

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 635.21:575.222.73

Поступило в редакцию 22.06.2017
Received 22.06.2017

**А. П. Ермишин¹, А. В. Левый¹, Е. В. Воронкова¹, Ю. В. Полухович¹,
В. И. Лукша¹, А. С. Агеева²**

¹*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**ДИПЛОИДНЫЕ ГИБРИДЫ МЕЖДУ ДИКИМ АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ
КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLDTL. & BOUCHET
И ДИПЛОИДНЫМИ КЛОНАМИ КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ *S. TUBEROSUM* L.,
ИМЕЮЩИЕ ГЕНОМ В ДИКОГО ВИДА**

(Представлено академиком Л. В. Хотылевой)

Аннотация. Среди гибридов между дикими тетраплоидными видами картофеля и диплоидными клонами *S. tuberosum* наряду с ожидаемыми триплоидными гибридами встречаются диплоидные гибриды. Ранее нами было показано, что у них сохраняется только один из геномов дикого вида (геном А). В сообщении впервые представлены результаты выявления диплоидных межвидовых гибридов, несущих геном В дикого вида. Среди 235 семян гибридов от скрещивания ценных для селекции образцов *S. stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* отобраны четыре гибрида, формирующих жизнеспособную пыльцу. Анализ мейоза в материнских клетках пыльцы показал наличие у них 24 хромосом. У всех диплоидных гибридов, как и у родительских клонов *S. stoloniferum* и триплоидных гибридов выявлен ДНК маркер генома В SolB. Все диплоидные гибриды наследовали характерные для дикого вида маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля RYSC 3 и Yes3-3A, а также маркеры генов устойчивости к фитофторозу R1 и R3b. Два гибрида без потерь наследовали маркеры гена устойчивости к фитофторозу Rpi-sto1, представленные у родительских клонов дикого вида. У одного диплоидного гибрида не детектировался маркер 517/1519, а у одного гибрида произошла утрата обоих маркеров (517/1519 и 1521/518). Получение гибридов с геномом В делает приоритетной версию о возможном механизме их формирования за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития изначально триплоидных межвидовых гибридов.

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum*, межвидовая гибридизация, ДНК-маркеры, гены устойчивости, PVY, фитофтороз

Для цитирования: Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum* L., имеющие геном В дикого вида / А. П. Ермишин [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 80–89.

**Alexander P. Yermishin¹, Alexander V. Levy¹, Elena V. Voronkova¹, Yulia V. Polyukhovich¹,
Victoria I. Luksha¹, Anastasiya S. Ageeva²**

¹*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

**DIPLOID HYBRIDS BETWEEN THE WILD ALLOTETRAPLOID POTATO SPECIES *SOLANUM
STOLONIFERUM* SCHLDTL & BOUCHET AND DIPLOID CLONES OF CULTIVATED POTATO
S. TUBEROSUM L. HAVING GENOME B OF WILD SPECIES**

(Communicated by Academician Lubov V. Khotyleva)

Abstract. We were the first who demonstrated the possibility to produce diploid hybrids (along with triploid ones) while pollinating some wild allotetraploid potato species with the pollen of *S. tuberosum* diploid clones. It was determined that these hybrids only retained one of the genomes of wild species (genome A). Here, we present the results of revealing diploid interspecific hybrids having genome B of wild species. There were selected four hybrids producing the viable pollen among 235 hybrids between valuable for breeding accessions of *S. stoloniferum* and fertile diploid clone of *S. tuberosum*. The analysis of meiosis in pollen mother cells showed that they had 24 chromosomes. The DNA marker SolB of genome B of wild spe-

cies was detected in diploid hybrids, as well as in parental clones of *S. stoloniferum* and triploid interspecific hybrids. The diploid hybrids inherited the typical for wild species markers RYSC 3 and Yes3-3A of Y-virus resistance genes, as well as the markers of late blight resistance genes *R1* and *R3b*. Two of the diploid hybrids inherited markers of late blight resistance gene *Rpi-sto1* presented in parental clones of the wild species lossless. The marker 517/1519 of this gene was not detected in one diploid hybrid and both markers (517/1519 and 1521/518) – in another one. Production of the hybrids with genome B makes the version on a possible mechanism of their formation through the selective elimination of one of the genomes of wild species in ontogenesis of initially triploid interspecific hybrids to be priority.

