УДК 575.222.73+575.853’316.7

СПАРИВАНИЕ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ У ОТДАЛЕННЫХ АЛЛОГАПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ РОДА *SOLANUM*

© 2014 г. **Т.А. Гавриленко[1, 2], Г.И. Пендинен[1], В.-М. Рокка[3], О.Ю. Антонова[1], Р. Тиме[4]**

[1] Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: tatjana9972@yandex.ru;
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;
[3] MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;
[4] 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 BAC-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 AE 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 A и L геномов картофеля и томата, которые отличаются по пяти перицентрическим инверсиям (Tanksley *et al*., 1992; Doganlar *et al*., 2002). Информация о гомологии геномов A–E и L–E 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 BAC-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 A, E 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 A–E и L–E 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 BAC-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, 2*n* = 2*x* = 24) Т67 и диким неклубненосным видом секции Etuberosum – *S. etuberosum* (EE, 2*n* = 2*x* =24), образец k-9141 (Gavrilenko *et al*., 2003) и 2) между культурным томатом *S. lycopersicum* (LL, 2*n* = 2*x* = 24) сорт Tamina и *S. etuberosum* (EE, 2*n* = 2*x* = 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 (2*n* = 4*x* = 48) в комбинации *S. tuberosum* с *S. etuberosum* и LLEE (2*n* = 4*x* = 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 (2*n* = 25, 12 хромосом L генома и 13 хромосом E генома) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (Gavrilenko *et al*., 2001) и (2) диплоидные (2*n* = 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 °C). Пыльники мацерировали в растворе ферментов (4 %-я целлулаза и 1 %-я пектиназа) при 37 °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 °C), снимали покровное стекло, высушивали при комнатной температуре. Препараты обрабатывали раствором пепсина в концентрации 0,1 мг/мл в течение 45 мин при 37 °C.

FISH проводили согласно общепринятым методикам (Leitch *et al*., 1994) с небольшими модификациями (Pendinen *et al*., 2008) с использованием хромосомоспецифичных BAC-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-UTP и Biotin-UTP) ДНК двух BAC-клонов. Перед нанесением на препарат смесь для гибридизации инкубировали 8 мин при 85 °C. После нанесения на препарат 20 µl денатурированной смеси стекла 5 мин инкубировали при 80 °C. Препараты помещали на ночь (16–20 ч) в термостат для гибридизации при 37 °C. После гибридизации и отмывки препаратов меченную дигоксигенином ДНК детектировали анти-DIG-родамин-конъюгатом, меченую биотином ДНК – авидин-FITC-конъюгатом. Затем препараты промывали три раза в буфере 4×SSC при 42 °C, контрастировали 4,6-диамино-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-Cy3- (Dianova) или авидин-FITC-конъюгатом (Roche Diagnostics).

При сопоставлении FISH и GISH результатов, соответствующих одной и той же клетке, определяли геномную принадлежность меченых BAC-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 аллогаплоидного 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 BAC клонов, маркирующих все хромосомы набора (табл. 1). Данные FISH мейотических хромосом показали, что гибридизационный сигнал каждого BAC-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 AE); 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 аллогаплоидов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*

Согласно результатам GISH, аллогаплоиды геномного состава AE 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 аллогаплоидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*).

Изучение спаривания индивидуальных хромосом аллогаплоидов проведено при сопоставлении изображений, полученных в BAC-FISH анализе, с изображениями тех же мейоцитов после GISH. Было показано, что у аллогаплоидов геномного состава AE 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 аллогаплоидов геномного состава AE в биваленте, образованном гомеологами хромосомы 3, гибридизационные 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	BAC-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 *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*					
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 *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*					
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 аллогаплоидов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*

Такой же подход был применен к андрогенным регенерантам гибридов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*, для которых характерен в основном унивалентный 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 BAC-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 соответствующих хромосомоспецифичных маркеров детектировали только в унивалентах (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* (A-геном), *S. etuberosum* (E-геном) и *S. lycopersicum* (L-геном) хромосомоспецифичных BAC-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 аллогаплоидов 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 A и E геномов коллинеарны. По нашим данным, у аллогаплоидов геномного состава AE хиазмы формируются в коротких плечах хромосом 6 и 12; случаев локализации хиазм в 5S и 11S не обнаружено; кроме того, у аллогаплоидов хиазмы отмечены в участках 4S и 10S (табл. 1).

Lou с соавт. (2010) сообщили о перицентрической инверсии хромосомы 6, различающей A и E геномы, и продемонстрировали коллинеарность дистальных участков обоих плеч хромосомы 6. Согласно нашим результатам, у аллогаплоидов геномного состава AE 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

