

УДК 575.222.73+575.853'316.7

## СПАРИВАНИЕ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ У ОТДАЛЕННЫХ АЛЛОГАПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ РОДА *SOLANUM*

© 2014 г. Т.А. Гавриленко<sup>1,2</sup>, Г.И. Пендинен<sup>1</sup>, В.-М. Рокка<sup>3</sup>,  
О.Ю. Антонова<sup>1</sup>, Р. Тиме<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия,  
e-mail: tatjana9972@yandex.ru;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;

<sup>4</sup> Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

Изучено спаривание хромосом в мейозе уникальных аллогаплоидных гибридов, полученных с использованием методов клеточной и хромосомной инженерии. Использованы две комбинации гибридов: 1) между дигаплоидом культурного картофеля *Solanum tuberosum* (AA-геном,  $2n = 2x = 24$ ) и дикорастущим видом *S. etuberosum* (EE,  $2n = 2x = 24$ ); 2) между культурным томатом *S. lycopersicum* (LL,  $2n = 2x = 24$ ) и *S. etuberosum* (EE,  $2n = 2x = 24$ ). Хромосомоспецифичные ВАС-клоны картофеля и пробы дифференциально меченой тотальной ДНК родительских видов позволили идентифицировать конъюгирующие хромосомы и их геномную принадлежность. У аллогаплоидов *S. tuberosum* с *S. etuberosum* геномного состава АЕ обнаружено до 7 межгеномных бивалентов на клетку; хиазмы формируются в дистальном районе длинного плеча каждой хромосомы набора; хиазмы в коротком плече имеют хромосомы 3, 6, 11 и 12. Для андрогенных регенерантов соматических гибридов *S. lycopersicum* с *S. etuberosum* характерен в основном унивалентный мейоз; редкие биваленты (от 0 до 2 на клетку) образованы гомеологами хромосом 4 и 6. Обсуждаются перспективы предложенного подхода, основанного на использовании методов соматической гибридизации и *in vitro* андрогенеза, для изучения спаривания гомеологичных хромосом и разработки стратегии интрогрессивной гибридизации отдаленных видов растений.

**Ключевые слова:** *Solanum*, картофель, томат, *Etuberosum*, отдаленная гибридизация, спаривание гомеологичных хромосом, FISH, GISH.

### ВВЕДЕНИЕ

Межвидовая гибридизация остается одним из основных экспериментальных подходов для расширения генетического разнообразия важнейших представителей рода *Solanum*: культурного картофеля *Solanum tuberosum* (геномная формула AAAA,  $2n = 4x = 48$ ) и культурного томата *S. lycopersicum* (LL,  $2n = 2x = 24$ ), характеризующихся невысокой внутривидовой генетической вариабельностью (Ross, 1986; Bai, Lindhout, 2007). Всего 10 % видов секции *Petota*, объединяющей более 200 дикорастущих видов

картофеля, были вовлечены в селекционный процесс с использованием традиционных методов гибридизации (Gavrilenko, 2011). Кроме того, барьеры несовместимости ограничили гибридизацию как культурного картофеля, так и томатов (секция *Lycopersicon*) с дикорастущими неклубненосными видами секции *Etuberosum* рода *Solanum* (EE,  $2n = 2x = 24$ ), являющихся источником устойчивости к важнейшим вирусным заболеваниям и их переносчикам (Valkonen *et al.*, 1992а, б), мокрым гнилям (McGrath *et al.*, 2002), низким положительным температурам (Hawkes, 1994).

Традиционные исследования по межвидовой гибридизации включают скрещивания исходных родительских видов и в случае стерильности отдаленных гибридов – их диплоидизацию с целью получения фертильных амфидиплоидов и создания интрогрессивных форм в поколениях беккроссов. Анализ мейоза исходных гибридов и амфидиплоидов позволяет исследовать особенности взаимодействия геномов родительских видов и прогнозировать возможность переноса посредством гомеологичной рекомбинации генов дикорастущих видов, повышающих адаптивность культурных растений.

Среди различных причин, влияющих на конъюгацию хромосом в мейозе межвидовых гибридов, большое значение имеет структурная дивергенция гомеологичных хромосом. Виды секций *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* рода *Solanum* имеют сходные кариотипы; базовый тип хромосомного набора представлен 12 хромосомами, большинство из которых сложно однозначно идентифицировать на уровне световой микроскопии из-за небольших размеров и сходной морфологии. В исследованиях по сравнительному генетическому картированию установлен высокий уровень коллинеарности ДНК маркеров на гомеологичных хромосомах представителей этих секций, за исключением относительно небольшого числа участков, вовлеченных в хромосомные перестройки. Большая часть исследований относится к изучению коллинеарности маркеров на хромосомах А и L геномов картофеля и томата, которые отличаются по пяти перицентрическим инверсиям (Tankley *et al.*, 1992; Doganlar *et al.*, 2002). Информация о гомологии геномов А–Е и L–Е ограничена одной работой (Perez *et al.*, 1999), выполненной с использованием небольшого числа ПДРФ маркеров, в которой были выявлены участки хромосом, консервативные для видов *S. tuberosum*, *S. etuberosum*, *S. lycopersicum*, и перестройки, различающие гомеологичные хромосомы. В последние годы для идентификации индивидуальных хромосом и изучения структурной организации гомеологичных хромосом представителей рода *Solanum* успешно применяются методы молекулярной цитогенетики (Gavrilenko, 2011). В исследованиях по сравнительному картированию ВАС-клонов, содержащих хромосомоспецифичные последовательности

картофеля и томата, на пахитенных хромосомах *S. tuberosum*, *S. etuberosum*, *S. lycopersicum* продемонстрирован высокий уровень эволюционного консерватизма кариотипов этих видов. В этих работах показано, что наиболее частыми событиями в кариотипической эволюции представителей секций *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* являются парацентрические инверсии (Iovene *et al.*, 2008; Lou *et al.*, 2010; Szinay *et al.*, 2012). Важно отметить, что информация об изменениях структурной организации гомеологичных хромосом А, Е и L геномов пока еще неполная, исследованы хромосома 6 и отдельные участки гомеологичных хромосом 5, 9, 10, 11, 12.