Keywords: potato, *Solanum stoloniferum*, interspecific hybridization, DNA markers, resistance genes, PVY, late blight

For citation: Yermishin A. P., Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Luksha V. I., Ageeva A. S. Diploid hybrids between the wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl & Bouchet and diploid clones of cultivated potato *S. tuberosum* L. having genome B of wild species. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 80–89 (in Russian).

Введение. Получение гибридов между отдельными видами может сопровождаться элиминацией хромосом (части или всего генома) одного из родителей. С одной стороны, это может существенно осложнить использование некоторых ценных диких видов в селекции. С другой стороны, это свойство некоторых видов может использоваться в селекции, например, для получения гаплоидов [1].

Нами [2] впервые было установлено, что в результате гибридизации между дикими тетраплоидными видами картофеля *S. acaule*, *S. stoloniferum* (в качестве материнских форм) и диплоидными клонами *S. tuberosum* наряду с ожидаемыми триплоидными гибридами с определенной частотой встречаются диплоидные гибриды. Сравнительный RAPD-анализ показал, что представленность видоспецифических локусов диких видов у диплоидных гибридов оказалась приблизительно в два раза ниже, чем у соответствующих триплоидных межвидовых гибридов, что означает, что при получении диплоидных гибридов происходила утрата половины генетического материала дикого вида [3].

Несмотря на утрату одного из геномов аллотетраплоидного родителя описанные гибриды представляют значительный интерес для селекции. Среди диплоидных гибридов на основе *S. acaule* и *S. stoloniferum* выделены генотипы с высокой устойчивостью к вирусам картофеля PVX и PVY, к фитофторозу [4]. Характерной особенностью диплоидных гибридов является высокая регулярность мейоза и достаточно высокая фертильность. Это позволяет успешно их беккроссировать диплоидами культурного картофеля, применяя как в качестве материнских форм, так и опылителей. Использование диплоидных гибридов эффективнее традиционных схем вовлечения в селекцию полиплоидных диких видов картофеля, которые предполагают получение полиплоидных форм дикого вида и/или межвидовых гибридов с их участием [5]. Получение и беккроссирование диплоидных межвидовых гибридов дает возможность проводить отбор по признакам, которые предполагают перенести в селекционный материал от дикого вида, осуществлять картирование и ДНК-маркирование интрогрессированных генов на диплоидном уровне, что позволяет существенно сократить время и трудовые затраты на эти операции.

Поскольку для диплоидных межвидовых гибридов характерна высокая регулярность мейоза и, как следствие, высокая фертильность, можно заключить, что они помимо генома А *S. tuberosum* несут гомологичный ему геном А дикого аллотетраплоидного вида. Остается неясным, возможно ли получение диплоидных гибридов, несущих геном В (А' для *S. acaule*) и, соответственно, возможна ли интрогрессия в селекционный материал всего многообразия ценных генов, имеющих у диких аллотетраплоидных видов, или только его части.

В сообщении впервые представлены результаты выявления и первичной генетической характеристики диплоидных межвидовых гибридов, несущих геном В дикого вида, в гибридной популяции, полученной в результате скрещивания ценных для селекции образцов аллотетраплоидного дикого вида картофеля *Solanum stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum*.

Материал и методы исследования. В качестве материала использовали межвидовые гибриды между образцами *S. stoloniferum* PI 205522 и PI 473534 (материнские формы) и диплоидным клоном *S. tuberosum* IGC 10/1.21, созданным в нашей лаборатории в результате специальной селекции на высокую функциональную фертильность пыльцы. Семена образцов *S. stoloniferum* по-

лучены из генбанка по картофелю США (United States Potato Genebank NRSP 6). У названных образцов дикого вида нами ранее были выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY), а также гена *Rpi-stol* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу [6]. Генетический тип цитоплазмы у образцов *S. stoloniferum* определяли по методике [7]. Было установлено, что образец *S. stoloniferum* PI 205522 имел цитоплазму типа W/γ, а PI 473534 – W/α.

