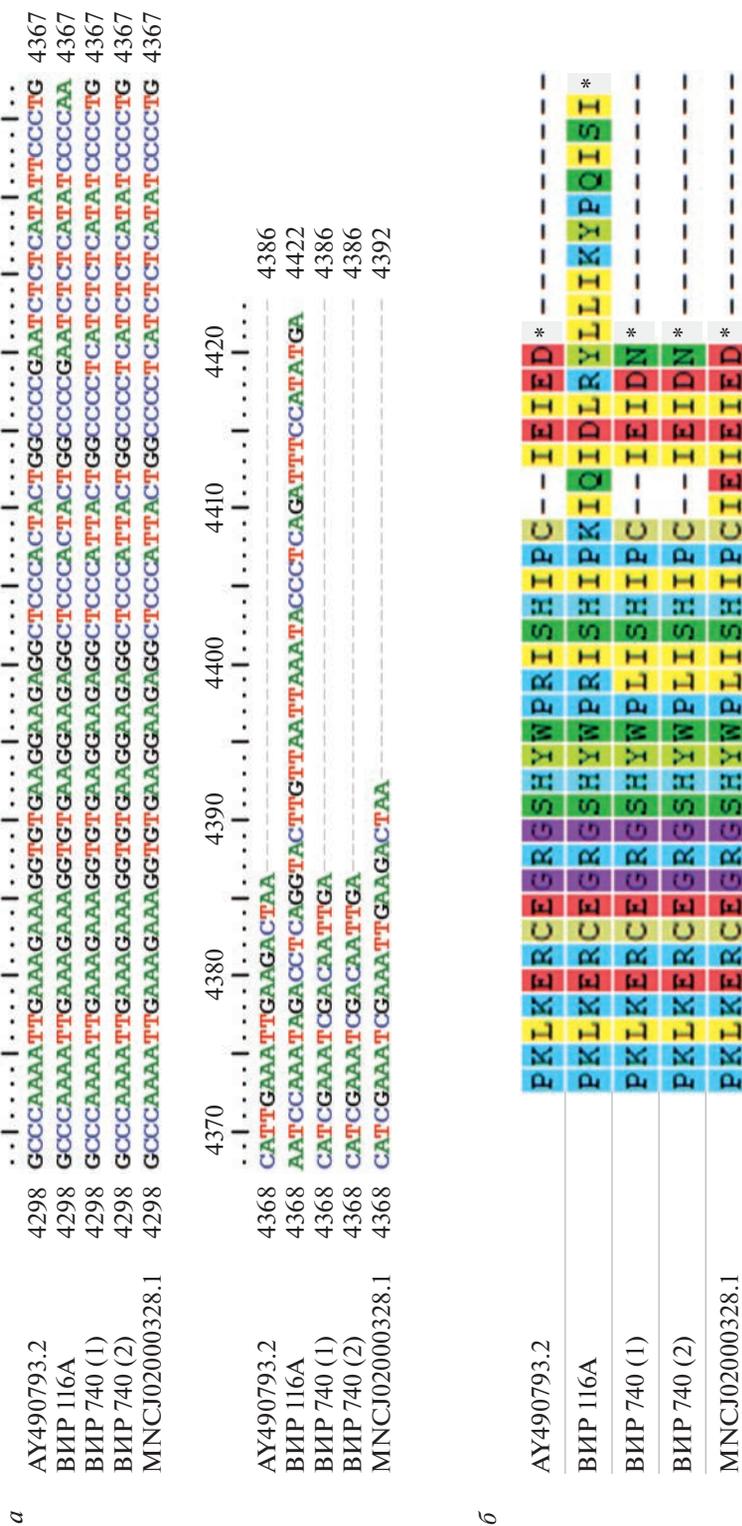
Другой возможной причиной элиминации рекомбинантного фенотипического класса могла быть нежизнеспособность гамет, несущих аллели *rf1* и *p*, которые продуцировали растения  $F_1$ . Для проверки этого предположения изучили показатели фертильности пыльцы у растений популяции  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195) с различными вариантами маркера. В анализ были включены только фертильные растения, поскольку пыльники стерильных (генотип *rf1rf1*) лишены пыльцы. Предполагали, что большая часть фертильных растений могла быть представлена гетерозиготами по локусу *Rf1*, т.е. имела генотипы *Rf1rf1pp*, *Rf1rf1mm* либо *Rf1rf1mp* и, следовательно, гаметы, одновременно несущие аллели *rf1* и *p*, могли продуцироваться растениями  $F_2$  как с отцовским (p), так и с гибридным (m/p) вариантами маркера.

В целом анализ пыльцы ацетокарминовым методом позволил выявить среди фертильных по фенотипу гибридных растений  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195) значительное разнообразие по качеству пыльцы, а именно по степени окрашиваемости и диаметру пыльцевых зерен. Диапазон вариаций проявления этих параметров укладывается в три класса: от высокофертильных растений с показателем фертильности более 80% (84–97%), через группу растений со средней фертильностью 53–76%, до низкофертильных растений с показателем фертильности менее 50% (8–48%) (рис. 3, 4).