Возможности интрогрессивной гибридизации значительно расширились благодаря развитию методов клеточной и хромосомной инженерии. Так, слияние соматических клеток позволяет в один этап синтезировать амфидиплоидные формы филогенетически отдаленных видов растений. В разных лабораториях получены соматические гибриды между нескрещиваемыми видами рода *Solanum*, в том числе относящимися к секциям *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* (Gavrilenko *et al.*, 1992, 2001, 2003; Helgeson *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1999; Novy *et al.*, 2002). В большинстве комбинаций отобраны фертильные тетраплоидные соматические гибриды (геномный состав AAEE, LLEE), которые были успешно вовлечены в возвратные скрещивания. Однако потенциал межгеномной рекомбинации у синтезированных соматических гибридов оценить достаточно сложно, поскольку для них характерен регулярный бивалентный мейоз – спаривание происходит между гомологами (Dong *et al.*, 1999; Gavrilenko *et al.*, 2001, 2012).

С целью изучения возможности гомеологичной конъюгации хромосом А–Е и L–Е геномов, а также для оценки перспектив интрогрессивной гибридизации видов секций *Petota*, *Etuberosum* и *Lycopersicon* нами разработана оригинальная схема, направленная на получение аллогаплоидов, имеющих гаплоидные наборы хромосом родительских видов (рис. 1).

Схема включает гаплоидизацию соматических гибридов (амфидиплоидов) с использованием андрогенеза *in vitro* и изучение потенциала межгеномной рекомбинации у полученных



**Рис. 1.** Схема получения аллогаплоидов (андрогенных регенерантов) между нескрещиваемыми видами рода *Solanum* и стратегия интрогрессивной гибридизации.

андрогенных регенерантов. В данной работе представлены результаты изучения гомеологичного спаривания хромосом аллогаплоидов различного геномного состава, выполненного на основе ВАС-FISH и GISH.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На основе метода слияния протопластов ранее были получены межвидовые тетраплоидные соматические гибриды в двух комбинациях: 1) между дигаплоидом возделываемого картофеля *S. tuberosum* (AA,  $2n = 2x = 24$ ) Т67 и диким не клубненосным видом секции *Etuberosum* – *S. etuberosum* (EE,  $2n = 2x = 24$ ), образец k-9141 (Gavrilenko *et al.*, 2003) и 2) между культурным томатом *S. lycopersicum* (LL,  $2n = 2x = 24$ )

сорт Tamina и *S. etuberosum* (EE,  $2n = 2x = 24$ ), образец k-9141 (Gavrilenko *et al.*, 1992, 2001) (рис. 1). Эти гибриды характеризуются строгой – бивалентной гомологичной конъюгацией хромосом. Таким образом, синтезированные гибриды содержат два диплоидных набора хромосом родительских видов, являясь амфидиплоидами с геномным составом: AAEE ( $2n = 4x = 48$ ) в комбинации *S. tuberosum* с *S. etuberosum* и LLEE ( $2n = 4x = 48$ ) в комбинации *S. lycopersicum* с *S. etuberosum*.

Андрогенные регенеранты были получены при культивировании пыльников тетраплоидных соматических гибридов (амфидиплоидов) с использованием модифицированного метода *in vitro* андрогенеза (Rokka *et al.*, 2000). Для отбора регенерантов, содержащих предположительно

полные гаплоидные наборы хромосом родительских видов, был использован GISH (рис. 1). В настоящем исследовании участвовали андрогенные регенеранты: (1) анеуплоидный генотип 15.5.b.1.1.1 ( $2n = 25$ , 12 хромосом L генома и 13 хромосом E генома) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (Gavrilenko *et al.*, 2001) и (2) диплоидные ( $2n = 24$ ) генотипы E15 и E18 комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*, геномный и хромосомный составы которых определены в данной работе. Названия видов и секций даны в соответствии с последними таксономическими ревизиями изучаемых секций рода *Solanum* (Contreras, Spooner, 1999; Peralta *et al.*, 2008).

**Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).** Бутоны помещали в фиксатор 3 : 1 (96 %-й этанол : ледяная уксусная кислота), фиксации хранили в морозильнике ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Пыльники мацерировали в растворе ферментов (4 %-я целлулаза и 1 %-я пектиназа) при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 95 мин. Отмацерированные ткани суспензировали на предметном стекле в капле 45 %-й уксусной кислоты, осторожно раздавливали, затем препарат замораживали в морозильнике ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), снимали покровное стекло, высушивали при комнатной температуре. Препараты обрабатывали раствором пепсина в концентрации 0,1 мг/мл в течение 45 мин при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

FISH проводили согласно общепринятым методикам (Leitch *et al.*, 1994) с небольшими модификациями (Pendinen *et al.*, 2008) с использованием хромосомоспецифичных ВАС-клонов картофеля (Iovene *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009), меченных биотином или дигоксигенином методом nick-трансляции. Каждая смесь для гибридизации включала дифференциально меченые (DIG-УТР и Biotin-УТР) ДНК двух ВАС-клонов. Перед нанесением на препарат смесь для гибридизации инкубировали 8 мин при  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После нанесения на препарат 20  $\mu\text{l}$  денатурированной смеси стекла 5 мин инкубировали при  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Препараты помещали на ночь (16–20 ч) в термостат для гибридизации при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После гибридизации и отмывки препаратов меченую дигоксигенином ДНК детектировали анти-DIG-родамин-конъюгатом, меченую биотином ДНК – авидин-FITC-конъюгатом. Затем препараты промывали три раза в буфере  $4\times\text{SSC}$  при  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , контрастировали 4,6-диа-

мино-2-фенилиндолом (DAPI) и заключали в Vectashield antifade (Vector Laboratories).