С целью выделения диплоидных гибридов у межвидовых гибридов проводили оценку жизнеспособности пыльцы (с помощью окраски ацетокармином) и функциональной фертильности пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльцевых зерен за 4 ч при 25 °С на питательной среде, предложенной [8]. Для подтверждения плоидности отобранных гибридов использовали подсчет хромосом в материнских клетках пыльцы (применяли окраску хромосом по Сноу).

Использовали модифицированный для зеленых тканей картофеля протокол выделения ДНК с помощью **DNA purification Kit (Thermo Scientific, EC)**. **Оценку межвидовых гибридов и родительских форм** на наличие ДНК-маркеров генов устойчивости, а также определение типа цитоплазмы осуществляли с применением соответствующих праймеров (синтезированы ОДО «Праймтех», Минск, Беларусь), по протоколам, предложенным разработчиками праймеров (табл. 1). У всех гибридов произведена детекция маркера SolB₄₆₉, который применяется в филогенетических исследованиях для детекции генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля секции *Longipedicillata* [9]. С его помощью можно судить, какой из геномов дикого вида перенесен в диплоидные гибриды, а какой элиминирован и, соответственно, какие гены устойчивости дикого вида могут быть перенесены в диплоидные гибриды в зависимости от их геномной локализации.

Т а б л и ц а 1. **Использованные в работе ДНК-маркеры генома В и генов устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу картофеля (PVY)**

Table 1. **Used DNA markers of genome B and late blight resistance genes and potato Y-virus (PVY) resistance genes**

Ген Gene	Признак Character	Маркер Marker	Праймер (5'-3') Primer (5'-3')	Температура отжига праймеров, °С Primer annealing temperature, °С	Источник Source
	Маркер генома В	SolB ₄₆₉	F – АТААСТСТСАААТАСГАААСААА R – СТСТГТААСТГТСТТАГАТТСТГТГТ	60	[9]
<i>Ry_{adg}</i>	Устойчивость к PVY	RYSC3 ₃₂₁	F – АТАСАСТСАТСТАААТТТГАТГГ R – АГГАТАТАСГГСАТСАТТТТССГА	56	[10]
<i>Ry_{sto}</i>	Устойчивость к PVY	Yes3-3A ₃₄₁	F – ТААСТСААГСГГААТААССС R – ААТТСАСТГТТТАСАТГСТТСТТГТГ	60	[11]
<i>Rpi-stol</i>	Устойчивость к фитофторозу	517/1519 ₇₅₀	F – САТТССААСТАГСССАТСТТГГ R – ТАТТСАГАТСГАААГТАС	58	[12]
<i>Rpi-stol</i>	Устойчивость к фитофторозу	1521/518 ₇₀₄	F – ГАААГТСТАГАТТАСАСТГГ R – СААТСАААТГГСАГГААСС	58	[12]
<i>R1</i>	Устойчивость к фитофторозу	R1 ₁₄₀₀	F – САСТСГТГАСАТАТССТСАСТА R – СААСССТГГСАТГСССАСГ	55	[9]
<i>R3b</i>	Устойчивость к фитофторозу	R3b ₃₇₈	F – ГТСГАТГААТГСТАТГТТТСТСГАГА R – АССАГТТТСТТГСААТТССАГАТТГ	64	[9]

Производили детекцию названных маркеров у родительских форм: фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21, образцов *S. stoloniferum* (отдельно у клонов, которые были использованы при получении диплоидных гибридов), диплоидных и соответствующих триплоидных гибридов (в анализ было взято 7 триплоидных гибридов от клона PI 205522.2, 8 гибридов от клона PI 205522.3 и 6 гибридов от клона PI 473534.2).

Результаты и их обсуждение. *Выделение диплоидных гибридов 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum.* В 2015 г. в результате опыления 136 цветков *S. stoloniferum* PI 205522 получено 94 ягоды, из которых выделили 5000 семян. Эффективность гибридизации: 53 семени/ягоду, 37 семян/опыление. Семена в основном были мелкие, невыполненные, имели низкую всхожесть – 9,3 %. Получено 467 сеянцев, часть из которых (407 растений) была высажена в 2016 г. в поле. У 219 сеянцев гибридов *S. stoloniferum* PI 205522 × *S. tuberosum* IGC 10/1.21 были взяты пробы пыльцы, анализ которых показал, что у 216 сеянцев пыльца стерильная, что говорит о том, что они, оче-

видно, являются триплоидами. Три сеянца образовывали выполненную жизнеспособную пыльцу, однако функционально фертильной (ФФП = 15 %) она была только у одного. Подсчет хромосом в мейозе материнских клеток пыльцы удалось провести у 2 сеянцев. Гибрид, который образовывал функционально фертильную пыльцу, оказался пентаплоидом (число хромосом около 60), другой гибрид – диплоидом (24 хромосомы).

