

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ CAPS-МАРКЕРА, АССОЦИИРОВАННОГО С ГЕНОМ *Rf2* У СОРГО (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Радченко Е. Е.^{1*}, Алпатьева Н. В.¹, Карабицина Ю. И.¹, Рязанова М. К.², Кузнецова Е. Б.¹, Романова О. И.¹, Анисимова И. Н.¹

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44

*  eugene_radchenko@rambler.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), 199034 Россия, г.Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9;

Актуальность. Создание гетерозисных гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) является ведущей стратегией селекции сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). В контроле признака восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС А1 (milo), наиболее широко используемым в селекции, принимают участие не менее двух доминантных комплементарных генов, *Rf1* и *Rf2*, а также ген *Rf5*. Разработка доступных молекулярных маркеров *Rf* генов сорго весьма актуальна для гибридной селекции, так как с их помощью можно значительно ускорить процесс создания материнских стерильных линий (А), линий – закрепителей стерильности (В) и восстановителей фертильности пыльцы (R) при создании гетерозисных гибридов F₁. **Материал и методы.** Материалом исследования служили 36 образцов сорго из коллекции ВИР, различающихся по способности к восстановлению фертильности пыльцы при ЦМС А1-типа. Изучали нуклеотидный полиморфизм фрагментов длиной 935 пн PPR-генов *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200*, расположенных на хромосоме 2. **Результаты.** Полученные с помощью праймеров 2459403fw и 2459403 фрагменты длиной 935 пн включали участки трех генов: *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200*. Для идентификации вариантной последовательности *Sobic.002G057050*-1090, ассоциированной с геном *Rf2*, была подобрана рестриктаза Tru9 I, позволяющая получить в суммарном спектре уникальный для исследованных R-линий фрагмент длиной 572 пн. В коллекции генетических ресурсов ВИР такой маркер был найден у 10 линий сорго из западного Китая и Киргизии, используемых селекционерами в качестве восстановителей. Ни у одной из трех линий со стерильной цитоплазмой и их фертильных аналогов, а также у 7 образцов кафрского сорго, не имеющих функциональных аллелей генов *Rf*, фрагмент не обнаружен. **Заключение.** Показано, что маркер может быть использован для отбора и проверки чистоты R и В/А линий, а также применим в гибридной селекции при проверке гибридности семян F₁ и анализа гибридных популяций, полученных от скрещивания исследованных R-линий 924-4, 928-1, 929-3, 931-1, 933-1/6, 1237-3, 1243-2, 1251, 1150-1, F₁₀BC₂ и А линий Низкорослое 81с, А-83 и А-10598. Можно предположить, что у R-линий, не имеющих маркера CAPS-572, способность восстанавливать фертильность пыльцы определяется другим *Rf* геном. У исследованных R и В/А линий изученный фрагмент *Sobic.002G057050* имеет 22 SNP на участке длиной 935 пн, следовательно, разработка CAPS-маркеров для их идентификации и дифференциации может быть перспективной.

Ключевые слова: цитоплазматическая мужская стерильность, А1 (milo), восстановление фертильности пыльцы, генетический контроль, ПЦР-маркеры, рестрикционный анализ

Для цитирования:

Радченко Е.Е., Алпатьева Н.В., Карабицина Ю.И., Рязанова М.К., Кузнецова Е.Б., Романова О.И., Анисимова И.Н. Разработка и валидация CAPS-маркера, ассоциированного с геном *Rf2* у сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(2):38-47. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-04

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.** **Дополнительная информация.** Полные данные этой статьи доступны <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-04> **Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы. Все авторы одобрили рукопись. Конфликт интересов отсутствует.**

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования России в рамках соглашения № 075-15-2020-911 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CAPS-MARKER ASSOCIATED WITH THE *Rf2* GENE IN SORGHUM (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Radchenko E. E.^{1*}, Alpatieva N. V.¹, Karabitsina Yu. I.¹, Ryazanova M. K.², Kuznetsova E. B.¹, Romanova O. I.¹, Anisimova I. N.¹

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia

*  eugene_radchenko@rambler.ru

²Saint Petersburg State University (SPbU),
7/9 Universitetskaya Emb., 199034, St. Petersburg, Russia

Background. The development of heterotic hybrids based on cytoplasmic male sterility (CMS) is the leading strategy in breeding sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). The trait of pollen fertility restoration in forms with CMS A1 (milo), predominantly used in sorghum breeding, is determined by at least two dominant complementary genes *Rf1* and *Rf2*, and also gene *Rf5*. The development of accessible molecular markers of sorghum *Rf* genes is highly relevant for hybrid breeding, since they can significantly accelerate the process of creating female sterile forms (A lines), sterility maintainers (B lines) and pollen fertility restorers (R lines). **Material and methods.** The studied material included 36 sorghum accessions from the VIR collection, which differed by the ability to restore pollen fertility in forms with A1-type CMS. The nucleotide polymorphism of 935 bp fragments of the PPR genes *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, and *Sobic.002G054200* located at the chromosome 2 was studied. **Results.** The fragments obtained with the use of a pair of 2459403fw and 2459403 primers were 935 bp long and included parts of three genes: *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200*. For identifying the sequence variant *Sobic.002G057050-1090* associated with the *Rf2* gene, Tru9 I restrictase was chosen, which allows obtaining a 572 bp fragment unique for all the studied R lines. Such a marker was found in 10 sorghum lines from West China and Kyrgyzstan, which are widely used in breeding as fertility restorers. The fragment was found neither in three lines with sterile cytoplasm and their fertile analogues, nor in 7 accessions of kafir sorghum, which lacked functional alleles of *Rf* genes. **Conclusions.** It has been demonstrated that the marker can be used for selection and checking purity of R and B/A lines. It is also applicable for verifying hybridity of F₁ seeds and analyzing hybrid populations from crosses of R lines 924-4, 928-1, 929-3, 931-1, 933-1/6, 1237-3, 1243-2, 1251, 1150-1, F₁₀BC₂ with A lines Nizkorosloe 81s, A-83 and A-10598. It may be suggested that the ability to restore pollen fertility in R lines, which lack the marker CAPS-572, is determined by another *Rf* gene. The studied 935 bp fragment of *Sobic.002G057050* harbours 22 SNP, therefore the development of CAPS-markers for their identification and differentiation can be promising.