На препаратах изучали тип и частоту ассоциаций меченых хромосом на стадии диакинеза–метафазы I, а также отмечали участие разных плеч хромосом в образовании бивалентов.

После FISH на тех же препаратах проводили репробинг с использованием дифференциально меченой тотальной ДНК родительских видов. GISH проводили согласно общепринятым методикам (Leitch *et al.*, 1994) с небольшими модификациями (Pendinen *et al.*, 2008), используя в пробе для гибридизации дифференциально меченые ДНК родительских видов в соотношении 1 : 1. Тотальную ДНК *S. etuberosum* метили дигоксигенином, а ДНК *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* – биотином (DIG- или Biotin-Nick Translation Mix, Roche). Меченую дигоксигенином ДНК детектировали анти-DIG-родамин- или анти-DIG-fluorescein-конъюгатом (Roche Diagnostics), а меченую биотином ДНК – стрептовидин-Су3- (Dianova) или авидин-FITC-конъюгатом (Roche Diagnostics).

При сопоставлении FISH и GISH результатов, соответствующих одной и той же клетке, определяли геномную принадлежность меченых ВАС-клонами хромосом, образующих биваленты. Кроме того, при изучении GISH изображений считали среднюю частоту межгеномных бивалентов на клетку.

**Микроскопия и анализ препаратов.** Препараты анализировали с использованием эпифлюоресцентного микроскопа Olympus BX60. Для создания и обработки изображений использованы совмещенная с микроскопом камера SenSys CCD (charge coupled device, Roper Scientific, Tucson, AZ) и программа IPLab Spectrum v3.1 software (Signal Analytics, Vienna, VA) для компьютера Macintosh.

**SSR-, STS- и CAPS- маркеры.** В работе был использован набор из 132 пар праймеров, специфичных к последовательностям индивидуальных локусов генома *A. S. tuberosum* с известной хромосомной локализацией. Маркеры были отобраны по литературным источникам, а также разработаны нами на основе информации о картированных монолокусных последовательностях генома картофеля (Milbourne *et al.*, 1998; Oberhagemann *et al.*, 1999; Feingold *et al.*, 2005; <http://www.gabipd.org/database/maps.shtml>).



## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Доказательство аллогамного состояния андрогенных регенерантов соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*

Анализ геномного и хромосомного состава диплоидных ( $2n = 24$ ) андрогенных регенерантов включал три подхода: 1) GISH митотических препаратов, выявивший у диплоидных регенерантов (E15 и E18) 12 хромосом А генома *S. tuberosum* и 12 хромосом Е генома *S. etuberosum*; 2) FISH, проведенный с набором хромосомоспецифичных ВАС клонов, маркирующих все хромосомы набора (табл. 1). Данные FISH мейотических хромосом показали, что гибридационный сигнал каждого ВАС-клона идентифицируется только на двух хромосомах андрогенных регенерантов. Эти результаты с учетом данных GISH доказывают, что отобранные диплоидные андрогенные регенеранты гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* содержат 12 пар гомеологичных хромосом, соответствующих гаплоидным наборам хромосом родительских видов ( $2n = 2x = 24$ , геномная формула АЕ); 3) параллельно проведен молекулярно-генетический анализ. Из 132 проанализированных пар хромосомоспецифичных праймеров большинство не образовывали ПЦР-продукты с ДНК дикого вида *S. etuberosum* или не выявляли различий между исходными родительскими формами. По результатам ПЦР анализа отобрано 35 пар праймеров, генерировавших у родительских видов полиморфные ПЦР-фрагменты либо непосредственно (1 STS и 20 SSR маркеров), либо после обработки соответствующими рестриктазами (14 CAPS маркеров) (табл. 2). У андрогенных регенерантов E15 и E18 соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* были выявлены диагностические фрагменты всех 35 маркерных локусов *S. etuberosum*.

### Изучение спаривания хромосом аллогамноидов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*

Согласно результатам GISH, аллогамноиды геномного состава АЕ характеризуются низким уровнем спаривания хромосом и формируют

от 0 до 7 бивалентов на клетку; мультиваленты отсутствуют. Результаты GISH показали, что фактически все биваленты представлены гомеологичными ассоциациями хромосом (за исключением случая выявления в единичной клетке одного бивалента картофеля). Число межгеномных бивалентов в среднем на клетку составляет 3,09 (у изученных генотипов E15 и E18 эти значения близки – 2,94 и 3,23, поэтому в дальнейшем приведены суммарные данные для аллогамноидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*).

Изучение спаривания индивидуальных хромосом аллогамноидов проведено при сопоставлении изображений, полученных в ВАС-FISH анализе, с изображениями тех же мейоцитов после GISH. Было показано, что у аллогамноидов геномного состава АЕ все хромосомы набора могут участвовать в формировании межгеномных бивалентов. Чаще всего спариваются гомеологичные хромосомы 4, 5 и 6 (в случае хромосом 11 и 12 выводы делать сложно из-за относительно небольшого числа изученных мейоцитов) (табл. 1; рис. 2, а–г). Хиазмы локализованы в основном в длинных плечах хромосом; локализация хиазм в коротких плечах отмечена для хромосом 3, 6, 10 и 12 (табл. 1). Практически все биваленты являются открытыми, с хиазмами в дистальных участках хромосом; кольцевой бивалент в единичном случае сформирован гомеологами хромосомы 10 (табл. 1).