Среди исследованных растений оказалось 19 (52.7% от общего числа) высокофертильных (ВФ), среднефертильных (СФ) было 11 (30.5%), низкофертильных (НФ) — 6 (16.6%). Таким образом, примерно половина растений имела пыльцу хорошего качества, а половина — пыльцу пониженного качества. Группа высокофертильных растений и группа растений с пониженным качеством пыльцы (средне и низкофертильных растений) по количеству растений распределились как 19 : 17, что соответствует соотношению 1 : 1 (показатель  $\chi^2 =$



**Рис. 1.** Расщепление по вариантам маркера Na-P1 в  $F_2$  гибридов ВИР 116А × ВИР 195 (а), ВИР 116А × ВИР 740 (б) и ВИР 116А × RIL 80 (в). Значками ♀ и ♂ обозначены продукты амплификации маркера материнской (ВИР 116А) и отцовских форм: ВИР 195 (а), ВИР 740 (б) и RIL 80 (в). Цифрами 1–7 обозначены варианты маркера гибридных растений: материнский у растений 1, 5 (а), 1, 2 (б), 7 (в); отцовский у растений 2 (а) 3, 4, 7 (б), 3, 6 (в); гибридный у растений 3, 4, 6, 7 (а), 5, 6 (б), 1, 2, 4, 5 (в). М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific.



**Рис. 2.** Выравнивание фрагмента нуклеотидных (а) и предполагаемых белковых (б) последовательностей На-Р1, прилегающих к стоп-кодону, у образцов ВИР 116А и ВИР 740. В качестве референсных использованы последовательности из базы NCBI: GenBank MNCJ02000328.1 (предположительно кодирует белок суперсемейства нуклеозидтрифосфатгидролаз, содержащих Р-петлю и обогащенные лейциновыми повторами домены) и GenBank AY490793.2 (кодирует белок семейства СС-NBS-LRR). Нумерация нуклеотидов соответствует последовательности GenBank: AY490793.2. Для трансляции использовали стандартный генетический код (программа MEGA 7).

**Таблица 3.** Анализ совместного наследования признака фертильности/стерильности и аллельных вариантов маркера На-Р1 в семьях F<sub>2</sub> гибридов от межлинейных скрещиваний

Комбинация скрещивания	Число растений с фенотипом и предполагаемый генотип каждого фенотипического класса							$\chi^2$ для теоретического соотношения 6:3:3:2:1:1*	P	r
	F, m/p <i>Rf1Rf1mp</i> , <i>Rf1rf1mp</i> (A-Bb)	F, p <i>Rf1Rf1pp</i> , <i>Rf1rf1pp</i> (A-BB)	F, m <i>Rf1Rf1mm</i> , <i>Rf1rf1mm</i> (A-bb)	S, m/p <i>rf1rf1mp</i> (aaBb)	S, m <i>rf1rf1mm</i> (aabb)	S, p <i>rf1rf1pp</i> (aaBB)	всего			
ВИР 116А × ВИР 740	58	27	6	7	23	0	121	58.849	<0.01	8.61
ВИР 116А × ВИР 195, семья 1	48	16	10	3	21	0	98	56.803	<0.01	13.56
ВИР 116А × ВИР 195, семья 2	46	18	13	4	14	0	95	26.432	<0.01	20.4
ВИР 116А × RIL 80	63	39	4	14	21	0	141	53.364	<0.01	14.66

Примечание. Идентифицируемые по фенотипу рекомбинантные классы выделены полужирным шрифтом, в скобках указан предполагаемый фенотипический радикал. F – фертильные растения, S – стерильные растения; m, p и m/p – растения соответственно с материнским, отцовским и гибридным профилем маркера На-Р1. Приведены предполагаемые генотипы растений, относящиеся к конкретному фенотипическому классу. *Rf1* и *rf1* – соответственно доминантный и рецессивный аллели локуса восстановления фертильности, *m* и *p* – аллели STS-маркера локуса *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>*. Ампликон материнской линии ВИР 116А имел длину 1250 пн. Профили маркера отцовских линий различались размерами ампликонов: у линии ВИР 740 ампликоны имели длину 1100 и 1450 пн, ВИР 195 – 1450 и 1650 пн, RIL 80 – 1500, 1750 и 2000 пн. *r* – коэффициент рекомбинации, %. \* *df* = 5,  $\chi^2_{0.05} = 11.1$ .

= 0.74). В зависимости от профилей маркера эти показатели распределились следующим образом: материнский вариант маркера (m) – 6 ВФ/3 СФ/3 НФ, отцовский вариант маркера (p) – 7 ВФ/3 СФ/2 НФ, гибридный вариант маркера (m/p) – 6 ВФ/5 СФ/1 НФ (рис. 3). Таким образом, наличие маркера p не ведет к летальности пыльцы; кроме того, среди растений, продуцирующих гаметы с маркером p, доля стерильной пыльцы не выше, чем у пыльцы, несущей маркер m.