Принимая во внимание, что на цитоплазме *W/γ S. stoloniferum* PI 205522 диплоидные гибриды могли быть мужски стерильными, а также тот факт, что полученные нами ранее диплоидные гибриды предположительно имели геном А аллотетраплоидных видов, для отбора диплоидов мы детектировали маркер SolB₄₆₉ генома В у 82 гибридных сеянцев. Маркер был выявлен у 81 гибрида, что с высокой степенью вероятности указывает на их триплоидную природу (геномная формула ААВ). У одного гибрида маркер отсутствовал (геномная формула АА). Подсчет хромосом у этого гибрида показал, что он является диплоидом.

В результате опыления 33 цветков *S. stoloniferum* PI 473534 получено 16 ягод, из которых выделили 783 семени. Эффективность гибридизации: 49 семян/ягоду, 24 семени/опыление. Всхожесть семян составила 6,9 %: было получено 28 гибридных сеянцев. Анализ 16 сеянцев выявил 2 гибрида, формирующих жизнеспособную, но функционально неактивную пыльцу. Цитологический анализ подтвердил их диплоидную природу.

Таким образом, нам удалось выделить в общей сложности 4 диплоидных межвидовых гибрида (два с PI 205522 и два с PI 473534), формирующих жизнеспособную пыльцу и один мужски стерильный диплоидный гибрид (с PI 205522). Один гибрид с участием PI 205522 оказался пентаплоидом, способным образовывать функционально фертильную пыльцу.

Диплоидные межвидовые гибриды заметно отличались от соответствующих триплоидных гибридов по морфологии растений. У них сильнее были выражены признаки культурного родительского вида: более широкие семядоли листьев, более короткие столоны, они имели более крупные цветки по сравнению с диким родительским видом. Пентаплоидный гибрид по внешнему виду был близок *S. stoloniferum*. Как триплоидные, так и все выделенные диплоидные гибриды и пентаплоидный гибрид не поражались в поле фитофторозом (устойчивость 9 баллов).

Попытки вовлечь в гибридизацию отобранные диплоидные гибриды с фертильными диплоидными клонами *S. tuberosum* оказались неудачными. Также не удалось вовлечь в гибридизацию с культурным картофелем пентаплоидный гибрид ни в качестве материнской формы, ни в качестве опылителя (результаты не приводятся).

Анализ мейоза в материнских клетках пыльцы диплоидных гибридов 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum. Для большинства проанализированных клеток межвидовых гибридов, образующих жизнеспособную пыльцу, характерна относительно высокая регулярность мейоза. В метафазе I у них обнаружено 12 бивалентов, что предполагает наличие 24 хромосом в ядрах соматических клеток (рисунок, а). У одного из гибридов насчитали 30 бивалентов, что говорит о том, что он является пентаплоидом. В отдельных мейоцитах диплоидных межвидовых гибридов наблюдали следующие нарушения: в метафазе I – анафазе I **преждевременное расхождение хромосом (до четырех пар)** (рисунок, б) и отстающие хромосомы (2–3) (рисунок, в), в анафазе II униваленты (1–2) (рисунок, д), тетрады с микроклетками. У пентаплоидного гибрида мейоз проходил с многочисленными нарушениями (напоминал картину, наблюдаемую у триплоидных гибридов). В результате вместо тетрад микроспор образовывались конгломераты, содержащие до 11 микроспор и микроклеток.