Отдельно следует остановиться на данных конъюгации гомеологов хромосомы 3, формирующих межгеномный бивалент (рис. 2, д; табл. 1). У аллогамноидов геномного состава АЕ в биваленте, образованном гомеологами хромосомы 3, гибридационные сигналы RH079E02 (3L) и RH078O14 (3S) видны и в длинном, и в коротком плечах хромосомы 3 картофеля *S. tuberosum*, тогда как в другой меченой хромосоме бивалента оба эти маркера лежат в дистальном районе одного и того же плеча (рис. 2, д). Анализ локализации маркеров хромосомы 3 – RH079E02 (3L) и RH078O14 (3S) у дикого вида *S. etuberosum* подтвердил, что оба эти маркера локализованы в дистальной части одного и того же плеча, при этом маркер короткого плеча RH078O14 расположен дистальнее маркера длинного плеча RH079E02 (рис. 2, е).

Таблица 1

Частота спаривания гомеологичных хромосом у аллогаплоидов двух комбинаций:  
*S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* (AE) и *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (LE)

Хромосома	ВАС-клоны и их локализация в коротком (S) или длинном (L) плече хромосом картофеля	Число изученных МКП*	Число / % МКП с бивалентами, образованными меченой парой хромосом		
			всего	с хиазмой в L плече	с хиазмой в S плече
Аллогаплоиды комбинации <i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>					
1	RH083J12 (S) RH096H03 (L)	17	6/ 35,29 ± 11,59	6/ 35,29 ± 11,59	0
2	RH075N07 (L)	24	5/ 20,83 ± 8,29	5/ 20,83 ± 8,29	0
3	RH078O14 (S) RH079E02 (L)	45	15/ 33,33 ± 7,03	14/ 31,11 ± 6,90	1/ 2,22 ± 2,20
4	RH191L87 (L) RH162B09 (S)	45	19/ 42,22 ± 7,36	19/ 42,22 ± 7,36	0
5	RH044A21 (S) RH081B09 (L)	54	27/ 50,0 ± 6,62	27/ 50,0 ± 6,62	0
6	RH103A21 (L) RH 160K03 (S)	57	26/ 45,6 ± 6,59	25/ 43,9 ± 6,57	1/ 1,6 ± 1,66
7	RH186I02 (S) RH075O19 (L)	27	5/ 18,52 ± 7,48	5/ 18,52 ± 7,48	0
8	RH122E19 (L) RH122L16 (S)	32	7/ 21,88 ± 7,96	7/ 21,88 ± 7,96	0
9	RH135I22 (S) RH168F09 (L)	17	3/ 17,64 ± 9,24	3/ 17,64 ± 9,24	0
10	RH178K07 (S) RH184D02 (L)	31	6/ 27,27 ± 8,00 (1-ring)	2/ 9,09 ± 5,16	5/ 22,72 ± 7,53
11	RH204G21 (L) RH042C12 (S)	6	1/ 16,7 ± 15,23	1/ 16,7 ± 15,23	0
12	RH084C24 (S) RH106P06 (L)	7	2/ 28,5 ± 12,5	0	2/ 28,5 ± 12,5
Аллогаплоиды комбинации <i>S. lycopersicum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>					
1	RH083J12 (S)	23	0	0	0
3	RH078O14 (S) RH079E02 (L)	13	0	0	0
4	RH162B09 (S)	23	2/ 8,7 ± 5,88	2/ 8,7 ± 5,88	0
5	RH044A21 (S)	44	0	0	0
6	RH103A21 (L) RH060H14 (L)	30	3/ 10,0 ± 5,48	3/ 10,0 ± 5,48	0
7	RH186I02 (S)	13	0	0	0
9	RH135I22 (S)	32	0	0	0

Примечание. \* МКП – материнские клетки пыльцы. В подавляющем числе случаев ассоциации гомеологичных хромосом представлены открытыми (rod) бивалентами; в скобках указаны случаи формирования закрытых кольцевых бивалентов (ring).

**Таблица 2**

Список отобранных хромосомспецифичных маркеров, выявляющих полиморфизм родительских форм – дигаплоида культурного картофеля *S. tuberosum* Т67 и дикого вида *S. etuberosum*, образец к-9141

Хромосома	Название маркера	
	SSR-маркеры	CAPS- и STS-маркеры
1	STM1029; STM2020; STG0016	GP264/ TaqI
2	STM5114	–
3	Sti050	Chr 3-1/ HinfI; GP25/ TaqI; St4cl/ MboI
4	Sti026; Sti055	Chr 4-2/ AluI; GP83/ DdeI
5	Sti032	Chr 5-1/ HinfI
6	Sti045	GP76/ TaqI
7	Sti008; Sti025; Sti064	–
8	Sti027; Sti048; STM0024	GP170
9	Sti014; Sti057	GP97/HinfI; GP260/AluI; prp1/AluI
10	STG0025	GP218/ TaqI
11	Sti039	–
12	Sti054	GP122-718/ MseI; IPM4/ HaeIII

#### Анализ спаривания хромосом аллогамноидов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*

Такой же подход был применен к андрогенным регенерантам гибридов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*, для которых характерен в основном унисвалентный мейоз. По данным GISH, у этих гибридов обнаружено от 0 до 2 межгеномных бивалентов при среднем числе 0,38 на клетку. Для гибридов этой комбинации результаты FISH удалось получить с ВАС-клонами семи хромосом, хиазмы были выявлены только в длинных плечах хромосом 4 и 6 (табл. 1; рис. 2, ж, з); во всех случаях хиазмы регистрировали в дистальных участках этих хромосом. Гомеологичные хромосомы 1, 3, 5, 7 и 9 не формировали биваленты; сигналы гибридизации соответству-

ющих хромосомспецифичных маркеров детектировали только в унисвалентах (рис. 2, ж).