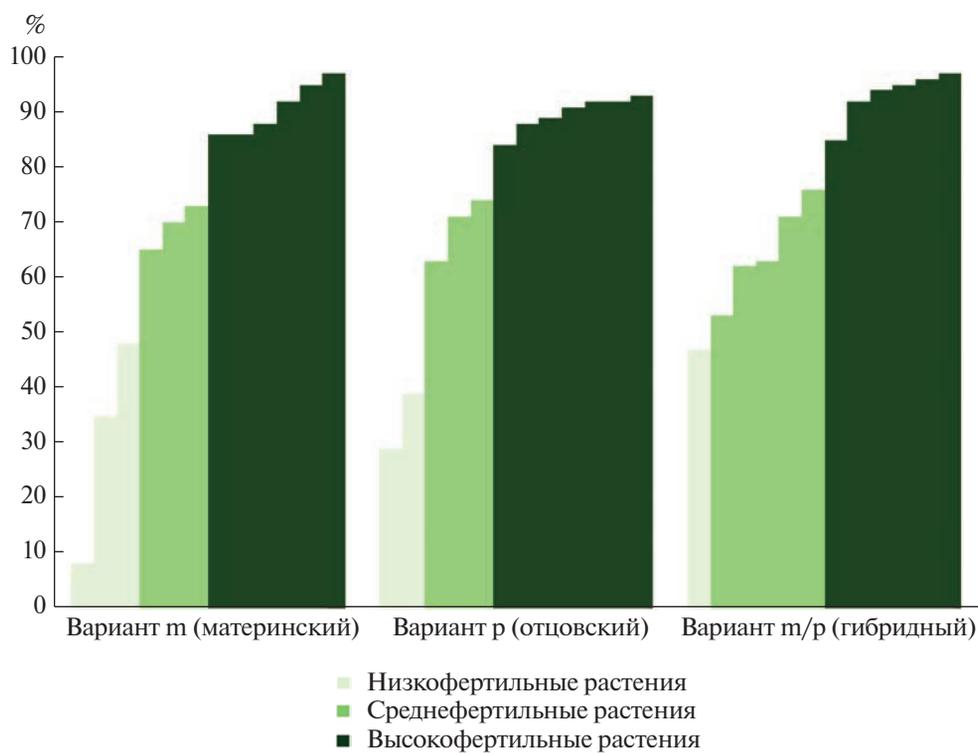
Распределение по уровню фертильности среди растений, относящихся к семье 1, было следующим: 12 ВФ, 5 СФ и 1 НФ. Среди растений из семьи 2 было 7 ВФ, 6 СФ и 5 НФ. В целом в выборке из семьи 1 было отмечено больше растений с высокой фертильностью, чем в выборке из семьи 2. Как видно из диаграммы (рис. 4), разброс значений показателя фертильности пыльцы среди растений из семьи 2 оказался более заметным, чем в семье 1.

Высокофертильные растения характеризуются выровненной по размеру пыльцой, вариационная кривая по диаметру у них имеет нормальный вид, с хорошо выраженным единичным пиком (рис. 5а, б). У пыльцы растений с пониженной фертильностью наблюдается значимо большая гетерогенность по диаметру в сравнении с высокофертильными формами. У среднефертильных растений на графике виден выступ слева, который является показателем того, что увеличивается число более мелких пыльцевых зерен (рис. 5, в, г). При большом количестве стерильной пыльцы

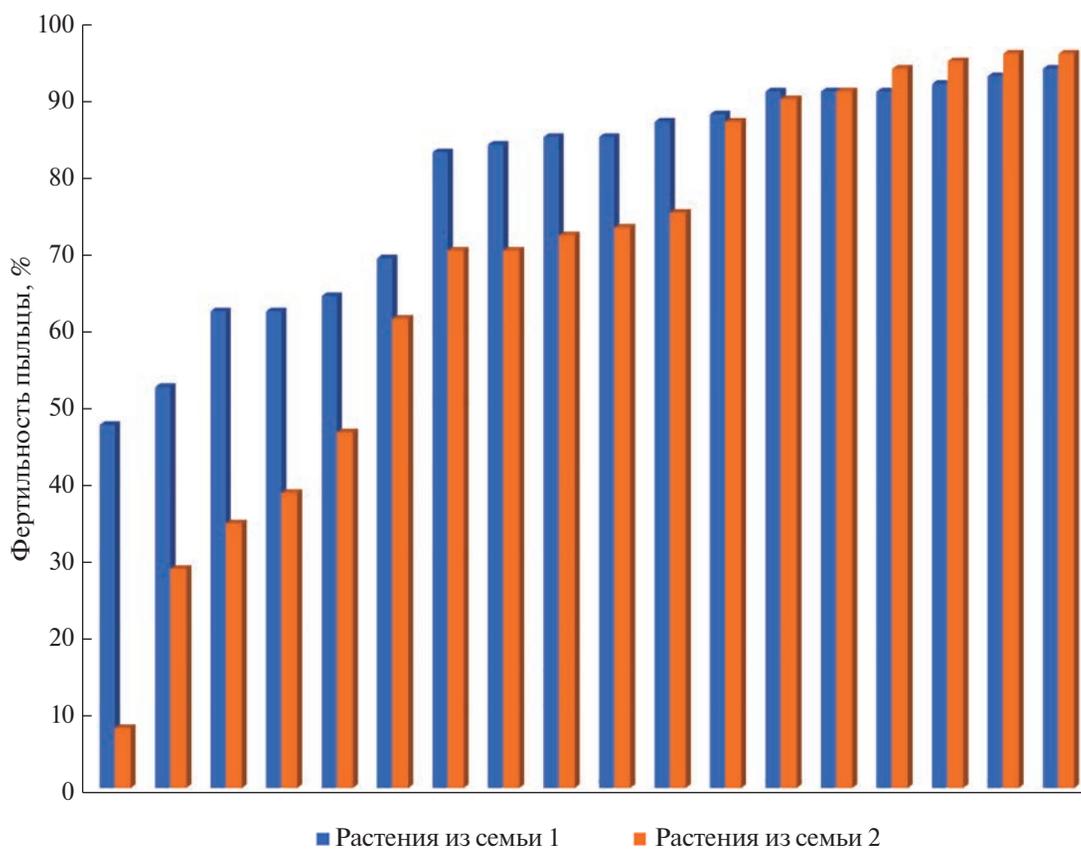
этот выступ может принимать вид второго пика. Появление на графике дополнительного выступа справа свидетельствует о наличии заметного количества более крупных пыльцевых зерен и, как правило, одновременно формируются и совсем мелкие пыльцевые зерна, что отображается в виде подъема в левой части (рис. 5д, е).