Key words: cytoplasmic male sterility, A1 (milo), pollen fertility restoration, genetic control, PCR markers, restriction analysis

For citation:

Radchenko E.E., Alpatieva N.V., Karabitsina Yu.I., Ryazanova M.K., Kuznetsova E.B., Romanova O.I., Anisimova I.N. Development and validation of CAPS-marker associated with the *Rf2* gene in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(2):38-47. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-04

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. Additional information.

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-04> The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. All authors approved the manuscript. No conflict of interest.

ORCID ID:

Radchenko E.E. <https://orcid.org/0000-0002-3019-0306>

Alpatieva N.V. <https://orcid.org/0000-0002-5531-2728>

Karabitsina Yu.I. <https://orcid.org/0000-0002-8384-5134>

Ryazanova M.K. <https://orcid.org/0000-0003-4444-3658>

Kusnetsova E.B. <https://orcid.org/0000-0002-9804-1286>

Anisimova I.N. <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

УДК 633.174:631.527.56:577.21

Поступила в редакцию: 15.05.2021

Принята к публикации: 25.06.2021

Acknowledgments: The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of Agreement No. № 075-15-2020-911 of 16.11.2020 on providing a grant in the form of subsidies from the federal budget for the implementation of state support for the creation and development of the world-class scientific center "Agrotechnologies for the future".

Введение

Сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) – ценное сельскохозяйственное растение, возделываемое в 85 странах мира в качестве кормовой, пищевой и технической культуры. Сорго обладает рядом ценных биологических свойств: высокими кормовыми и питательными качествами, высокой фотосинтетической активностью, устойчивостью к засухе и выносливостью к засолению почв, хорошей экологической пластичностью. Наблюдаемые в последние десятилетия изменения климата сопровождаются возрастанием температур, увеличением частоты и интенсивности засух, поэтому интерес к сорго как перспективной страховой культуре в Российской Федерации неуклонно возрастает (Alabushev et al., 2017). По сравнению с большинством других злаков, сорго имеет небольшое число хромосом и малый объем генома (около 800 Мб), что делает его уникальным объектом для генетических и геномных исследований (Paterson et al., 2009; Boatwright et al., 2021).

Ведущей стратегией селекции сорго в мире является создание гетерозисных гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), открытой в 1930-х гг. М.И. Хаджиновым (Hadjinov, 1937) и Стивенсом и Квинби (Stephens, Quinby, 1934). В настоящее время наиболее широко используется тип ЦМС А1 (milo), впервые описанный Стивенсом и Холландом (Stephens, Holland, 1954) как результат взаимодействия цитоплазмы milo с ядерными генами, полученными при гибридизации, от кафрского сорго.

Известно, что в контроле признака восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС А1 (milo) принимают участие не менее двух доминантных комплементарных генов *Rf* (*Restoration of pollen fertility*, восстановление фертильности пыльцы), *Rf1* и *Rf2*, а также ген *Rf5* (Klein et al., 2005; Jordan et al., 2010, 2011), локализованные на хромосомах SBI-08, SBI-02 и SBI-05, соответственно.

Разработка доступных молекулярных маркеров генов *Rf* сорго весьма актуальна для гибридной селекции, так как с их помощью можно значительно ускорить процесс получения материнских стерильных линий (А), линий-закрепителей стерильности (В) и восстановителей фертильности пыльцы (R) при создании гетерозисных гибридов F₁ на основе ЦМС. Молекулярные маркеры эффективны при подборе родительских пар, а также могут служить дополнительным инструментом при изучении генетического разнообразия линий сорго, сохраняемых в генетических банках семян. Идеальными маркерами генов *Rf*, безусловно, могут служить аллель-специфичные вну-