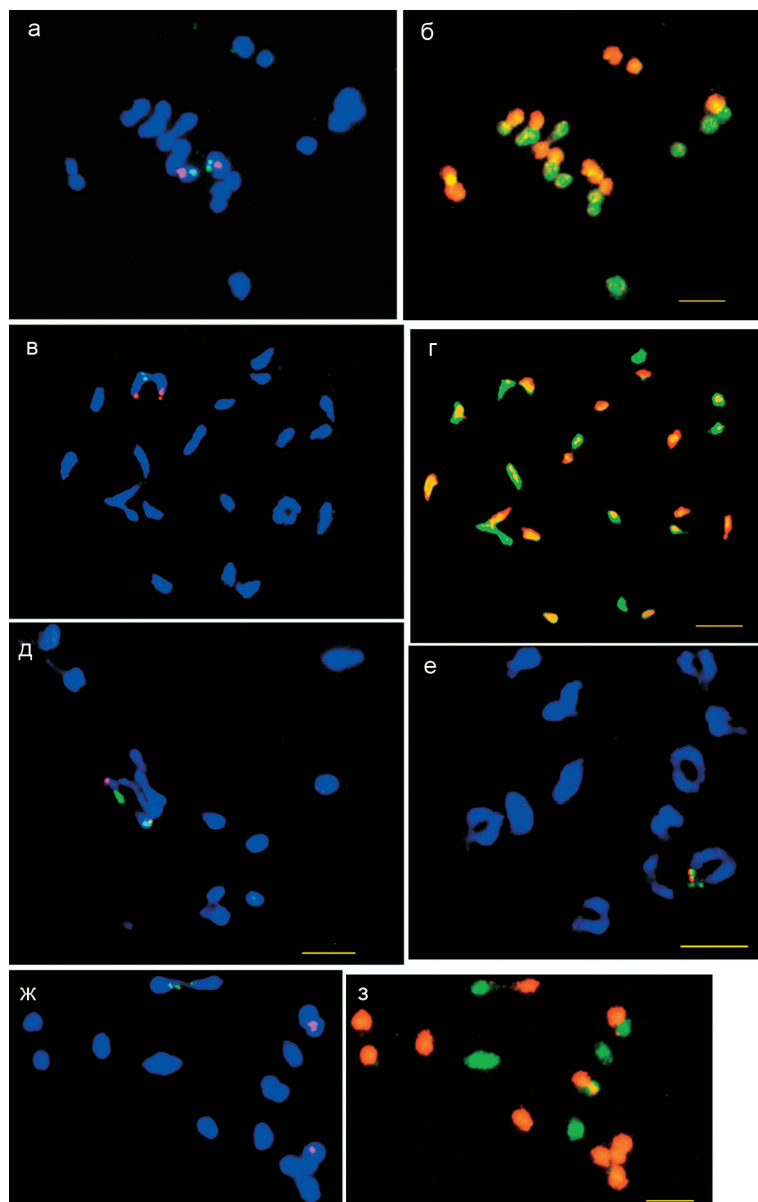
#### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что геномы культурных видов картофеля и томата секвенированы, данные по сравнительному анализу структуры гомеологичных хромосом этих важнейших представителей рода *Solanum* еще немногочисленны. К настоящему времени опубликованы результаты по сравнительному FISH картированию на пахитенных хромосомах 5S, 6S, 6L, 9S, 10L, 11S, 12S *S. tuberosum* (А-геном), *S. etuberosum* (Е-геном) и *S. lycopersicum* (L-геном) хромосомспецифичных ВАС-клонов картофеля и томата (Lou *et al.*, 2010; Szinay *et al.*, 2012). Выявлены участки гомеологичных хромосом с одинаковым порядком расположения маркеров и районы, вовлеченные в хромосомные перестройки. Хорошо известно, что изменения структурной организации гомеологичных хромосом являются одной из причин нарушения межгеномной конъюгации у гибридов. Мы сопоставили полученные результаты изучения распределения хиазм на хромосомах аллогамноидов с литературными данными.

Согласно данным Szinay с соавт. (2012), молекулярно-цитогенетические маркеры располагаются в одинаковом порядке в коротких плечах гомеологичных хромосом 5, 6, 11, 12 *S. tuberosum* и *S. etuberosum*, эти участки А и Е геномов коллинеарны. По нашим данным, у аллогамноидов геномного состава АЕ хиазмы формируются в коротких плечах хромосом 6 и 12; случаев локализации хиазм в 5S и 11S не обнаружено; кроме того, у аллогамноидов хиазмы отмечены в участках 4S и 10S (табл. 1).

Lou с соавт. (2010) сообщили о перичентрической инверсии хромосомы 6, различающей А и Е геномы, и продемонстрировали коллинеарность дистальных участков обоих плеч хромосомы 6. Согласно нашим результатам, у аллогамноидов геномного состава АЕ хиазмы выявлены в дистальном районе длинного плеча и с более низкой частотой – в дистальном районе короткого плеча хромосомы 6 (табл. 1).