## ОБСУЖДЕНИЕ

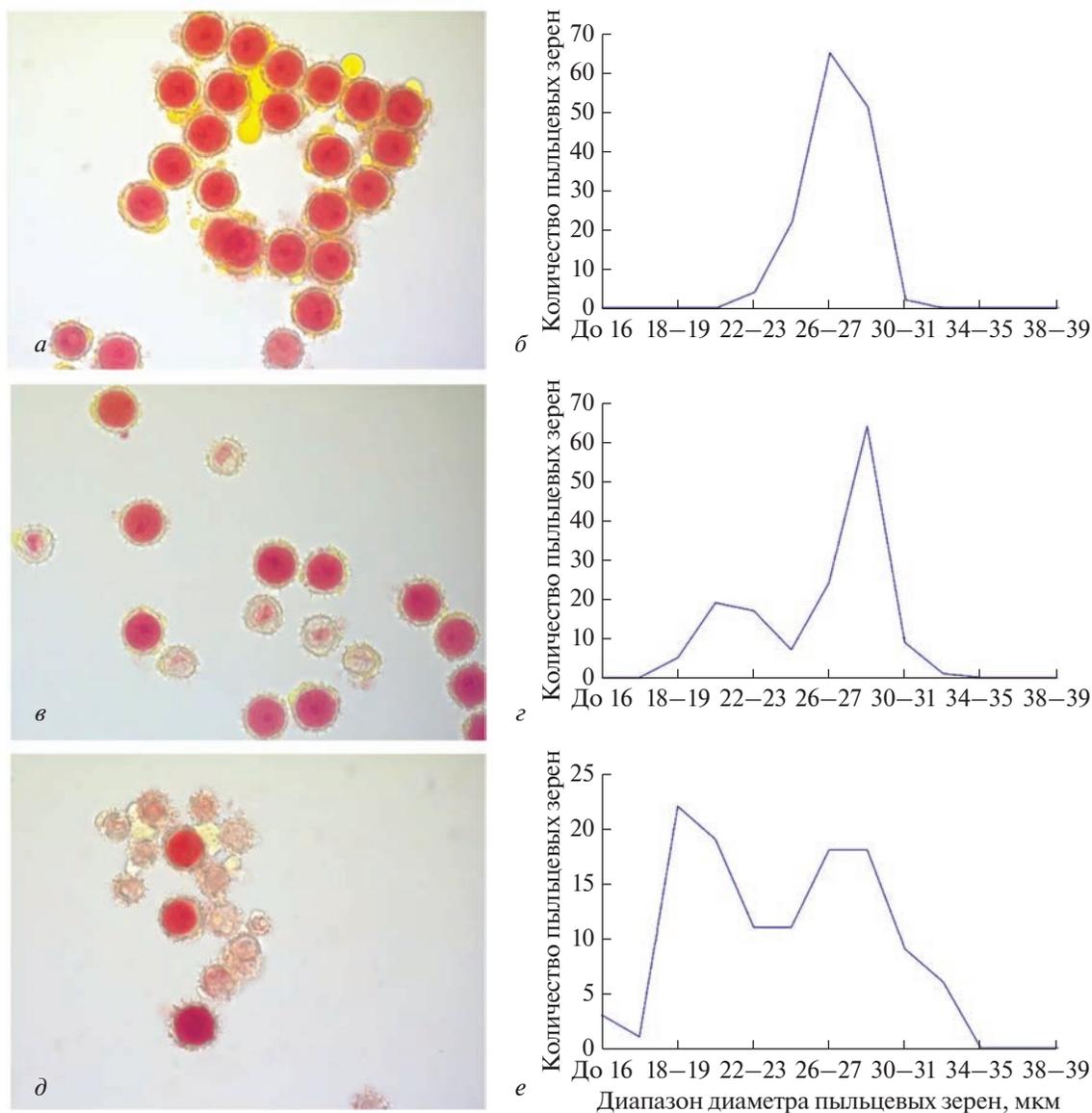
Расщепление в F<sub>2</sub> гибридов от скрещивания одной и той же стерильной линии *H. annuus* с тремя восстановителями фертильности пыльцы, различающимися по происхождению, было близко к теоретически ожидаемому при моногенном контроле признака. Согласно литературным данным за восстановление мужской фертильности при ЦМС РЕТ1-типа отвечает ген *Rf1*, находящийся в хромосоме 13 [2, 18]. Поэтому в качестве рабочей гипотезы было принято предположение о том, что в изучаемых комбинациях скрещивания признак восстановления фертильности пыльцы контролировался одним и тем же локусом (*Rf1*). В пользу этой гипотезы свидетельствуют сходное расщепление в F<sub>2</sub> и сцепленный характер наследования признака с маркерами локуса *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>*, также картированного в группе сцепления 13. В литературе сообщалось еще об одном не сцепленном с *Rf1* локусе, отвечающем за признак восстановления фертильности пыльцы [32]. Считается, что этот ген присутствует в генотипах как стерильных линий, так и восстановителей, и поэтому не влияет



**Рис. 3.** Фертильность пыльцы (%) у растений  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195) с разными вариантами маркера На-Р1 (локус  $Pl_3/Pl_8$ ).



