



Генотипирование линий генетической коллекции подсолнечника ВИР с использованием аллель-специфичных маркеров локуса Rf1

И. Н. Анисимова¹, Н. В. Алпатьева¹, М. К. Рязанова¹, Р. Д. Бердиган², Е. Е. Радченко¹, В. А. Гаврилова¹

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ирина Николаевна Анисимова, irina_anisimova@inbox.ru

Актуальность. При создании промышленных гибридов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) преимущественно используется генетическая система ЦМС-Rf на основе цитоплазматической мужской стерильности РЕТ1-типа. Ключевым геном в селекции гибридов является Rf1, необходимый для восстановления фертильности пыльцы растений F₁. Эффективным инструментом для идентификации генотипов родительских линий по локусу Rf1, контроля однородности, а также определения генетической чистоты партий гибридных семян являются молекулярно-генетические маркеры, апробированные на различном генетическом материале. В настоящем исследовании для идентификации генотипов линий генетической коллекции подсолнечника ВИР и межлинейных гибридов F₂ использованы доступные из литературных источников аллель-специфичные маркеры генов-кандидатов локуса Rf1. **Материал и методы.** Изучены две выборки генотипов: 46 линий генетической коллекции подсолнечника ВИР, ранее охарактеризованных в полевых опытах по способности к восстановлению фертильности пыльцы, и 80 фенотипированных по признакам фертильности/стерильности растений, из расщепляющихся популяций F₂ от скрещиваний линии ЦМС ВИР 116А с восстановителями фертильности ВИР 740 и RIL 130. Линии различались по типу цитоплазмы и наличию SCAR-маркера HRG02, тесно сцепленного с локусом Rf1. Линии генотипированы с использованием маркеров, специфичных для доминантного (PPR621.5R, SRF833, 67N04_P_170) и рецессивного (PPR621.5M, 67N04_P_155) аллелей генов-кандидатов Rf1. Маркерные фрагменты PPR621.5M и PPR621.5 R, амплифицированные у шести генотипов, были выделены и секвенированы. **Результаты.** Нуклеотидные последовательности маркеров PPR621.5M и PPR621.5R отличались по четырём SNP и были полностью идентичными с опубликованными в литературе. У линий ЦМС и большинства закрепителей стерильности идентифицированы маркеры PPR621.5M и 67N04_P_155, специфичные для аллеля rf1. Девятнадцать из 21 линии, характеризовавшейся стерильной цитоплазмой и наличием маркера HRG02, имели по три маркера, специфичных для доминантного аллеля; у двух линий обнаружены по два аллель-специфичных маркера. У четырёх из семи восстановителей фертильности (стерильная цитоплазма, без маркера HRG02) выявлено по два или три маркера, специфичных для доминантного аллеля, у трёх линий идентифицированы лишь маркеры рецессивного аллеля. Обнаружены генотипы F₂, возникшие в результате рекомбинации между SCAR-маркером HRG02 и аллель-специфичными маркерами. **Заключение.** Подтверждены эффективность аллель-специфичных маркеров генов-кандидатов локуса Rf1 для генотипирования линий подсолнечника и их диагностическая ценность для отбора целевых генотипов из расщепляющихся гибридных популяций.

Ключевые слова: *Helianthus annuus*, система ЦМС-Rf, гибриды, восстановление фертильности пыльцы, генотип, SNP, гаплотип

Благодарности: работа выполнена в рамках Государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM –2022-0005 «Растительные ресурсы масличных и прядильных культур ВИР как основа теоретических исследований и их практического использования»

Для цитирования: Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Рязанова М.К., Бердиган Р.Д., Радченко Е.Е., Гаврилова В.А. Генотипирование линий генетической коллекции подсолнечника ВИР с использованием аллель-специфичных маркеров локуса Rf1. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(4):56-67. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-08

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Рязанова М.К., Бердиган Р.Д., Радченко Е.Е., Гаврилова В.А., 2024

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o8

Genotyping of lines from the VIR sunflower genetic collection using allele-specific markers of the Rf1 locus

Irina N. Anisimova¹, Natalia V. Alpatieva¹, Maria K. Ryazanova¹, Roman D. Berdigan², Evgeny E. Radchenko¹, Vera A. Gavrilova¹

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Irina N. Anisimova, irina_anisimova@inbox.ru

Background. The CMS-*Rf* genetic system based on the PET1-type cytoplasmic male sterility (CMS) is commonly used to create commercial sunflower (*Helianthus annuus*) hybrids. The *Rf1* gene, of key importance for hybrid breeding, is necessary for restoring pollen fertility in F₁ plants. The molecular genetic markers tested on various genetic materials are an effective tool for identifying parental line genotypes at the Rf1 locus, controlling homogeneity, and determining the genetic purity of hybrid seed lots. In the present study, the allele-specific markers of the *Rf1* candidate genes available from literature were used to genotype lines from the VIR sunflower genetic collection and F₂ hybrids. **Material and methods.** The study concentrated on two sample sets of genotypes, one of which contained 46 lines from the VIR sunflower genetic collection, previously characterized in field experiments for the pollen restoration ability, and the other 80 plants from segregating F₂ populations from crosses of the CMS VIR 116A line with fertility restorers VIR 740 and RIL 130, phenotyped for fertility/sterility. The lines differed in respect of the cytoplasm type and the presence of the SCAR marker HRG02 closely linked to the Rf1 locus. The lines have been genotyped using markers specific for the dominant (PPR621.5R, SRF833, 67N04_P_170) and recessive (PPR621.5M, 67N04_P_155) alleles of the *Rf1* candidate genes. The PPR621.5M and PPR621.5 R, marker fragments amplified in six genotypes, have been isolated and sequenced. **Results.** The nucleotide sequences of PPR621.5M and PPR621.5R turned out to be different in four SNPs and completely identical to those presented in the published literature. The PPR621.5M and 67N04_P_155 markers specific for the *rf1* allele were identified in CMS lines and the majority of sterility maintainers. Nineteen out of 21 lines characterized by sterile cytoplasm and the presence of the HRG02 marker had three markers specific for the dominant allele; two lines had two allele-specific markers. Four out of seven fertility restorers (sterile cytoplasm, without the HRG02 marker) were found to contain two or three markers specific for the dominant allele, while three lines had only markers for the recessive allele. The F₂ genotypes resulting from recombination between the SCAR marker HRG02 and allele specific markers were detected. **Conclusion.** The study confirmed efficiency of allele-specific markers of the Rf1 locus candidate genes for genotyping sunflower lines, as well as their diagnostic value for selecting target genotypes from segregating hybrid populations.

Keywords: *Helianthus annuus*, CMS-*Rf* system, hybrids, pollen fertility restoration, genotype, SNP, haplotype

Acknowledgements: The research was performed within the framework of the State Assignment according to the Theme Plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0005 “Plant resources of oil and fiber crops at VIR as the basis for theoretical research and their practical utilization”.