Szinay с соавт. (2012) описали крупную парацентрическую инверсию, захватывающую генетический материал всего короткого плеча



**Рис. 2.** FISH с хромосомспецифичными маркерами картофеля и GISH тех же мейоцитов аллогамноидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* (геномный состав AE (а–д)) и анеуплоидного андрогенного регенеранта (геномный состав LE) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (ж, з).

а, б – маркеры хромосомы 5: RH044A21 (DIG-red, короткое плечо) и RH081B09 (BIO-green, длинное плечо) – хиазма в длинном плече (а), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-red) и *S. tuberosum* (BIO-green) – бивалент с маркерами хромосомы 5 образован гомеологами (б);  
 в, г – маркеры хромосомы 6: RH160A21 (DIG-red, длинное плечо) и RH160K03 (BIO-green, короткое плечо) – хиазма в коротком плече (в), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-red) и *S. tuberosum* (BIO-green) – бивалент с маркерами хромосомы 6 образован гомеологами (г);  
 д – маркеры хромосомы 3: RH078O14 (DIG-red, короткое плечо) и RH079E02 (BIO-green, длинное плечо) – хиазма с участием длинного плеча *S. tuberosum* и немаркированного плеча *S. etuberosum*;  
 е – диакинез у *S. etuberosum* – FISH с маркерами хромосомы 3: RH078O14 (DIG-red, короткое плечо) и RH079E02 (BIO-green, длинное плечо), оба маркера локализованы в одном плече;  
 ж, з – фрагмент клетки анеуплоидного андрогенного регенеранта 15.5b.1.1.1 ( $2n = 25$ ) геномного состава LE: маркеры хромосомы 5: RH044A21 (DIG-red, короткое плечо) и хромосомы 6 – RH060H14 (BIO-green, длинное плечо) (ж), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-green-(FITS)) и *S. lycopersicum* (BIO-red-(Cy3)) (з). Идентифицирован открытый бивалент, образованный гомеологами хромосомы 6 с хиазмой в длинном плече; гомеологичные хромосомы 5 представлены унивалентами; закрытый бивалент образован гомологичными хромосомами *S. etuberosum*. Шкала – 5µm.



хромосомы 7, а также множественные перестройки в коротком плече хромосомы 9. У аллогаплоидов геномного состава АЕ не обнаружено ни одной хиазмы в коротких плечах хромосом 7 и 9, что согласуется с литературными данными.

Еще одна парацентрическая инверсия, различающая геномы А и Е, обнаружена Szinaу с соавт. (2012) в длинном плече хромосомы 10. По нашим данным, в дистальном районе длинного плеча хромосомы 10 хиазмы формируются (табл. 1). В то же время Szinaу с соавт. (2012) не исключают, что инверсия в 10L может быть локализована в субтеломерном гетерохроматине.

Результаты изучения конъюгации у андрогенных регенерантов гибридов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* также не противоречили литературным данным. Так, отсутствие хиазм в участках 5S, 6S, 7S и 9S у гибридов с геномным составом LE согласуется с данными Szinaу с соавт. (2012) о наличии в этих районах крупных парацентрических инверсий, различающих L и E геномы. К сожалению, для гибридов LE нам не удалось получить данные FISH с маркерами, специфичными к районам 11S и 12S, в которых Szinaу с соавт. (2012) также обнаружили крупные парацентрические инверсии.

Одинаковый порядок расположения молекулярно-цитогенетических маркеров на гомеологичных хромосомах L и E геномов сохраняется только в длинном плече хромосомы 10 и в дистальном районе длинного плеча хромосомы 6 (Lou *et al.*, 2010; Szinaу *et al.*, 2012). У гибридов геномного состава LE хиазмы выявлены в дистальном районе длинного плеча хромосомы 6, а для длинного плеча хромосомы 10 данные об образовании хиазм отсутствуют (табл. 1). Кроме того, мы обнаружили хиазмы в длинном плече хромосомы 4, но для этого участка еще нет литературных данных по сравнительному ВАС-FISH анализу.

Изучение конъюгации хромосом аллогаплоидов позволило получить новую информацию, дополняющую литературные данные. Согласно нашим результатам, терминальные хиазмы формируются в длинных плечах фактически всех хромосом набора, что указывает на коллинеарность соответствующих районов А и Е геномов. Ранее известные литературные данные по сравнительному ВАС-FISH картированию участков

длинных плеч гомеологичных хромосом А и Е геномов ограничены только районами 6L и 10L. Кроме того, мы обнаружили перестройку хромосомы 3, различающую А и Е геномы.

Помимо коллинеарности, спаривание гомеологичных хромосом в мейозе гибридов зависит от разных причин и прежде всего от действия генетических систем, контролирующих синапсис хромосом. Индукция гомеологичной рекомбинации может быть обусловлена мутациями генов, подобных *Ph1* мягкой пшеницы, переключающих гомологичный бивалентный синапсис на гомеологичный (Dvorak *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2006; Al-Kaff *et al.*, 2007) или допускающих негомологичный синапсис – мутации генов типа *sy10* ржи (Mikhailova *et al.*, 2006). Поскольку у амфидиплоидов геномного состава LLEE и AAEE спаривание происходит только между гомологичными хромосомами (Gavrilenko *et al.*, 2001, 2012), можно полагать, что у них также функционируют гены типа *Ph1*, хотя у представителей рода *Solanum* подобные генетические системы до настоящего времени не идентифицированы.

Полученная в данном исследовании информация важна для разработки стратегии дальнейших исследований по интрогрессивной гибридизации (рис. 1). Низкий уровень гомеологичного спаривания хромосом L и E геномов у андрогенных регенерантов комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* указывает на необходимость использования индуцированного мутагенеза, например, радиационных воздействий, для интрогрессии в геном томата генетического материала *S. etuberosum*.