**Рис. 4.** Вариабельность по признаку фертильности пыльцы выборок растений из двух семей гибридов  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195).



**Рис. 5.** Микрофотографии пыльцы растений  $F_2$  гибридов (ВИР 116А × ВИР 195) и вариационные кривые по диаметру пыльцевых зерен: а, б – высокофертильное растение (фертильность 97%); в, г – среднефертильное растение (фертильность 74%); д, е – низкофертильное растение (фертильность 39%).

на характер расщепления. Генетическое расстояние между локусами *Rf1* и *Pl5*, впервые установленное в работах L. Gentzbittel et al. [16] и P. Bert et al. [17], составило около 15%. В наших экспериментах значения силы сцепления между двумя локусами, полученные в разных комбинациях скрещивания, колебались от 8,6% (ВИР 116А × ВИР 740) до 20,4% (ВИР 116А × ВИР 195, семья 2). Поскольку во всех трех скрещиваниях материнской формой служила одна и та же линия, а гибриды  $F_1$  были выращены в одинаковых условиях, различия величины рекомбинации могли быть обусловлены влиянием генотипа отцовской формы.

Частота рекомбинации зависит от многих факторов, среди которых основным является степень дивергенции гомологичных районов хромосом. В районах хромосом с относительно низким уровнем гомологии (например, интрогрессированных из геномов других видов) степень рекомбинации при конъюгации может быть снижена. Сравнительные исследования транскриптома четырех однолетних видов подсолнечника (*H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. debilis* Nutt., *H. petiolaris*) показали, что в эволюции геномов видов решающим фактором является не столько обмен генами (речь идет о видах, способных скрещиваться), сколько подавление рекомбинации в определенных районах, что при-

водит к образованию так называемых “островков дивергенции” [33]. Так, например, частота рекомбинации между молекулярными маркерами и локусом  $Pl_{arg}$ , интрогрессированным от однолетнего дикого вида *H. argophyllus*, невелика, тогда как на физической карте маркеры и локус находятся на значительном расстоянии. В результате подавления рекомбинации в данном районе наблюдается “кластеризация” молекулярных маркеров вблизи локуса гена устойчивости, что весьма благоприятно для проведения маркер-опосредованного отбора в селекции устойчивых форм [12] и пирамидирования генов [13].

Наиболее вероятные кандидаты в локусе  $Rf1$  хромосомы 13 находятся между позициями 170494693–178217103 [5] или 169655088–173581392 референсного генома [6]. В нашей работе установлено, что сайт отжига праймера для маркера На-Р1 локализован в позиции 165737987. Следовательно, физическое расстояние между маркером На-Р1 и локусом  $Rf1$  составляет 4–5 млн пн (длина хромосомы 13 по данным сайта NCBI – примерно 173 млн пн).

В настоящей работе при анализе рекомбинации между геном  $Rf1$  (фенотипический маркер – признак восстановления фертильности) и внутрилокусным STS-маркером На-Р1 впервые выявлена нехватка одного из рекомбинантных классов. Это может служить одним из факторов наблюдаемого снижения показателя рекомбинации на данном участке хромосомы 13 в отдельных комбинациях скрещиваний.

Результаты цитологического анализа свидетельствуют о значительной гетерогенности популяции  $F_2$  (ВИР 116А × ВИР 195) по признаку фертильности пыльцы. Среди растений, фенотипированных как фертильные, выявлена группа высокофертильных, имеющих пыльцу хорошего качества, и группа растений с пониженным качеством пыльцы (средне- и низкофертильных растений), с соотношением 1 : 1. Также выявлена тенденция к снижению уровня фертильности у рекомбинантов с материнским типом маркера На-Р1, специфичного для локуса  $Pl_5/Pl_8$ , т.е. у генотипов, гомозиготных по аллелю  $m$ , полученному от материнской формы. Однако эти факты не могут объяснить отсутствие фенотипического класса “стерильный с отцовским (р) вариантом маркера” в расщепляющихся популяциях гибридов  $F_2$ . Нехватка фенотипического класса стерильных растений с отцовским вариантом маркера среди 455 проанализированных сегрегантов  $F_2$  может быть связана с эмбриональной летальностью генотипов, гомозиготных по рецессивному аллелю гена восстановления фертильности  $Rf1$  и аллелю гена устойчивости в локусе  $Pl_5/Pl_8$ , полученному от отцовского родителя ( $rf1rf1pp$ ). У растений идентифицирован ряд генов, вызывающих летальность либо понижен-

ную жизнеспособность гибридов от межвидовых скрещиваний. Многие из них обуславливают устойчивость к патогенам и кодируют рецепторы внутриклеточного ответа – белки семейства NBS-LRR [34]. В частности, недавно показано, что ген, обуславливающий гибридную летальность при скрещивании видов хлопчатника *Gossypium barbadense* L. и *G. hirsutum* L., кодирует белок семейства CC-NBS-LRR [35]. Установлено также, что нарушения эмбриогенеза и развития зародыша у кукурузы и арабидопсиса часто связаны с дефектами генов, кодирующих PPR-белки, принимающих участие в редактировании транскриптов митохондриальных и хлоропластных генов [36].