трилокусные маркеры, разработанные на основе анализа полиморфизма кодирующих последовательностей. Последовательность гена-кандидата в локусе *Rf1* известна; его продукт относится к классу PPR-белков. Опубликованы SSR-маркеры, наиболее близкие к локусу *Rf1*. Один из них – микросателлитный маркер Xtxp18 – использован для молекулярной идентификации аллелей гена *Rf1* в коллекционных образцах Аграрного научного центра «Донской» (Vozhzhova et al., 2021). Наиболее вероятный ген-кандидат в локусе *Rf2* – гомолог гена *Rf1* риса *Oryza sativa* L, восстановитель фертильности пыльцы при ЦМС ВТII-типа (Jordan et al., 2010). Фрагмент последовательности гена *Rf2* (XM_002459403.1) из первой версии аннотированного генома *Sorghum bicolor* (Paterson et al., 2009) использовался нами в качестве референсного при сравнительном анализе полиморфизма у линий-носителей рецессивного и доминантного аллелей (Anisimova et al., 2017). Почти одновременно и независимо от нас индийским ученым Мадугула с соавторами (Madugula et al., 2018) было выполнено тонкое генетическое картирование локуса *Rf2*; в качестве референсной использовалась последовательность предполагаемого гена *Sobic.002G057050* из обновленной версии аннотированного генома *Sorghum bicolor* (McCormick et al., 2017). Авторы секвенировали полноразмерную геномную последовательность гена-кандидата *Rf2*, изучили характер его экспрессии у линий, используемых в национальных селекционных программах по созданию гибридов сорго, провели анализ полиморфизма аллельных вариантов и предложили ряд SSR-маркеров для выявления функционального аллеля (Madugula et al., 2018). При изучении другого селекционного материала, используемого в гибридной селекции на территории Западной Африки, с использованием технологии секвенирования GBS Канте с соавторами (Kante et al., 2018) идентифицировали гены *Rf2* и *Rf5*, а также QTL, влияющие на проявление признака восстановления фертильности пыльцы. В последовательности *Sobic.002G057050* (ген *Rf2*) авторы выявили миссенс-мутацию в позиции 1090 первого экзона PPR-гена. Мутация связана с нуклеотидной заменой А/Т и позволяет четко дифференцировать линии-восстановители фертильности (R-линии) и закрепители стерильности (В-линии). Для идентификации мутации была использована технология KASPTM (Конкурентная аллель-специфичная ПЦР /Competitive Allele Specific PCR) и разработан KASP¹-маркер (Competitive Allele Specific PCR), и с помощью ПЦР исследован пул сортов сорго Северной Африки (Kante et al., 2018). Настоящее исследование посвящено разработке маркера CAPS

¹ **От Редактора:** Маркер получил название KASP, поскольку акроним CASP, более правильный с грамматической точки зрения, уже к тому времени получил распространение в биологии для обозначения трансмембранного белка матрикса аппарата Гольджи (например, см. Renna et al., 2005 DOI: 10.1007/s11103-005-4618-4)

¹ **Editor's note:** The marker was named KASP because the CASP acronym, which is more correct in terms of grammar, had already become common in biology to denote the transmembrane matrix protein of the Golgi apparatus (for example, see Renna et al., 2005 DOI: 10.1007/s11103-005-4618-4)

(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) для поиска носителей этой мутации у линий сорго коллекции ВИР, различающихся по способности к супрессии фенотипа ЦМС А1-типа.

Материал и методы

Для разработки и валидации маркера, ассоциированного с доминантным аллелем гена *Rf2*, исследовали 20 линий, отобранных по устойчивости к фитофагу, обыкновенной злаковой тле (*Schizaphis graminum* Rondani), из образцов хлебного сорго (Radchenko, 2000, 2006). Все линии восстанавливают фертильность пыльцы в полевых условиях. Кроме того, исследовали 7 линий

кафрского сорго из США, способность к восстановлению фертильности пыльцы которых ранее не изучалась. Материалом служили также стерильные линии на основе ЦМС А1 (milo) Низкорослое 81с (Украина), А-10598 и А-83 (Индия), их фертильные аналоги Низкорослое 81ф, В-10598 и В-83, гибрид F_1 Низкорослое 81с \times 929-3 и устойчивые к *S. graminum* сестринские линии $F_{10}BC_2$, $F_{11}BC_2$, выделенные из гибридов от скрещиваний стерильной линии Низкорослое 81с с восстановителем 929-3, который защищен двумя доминантными генами устойчивости к краснодарской популяции данного фитофага (Radchenko, 2006). Список образцов представлен в таблице 1.

Таблица 1. Материал исследования

Table 1. The studied material

№ по каталогу ВИР/ VIR Catalogue number	Образец, происхождение/ Accession, origin	Способность восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность при ЦМС А1-типа/ The ability to restore fertility of pollen or to maintain sterility in case of A1 type CMS
830	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
831	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
922	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
923	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
924	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
928	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
929	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
930	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
931	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
932	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
933	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1206/В	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1237	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1239	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1240	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1241/А	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1243	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1251	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
2588	Джугара белая, Китай	Восстановитель фертильности
1150	Джугара, Киргизия	Восстановитель фертильности
-	Низкорослое 81с, Украина	Стерильная линия
-	Низкорослое 81ф, Украина	Закрепитель стерильности
10774	А-83, Индия	Стерильная линия
10775	В-83, Индия	Закрепитель стерильности
9071	А-10598, Индия	Стерильная линия
9072	В-10598, Индия	Закрепитель стерильности
161	Sunrise kaffir, США	Не изучено
198	Red Kaffir, США	«
225	Dawn Kaffir 186, США	«
239	White Kaffir Corn, США	«
244	Blackhull Kaffir, США	«
245	Blackhull Kaffir, США	«
251	Sunrise Kaffir, США	«
-	$F_{11}BC_2$ Низкорослое 81с \times 929-3	Стерильная линия
-	$F_{10}BC_2$ Низкорослое 81с \times 929-3	Восстановитель фертильности
-	F_1 Низкорослое 81с \times 929-3	«

В качестве референсных при разработке CAPS-маркера использовали нуклеотидные последовательности *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200*, *Sobic.002G059700* и XM_002459403.2, представленные в международных информационных базах (Plaza, 2020; Blast, 2020), а также фрагмент вариантной последовательности, ассоциированной с геном восстановления фертильности пыльцы *Rf2* у инбредной R-линии Lata (Kante et al., 2018). Нумерация нуклеотидов соответствует последовательности *Sobic.002G057050*.