Иные подходы могут быть использованы для аллогаплоидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*, имеющих более высокий уровень гомеологичного спаривания (рис. 1; табл. 1). Так, в целях интрогрессии генов *S. etuberosum* в геном картофеля посредством гомеологичной рекомбинации реализуется традиционный подход с возвратными скрещиваниями фертильных соматических гибридов; получены гибриды потомства BC<sub>2</sub>–BC<sub>3</sub> с геномным составом AAAA(E'), в том числе устойчивые к вирусам и их переносчикам (Dong *et al.*, 1999; Novy *et al.*, 2002; Gavrilenko *et al.*, 2003). Изучение процессов интрогрессии этих BC гибридов показало, что разрешающей способности GISH недоста-

точно для визуализации обменов, которые, судя по полученным в настоящей работе результатам, наиболее вероятны в терминальных участках гомеологических хромосом А и Е геномов. Поэтому для изучения процессов интрогрессии у ВС гибридов перспективно использование молекулярно-генетических методов. Сформированный в ходе данного исследования набор полиморфных хромосомоспецифических SSR, STS, CAPS-маркеров необходимо расширять, уделяя при отборе наибольшее внимание тем маркерам, которые локализованы в терминальных участках, имеющих наибольший потенциал для переноса посредством гомеологической рекомбинации.

Для использования рекомбинационного потенциала аллогамноидов с геномным составом АЕ в селекционно-генетических программах возможны и другие подходы (рис. 1). Например, перспективен поиск генотипов, формирующих нередуцированные FDR гаметы. Кроме того, возможно осуществление второго цикла соматической гибридизации культурного картофеля с протопластами, изолированными из пыльцы аллогамноидов. Методы получения протопластов из пыльцы разработаны для разных объектов (Fang *et al.*, 2006).

Обсуждая перспективы предложенного подхода, основанного на использовании соматической гибридизации и *in vitro* андрогенеза для планирования стратегии интрогрессивной гибридизации отдаленных видов растений, отметим, что методы преодоления нескрещиваемости, слияния протопластов и получения аллогамноидов хорошо разработаны для широкого круга объектов (Davey *et al.*, 2005). Однако успех интрогрессивной гибридизации во многом зависит от потенциала гомеологической рекомбинации. Поэтому информация о характере взаимодействия геномов родительских видов имеет первостепенное значение. Предложенная схема, включающая использование методов клеточной и хромосомной инженерии для получения амфидиплоидов и аллогамноидов, и последующее изучение у них спаривания гомеологических хромосом наиболее перспективны для отдаленных нескрещиваемых видов растений, для которых молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические подходы слабо разработаны и информация об изменениях струк-

турной организации гомеологических хромосом пока не доступна.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Dr. M. Iovene, Prof. J. Jiang (University Wisconsin-Madison, USA) за предоставление меченых ДНК ВАС-клонов; ассистента К. Mäkelä (МТТ) – за индукцию диплоидных регенерантов. Авторы сердечно благодарят д.б.н. И.Н. Голубовскую за ценные критические замечания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке фонда МНТЦ (проект № 3329) и двустороннего российско-германского сотрудничества (проект № 131).

## ЛИТЕРАТУРА

- Al-Kaff N., Knight E., Bertin I., Foote T., Hart N., Griffiths S., Moore G. Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling // *Annals Bot.* 2007. V. 101. P. 1–10.
- Bai Y., Lindhout P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? // *Annals Bot.* 2007. V. 100. P. 1085–1094.
- Contreras-M., Spooner D. Revision of *Solanum* section *Euberosum* // *Solanaceae IV: advances in biology and utilization* / Eds M. Nee, D. Symon, P. Jessop. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K, 1999. P. 227–245.
- Davey M., Anthony P., Power J., Lowe C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives // *Biotechnol. Adv.* 2005. V. 23. P. 131–171.
- Doganlar S., Frary A., Daunay M., Lester R., Tanksley S. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the *Solanaceae* // *Genetics*. 2002. V. 161. P. 1697–1711.
- Dong F., Novy R., Helgeson J., Jiang J. Cytological characterization of potato – *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their backcross progenies by genomic in situ hybridization // *Genome*. 1999. V. 42. No. 5. P. 987–992.
- Dvorak J., Deal K.R., Luo M.-C. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors // *Genetics*. 2006. V. 174. P. 17–27.
- Fang K., Zhang L., Lin J. A rapid, efficient method for the mass production of pollen protoplasts from *Pinus bungeana* and *Picea wilsonii* // *Flora*. 2006. V. 201. P. 74–80.
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 456–466.
- Gavrilenko T. Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato (Review) // *Genetics, Genomics and Breeding of Potato* / Ed. J. Bradeen, C. Kole. Published by 'Science Publishers'. 1st edition. USA, 2011. Chapter 9. P. 184–206.