For citation: Anisimova I.N., Alpatieva N.V., Ryazanova M.K., Berdigan R.D., Radchenko E.E., Gavrilova V.A. Genotyping of lines from the VIR sunflower genetic collection using allele-specific markers of the Rf1 locus. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(4):56-67. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o8

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. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Anisimova I.N., Alpatieva N.V., Ryazanova M.K., Berdigan R.D., Radchenko E.E., Gavrilova V.A., 2024

Введение

Подсолнечник однолетний *Helianthus annuus* L. – ценная масличная культура, занимающая четвертое место в мире среди масличных растений и основная в Российской Федерации. Производство семян подсолнечника базируется на возделывании высокопродуктивных, устойчивых к болезням и вредителям гетерозисных гибридов. В качестве материнских форм при получении гибридов преимущественно используются стерильные линии (А) на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) РЕТ1-типа, источник которой впервые был обнаружен французским исследователем П. Леклерком в потомстве от межвидового скрещивания подсолнечника черешкового *H. petiolaris* Nutt. с культурным подсолнечником *H. annuus* (сорт Армавирский 9345 селекции ВНИИМК) (Lecleq, 1969). Для получения семян материнской линии ЦМС проводят скрещивания с линией В, закрепителем стерильности. Ядерные гены В-линии идентичны генам стерильной линии А, тогда как оргanelльные геномы различны: митохондриальная ДНК растений с ЦМС РЕТ1 содержит открытую рамку считывания *orfH522*, продукт которой – белок с молекулярной массой 16 кДа – оказывает токсическое действие на материнские клетки пыльцы, что приводит к стерильности (Horn et al., 1991). Отцовскими компонентами скрещиваний при получении гибридов служат линии R – восстановители фертильности пыльцы. В большинстве случаев используемые при создании гибридов восстановители фертильности пыльцы несут доминантный аллель гена *Rf1*.

Первоначально ген восстановления фертильности был интрогрессирован в генотипы линий *H. annuus* от дикорастущего техасского подсолнечника *H. annuus* subsp. *texanus* по классификации Heiser (Heiser, 1951). Созданная с их участием линия Т66006-2-1-В послужила донором доминантных аллелей *Rf1* в последующей селекции подсолнечника (Kinman, 1970; Baute et al., 2015). Ген *Rf1* является основной генетической детерминантой, контролирующей признак восстановления фертильности пыльцы в гибридной селекции подсолнечника на основе ЦМС РЕТ1-типа. Еще один ген, *Rf2*, необходимый для полного восстановления фертильности при ЦМС РЕТ1, был обнаружен в результате скрещивания Т66006-2-1-В с местным сортом ‘МЗО1398’. Этот ген присутствует в большинстве линий закрепителей стерильности и восстановителей фертильности (Anashchenko, Duka, 1985; Serieys, 2005).

Известно большое число и других источников ЦМС подсолнечника, полученных на основе межвидовых скрещиваний (Choudhari, Bagade, 2019), однако их использование в селекции ограничено из-за отсутствия надежных источников генов восстановления фертильности и негативного влияния стерильной цитоплазмы на проявление хозяйственно ценных признаков гибридов. В литературе сообщалось об 11 генах, ассоциированных с признаком восстановления фертильности пыльцы в различ-

ных генетических системах ЦМС-*Rf* у подсолнечника (Horn et al., 2003; Yue et al., 2010; Feng, Jan, 2008; Zhang et al., 2023, Trubacheeva et al., 2024). Ген *Rf3*, также восстанавливающий фертильность при ЦМС РЕТ1, обнаружен в генотипах линии RHA 340, производной скрещивания HA89*3/*H. argophyllus* 415) (Jan, Vick, 2007) и линии кондитерского подсолнечника RHA 280, полученной из сорта ‘Sundak Sel’ (Abratti et al., 2008; Liu et al., 2012). Ген *Rf4* необходим для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС GIG2-типа (Feng, Jan, 2008), *Rf-PEF1* – при ЦМС PEF1 (Schnabel et al., 2008).

Ген *Rf1* картирован в группе сцепления 13 (LG13) молекулярно-генетической карты подсолнечника (Jan et al., 1998). В LG13 также локализованы гены *Rf5*, *Rf7* (Qi et al., 2012; Talukder et al., 2019) и *Rf-PET2* (Sajer et al., 2020). В LG3 картированы гены *Rf4*, *Rf6* и *Rf9* (Feng, Jan, 2008; Liu et al., 2013; 2023), в LG7 – ген *Rf3* (Abratti et al., 2008; Liu et al., 2012).

Поиск новых доноров генов восстановления фертильности пыльцы (*Rf*) для создания отцовских линий гибридов является весьма трудоёмким процессом. Он требует проведения тест-скрещиваний и фенотипирования растений F₁ по признакам мужской фертильности/стерильности. Решению этой задачи могут способствовать молекулярные маркеры. Исследования в области маркер-опосредованной селекции подсолнечника сосредоточены на разработке молекулярных маркеров, тесно сцепленных с локусом *Rf1* (Radanović, 2022; Trubacheeva et al., 2024). До недавнего времени для маркирования генотипов подсолнечника по локусу *Rf1* преимущественно использовались сцепленные с ним SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, картированные на расстояниях 0,8 сМ и 2,0 сМ, соответственно. Маркеры показали высокую диагностическую ценность, но из-за возможных рекомбинационных событий, а также доминантного характера наследования они не обладают 100%-ной эффективностью при отборе целевых генотипов в расщепляющихся популяциях (Horn et al., 2003; Anisimova et al., 2021).

Трудности разработки аллель-специфичных маркеров обусловлены сложной организацией локуса *Rf1*. По данным независимых исследований, потенциальные гены-кандидаты в локусе *Rf1* локализованы в двух обширных районах группы сцепления 13 с размерами 30 мегаоснований (с координатами 28,051,124-58,081,625) и 3,9 мегаоснований (с координатами 169,655,088-173,581,392), между которыми находится протяжённая неидентифицированная область длиной 114 мегаоснований (Goryunov et al., 2019; Horn et al., 2019; Polivanova et al., 2021; Sivolapova et al., 2023). Методом GWAS (англ. Genome-Wide Association Studies, GWA study) в последовательностях генов-кандидатов идентифицированы и валидированы на репрезентативной выборке генотипов серии функционально значимых SNP (англ. Single Nucleotide Polymorphism). На их основе разработаны три аллель-специфичных маркера гена *Rf1*: кодоминантный 67N04_P (фланкирующий область в 30 мегаоснований)

и два доминантных, PPR621.5R (для идентификации восстановителей фертильности) и PPR621.5M (для идентификации закрепителей стерильности), которые находятся на противоположном конце, в области 3,9 мегаоснований (Horn et al., 2019). Недавно опубликован ряд новых аллель-специфичных маркеров, которые были апробированы при анализе образцов коллекции ВНИИМК и пула родительских линий, используемых при создании гибридов в семеноводческой компании «Агроплазма» (Polivanova et al., 2021; Sivolapova et al., 2023). Наиболее эффективным среди них оказался тесно сцепленный с локусом Rfl маркер SRF833, эффективность которого подтверждена при анализе расщепляющейся гибридной популяции (Sivolapova et al., 2023). Маркеры HRG02 и PPR621.5 находятся по обе стороны от локуса Rfl на расстоянии 0,3 сМ и 0,4 сМ соответственно (Sivolapova et al., 2023).

Цель настоящего исследования – характеристика генов-кандидатов локуса Rfl генотипов линий подсолнечника генетической коллекции ВИР с помощью аллель-специфичных маркеров.