ДНК выделяли из суммарной пробы как минимум пяти проростков, либо из 10-20 индивидуальных растений, выращенных в теплице по протоколу, основанному на использовании SDS-буфера (Dorokhov, Kloke, 1997) с нашими модификациями (Anisimova et al., 2018).

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 50 нг геномной ДНК, однократный буфер для ПЦР, 2,0 mM MgCl₂, по 5 пM каждого из праймеров: 2459403fw – CAGGGGCCAAATGTTGTTAC и 2459403rev – CACAGTTTTATATTTCCGTGATAGTG (Anisimova et al., 2017), по 0,2 mM каждого dNTP и 1 е.а. *Taq* ДНК полимеразы. ПЦР проводили в следующем режиме: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 55°C – 30 с и 72°C – 2 мин; финальная элонгация – 10 мин при 72°C. Рестрикцию продуктов ПЦР с помощью фермента Tru9 I (аналог MseI) проводили при 65°C в 10 мкл реакционной смеси (SibEnzyme, Russia). Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 1,5 или 3% агарозном геле, и визуализировали в 0,005% растворе бромистого этидия.

Продукты ПЦР, полученные с помощью праймеров 2459403fw и 2459403rev (Anisimova et al., 2017) для образцов сорго, характеризующихся мужской фертильностью, а именно: Низкорослое 81ф, В-10598 (В-линии) и 1240-1, 1206/В-2, 929-3, F₁₀BC₂ (R-линии), выделяли из ПЦР-смеси с помощью набора реактивов «Cleanup

Standard» (Evrogen, 2020) и клонировали в pAL-TA-вектор (Evrogen, 2020). Лигирование вектора со вставкой проводили по протоколу той же фирмы (Evrogen, 2020). Для трансформации использовали штамм DH5α *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers. Клоны отбирали с помощью ПЦР. Подробно методика лигирования, трансформации и анализа данных описана в Методических указаниях ВИР (Alpatieva et al., 2019). Фрагменты, полученные путем амплификации ДНК двух-трех клонов, секвенировали в двух направлениях. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИХМ на приборе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Выравнивание полученных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы MEGA Version 7.0 (Kumar et al., 2016). Позиции нуклеотидов соответствуют их нумерации в последовательности гена-кандидата *Sobic.002G057050* в биоинформационной базе Plaza.

Результаты

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов *PPR*-генов в локусе *Rf2* и разработка CAPS-маркера для идентификации SNP, ассоциированных с доминантным аллелем *Rf2*

Для разработки CAPS-маркера, позволяющего идентифицировать вариантную последовательность локуса *Sobic.002G057050*, ассоциированную с доминантным аллелем *Rf2*, провели анализ отличий последовательности ДНК размером в один нуклеотид (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) на участке длиной 26 нуклеотидов, приведенном в работе Канте с соавторами (Kante et al, 2018). В последовательности гена фрагмент находится в интервале между нуклеотидами 1081 и 1106 (рис. 1).

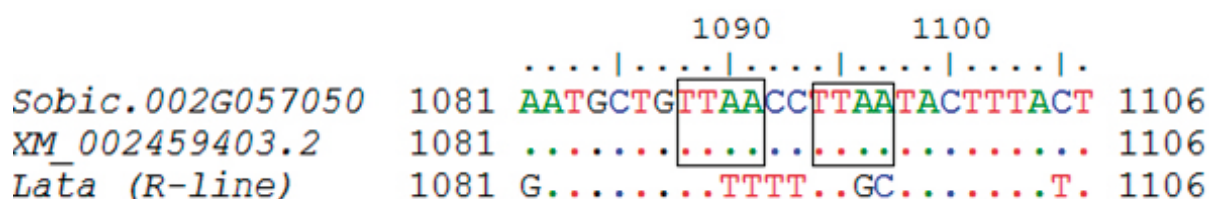


Рис. 1. Фрагменты референсных последовательностей *Sobic.002G057050* и XM_002459403.2, представленных в международных биоинформационных базах данных Plaza и Blast. Lata – инбредная линия – восстановитель фертильности пыльцы (R-линия) (Kante et al. (2018). Участки узнавания рестриктазой Tru9 I в референсных последовательностях выделены рамкой.

Fig. 1. Fragments of reference sequences *Sobic.002G057050* and XM_002459403.2 presented in Plaza and Blast international bioinformatic databases. Lata – an inbred line – pollen fertility restorer (R-line) (Kante et al. (2018). Tru9 I restriction sites in reference sequences are framed.

В референсных последовательностях *Sobic.002G057050* и XM_002459403.2 он включает два сайта ТТАА, узнаваемых эндонуклеазой Tru9 I, а у R-линий, ни одного. Для того, чтобы разработать CAPS-маркер, необходимо было амплифицировать более протяженный участок, однако вариантная последовательность в работе Канте с соавторами (Kante et al, 2018) не была опубликована. Поэтому для амплификации использовали праймеры 2459403fw и 2459403rev, ранее разработанные нами для амплификации фрагмента XM_002459403.1 длиной 935 пн, который локализован в интервале между позициями нуклеотидов 337 и 1271 (Anisimova et al., 2017). В референсных последовательностях фрагмент такой протяженности включает 5 сайтов рестрикции.