В настоящей работе выявлены различные аномалии пыльцы растений  $F_2$ , в частности так называемые микро- и макропыльцевые зерна. Они образуются в результате неравномерного расхождения хромосом в мейозе при образовании микроспор: одному ядру достается излишек генетического материала, а в другом получается недостаток, что приводит к несимметричному заложению клеточных перегородок в тетраде и в итоге к образованию неравных микроспор. А это, в свою очередь, случается при нестабильном геноме (у гибридов, у полиплоидов) или же может быть ответом на неблагоприятные условия среды. Так, исследование пыльцы у  $F_1$  между *H. annuus* и *H. resinosus* Small выявило гетерогенность пыльцевых зерен по размеру, а на графиках распределения пыльцы по диаметру были обнаружены два четко различимых пика: в районе 19 и 24 мкм, что было связано с нарушениями в мейозе, которые приводят к формированию диплоидной пыльцы [37]. Значимая разница между диаметром фертильных (окрашенных) и стерильных пыльцевых зерен отмечается не только у подсолнечника, но и у других видов. Например, у *Mimulus guttatus* DC это разница составляет около 13 мкм, что позволяет использовать диаметр пыльцевого зерна для автоматического подсчета соотношения фертильных и стерильных пыльцевых зерен [38].

Довольно большое число генов растений незаменимы для функционирования гаметофита и раннего развития семян. У подсолнечника фертильность пыльцы гибридов  $F_1$  высока (90–100%), тогда как в  $F_2$  она может значительно снижаться [39]. Теоретически растения  $F_1$  изученных комбинаций скрещиваний продуцировали четыре типа гамет – несущих доминантный или рецессивный аллель гена восстановления фертильности, а также разные аллели маркерного фрагмента. Существует вероятность того, что гаметы с разным сочетанием аллелей гена  $Rf1$  и вариантов маркерного фрагмента На-Р1 различаются по жизнеспособности. Однако, как было показано ранее на других комбинациях скрещивания с участием линии ВИР 116А, вся пыльца выглядит качественно в  $F_1$  и неодно-

родность по показателям фертильности более четко проявляется в  $F_2$  [39]. Это позволяет предположить, что контроль показателей фертильности пыльцы осуществляется на уровне спорофита.

Фертильность пыльцы – важный селекционный признак, определяющий продуктивность гибридов. Снижение уровня фертильности приводит к снижению урожайности гибридов подсолнечника, появлению “череззерницы”. Как следует из полученных данных, гибель части зародышей при самоопылении гибридов  $F_1$  может быть генетически детерминирована. Это может приводить к снижению завязываемости семян и снижению продуктивности гибридов. Другим фактором, влияющим на завязываемость семян при самоопылении, является автофертильность, показателем которой служит отношение числа завязавшихся семян к общему числу семян в корзинке при самоопылении и при открытом цветении. Завязываемость семян, особенно при самоопылении, является сложным признаком полигенной природы [40]. Автофертильность гибридов подсолнечника составляет 43%, самоопыленных линий – 37% и сортов-популяций – 7% [41]. Доказан существенный вклад генотипа в завязываемость семян [42]. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что на завязываемость семян у гибридов  $F_1$  на основе ЦМС РЕТ1 может оказывать влияние и такой фактор, как гибель одного из рекомбинантных классов, включающего полученный от материнского родителя рецессивный аллель гена *rf1* и аллель находящегося в том же плече хромосомы 13 локуса устойчивости отцовского родителя.

В настоящей работе изучены особенности совместного наследования двух картированных в группе сцепления 13 *H. annuus* локусов: *Rf1* (фенотипический маркер – признак восстановления фертильности пыльцы) и *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* (STS-маркер На-Р1). Частота рекомбинации между двумя локусами в популяциях  $F_2$  от скрещиваний одной и той же стерильной линии-тестера с тремя линиями – восстановителями фертильности пыльцы варьирует от 8.7 до 20%. Среди фенотипических классов во всех изученных популяциях  $F_2$  не выявлены рекомбинантные гомозиготы по рецессивному аллелю *rf1*, полученному от материнского родителя, и отцовскому варианту внутрислокусного маркера *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* отцовского родителя. Возможно, их отсутствие обусловлено гибелью зигот, содержащих аллель *rf1* и аллель гена устойчивости в локусе *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>*, продуктами которого являются белки подсемейства CC-NBS-LRR.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России “Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного развития РФ в сфере гене-