Наследование ДНК маркеров генома В и генов устойчивости к PVY и фитофторозу диплоидными и триплоидными гибридами 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum

У опылителя – фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21 ДНК-маркер генома В SolB₄₆₉, а также маркеры генов устойчивости к PVY и фитофторозу отсутствовали. Маркер генома В был выявлен у всех использованных в работе клонов *S. stoloniferum*, у всех проанализированных триплоидных гибридов и пентаплоидного гибрида. Также он был обнаружен у четырех выделенных межвидовых диплоидных гибридов, формирующих жизнеспособную пыльцу. ДНК мужски стерильного диплоидного гибрида оказалась низкого качества, в связи с чем ее адекватный анализ оказался невозможным. В табл. 2 представлены результаты анализа представленности маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу у диплоидных межвидовых гибридов, несущих маркер генома В *S. stoloniferum*.

Т а б л и ц а 2. Интрогрессия ДНК-маркеров генома В и генов устойчивости к фитофторозу и PVY от *S. stoloniferum* к межвидовым гибридам на их основе (1 означает наличие маркера, 0 – его отсутствие)

Table 2. Introgression of DNA markers of genome B and genes of resistance to late blight and PVY from *S. stoloniferum* to interspecific hybrids on their base (1 – the presence of a marker, 0 – the absence)

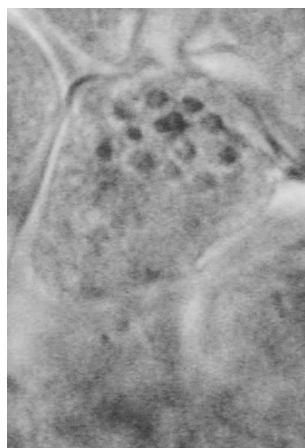
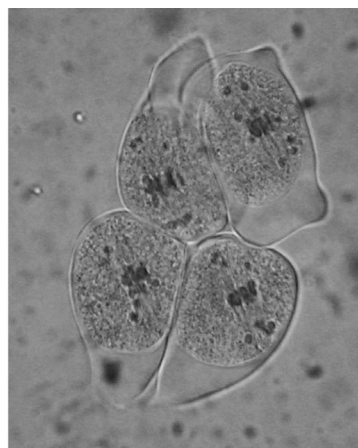
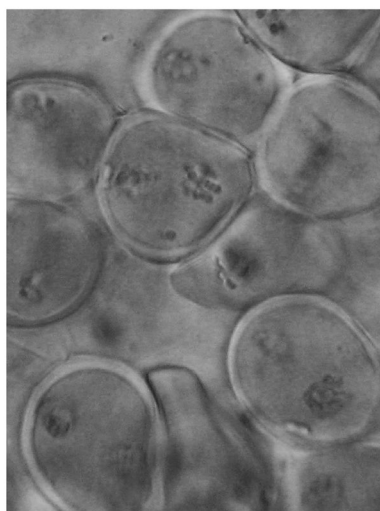
Гибриды, родительские формы Hybrids, parental forms	Маркер генома В Genome B marker SolB	Маркер гена Gene marker <i>Ryadg</i> RYSC3	Маркер гена Gene marker <i>Rysto</i> Yes 3-3A	Маркер гена Gene marker <i>Rpi-stol</i> 517/1519	Маркер гена Gene marker <i>Rpi-stol</i> 1521/518	Маркер гена Gene marker <i>Rl</i> R1	Маркер гена Gene marker <i>R3b</i> R3b
<i>S. tuberosum</i> IGC 10/1.21	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.1	1	1	1	1	1	0	1
F1 2x/1	1	1	1	0	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.2	1	1	1	1	1	0	1
F1 2x/2	1	1	1	1	1	0	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.3	1	1	1	1	1	0	1
F1 5x	1	1	1	1	1	0	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI473534.1	1	1	1	0	1	0	1
F1 2x/3	1	1	1	0	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI473534.2	1	1	1	1	1	1	1
F1 2x/4	1	1	1	0	0	1	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	1	1

Маркеры генов устойчивости к PVY дикого вида наследовали все проанализированные диплоидные и триплоидные гибриды (расщепления по этим маркерам не наблюдалось). Также названные маркеры были представлены и у пентаплоидного гибрида.