Для того, чтобы определить число сайтов рестрикции в последовательности амплифицированного фрагмента у образцов сорго из коллекции ВИР, различающихся по способности восстанавливать фертильность пыльники, первоначально были исследованы последовательности локуса *Sobic.002G057050* у двух В-линий: Низкорослое 81ф, В-10598 и двух R-линий, одна из которых (929-3) получена отбором из образца хлебного сорго к-929, а вторая – путем гибридизации (Низкорослое 81с × 929-3), поколение F₁₀BC₂. Амплифицированные фрагменты были клонированы, а затем отдельные клоны использованы для секвенирования последовательностей

изучаемых фрагментов. У фертильных аналогов стерильных линий Низкорослое 81ф и В-10598 последовательности *Sobic.002G057050* оказались в значительной степени сходны с референсными и предсказуемо включали пять сайтов рестрикции ферментом Tru9 I (рис. 2). Напротив, у R-линий были найдены существенные отличия. При сравнении последовательностей фрагментов В-линий и референсных образцов выявили 22 SNP, включая характерную для R-линий замену А/Т в позиции 1090 (табл. 2). Сайтов ТТАА, узнаваемых рестриктазой Tru9 I, было три.

Исходя из позиций выявленных SNP, число рестрикционных фрагментов в электрофоретических спектрах после обработки эндонуклеазой должно было различаться у линий-восстановителей фертильности и закрепителей стерильности: электрофоретический спектр у восстановителей 929-3 и у F₁₀BC₂ должен был включать фрагменты длиной 572 пн, 210 пн, 83 пн и 70 пн, а у В-линий – 459 пн, 210 пн, 107 пн, 83 пн, 70 пн и 6 пн. Однако наблюдавшиеся профили оказались в обоих случаях более многокомпонентными из-за присутствия в ампликонах фрагментов других PPR-генов, гомологичных *Sobic.002G057050*. После секвенирования клонированных фрагментов у R- и В-линий были найдены последовательности, характерные для *Sobic.002G054100* и *Sobic.002G054200*.

Таблица 2. Нуклеотидный полиморфизм участка кодирующей последовательности гена *Sobic.002G057050* в диапазоне 337-1271 пн

Table 2. Nucleotide polymorphisms within the fragment of *Sobic.002G057050* coding region in the 337-1271 bp range

Образец/ Accession	Позиции нуклеотидов в последовательности предполагаемого гена <i>Sobic.002G057050</i> из международной биоинформационной базы Plaza/ Nucleotide position according to putative gene sequence <i>Sobic.002G057050</i> in Plaza international bioinformatic database																					
	871	878	881	882	887	889	1056	1081	1090	1091	1092	1093	1096	1097	1105	1117	1124	1125	1128	1134	1137	1138
Низкорослое 81ф (В)/ Nizkorosloe 81f (B)	A	A	C	G	A	T	T	A	A	A	C	C	A	A	C	C	T	T	C	A	A	A
В-10598	A	A	C	G	A	T	T	A	A	A	C	C	A	A	C	C	T	T	C	A	A	A
Р-линия 929/ R-line 929	G	C	T	C	G	G	G	G	T	T	T	T	G	C	T	G	A	G	A	T	T	G
Р-линия F ₁₀ BC ₂ / R-line F ₁₀ BC ₂	G	C	T	C	G	G	G	G	T	T	T	T	G	C	T	G	A	G	A	T	T	G

		1090	1100	
Sobic.002G057050	1081	AATGCTGTTAACTTAACTACTTTACT		1106
XM_002459403.2	1081		1106
Nizkorosloe 81f clone 1	1081		1106
B-10598 cone 1	1081		1106
929-3 (R line) clone 1	1081	G.....TTTT..GC...T.		1106
Sobic.002G054100	1081	.C.....C.T.....		1106
B-10598 cone_2	1081	.C.....C.T.....		1106
929-3 (R line) clone 2	1081	.C.....C.T.....		1106
Sobic.002G054200	1081	.C.....C.T.....		1106
929-3 (R line) clone 3	1081	.C.....C.T.....		1106
Nizkorosloe 81f clone 2	1081	.C.....C.T.....		1106

Рис. 2. Выравнивание последовательностей *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200* и XM_002459403.2; 929-3 – R-линия, Низкорослое 81ф и В-10598 – фертильные аналоги стерильных линий. Участки ТТАА, узнаваемые рестриктазой Tru9 I, обведены рамкой.

Fig. 2. Alignment of sequences *Sobic.002G057050*, *Sobic.002G054100*, *Sobic.002G054200* and XM_002459403.2; 929-3 – R line, Nizkorosloe 81f and B-10598 – fertile analogs of sterile lines. TTAA restriction sites of Tru9 I are framed.

Варианты последовательности *Sobic.002G059700* не обнаружены, вероятно, вследствие значительных ее отличий в областях праймирования от последовательностей гомологичных *PPR*-генов. Все обнаруженные варианты *Sobic.002G054100* и *Sobic.002G054200* имели сайт рестрикции в интервале 1088-1097 пн, следовательно, фрагмент длиной 572 оказался уникальным и присутствовал только у линий 929-3 и F₁₀BC₂ с вариантной последовательностью *Sobic.002G057050-1090*, не имеющей сайтов узнавания рестриктазой Tru9 I в этом диапазоне (929 R-line clone 1, см. рис. 2).