Материалы и методы

Материал включал две выборки генотипов подсолнечника. В **первую** вошли 46 линий генетической коллекции подсолнечника ВИР, различавшихся по способности к восстановлению фертильности пыльцы форм с ЦМС РЕТ1 (табл. 1). Линии были репродуцированы на Кубанской опытной станции – филиале ВИР – в 2016 году. Способность линий к восстановлению фертильности пыльцы или закреплению стерильности установлена методом тест-скрещиваний с линиями ЦМС в результате мно-

голетних исследований (Gavrilova et al., 2017). Предварительный молекулярный скрининг выборки выполнен с помощью диагностических маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*: митохондриального маркера orfH522 и SCAR-маркера HRG02, сцепленного с доминантным аллелем ядерного гена *Rf1* (см. табл. 1). **Вторая** выборка включала 80 генотипов из расщепляющихся популяций F₂ от скрещиваний линии ЦМС ВИР 116А с линиями-восстановителями фертильности ВИР 740 и RIL 130. Гибриды F₂ были выращены на полях Научно-производственной базы (НПБ) «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» в 2015 году и каждое растение охарактеризовано по признаку «фертильность/стерильность». Для молекулярного анализа в каждой из популяций F₂ отобраны по две группы растений: фертильные и стерильные (20 растений в каждой).

Выделение ДНК и ПЦР-анализ. Фракции суммарной ДНК были выделены из зеленых листьев взрослых растений с использованием модифицированного СТАВ-метода (Li et al., 2007). Для генотипирования линий использовали аллель-специфичные маркеры, доминантного (PPR621.5R, SRF833, 67N04_P_170) и рецессивного (PPR621.5M, 67N04_P_155) аллелей гена *Rf1* (см. табл. 1).

ПЦР проводили по протоколам, рекомендованным разработчиками маркеров. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5%, 2% или 3% агарозных гелях (в зависимости от размера ампликона) в 1× буфере ТВЕ. Гели окрашивали бромистым этидием и анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием гель-документирующей системы «GelDoc Go» («Bio-Rad», США).

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе
Table 1. Characteristics of primers used in this study

Праймер/ Primer	Последовательность/ Sequence	Размер продукта, пн/ Product size, bp	Источник/ Reference
HRG02-F	AAACGTGGGAGAGAGGTGG	740	Horn et al., 2003
HRG02-R	AAACGTGGGCTGAAGAATA		
PPR621.5-F1	AGTAATCTCCACATGAACATTG	164	Horn et al., 2019
PPR621.5-F2	CAATAATCTCCACATGAACATTC		
PPR621.5-Rev	CCGGATTGTGTTCCGATTAG		
67N04-F1a	TGCAAGATAGGCGACTGAGGGCTCATCTCCAATTA	170, 155	Horn et al., 2019
67N04-F1b	TGAGGGCTCATCTCCAGCTG		
67N04-R	GGCTGCCATTAGTGAAGGAG		
SRF833-F	CTCAAGATAACATCAACACGG	248	Sivolapova et al., 2023
SRF833-R	GAAAGAACATGTCATCACCA		
orfH522-F	TGCCTCAACTGGATAAATTCAC	516	Schnabel et al., 2008
orfH522-R	ACCGTTCTCTCACGAGTTGAAG		

Фрагменты, амплифицированные с помощью комбинаций праймеров PPR621.5-F1/PPR621.5-Rev и PPR621.5-F2/PPR621.5-Rev, были выделены из ПЦР-смеси и секвенированы на приборе ABI 3500xL (Applied Biosystems, USA) в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. В работе использовали реактивы от фирм «Хеликон», «Евроген», «Диалат», «Синтол» (Россия).

Результаты

Анализ ассоциаций между наличием аллель-специфичных маркеров, типом цитоплазмы и способностью к восстановлению фертильности пыльцы. Информативность маркеров PPR621.5R, PPR621.5M, 67N04_P и SRF833 для определения генотипов линий генетической коллекции подсолнечника ВИР по локусу Rfl оценивали на основании ассоциации между наличием диагностических фрагментов и способностью линии восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность.

Маркеры PPR621.5R и PPR621.5M разработаны для идентификации двух разных гаплотипов одного из генов-кандидатов в локусе Rfl (Horn et al., 2019). Они позволяют выявлять значимые SNP G/C в позиции 173473513 геномной последовательности, ассоциированной с доминантным (*Rfl*) или рецессивным (*rfl*) аллелями гена. Комбинация праймеров PPR621.5F2/PPR621.5-Rev выявляет гаплотип с нуклеотидным основанием С (цитозин) в указанной позиции. Маркерный фрагмент PPR621.5R амплифицируется у линий-восстановителей фертильности (носителей доминантного аллеля *Rfl*). Комбинация праймеров PPR621.5-F1/PPR621.5-Rev выявляет гаплотип с нуклеотидным основанием G (гуанин). Маркерный фрагмент PPR621.5M амплифицируется с комбинацией праймеров PPR621.5-F1/PPR621.5-Rev носителей рецессивного аллеля *rfl* – стерильных линий и закрепителей стерильности. Оба маркерных фрагмента имеют размер 164 пн (рис. 1).

Для верификации гаплотипов, детектируемых с помощью маркеров PPR621.5M и PPR621.5R, секвенировали фрагменты, амплифицированные у шести генотипов:

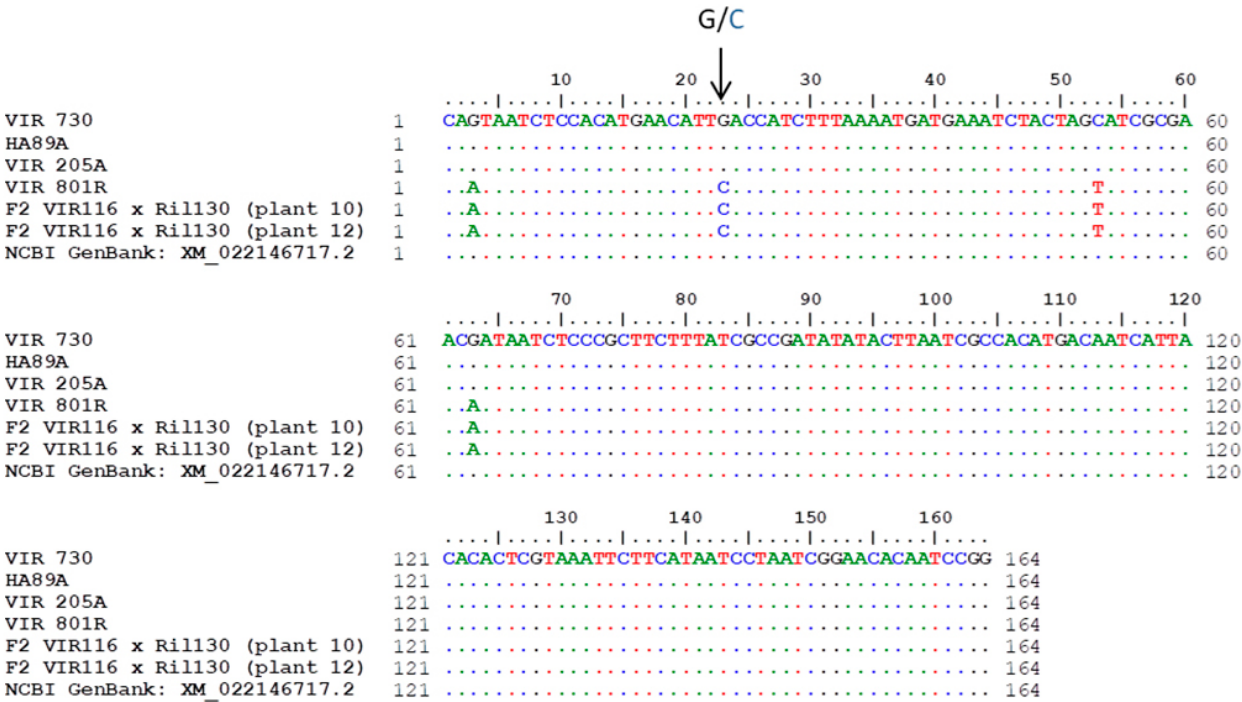


Рис. 1. Выравнивание последовательностей маркера PPR621.5M, амплифицированного у закрепителя стерильности ВИР 730, стерильных линий НА 89А, ВИР 205А, и маркера PPR621.5R, амплифицированного у восстановителя фертильности ВИР 801R и фертильных растений из популяции F₂ от скрещивания ВИР 116А × RIL 130. Позиция SNP G/C указана стрелкой. XM_022146717.2 – фрагмент референсной последовательности

Fig. 1. Alignment of the sequences of the PPR621.5M marker amplified from the maintainer line VIR 730, sterile lines HA 89A and VIR 205A, of the PPR621.5R marker amplified from the restorer line VIR 801R, and fertile plants from the F₂ hybrid population (VIR 116A × RIL 130). Arrow points to the SNP G/C position. XM_022146717.2 is the reference sequence fragment (NCBI, 2024)

с комбинацией праймеров PPR621.5-F1/PPR621.5-Rev – у стерильных линий ВИР 205А, НА 89А (ЦМС РЕТ1) и фертильной линии ВИР730 закрепителя стерильности; с комбинацией праймеров PPR621.5-F1/PPR621.5-Rev – у восстановителя фертильности пыльцы ВИР801 и двух фертильных растений (продуцировавших пыльцу) из расщепляющейся популяции F_2 (ВИР116А × ВИР740). Как и ожидалось, нуклеотидные последовательности изученных фрагментов оказались полностью идентичны опубликованным (Horn et al., 2019). В позиции 23 последовательности маркера PPR621.5M, амплифицированного у носителей рецессивного аллеля *rf1*, идентифицировано нуклеотидное основание G (гуанин), а в последовательности маркера PPR621.5R предполагаемых носителей доминантного аллеля ВИР 801 и двух рекомбинантных генотипов F_2 ВИР 116А × ВИР 740 в той же позиции присутствовало нуклеотидное основание С (цитозин). Последовательности также отличались другими аллель-специфичными SNP: G/A – в позиции 3, С/Т – в позиции 54 и G/A – в позиции 63, что подтверждает их идентич-

ность опубликованным ранее генотипам (Horn et al., 2019) (см. рис. 1).

В зависимости от типа цитоплазмы и наличия SCAR-маркера HRG02 (Horn et al., 2003), а также способности к восстановлению фертильности в полевых условиях, линии объединены в несколько групп: 1) стерильные линии ЦМС РЕТ1, без маркера HRG02, 2) закрепители стерильности с нормальной (фертильной) цитоплазмой, без маркера HRG02; 3) линии с нормальной цитоплазмой и маркером HRG02, среди которых ВИР 369, ВИР 740 и ВИР 743 восстанавливали фертильность пыльцы, в то время как ВИР 387 закрепляла стерильность гибридов F_1 от скрещиваний с линиями с ЦМС; 4) восстановители фертильности с цитоплазмой стерильного типа, без маркера HRG02; 5) восстановители фертильности и предполагаемые восстановители фертильности, не тестированные на восстановительную способность, с цитоплазмой стерильного типа и маркером HRG02 (табл. 2).

Таблица 2. Линии подсолнечника в зависимости от типа цитоплазмы и способности восстанавливать фертильность пыльцы при скрещиваниях с линиями ЦМС РЕТ1, либо закреплять стерильность

Table 2. Sunflower lines according to the cytoplasm type and the ability to restore pollen fertility or maintain sterility in crosses with CMS PET1 lines

Линия/ Line	Номер по каталогу ВИР/ VIR catalogue number	Происхождение/ Origin
1) Стерильные линии, цитоплазма РЕТ1-типа, без HRG02		
НА89А	2397	США
ВИР 116А	3454	к-2182, Вымпел, РФ
ВИР 205А	3464	РФ
ВИР 434А	3514	НА 378А, США
2) Цитоплазма фертильного типа, без HRG02		
ВИР 171 М	2792	К-2026, Канада
ВИР 340 М	3476	к-1933, Венгрия
ВИР 449 М	3527	Румыния, возможно, гибрид <i>Rf</i> 1201
ВИР 648 М	3420	к-2961, Аргентина
ВИР 665 М	3492	к-2961, Аргентина
ВИР 692 М	3522	РФ
ВИР 730 М	3502	РФ
ВИР 786 М	3775	РФ
ВИР 826 М	3649	к-1034, Италия
СЛ-2290 М	3606	Украина
3) Цитоплазма фертильного типа, с HRG02		
ВИР 369 R	3328	ВИР 113 × источник <i>Rf</i> , РФ
ВИР 387 М	3338	питомник ЦМС 83, РФ

Линия/ Line	Номер по каталогу ВИР/ VIR catalogue number	Происхождение/ Origin
5) Цитоплазма стерильного типа, с HRG02		
ВИР 263 R	3324	ВИР 113 × источник <i>Rf</i> , РФ
ВИР 386 R	3337	питомник ЦМС 83, РФ
ВИР 583 R	3383	и-545789, РНА 340, США
ВИР 584 R	3384	и-548680, СМ 611, Канада
ВИР 758 R	3554	ВИР 129 × <i>H. floridanus</i> , РФ
ВИР 768 R	3568	ВИР 232 × <i>H. maximiliani</i> , РФ
ВИР 769 R	3556	НА 232 × <i>H. trachelifolius</i> , РФ
ВИР 772 R	3559	и-588386, SAM 462, Финляндия
ВИР 789 R	3702	РФ
ВИР 794 R	3797	РФ
ВИР 795 R?	3760	РФ
ВИР 815 R	3686	РФ
ВИР 817 R	3630	МДА 3617, Финляндия
ВИР 819 R?	3761	ВИР 114 × к-1039, РФ
ВИР 830 R?	3789	и-598386, Финляндия
ВИР 832 R?	3646	и-576407, США
ВИР 833 R	3647	и-576407, США
ВИР 839 R?	3675	РФ

Линия/ Line	Номер по каталогу ВИР/ VIR catalogue number	Происхождение/ Origin
ВИР 740 R	3528	ВИР 113 × источник <i>Rf</i> , РФ
ВИР 743 R	3530	гибрид SW540 × R5E, Франция
4) Цитоплазма стерильного типа, без HRG02		
ВИР 196 R	3286	SL 3376, Болгария
ВИР 365 R	3326	Прогресс × к-2699, РФ
ВИР 370 R	3329	ВИР 113 × источник <i>Rf</i> , РФ
ВИР 631 R	3440	гибрид Sunbred 265, Франция
ВИР 646 R	3491	Ромсун-41, Румыния
ВИР 801 R	3571	Sunbred 265, Франция
ВИР 902 R	3650	к-3411, Финляндия