тических технологий” по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021 г.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Leclercq P.* Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol // Ann. Amélior. Plant. 1969. V. 19. № 2. P. 99–106.
2. *Kinman M.L.* New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs // Proc. 4th Intern. Sunflower Conference. Memphis, TN, USA, 23 June 1970. P. 181–183.
3. *Dimitrijevic A., Horn R.* Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection // Front. Plant Sci. 2018. V. 17. № 8. Article 2238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02238>
4. *Radwan O., Gandhi S., Heesacker A. et al.* Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower // Mol. Genet. Genomics. 2008. V. 280. P. 111–125. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0346-1>
5. *Goryunov D.V., Anisimova I.N., Gavrilova V.A. et al.* Association mapping of fertility restorer gene for CMS РЕТ1 in sunflower // Agronomy. 2019. V. 9. № 2. Article 49. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020049>
6. *Horn R., Radanovic A., Fuhrmann L. et al.* Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rf1* in sunflower // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 6. Article 1260. <https://doi.org/10.3390/ijms20061260>
7. *Radanović A., Sprycha Y., Jocković M. et al.* KASP markers specific for the fertility restorer locus *Rf1* and application for genetic purity testing in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) // Genes. 2022. V. 13. Article 465. <https://doi.org/10.3390/genes13030465>
8. *Qi L.L., Seiler G.J., Vick B.A., Gulya T.J.* Genetics and mapping of the *R11* gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Publ. from USDA-ARS / UNL Faculty. 2012. 1318. <https://doi.org/digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1318>
9. *Dahan J., Mireau H.* The *Rf* and *Rf*-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes // RNA Biol. 2013. V. 10. № 9. P. 1469–1476. <https://doi.org/10.4161/rna.25568>
10. *Ma G., Long Y., Song Q. et al.* Map and sequence-based chromosome walking towards cloning of the male fertility restoration gene *Rf5* linked to *R11* in sunflower // Sci. Reports. 2021. № 11. Article 777. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80659-6>
11. *Wei F.S., Gobelman-Werner K., Morroll S.M. et al.* The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated

- with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley // *Genetics*. 1999. V. 153. № 4. P. 1929–1948.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/153.4.1929>
12. *Wieckhorst S., Bachlava E., Dußle C.M. et al.* Fine mapping of the sunflower resistance locus *Plarg* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. № 8. P. 1633–1644.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1416-4>
  13. *Qi L., Ma G.* Marker-assisted gene pyramiding and the reliability of using SNP markers located in the recombination suppressed regions of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Genes*. 2020. V. 11. № 1. Article 10.  
<https://doi.org/10.3390/genes11010010>
  14. *Bowers J.E., Bachlava E., Brunick R.L. et al.* Development of a 10,000 locus genetic map of the sunflower genome based on multiple crosses // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2012. V. 2. № 1. P. 721–729.  
<https://doi.org/10.1534/g3.112.002659>
  15. *McMullen M.D., Kresovich S., Villeda H.S. et al.* Genetic properties of the maize nested association mapping population // *Science*. 2009. V. 325. P. 737–740.  
<https://doi.org/10.1126/science.1174320>
  16. *Gentzbittel L., Vear F., Zhang Y.X. et al.* Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 1079–1086.  
<https://doi.org/10.1007/BF00222925>
  17. *Bert P., Tourvieille de Labrouhe D., Phillippon J. et al.* Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 103. P. 992–997.  
<https://doi.org/10.1007/s001220100660>
  18. *Yu J.K., Tang S., Slabaugh M.B. et al.* Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // *Crop. Sci.* 2003. V. 42. P. 367–387.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2003.3670>
  19. *Vear V.* Classic genetics and breeding // *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower* / Eds Hu J., Seiler G., Kole Ch. USA: Clemson Univ., Clemson, SC, 2010. P. 50–77.
  20. *Vear F., Serieys H., Petit A. et al.* Origins of major genes for downy mildew resistance in sunflower // *Proc. 17th Intern. Sunflower Conference*. Spain: Córdoba, 2008. P. 125–130.
  21. *Radwan O., Bouzidi M.F., Nicolas P., Mouzeyar S.* Development of PCR markers for the *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. № 1. P. 176–185.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1613-0>
  22. *Маркин Н.В., Тихобаева В.Е., Усатенко Т.В. и др.* Генотипирование линий подсолнечника с различной устойчивостью к ложной мучнистой росе с помощью STS-маркеров // *Научно-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур*. 2012. Вып. 2. С. 151–152.
  23. *Рамазанова С.А., Антонова Т.С.* Маркирование локусов *Pl6*, *Pl13* and *Plarg*, контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника селекции ВНИИМК // *Масличные культуры*. Научно-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур. 2020. Вып. 3 (1831). С. 20–26.  
<https://doi.org/10.25230/2412-608X-2020-3-183-20-26>
  24. *Гаврилова В.А., Ступникова Т.Г., Макарова Л.Г. и др.* Линии генетической коллекции подсолнечника ВИР, устойчивые к ложной мучнистой росе // *Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2021. Т. 182. № 3. С. 101–110.  
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-101-110>
  25. *Анисимова И.Н., Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В. и др.* Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rf1* подсолнечника // *Биотехнология и селекция растений*. 2021. Т. 4. № 2. С. 28–37.  
<https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-о3>
  26. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Выш. шк., 1974. 448 с.
  27. *Li J.T., Yang J., Chen D.C. et al.* An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower // *Genet. Mol. Res.* 2007. V. 6. № 4. P. 1064–1071.  
<https://doi.org/gmr341>
  28. *Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H.* One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 7. P. 2172–2175.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>
  29. *Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е. и др.* ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: методические указания / Под ред. Потокиной Е.К. СПб.: ВИР, 2019.  
<https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3>
  30. *Воронова О.Н., Гаврилова В.А.* Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе // *Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019. Т. 180. № 1. С. 95–104.  
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
  31. *Radwan O., Bouzidi M.F., Vear F. et al.* Identification of non-TIR-NBSLRR markers linked to the *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 1438–1444.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1196-1>
  32. *Horn R., Kusterer B., Lazarescu E. et al.* Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 599–606.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-002-1078-y>
  33. *Renaut S., Grassa C.J., Yeaman S. et al.* Genomic islands of divergence are not affected by geography of speciation in sunflowers // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. Article 1827.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2833>
  34. *Swiadek M., Proost S., Sieh D. et al.* Novel allelic variants in ACD6 cause hybrid necrosis in local collection of *Arabidopsis thaliana* // *New Phytologist*. 2017. V. 213. P. 900–915.  
<https://doi.org/10.1111/nph.14155>
  35. *Deng J., Fang L., Zhu X. et al.* A CC-NBS-LRR gene induces hybrid lethality in cotton // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. № 19. P. 5145–5156.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz312525>