Валидация маркера CAPS-572 у образцов сорго коллекции ВИР с разной способностью к восстановлению фертильности пыльцы

Для того, чтобы доказать возможность использования разработанного маркера для идентификации вариантной последовательности Sobic.002G057050-1090, ассоциированной с доминантным аллелем гена *Rf2*, у линий сорго из коллекции ВИР провели рестрикционный анализ продуктов ПЦР, полученных с парой праймеров 2459403fw и 2459403rev у образцов из коллекции ВИР. В качестве носителей рецессивного аллеля *rf2* были изучены 7 образцов кафрского сорго, а также стерильные линии с цитоплазмой A1: Низкорослое 81с, А-83, А-10598. Ни у одного из образцов маркерный фрагмент не обнаружен. Следует отметить, что отсутствие фрагмента 572 пн предполагалось и для референсной последовательности.

источником которой служила линия-закрепитель стерильности BT \times 623 *S. bicolor*.

Была проверена чистота полученных нами линий от скрещивания протестированных образцов Низкорослое 81с (ЦМС А1) и восстановителя фертильности 929-3. Новые линии создавались путем отбора фертильных $R (F_{10}BC_2)$ и стерильных А форм ($F_{11}BC_2$), соответственно. Все проанализированные растения линии-восстановителя фертильности имели маркер CAPS-572, в то время как стерильные растения – нет. Кроме того, наличие маркерного фрагмента в спектре подтвердило гибридный генотип растений F_1 от скрещивания Низкорослое 81с \times 929-3. Помимо 929-3, было проанализировано еще 19 линий, отобранных из образцов Джугары белой, происходящих из западного Китая и Киргизии (рис. 3). Их способность восстанавливать фертильность пыльцы при скрещиваниях со стерильными линиями А1-типа была проверена в полевых условиях. Гены, определяющие эту способность, ранее не были идентифицированы. У линий 924-4, 928-1, 931-1, 933-1/6, 1237-3, 1243-2, 1251, 1150-1 был обнаружен фрагмент длиной 572 пн, что свидетельствует о наличии у них вариантной последовательности Sobic.002G057050-1090, ассоциированной с геном *Rf2*. В остальных образцах Джугары белой маркерный фрагмент обнаружен не был. У линий 1206/В-2 и 1240-1 были выборочно клонированы и секвенированы фрагменты. Вариантной последовательности не выявлено.

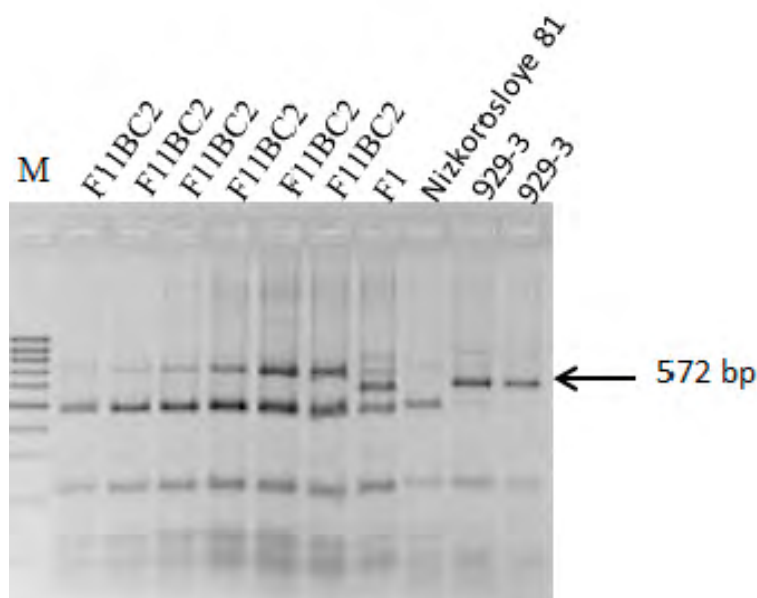


Рис. 3. Электрофоретические спектры ампликонов, полученных с помощью праймеров 2459403fw и 2459403rev после действия рестриктазы Tru9 I у стерильных линий F_1BC_2 (6 растений) и Низкорослое 81с (одно растение), у линии-восстановителя фертильности пыльцы 929-3 и гибрида F_1 , полученного от скрещивания линий Низкорослое 81с и 929-3. М – маркер молекулярного веса, 572 bp – маркерный фрагмент, ассоциированный с доминантным аллелем гена *Rf2*.

Fig. 3. Electrophoretic patterns of amplicons obtained with the use of primers 2459403fw and 2459403 after treatment with restrictase Tru9 I in sterile lines F_1BC_2 (6 plants) and Nizkorosloe 81f (one plant), in fertility restorer 929-3 and F_1 hybrid obtained from crossing lines Nizkorosloe 81s and 929-3. М – molecular weight marker, 572 bp – marker fragment associated with the *Rf2* dominant allele.