Линия/ Line	Номер по каталогу ВИР/ VIR catalogue number	Происхождение/ Origin
ВИР 840 R?	3676	РФ
ВИР 846 R	3683	к-3619, США
RIL 130 R	3599	Франция, I 1083 HR 4 × RHA 345

М – закрепитель стерильности, R – восстановитель фертильности, R? – предполагаемый восстановитель фертильности (нет результатов тест-скрещиваний)

M – sterility maintainer, R – fertility restorer, R? – supposed pollen fertility restorer (not tested)

Ранее показано, что большинство отцовских линий, используемых при создании гибридов подсолнечника, характеризуется стерильным типом цитоплазмы и имеет маркер HRG02 (Horn et al., 2019; Sivolarova et al., 2023). В этой связи особый интерес для нашего исследования представляли линии-восстановители фертильности пыльцы со стерильной цитоплазмой, но не имевшие маркера HRG02. Ассоциация маркера PPR621.5R с доминантным аллелем *Rf1* выявлена в группе 5 (см. табл. 2),

включавшей 21 линию со стерильным типом цитоплазмы и SCAR-маркером HRG02. В то же время у пяти из семи восстановителей фертильности, обладавших стерильным типом цитоплазмы и не имевших маркера HRG02 (группа 4, см. табл. 2), обнаружен маркер PPR621.5M, характерный для закрепителей стерильности. Маркер PPR621.5R, характерный для восстановителей фертильности (генотип *Rf1Rf1*), идентифицирован в этой группе лишь у линий ВИР 631 и ВИР 801 (рис. 2, табл. 3).

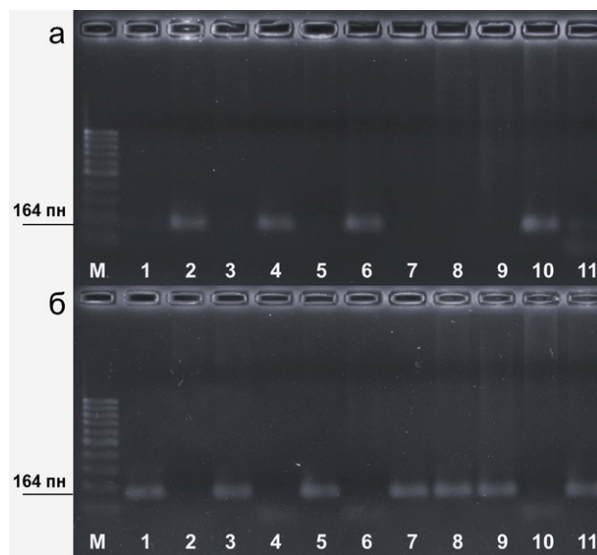


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации маркеров PPR621.5M (а) и PPR621.5R (б): 1 – ВИР 789, 2 – ВИР 902, 3 – ВИР 263, 4 – ВИР 583, 5 – ВИР 584, 6 – ВИР 319, 7 – ВИР 772, 8 – ВИР 369, 9 – ВИР 743, 10 – ВИР 387, 11 – ВИР 740

Fig. 2. Electrophoregrams of amplification products of markers PPR621.5M (a) and PPR621.5R (b): 1 – VIR 789, 2 – VIR 902, 3 – VIR 263, 4 – VIR 583, 5 – VIR 584, 6 – VIR 319, 7 – VIR 772, 8 – VIR 369, 9 – VIR 743, 10 – VIR 387, 11 – VIR 740

Аллель-специфичный SCAR-маркер SFR833 тесно сцеплен с доминантным аллелем гена *Rfl*. При анализе расщепляющейся гибридной популяции рекомбинанты между SFR833 и *Rfl* не обнаружены (Sivolapova et al., 2023). В выборке линий генетической коллекции подсолнечника ВИР подтверждена связь между маркером SFR833 и доминантным аллелем *Rfl*. Маркер отсутствовал у стерильных линий (группа 1, см. табл. 2) и закрепителей стерильности (группа 2, см. табл. 2). Диагностический фрагмент 248 пн, амплифицированный с комбинацией праймеров SRF833-F/ SRF833-R, отмечен у всех линий группы 5 (восстановителей фертильно-

сти на основе стерильной цитоплазмы, см. табл. 2) кроме ВИР 583. Известно, что линия RHA 340, на основе которой была создана ВИР 583, предположительно обладает геном *Rf3* (Jan, Vick, 2007). Все характеризовавшиеся наличием маркера SRF833 линии группы 5 (см. табл. 2), включая ВИР 583, имели и маркер PPR621.5R, характерный для обладателей доминантного аллеля (рис. 3). В то же время маркер SFR833 обнаружен лишь у трёх из семи линий четвёртой группы (см. табл. 2), обладающих стерильным типом цитоплазмы и не имеющих маркера HRG02.

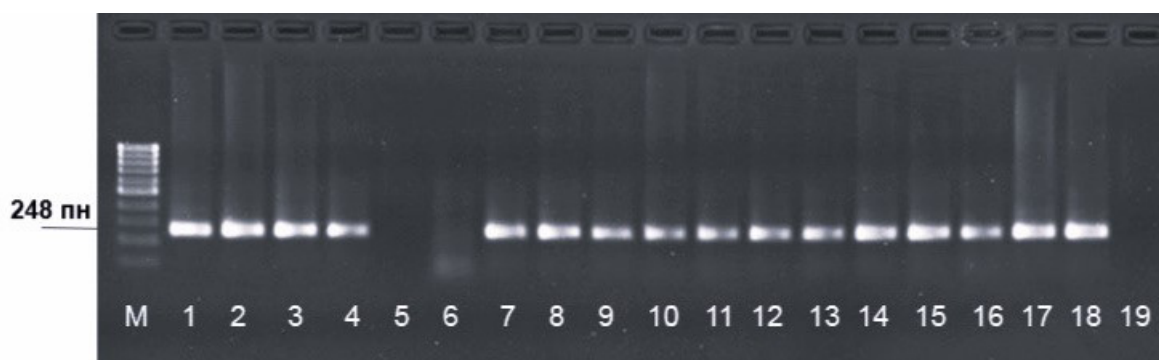


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации маркера SRF833: 1 – ВИР 365, 2 – ВИР 343, 3 – ВИР 370, 4 – ВИР 801, 5 – ВИР 205А, 6 – ВИР 434А, 7 – ВИР 795, 8 – ВИР 768, 9 – ВИР 817, 10 – ВИР 819, 11 – ВИР 830, 12 – ВИР 832, 13 – ВИР 833, 14 – ВИР 839, 15 – ВИР 840, 16 – ВИР 826, 17 – RIL 130, 18 – ВИР 386, 19 – ВИР 730

Fig. 3. Electrophoregrams of amplification products of the marker SRF833: 1 – VIR 365, 2 – VIR 343, 3 – VIR 370, 4 – VIR 801, 5 – VIR 205A, 6 – VIR 434A, 7 – VIR 795, 8 – VIR 768, 9 – VIR 817, 10 – VIR 819, 11 – VIR 830, 12 – VIR 832, 13 – VIR 833, 14 – VIR 839, 15 – VIR 840, 16 – VIR 826, 17 – RIL 130, 18 – VIR 386, 19 – VIR 730