36. Li X., Sun M., Liu S. et al. Functions of PPR proteins in plant growth and development // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Article 11274. <https://doi.org/10.3390/ijms222011274>
37. Kelly J.K., Rasch A., Kalisz S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation // *Amer. J. Bot.* 2002. V. 89. № 6. P. 1021–1023. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.6.1021>
38. Zanetti J.M., Greizerstein E., Camadro E. et al. Genomic relationship between hexaploidy *Helianthus resinosus* and diploid *Helianthus annuus* (Asteraceae) // *Plant Syst. Evol.* 2014. V. 300. P. 1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0945-0>
39. Karabitsina Yu.I., Gavrilova V.A., Alpatieva N.V. et al. Peculiarities of inheritance of pollen fertility restoration trait in sunflower with cytoplasmic male sterility // *Rus. J. Genet.* 2019. V. 55. № 11. P. 1375–1382. <https://doi.org/10.1134/S0016675819110079>
40. Sun Y., Godwin I.D., Arief V.N. et al. Factors controlling self-fertility in sunflower: the role of GCA/SCA effects, S alleles, and floret characteristics // *Crop Sci.* 2012. V. 52. P. 128–135. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.04.0188>
41. Бочковой А.Д., Камардин В.А., Назаров Д.А. О перспективах отбора самофертильных биотипов в первичных звеньях семеноводства подсолнечника // Масличные культуры. Научно-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур. 2020. Вып. 1 (181). С. 3–11. <https://doi.org/10.25230/2412-608X-2020-1-181-3-11>
42. Демури Я.Н., Рубанова О.А. Завязываемость семян у гибридов подсолнечника в конкурсном сортоиспытании // Тр. Кубанского гос. аграрного университета. Краснодар, 2019. № 5(80). С. 109–113. <https://doi.org/10.21515/1999-1703-80-109-113>

## A Recombination Suppressed Region of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Linkage Group 13 Covers Restoration of Fertility (*Rf1*) and Downy Mildew Resistance (*Pl*) Gene Clusters

I. N. Anisimova<sup>a, \*</sup>, N. V. Alpatieva<sup>a</sup>, O. N. Voronova<sup>b</sup>, V. A. Gavrilova<sup>a</sup>,  
Yu. I. Karabitsina<sup>a</sup>, E. B. Kuznetsova<sup>a</sup>, and E. E. Radchenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia

<sup>b</sup>Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197022 Russia

\*e-mail: irina\_anisimova@inbox.ru

A number of genes that control valuable for breeding traits introgressed from wild relatives, i.e. pollen fertility restoration, resistance to fungal diseases (downy mildew and rust), are mapped on linkage group 13 of the cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. genome. In sunflower and other plants, the recombination in the chromosome regions containing resistance genes can be suppressed that is favourable for marker assisted selection with applying molecular markers linked to these loci. The joint inheritance of the loci *Rf1* (the phenotypic marker is fertility restoration trait) and *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* conferring resistance to many races of *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni (the STS marker Ha-P1) was studied in the F<sub>2</sub> generation of hybrids between a sterile line VIR 116A lines and pollen fertility restorers from sunflower VIR collection. In the crossing VIR 116A × VIR 740, the frequency of recombination between the loci *Pl<sub>5</sub>/Pl<sub>8</sub>* and *Rf1* constituted 8.61 whereas in the crosses VIR 116A × VIR 195 and VIR 116A × VIR 80 turned out to be twice as high. In all examined F<sub>2</sub> populations the absence of phenotypic class of sterile plants possessing paternal Ha-P1 marker variant was mentioned. It has been shown by the cytological analysis that pollen fertility indices are most probably determined by the plant genotype rather than the male gametophyte allelic constitution. A deficiency of a recombinant F<sub>2</sub> class was proposed to be associated with embryonic lethality, i.e. the collapse of zygotes carrying the recessive allele of fertility restoration gene and a specific allele of the resistance (susceptibility) gene obtained from the male parent.

**Keywords:** hybrids, inheritance, loci, alleles, molecular markers, phenotypic classes, pollen fertility, zygotic lethality.