Обсуждение

Канте с соавторами (Kante et al., 2018) обнаружили полиморфизм нуклеотидной последовательности в первом экзоне *PPR*-гена *Sobic.002G057050*, локализованном во второй хромосоме генома сорго, и доказали его связь со способностью R-линий восстанавливать фертильность пыльцы в скрещиваниях со стерильными линиями, имеющими цитоплазму A1. Несинонимичная мутация в позиции 1090 в последовательности гена, приводящая к замене аденина на тимин, была ключевой в разработке CAPS-маркера, позволившего дифференцировать R- и A/B-линии. Нуклеотид А является маркером рецессивного аллеля *rf2*; он характерен для стерильных материнских линий А и линий В – закрепителей стерильности. Нуклеотид Т в позиции 1090 является маркером доминантного аллеля и присутствует в последовательностях гена у R-линии – восстановителей фертильности. Все проанализированные В-линии несли рецессивный аллель *rf2*, а 37 из 50 R-линий имели доминантный аллель. Такую же нуклеотидную замену нашли Мадугула с соавторами (Madugula et al., 2018)

в индийских линиях 296А и RS29. Авторы определили эту миссенс-мутацию как возможный маркер гена *Rf2*. Замена является смысловой и функциональной, т.е. приводит к смене неполярной аминокислоты фенилаланин на полярную – аспарагин. В нашей работе был исследован фрагмент *Sobic.002G057050* длиной 935 пн у линий сорго из коллекции ВИР и, помимо замены Т/А в позиции 1090, обнаружен значительный полиморфизм между линиями из коллекции ВИР с разной способностью восстанавливать пыльцу. Всего найдено 22 SNP. К транзциям относятся 5 замен А/Г и 4 замены Т/С, к трансверсиям – 3 А/С, 3 Г/Т, 5 А/Т и 2 Г/С; 15 из 22 замен оказались смысловыми. Значительное число SNP делает возможным разработку более доступных CAPS-маркеров. В настоящей работе для диагностики вариантной последовательности локуса *Rf2*, включающей нуклеотид Т в позиции 1090, разработан маркер, названный CAPS-572. Мы амплифицировали фрагмент гена длиной 935 пн и показали, что R-линии, с одной стороны, и А/В – с другой, отличаются числом сайтов узнавания рестриктазой Tru9 I и уникальным для линий-восстановителей является фрагмент 572 пн. Ни у одной из проанализированных

линий со стерильной цитоплазмой и их фертильных аналогов, а также у 7 образцов кафрского сорго, не имеющих функциональных генов *Rf*, такого фрагмента обнаружено не было. У 10 из 21 проанализированных линий из коллекции ВИР, обладающих способностью восстанавливать фертильность пыльцы, обнаружен фрагмент 572 пн, маркирующий доминантный аллель *Sobic.002G057050*. Маркер может быть успешно использован при вовлечении R-линий 924-4, 928-1, 929-3, 931-1, 933-1/6, 1237-3, 1243-2, 1251 и 1150-1 и F₁₀BC₂ в гибридизацию со стерильными линиями Низкорослое 81с, А-83 и А-10598, а также при проверке истинности гибридов F₁ и чистоты отобранных линий.

Заключение

Разработанный в ходе настоящего исследования маркер может быть использован в семеноводстве при проверке генетической чистоты R- и В/А-линий и оценке полноты гибридизации. Он также может быть эффективен при анализе гибридных популяций, полученных от скрещивания исследованных R-линий 924-4, 928-1, 929-3, 931-1, 933-1/6, 1237-3, 1243-2, 1251, 1150-1, F₁₀BC₂ со стерильными линиями Низкорослое 81с, А-83 и А-10598. Можно предположить, что у R-линий, не имеющих маркера CAPS-572, способность восстанавливать фертильность пыльцы определяется другим *Rf* геном. У исследованных R и В/А-линий изученный фрагмент *Sobic.002G057050* имеет 22 SNP на участке длиной 935 пн, следовательно, разработка CAPS-маркеров для их идентификации и дифференциации может быть перспективной.

References/Литература

- Alabushev A.V., Shishova E.A., Romanukin A.E., Ermolina G.M., Gorpinichenko S.I. Origin of sorghum and development of its breeding. *Scientific Journal of KubSAU*. 2017;127(03). [in Russian] (Алабушев А.В., Шишова Е.А., Романюкин А.Е., Ермолина Г.М., Горпиченко С.И. Происхождение сорго и развитие его селекции. *Научный журнал КубГАУ*. 2017;127(03):281-294. DOI: 10.21515/1990-4665-127-017)
- Alpatieva N.V., Antonova O.Yu., Radchenko E.E., Abdullaev R.A., Karabitsina Y.I., Anisimova I.N. PCR diagnostics for harmful organisms of guar: (guidelines). E.K. Potokina (ed.). St. Petersburg: VIR; 2019. 36 p. [in Russian] (Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Анисимова И.Н. ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: (методические указания) / под ред. Е.К. Потокиной. Санкт-Петербург: ВИР; 2019). DOI: 10.30901/978-5-907145-44-3
- Anisimova I.N., Alpatieva N.V., Abdullaev R.A., Karabitsina Y.I., Kuznetsova E.B. Screening of plant genetic resources with the use of DNA markers: basic principles, DNA isolation, PCR set-up, agarose gel electrophoresis: (guidelines). E. E. Radchenko (ed.). St. Petersburg: VIR; 2018. [in Russian] (Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле: (методические указания) / под ред. Е.Е. Радченко. Санкт-Петербург: ВИР; 2018). DOI: 10.30901/978-5-905954-81-8
- Anisimova I.N., Ryabova D.N., Malinovskaya E.V., Alpatieva N.V.,