Четвертый из использованных в работе маркеров – кодоминантный PAMSA (Polymerase chain reaction Amplification of Multiple Specific Alleles) 67N04_P – также разработан для детекции SNP в последовательности предполагаемого гена-кандидата *Rfl*. Этот аллель-специфичный маркер амплифицируется с помощью системы из трех праймеров: двух прямых и одного обратного. Один из прямых праймеров содержит на 3'-конце дополнительную последовательность длиной 15 нуклеотидов, что позволяет амплифицировать продукты, специфичные для доминантного (фрагмент длиной 170 пн) и рецессивного (фрагмент длиной 155 пн) аллелей гена *Rfl* (Horn et al., 2019). Ассоциация вариантов маркера 67N04_P со способностью линии восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность подтверждена при анализе линий ЦМС и закрепителей стерильности (группы 1 и 2, см. табл. 2, размер диагностического фрагмента 155 пн), а также восстановителей фертильности пыльцы и предполагаемых восстановителей, обладавших стерильной цитоплазмой и SCAR-маркером HRG02 (группа 5, см. табл. 2, размер диагностического фрагмента 67N04_P 170 пн). В группе 5 (см. табл. 2) фрагмент размером 155 пн обнаружен лишь у линии ВИР 794.

Генотипирование гибридных растений F_2 с помощью аллель-специфичных маркеров локуса *Rfl*. Для подтверждения диагностической ценности аллель-специфичных маркеров гена *Rfl*, из популяций гибридов F_2 от скрещивания линии ЦМС ВИР 116А с восстановителями фертильности ВИР 740 (цитоплазма фертильного типа) и RIL 130 (цитоплазма стерильного типа) были отобраны по 20 фертильных и стерильных растений. Оба отцовских родителя гибридов характеризовались наличием маркеров HRG02, PPR621.5R и SRF833, специфичных для доминантного аллеля *Rfl*. Каждое растение F_2 было генотипировано с использованием маркеров HRG02, PPR621.5M, PPR621.5R, SRF833. Маркер 67N04_P в анализ не включали, поскольку из-за небольших различий в длине диагностических фрагментов (155 пн и 170 пн) дифференцировать гомо- и гетерозиготы в агарозном геле затруднительно. За редкими исключениями (по одному в каждой популяции), все фертильные растения каждой популяции имели маркеры доминантного аллеля *Rfl* (PPR621.5R, SRF833 и HRG02), а стерильные – только маркер PPR621.5M, ассоциированный с рецессивным аллелем. В популяции F_2 (ВИР 116А × ВИР 740) обнаружено два рекомбинантных генотипа. Одно растение –

Таблица 3. Варианты аллель-специфичных маркеров генов-кандидатов *Rf1* у линий генетической коллекции подсолнечника ВИР

Table 3. Variants of allele-specific markers for the *Rf1* candidate genes in lines of the VIR sunflower genetic collection

Линия/ Line	Восстановительная способность (М, R)*	Профиль маркеров*	Генотип/ genotype
Группа 1 / Group 1***			
ВИР 205А, НА 89А, ВИР 434А, ВИР 116А	-	PPR621.5M, 67N04_155	<i>rf1rf1</i>
Группа 2 / Group 2			
ВИР 340, ВИР 171, ВИР730, Сл2290, ВИР 449, ВИР 665, ВИР 692, ВИР 786,	М	PPR621.5M, 67N04_155	<i>rf1rf1</i>
ВИР 648 ВИР 826	М	PPR621.5M, 67N04_170	<i>rf1rf1</i>
Группа 3 / Group 3			
ВИР 369, ВИР 740, ВИР 743	R	HRG02, PPR621.5R, SRF833, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 387	М	HRG02 , PPR621.5M, 67N04_155	<i>rf1rf1</i>
Группа 4 / Group 4			
ВИР 365, ВИР 370	R	PPR621.5M, SRF833, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 196, ВИР 646, ВИР 902	R	PPR621.5M, 67N04_155	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 801	R	PPR621.5R, SRF833, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 631	R	PPR621.5R, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
Группа 5 / Group 5			
ВИР 263, ВИР 386, ВИР 584, ВИР 758, ВИР768, ВИР769, ВИР 772, ВИР 789, ВИР 815, ВИР 817, ВИР 833, RIL 130, ВИР846	R	HRG02, PPR621.5R, SRF833, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 795, ВИР 819, ВИР 830, ВИР 832, ВИР 839, ВИР 840	R?	HRG02, PPR621.5R, SRF833, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 583	R	HRG02, PPR621.5R, 67N04_170	<i>Rf1Rf1</i>
ВИР 794	R	HRG02, PPR621.5R, SRF833, 67N04_155	<i>Rf1Rf1</i>

*М – закрепитель стерильности, R – восстановитель фертильности, R? – предполагаемый восстановитель фертильности (нет данных тест-скрещиваний)

**Маркеры, специфичные для доминантного аллеля *Rf1*, выделены полужирным шрифтом

***Характеристика линий по типу цитоплазмы и наличию/отсутствию маркера HRG02 приведена в таблице 2

*M – fertility restorer, R – sterility maintainer, R? – supposed pollen fertility restorer (data of field crosses are not available)

**Markers specific for the dominant *Rf1* allele are highlighted in bold

***Characterization of lines by cytoplasm type is given in Table 2

фертильное – имело маркер HRG02 и было гетерозиготным по маркеру PPR621.5 (SNP G/C), но маркер SRF833 у него не выявлен. Заметим, что ранее, при цитологическом анализе изменчивости морфометрических показателей пыльца у этого растения обнаружили низкие показатели фертильности пыльца (34%) и малый диаметр пыльцевых зёрен (22-23 мкм в отличие от 28-29 мкм у других растений (Karabitsina et al., 2019). У другого растения (стерильного) маркер HRG02 отсутствовал, но обнаружены PPR621.5R и SRF833, специфичные для доминантного аллеля. В популяции F₂ (ВИР 116А × RIL 130) выявлен один рекомбинантный генотип: фер-

тильное растение с маркерами HRG02 и PPR621.5M, но без маркеров PPR621.5R и SRF833, специфичных для доминантного аллеля.

Обсуждение

Распределение аллель-специфичных маркеров среди линий генетической коллекции, различающихся по способности к восстановлению фертильности пыльцы, подтверждает ассоциацию маркеров PPR621.5M и 67N04_P_155 с рецессивным, а PPR621.5R, SRF833 и 67N04_P_170 – с доминантными аллелями гена *Rf1*. Сцеп-

ленный характер наследования маркеров PPR621.5R и SRF833, показанный ранее (Sivolarova et al., 2023), в нашей работе подтвержден при анализе расщепляющихся гибридных популяций. В то же время в F₂ межлинейных гибридов обнаружены растения с генотипами, предположительно возникшими в результате рекомбинации между SCAR-маркером HRG02, локализованным на расстоянии 2,0 cM от локуса Rfl (Horn et al., 2003), и аллелями гена-кандидата.