- Gavrilenko T., Barbakar N., Pavlov A. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series // Plant Science. 1992. V. 86. P. 203–214.
- Gavrilenko T., Pendinen G., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme R. Intergenomic chromosome pairing in the allo-diploid hybrids of *Solanum etuberosum* with tomato and potato: an assessment through GISH and BAC-FISH // The 11th Gatersleben Res. Conf. «Chromosome biology, Genome Evolution and Speciation». 2012. P. 115–116.
- Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme T. Genomic *in situ* hybridisation analysis of fertile somatic hybrids of *Solanum etuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationships of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y // Euphytica. 2003. V. 131. P. 323–332.
- Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.-M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their androgenic regenerants // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 231–239.
- Griffiths S., Sharp R., Foote T.N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moor G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat // Nature. 2006. V. 439. P. 749–752.
- Hawkes J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships // Potato Genetics. UK: CAB Intern., 1994. P. 3–42.
- Helgeson J., Hunt G., Haberlach G., Austin S. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevidens*: potential for use in breeding programs // Amer. J. Potato Res. 1993. V. 70. P. 437–452.
- Iovene M., Wielgus S., Simon P., Buell C., Jiang J. Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato // Genetics. 2008. V. 180. P. 1307–1317.
- Leitch A., Schwarzacher T., Jacson D., Leitch I. *In situ* Hybridization: a practical guide. Oxford, Microscopy Handbooks. 27. BIOS Sci. Publ., 1994. 118 p.
- Lou Q., Iovene M., Spooner D., Buell C., Jiang J. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping // Chromosoma. 2010. V. 119. P. 435–442.
- McGrath J., Williams C., Haberlach G., Wielgus S., Uchytel T., Helgeson J. Introgression and stabilization of Erwinia tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* // Amer. J. Potato Res. 2002. V. 79. P. 19–24.
- Mikhailova E., Phillips D., Sosnikhina S., Lovtysus A., Jones R., Jenkins G. Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10* // Genetics. 2006. V. 174. P. 1247–1258.
- Milbourne D., Meyer R., Collins A.J., Ramsay L., Gerbhardt C., Waugh R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato // Mol. General Genet. 1998. V. 259. P. 233–245.
- Novy R., Nasruddin A., Ragsdale D., Radcliffe E. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y and green peach aphid in progeny of *Solanum etuberosum* // Amer. J. Potato Res. 2002. V. 79. P. 9–18.
- Oberhagemann P., Chatot-Balandras C., Bonnel E., Schäfer-Pregl R., Wegener D., Palomino C., Salamini F., Gebhardt C. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection // Mol. Breeding. 1999. V. 5. P. 399–415.
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization // Genome. 2008. V. 51. P. 714–720.
- Peralta I., Spooner D., Knapp S. The taxonomy of tomatoes: A revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolium* and *Lycopersicoides* // Syst. Bot. Monogr. 2008. V. 84. P. 1–186.
- Perez F., Menendez A., Dehal P., Quiros C. Genomic structural differentiation in *Solanum*: comparative mapping of the A- and E-genomes // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 1183–1193.
- Rokka V.-M., Pietilä L., Gavrilenko T., Tauriainen A., Larkka J. Utilization of haploid lines in the genetic improvement of cultivated potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) // Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells / Ed. B. Bohanec. Bield, Slovenia, 2000. P. 105–110.
- Ross H. Potato Breeding – problems and perspectives. Berlin: Paul Parey, 1986. 132 p.
- Szinay D., Wijnker E., Berg van den R., Visser R., de Jong H., Bai Y. Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH // New Phytologist. 2012. V. 195. P. 688–698.
- Tang X., de Boer J., Eck van H., Bachem C., Visser R., Jong de H. Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosomes by BAC-FISH technology // Chromosome Res. 2009. V. 17. P. 899–915.
- Tanksley S., Ganai M., Prince J., Bonierbale M. *et al.* High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes // Genetics. 1992. V. 132. P. 1141–1160.
- Valkonen J., Brigneti G., Pehu E. Resistance to *Myzus persicae* (Suls.) in wild potatoes of the series *Etuberosa* // Acta Agr. Scand. 1992a. V. 42. P. 118–127.
- Valkonen J., Brigneti G., Salazar L., Pehu E., Gibson R. Interactions of the *Solanum* subsp. of the *Etuberosa* group and nine potato-infecting viruses and viroid // Ann. Appl. Biol. 1992b. V. 20. P. 301–313.

## INTERGENOMIC CHROMOSOME PAIRING IN ALLOHAPLOID HYBRIDS OF GENUS *SOLANUM*

T.A. Gavrilenko<sup>1,2</sup>, G.I. Pendinen<sup>1</sup>, V.-M. Rokka<sup>3</sup>, O.Y. Antonova<sup>1</sup>, R. Thieme<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of Plant Industry, Saint-Petersburg, Russia,  
e-mail: tatjana9972@yandex.ru;

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;

<sup>4</sup> Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

### Summary

Intergenomic chromosome pairing was analyzed in unique allohaploid hybrids, which had been produced through a process of somatic hybridization followed by a haploidization procedure (*in vitro* androgenesis). Two hybrid combinations were studied: (1) between cultivated potato *S. tuberosum* (dihaploid,  $2n = 2x = 24$ , AA genome) and wild species *S. etuberosum* ( $2n = 2x = 24$ , EE genome), (2) between cultivated tomato *S. lycopersicum* (LL,  $2n = 2x = 24$ ) and wild species *S. etuberosum* ( $2n = 2x = 24$ , EE). Genome and chromosome composition of allohaploids were identified through FISH with chromosome specific BAC clones and GISH. Up to 7 intergenomic bivalents per cell were observed in allohaploids between *S. tuberosum* and *S. etuberosum* (AE); the chiasmata were distributed in the distal regions of long arms of each chromosome and in the short arms of chromosomes 3, 6, 11, 12. Rare bivalents (from 0 to 2) were observed in allohaploids between *S. lycopersicum* and *S. etuberosum* (LE); the chiasmata were distributed in the long arms of chromosome 4 and 6. The perspectives of proposed approach are discussed for application of somatic hybridization and chromosome engineering to study the potential of homeologous pairing and the strategy of introgression.

**Key words:** *Solanum*, potato, tomato, *Etuberosum*, interspecific hybridization, homeologous chromosome pairing, FISH, GISH.