- Karabitsina Yu.I., Radchenko E.E. Polymorphism of grain sorghum from VIR collection for the characters associated with the CMS-*Rf* genetic system. *Agricultural Biology*. 2017;52(5):952-963. [in Russian] (Анисимова И.Н., Рябова Д.Н., Малиновская Е.В., Алпатьева Н.В., Карабицина Ю.И., Радченко Е.Е. Полиморфизм по признакам, ассоциированным с генетической системой ЦМС-*Rf*, у зернового сорго из коллекции ВИР. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(5):952-963). DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.952rus
- Blast (Basic Local Alignment Search Tool): [website]. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> [дата обращения: 10.12.2020].
- Boatwright J.L., Brenton Z.W., Boyles R.E., Sapkota S., Myers M.T., Jordan K.E., Dale S.M., Shakoar N., Cooper E.A., Morris G.P., Kresovich S. Genetic characterization of a *Sorghum bicolor* multiparent mapping population emphasizing carbon-partitioning dynamics. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2021;11(4):jkab060. DOI: 10.1093/g3journal/jkab060
- Dorokhov D.B., Klocke E. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russian Journal of Genetics*. 1997;33(4):358-365. [in Russian] (Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов. *Генетика*. 1997;33(4):443-450).
- Evrogen: [website]. URL : <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/pAL-TA.pdf> [дата обращения: 05.03.2020].
- Hadjinov M.I. Sterility in varietal hybrids of sorghum. *Bulletin of applied botany, of genetics and plant breeding. Ser. 2, Genetics, plant breeding and cytology*. 1937;(7):417-446. [in Russian] (Хаджинов М.И. Стерильность у межрасовых гибридов сорго. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. Сер. 2, Генетика, селекция и цитология растений*. 1937;(7):417-446).
- Jordan D.R., Mace E.S., Henzell R.G., Klein P.E., Klein R.R. Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;120:1279-1287. DOI: 10.1007/s00122-009-1255-3
- Jordan D.R., Klein R.R., Sakreowski K.G., Henzell R.G., Klein P.E., Mace E.S. Mapping and characterization of *Rfs* a new gene conditioning pollen fertility restoration in A₁ and A₂ cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;123(3):383-396. DOI: 10.1007/s00122-011-1591-y
- Kante M., Rattunde H.F.W., Nébié B., Weltzien E., Haussmann B.I.G., Leiser W.L. QTL mapping and validation of fertility restoration in West African sorghum A1 cytoplasm and identification of a potential causative mutation for *Rf2*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131:2397-2412. DOI: 10.1007/s00122-018-3161-z
- Klein R.R., Klein P.E., Chhabra A.K., Dong J., Pammi S., Childs K.L., Mullet J.E., Rooney W.L., Schertz K.F. Molecular mapping of the *Rf1* gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;102:1206-1212. DOI: 10.1007/s001220100575
- Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111:994-1012. DOI: 10.1007/s00122-005-2011-y
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33:1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Madugula P., Uttam A.G., Tonapi V.A., Ragimasalawada M. Fine mapping of *Rf2*, a major locus controlling pollen fertility restoration in sorghum A1 cytoplasm, encodes a PPR gene and its validation through expression analysis. *Plant Breeding*. 2018;137:148-161. DOI: 10.1111/pbr.12569
- McCormick R.F., Truong S.K., Sreedasyam A., Jenkins J., Shu S., Sims D., Kennedy M., Amirebrahimi M., Weers B.D., McKinley B., Mattison A., Morishige D.T., Grimwood J., Schmutz J., Mullet J.E. The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant Journal*. 2017;93:338-354. DOI: 10.1111/tbj.13781

- Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A.K., Chapman J., Feltus F.A., Gowik U., Grigoriev I.V., Lyons E., Maher C.A., Martis M., Narechania A., Otiillar R.P., Penning B.W., Salamov A.A., Wang Y., Zhang L., Carpita N.C., Freeling M., Gingle A.R., Hash C.T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M.C., Ming R., Peterson D.G., Mehboob-Ur-Rahman M., Ware D., Westhoff P., Mayer K.F., Messing J., Rokhsar D.S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. 2009;457(7229):551-556. DOI: 10.1038/nature07723
- Plaza: [website]. URL : <https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza> [дата обращения: 10.12.2020].
- Radchenko E.E. Identification of genes for resistance to greenbug in sorghum. *Russian Journal of Genetics*. 2000;36(4):510-519.
- Radchenko E.E. Inheritance of greenbug resistance in several forms of grain sorghum and sudangrass. *Russian Journal of Genetics*. 2006;42(1):55-59. DOI: 10.1134/S1022795406010078
- Stephens J.C., Quinby J.R. Anthesis, pollination, and fertilization in sorghum. *Journal of Agricultural Research*. 1934;49(2):123-136.
- Stephens J.C., Holland R.F. Cytoplasmic male sterility for hybrid sorghum seed production. *Agronomy Journal*. 1954;46:20-23. DOI: 10.2134/agronj1954.00021962004600010006x
- Vozhzhova N., Ionova E., Popov A., Kovtunov V. Identification of fertility gene *Rfl* in collection samples of *Sorghum bicolor* (L.) Moench in Southern Russia. *Biology and Life Sciences Forum*. 2021;4:81. DOI 10.3390/IECPS2020-08710