Все использованные в настоящем исследовании аллель-специфичные маркеры гена *Rfl* достоверно ассоциированы со способностью к восстановлению фертильности пыльцы. Кроме того, у линий со стерильным типом цитоплазмы они также ассоциированы с наличием SCAR-маркера HRG02. Пока сложно интерпретировать результаты анализа изменчивости в линиях-восстановителях фертильности пыльцы, объединённых в группу 4 (цитоплазма стерильного типа, нет SCAR-маркера HRG02, см. табл. 2). Среди семи линий этой группы выявлено четыре различных профиля маркеров, причем лишь три линии – ВИР 196, ВИР 646 и ВИР 902 – не имели ни одного маркера, ассоциированного с доминантным аллелем (см. табл. 3). Аналогичные данные получены при оценке маркеров HRG02, PPR621.5M, PPR621.5R, 67N04 на ассоциативной панели, включавшей 557 образцов подсолнечника различного происхождения (Horn et al., 2019). В состав изученной панели входила 101 R-линия, преимущественно со стерильным типом цитоплазмы. Восемьдесят восемь R-линий характеризовались наличием маркеров доминантного аллеля. Профили маркеров 11 R-линий были характерны для носителей рецессивного аллеля *rfl*. Ещё у двух линий выявлены лишь два маркера доминантного аллеля, PPR621.5R и 67N04_170. Интересно, что большинство линий, не имевших маркеров, тем не менее, связаны происхождением с источниками доминантного аллеля *Rfl*. Так, например, линия RHA 398, не имевшая по результатам генотипирования ни одного маркера доминантного аллеля, выделена из гибрида RHA 274/BCD LINE BULK (Oil seed sunflower description..., 2024), где RHA 274 – восстановитель фертильности, в генотип которого ген *Rfl* был передан от источника, созданного с участием дикорастущего техасского подсолнечника (Baute et al., 2015).

Разнообразие профилей маркеров, специфичных для доминантного аллеля *Rfl* у линий генетической коллекции подсолнечника ВИР, по-видимому, обусловлено большим числом генов-кандидатов и протяженностью района, в котором они расположены.

Сложности идентификации генов-кандидатов в локусе Rfl связаны с большим размером генома *H. annuus*. Геном подсолнечника секвенирован, но из-за большого числа дубликаций генов и хромосомных перестроек до недавнего времени не был аннотирован полностью (Badouin et al., 2017). Пока ещё не представляется возможным полностью определить все гены-кандидаты в локусе Rfl, поскольку референсный геном представлен

линией закрепителем HanXRQ, и протяжённая область между двумя районами, содержащими потенциальные гены-кандидаты (30 и 3,9 миллионов пар оснований), не аннотирована (Horn et al., 2019). Кроме того, в процессе селекции линии-восстановители фертильности пыльцы имели повторные интрогрессии генетического материала от диких видов и, следовательно, могли возникать перестройки района локализации генов-кандидатов *Rfl* (Baute et al., 2015; Horn et al., 2019).

Заключение

В настоящей работе на материале генетической коллекции подсолнечника ВИР подтверждена диагностическая ценность аллель-специфичных маркеров гена *Rfl* 67N04_P, PPR621.5R, PPR621.5M и SRF833 для генотипирования линий подсолнечника по локусу Rfl и использования их в маркер-опосредованной селекции.

Установлено, что линии с одинаковым фенотипом, способностью к восстановлению фертильности пыльцы или закреплению стерильности характеризуются различными сочетаниями маркеров. Сделано заключение о гаплотипах локуса Rfl у линий генетической коллекции подсолнечника ВИР. Подтверждена перспективность маркеров PPR621.5M, PPR621.5R, SRF833 и 67N04_P для отбора носителей доминантных и рецессивных аллелей гена *Rfl* в маркер-опосредованной селекции подсолнечника.

References/Литература

- Abratti G., Bazzalo M.E., Leon A. Mapping a novel fertility restoration gene in sunflower. In: *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference; 2008 June 8-12; Cordoba, Spain*. Consejería de Agricultura y Pesca; 2008. Vol. 2. P. 617-621. Available from https://www.isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/17thISC_CordobaVol2/617sonia.pdf [accessed Nov. 15, 2024]
- Anashchenko A.V., Duka M.V. Study of the genetic system of CMS-*Rf* in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Communication II. Restoration of male fertility in hybrids based on CMS. *Genetika*. 1985;21(12):1999-2004. [in Russian] (Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение II. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМС. *Генетика*. 1985;21(12):1999-2004).
- Anisimova I.N., Karabitsina Yu.I., Alpatieva N.V., Kuznecova E.B., Titov N.V., Lyutko A.Yu., Gavrilova V.A. Diagnostic value of *Rfl* gene molecular markers in sunflower. *Biotechnology and Plant Breeding*. 2021;4(2):28-37. [in Russian] (Анисимова И.Н., Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В., Кузнецова Е.Б., Титов Н.В., Лютко А.Ю., Гаврилова В.А. Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rfl* подсолнечника. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(2):28-37). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-03
- Badouin H., Gouzy J., Grassa C.J., Murat F., Staton S.E., Cottret L., Lelandais-Brière C., Owens G.L., Carrère S., Mayjonade B., Legrand L., Gill N., Kane N.C., Bowers J.E., Hubner S., Bellec A., Bérard A., Bergès H., Blanchet N., Boniface M.-C., Brunel D., Catrice O., Chaidir N., Claudel C., Donnadiou C., Faraut T., Fievet G., Helmstetter N., King M., Knapp S.J., Lai Z., Le Paslier M.-C., Lippi Y., Lorenzon L., Mandel J.R., Marage G., Marchand G., Marquand E., Bret-Mestries E., Morien E., Nambesan S., Nguyen T., Pegot-Espagnet P., Pouilly N.,