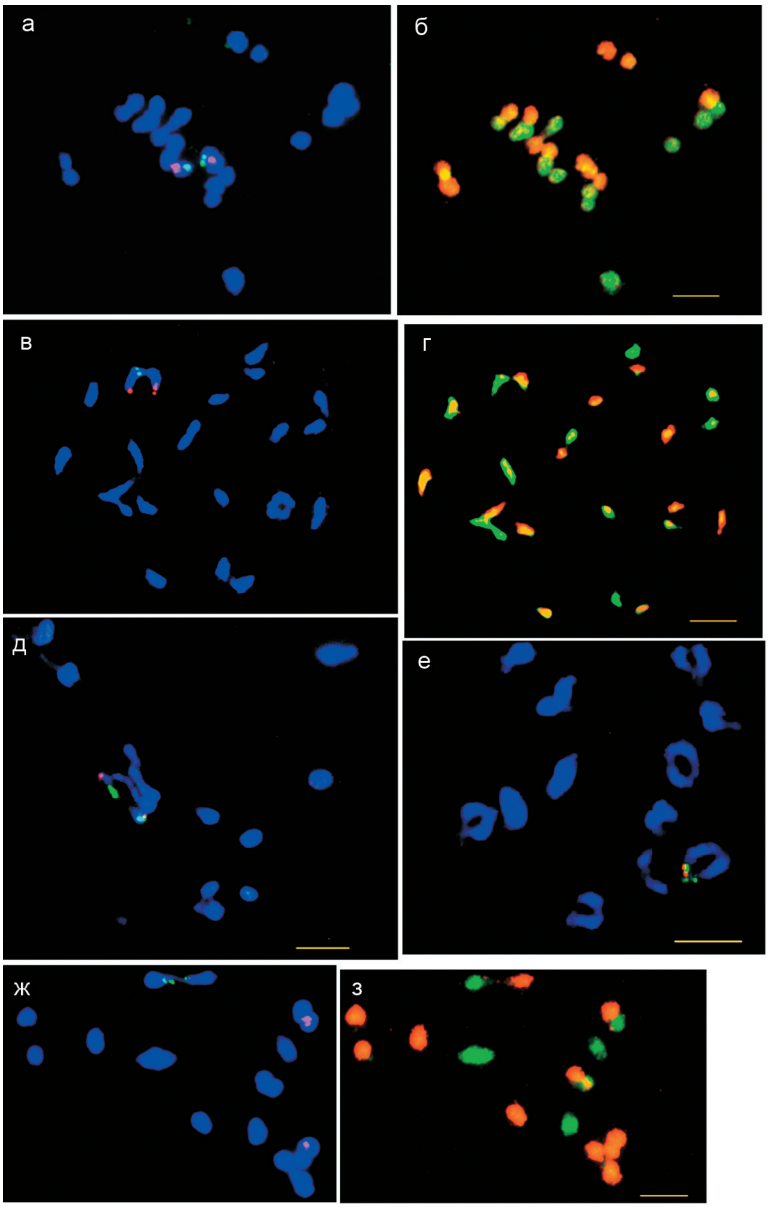

Рис. 2. FISH с хромосомоспецифичными маркерами картофеля и GISH тех же мейоцитов аллогаплоидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* (геномный состав AE (а–д)) и анеуплоидного андрогенного регенеранта (геномный состав LE) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (ж, з).

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 AE не обнаружено ни одной хиазмы в коротких плечах хромосом 7 и 9, что согласуется с литературными данными.

Еще одна парацентрическая инверсия, различающая геномы A и E, обнаружена Szinay 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 Szinay 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 Szinay 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 Szinay 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; Szinay *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 BAC-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 A и E геномов. Ранее известные литературные данные по сравнительному BAC-FISH картированию участков длинных плеч гомеологичных хромосом A и E геномов ограничены только районами 6L и 10L. Кроме того, мы обнаружили перестройку хромосомы 3, различающую A и E 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_2–BC_3 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 гомеологичных хромосом A и E геномов. Поэтому для изучения процессов интрогрессии у ВС гибридов перспективно использование молекулярно-генетических методов. Сформированный в ходе данного исследования набор полиморфных хромосомоспецифичных SSR, STS, CAPS-маркеров необходимо расширять, уделяя при отборе наибольшее внимание тем маркерам, которые локализованы в терминальных участках, имеющих наибольший потенциал для переноса посредством гомеологичной рекомбинации.

Для использования рекомбинационного потенциала аллогаплоидов с геномным составом AE 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 аллогаплоидов. 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 аллогаплоидов хорошо разработаны для широкого круга объектов (Davey *et al*., 2005). Однако успех интрогрессивной гибридизации во многом зависит от потенциала гомеологичной 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 аллогаплоидов, и последующее изучение у них спаривания гомеологичных хромосом наиболее перспективны для отдаленных нескрещиваемых видов растений, для которых молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические подходы слабо разработаны и информация об изменениях структурной организации гомеологичных хромосом пока не доступна.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Dr. M. Iovene, Prof. J. Jiang (University Wisconsin-Madison, USA) за предоставление меченых ДНК BAC-клонов; ассистента K.Mäkelä (MTT) – 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 Etuberosum // 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 Solanacea // Genetics. 2002. V. 161. P. 1697–1711.

Dong F., Novy R., Helgeson J., Jiang J. Cytological characterization of potato – *Solanum etuberosum* 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 allodiploid 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., Uchytil 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., Lovtsyus 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., Ganal 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[1, 2], G.I. Pendinen[1], V.-M. Rokka[3], O.Y.Antonova[1], R. Thieme[4]

[1] Vavilov Institute of Plant Industry, Saint-Petersburg, Russia,
e-mail: tatjana9972@yandex.ru;
[2] Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia;
[3] MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;
[4] 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.