- Raftis F., Sallet E., Schiex T., Thomas J., Vandecasteele C., Varès D., Vear F., Vautrin S., Crespi M., Mangin B., Burke J.M., Salse J., Muñoz S., Vincourt P., Loren H., Rieseberg L.H., Langlade N.B. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*. 2017;546:148-152. DOI: 10.1038/nature22380
- Baute G.J., Kane N.C., Grassa C.J., Lai Z., Rieseberg L.H. Genome scans reveal candidate domestication and improvement genes in cultivated sunflower, as well as post-domestication introgression with wild relatives. *New Phytologist*. 2015;206(2):830-838. DOI: 10.1111/nph.13255
- Choudhari A.K., Bagade A.B. Diverse cytotsteriles in sunflower: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019;8(11):1641-1644. DOI: 10.20546/ijemas.2019.811.189
- Feng J., Jan C.C. Introgression and molecular tagging of *Rf₄*, a new male fertility restoration gene from wild sunflower *Helianthus maximiliani* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;117(2):241. DOI: 10.1007/s00122-008-0769-4
- Gavrilova V.A., Anisimova I.N., Alpatyeva N.V., Rozhkova V.T., Stupnikova T.G., Karabitsina Yu.I., Kuznetsova E.B. Catalogue of the VIR global collection. Iss. 853. Genetic collection of sunflower (Geneticheskaya kolleksiya podsolnechnika). St. Petersburg: VIR; 2017. [in Russian] (Гаврилова В.А., Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Рожкова В.Т., Ступникова Т.Г., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 853. Генетическая коллекция подсолнечника. Санкт-Петербург: ВИР; 2017).
- Goryunov D.V., Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Chernova A.I., Sotnikova E.A., Martynova E.U., Boldyrev S.V., Ayupova A.F., Gubaev R.F., Mazin P.V., Gurchenko E.A., Shumskiy A.A., Petrova D.A., Garkusha S.V., Mukhina Z.M., Benko N.I., Demurin Y.N., Khaitovich P.E., Goryunova S.V. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower. *Agronomy*. 2019;9(2):49. DOI: 10.3390/agronomy9020049
- Heiser C.B. Hybridization in the annual sunflowers: *Helianthus annuus* × *H. debilis* var. *cucumerifolius*. *Evolution*. 1951;5(1):42-51. DOI: 10.2307/2405429
- Horn R., Köhler R.H., Zetsche K. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Molecular Biology*. 1991;17(1):29-36. DOI: 10.1007/BF00036803
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prüfe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rfl* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;106:599-606. DOI: 10.1007/s00122-002-1078-y
- Horn R., Radanovic A., Fuhrmann L., Sprycha Y., Hamrit S., Jockovic M., Miladinovic D., Jansen C. Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rfl* in sunflower. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(6):1260. DOI: 10.3390/ijms20061260
- Jan C.C., Vick B.A., Miller J.F., Kahler A.L., Butler E.T. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;96(1):15-22. DOI: 10.1007/s001220050703
- Jan C.C., Vick B.A. Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower. *Plant Breeding*. 2007;126(2):213-217. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01350.x
- Karabitsina Y.I., Gavrilova V.A., Alpatieva N.V., Kuznetsova E.B., Anisimova I.N. Peculiarities of inheritance of pollen fertility restoration trait in sunflower with cytoplasmic male sterility. *Russian Journal of Genetics*. 2019;55:1375-1382. DOI: 10.1134/S1022795419110073
- Kinman M.L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. In: *Proceedings of the 4th International Sunflower Conference; 1970 June 23-25; Memphis, Tennessee, USA*. 1970. P. 181-183. Available at: <https://www.isasunflower.org/fileadmin/documents/Proceedings/4thISC1970/T1970BRE08.pdf> [accessed Nov. 15, 2024].
- Leclercq P. Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. *Annales de l'Amélioration des Plantes*. 1969;19(2):99-106. [In French]
- Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.I., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genetics and Molecular Research*. 2007;6(4):1064-1071.
- Liu Z., Mulpuri S., Feng J., Vick B.A., Jan C.-C. Molecular mapping of the *Rf₁* fertility restoration gene to facilitate its utilization in breeding confection sunflower. *Molecular Breeding*. 2012;29:275-284. DOI: 10.1007/s11032-011-9563-0
- Liu Z., Wang D., Feng J., Seiler G.J., Cai X., Jan C.-C. Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene. *Genetics*. 2013;193(3):727-37. DOI: 10.1534/genetics.112.146092
- Liu Z., Zhang L., Seiler G.J., Jan C.-C. Molecular mapping of the *Rf₉* gene from RCMG 1 for CMS ANN3 derived from wild sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*. 2023;219:46. DOI: 10.1007/s10681-023-03176-3
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [accessed Nov. 15, 2024].
- Oil seed sunflower description of released restorer line germplasm. Available from: <https://www.ag.ndsu.edu/fss> North Dakota Foundation Seedstocks [accessed Nov. 15, 2024].
- Polivanova O.B., Sivolapova A.B., Goryunov D.V., Fedorova A.V., Sotnikova E.A., Chebanova Y.V., Karabitsina Y.U.; Benko N.I., Demurin Y.N., Goryunova S.V. Structural diversity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) candidate *Rfl* loci based on gene-specific PCR. *Research on Crops*. 2021;22(1):40-46. DOI: 10.1830/2348-7542.2021.034
- Qi L.L., Seiler G.J., Hulke B.S., 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.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;125:921-932. DOI: 10.1534/genetics.112.146092
- Radanović A.; Sprycha Y.; Jocković M.; Sundt M.; Miladinović D.; Jansen C.; Horn R. KASP markers specific for the fertility restorer locus *Rfl* and application for genetic purity testing in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Genes*. 2022;13:465. DOI: 10.3390/genes13030465
- Sajer O., Schirmak U., Hamrit S., Horn R. Mapping of the new fertility restorer gene *Rf-PET2* close to *Rfl* on linkage group 13 in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genes*. 2020;11:269. DOI: 10.3390/genes11030269
- Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding. *Plant Breeding*. 2008;127(6):587-591. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01516.x
- Serieys H. Identification, study, utilization in breeding programs of new CMS sources. In: *Proceedings of the Sunflower Subnetwork Progress Report; 2005 July 17-20; Novi Sad, Serbia and Montenegro*. Rome, Italy: FAO. 2005. P. 47-53.
- Sivolapova A.B., Polivanova O.B., Goryunov D.V., Fedorova A.V., Sotnikova E.A., Karabitsina Y.I., Benko N.I., Mukhina Z.M., Anisimova I.N., Demurin Y.N., Goryunova S.V. Refinement of *Rfl*-gene localization and development of the new molecular markers for fertility restoration in sunflower. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(9):7919-7926. DOI: 10.1007/s11033-023-08646-4
- Talukder Z., Ma G., Hulke B., Jan C.-C., Qi L. Linkage mapping and genome-wide association studies of the *Rf* gene cluster in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their distribution in world sunflower collections. *Frontiers in Genetics*. 2019;10:216. DOI: 10.3389/fgene.2019.00216
- Trubacheeva N.V., Salina E.A., Shumny V.K., The use of CMS/*Rf* system for sunflower hybrid breeding. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(2):119-131. [in Russian] (Трубачеева Н.В., Салина Е.А., Шумный В.К. Использование системы ЦМС-*Rf* в гибридной селекции подсолнечника. Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;10(2):119-131). DOI: 10.18699/letvjgb-2024-10-14
- Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rfl* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breeding*. 2010;129:24-28. DOI: 10.1111/j.14390523.2009.01661.x

Информация об авторах

Ирина Николаевна Анисимова, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, irina_anisimova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

Наталья Владимировна Алпатьева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, alpatievanatalia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5531-2728>

Мария Константиновна Рязанова, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, m.ryazanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4444-3658>

Роман Дмитриевич Бердиган, студент, Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), 199034 Россия, Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9, rberdigan@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-1706-0022>

Евгений Евгеньевич Радченко, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, eugene_radchenko@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3019-0306>

Вера Алексеевна Гаврилова, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, v.gavrilova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8110-9168>

Information about the authors

Irina N. Anisimova, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, irina_anisimova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

Natalia V. Alpatieva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, alpatievanatalia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5531-2728>

Maria K. Ryazanova, PhD Student, Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, m.ryazanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4444-3658>

Roman D. Berdigan, Student, St. Petersburg State University (SPbSU), 7-9, Universitetskaya Embankment, St. Petersburg, 199034 Russia, rberdigan@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-1706-0022>

Evgeny E. Radchenko, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Head of Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, eugene_radchenko@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3019-0306>

Vera A. Gavrilova, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, v.gavrilova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8110-9168>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 12.12.2024; одобрена после рецензирования 21.12.2024; принята к публикации 25.12.2024.

The article was submitted on 12.12.2024; approved after reviewing on 21.12.2024; accepted for publication on 25.12.2024.