Маркеры гена *Rpi-stol* 517/1519 (в тех случаях, когда он имелся у родительского клона *S. stoloniferum*) и 1521/518 были представлены у всех триплоидных гибридов, т. е. расщепления по ним не наблюдалось. Оба эти маркера присутствовали и у пентаплоидного гибрида. У диплоидного межвидового гибрида 2x/1 (PI 205522.1 × IGC 10/1.21) не детектировался маркер 517/1519, но присутствовал маркер 1521/518, а у гибрида 2x/4 (PI473534.2 × IGC 10/1.21) произошла утрата обоих маркеров. Напротив, гибрид 2x/2 (PI 205522.2 × IGC 10/1.21) унаследовал от дикого вида оба маркера гена *Rpi-stol*, а гибрид 2x/3 (PI473534.1 × IGC 10/1.21) – маркер 1521/518 (второй маркер этого гена 517/1519 у родительского клона дикого вида не представлен).

Маркер гена *R3b* был выявлен у всех диплоидных и триплоидных гибридов, а также пентаплоидного гибрида. Маркер гена *Rl*, имеющийся у клона PI473534.2, присутствовал у всех происходящих от него триплоидных гибридов, а также у единственного диплоидного гибрида, происходящего от этого родительского клона.

Представленные результаты выделения диплоидных межвидовых гибридов среди гибридов от скрещивания ценных для селекции образцов дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* показали, что частота таких гибридов в потомстве этих образцов очень низкая. Так, в результате анализа жизнеспособности пыльцы 219 межвидовых гибридов образца *S. stoloniferum* PI 205522 выявлено только 2 диплоидных гибрида (0,9 %) (причем для одного из них необходимо проведение дополнительных исследований для подсчета числа хромосом). Несколько выше этот показатель был у PI473534: 2 диплоидных гибрида было выделено в результате анализа 28 гибридных семян (7,1 %). Судя по опубликованным данным [2; 4], *S. stoloniferum* и другие тетраплоидные виды при использовании их в скрещиваниях с диплоидными клонами *S. tuberosum* в качестве материнских форм могут образовывать диплоидные гибриды со значительно более высокой частотой (12–33 %). С одной стороны, в генетическом пуле *S. stoloniferum* могут быть образцы, которые редко образуют диплоидные гибриды: PI205522, а также, в некоторой степени, PI473534, можно рассматривать в качестве примеров таких образцов. С другой стороны, хорошо зарекомендовавший себя ранее подход, основанный на отборе фертильных семян (диплоидные гибриды, в отличие от триплоидных, способны формировать жизнеспособную пыльцу), применительно к некоторым образцам диких видов может оказаться неэффективным из-за мужской стерильности, обусловленной генетическим типом цитоплазмы. В частности, с цитоплазмой *S. stoloniferum* W/γ связывают мужскую сте-

*a**b**c**d*

Мейоциты диплоидных гибридов, несущих В генотип дикого вида *S. stoloniferum*: *a* – наличие 12 хромосом в мейоците на стадии AI; *b* – преждевременное расхождение части хромосом в AI; *c* – отставание части хромосом при их расхождении в AI (две клетки слева) и расхождение хромосом без нарушений в AI (две клетки справа); *d* – нормальное расхождение хроматид в MII, в одной из клеток (в центре) наблюдается потеря одной из хромосом

Meiosis of diploid hybrids having gene B of wild species *S. stoloniferum*: *a* – 12 chromosomes in meiosis in stage AI; *b* – premature discrepancy of some of chromosomes in AI; *c* – lag of some of the chromosomes in AI (two cells to the left) and discrepancy of chromosomes without disorders in AI (two cells to the right); *d* – normal discrepancy of chromatids in MII, in one of the cells (in the center) it is observed that one of the chromosomes is lost

рильность сортов картофеля, происходящих от этого вида [11]. Примененный в настоящем исследовании альтернативный прием выделения диплоидных гибридов, основанный на детекции маркера генома В дикого вида, достаточно трудоемкий и позволяет выделять диплоидные гибриды, сохранившие лишь один из геномов дикого вида (геном А). Поэтому необходим поиск новых простых и информативных подходов выделения диплоидных семян в больших популяциях межвидовых гибридов с участием диких аллотетраплоидных видов картофеля.

Полученные нами ранее [2] диплоидные межвидовые гибриды на основе аллотетраплоидных диких видов картофеля имели геном А дикого вида (у них отсутствовал маркер генома В; данные не приводятся), что проявлялось в относительно высокой регулярности мейоза, мужской фертильности и хорошей скрещиваемости с диплоидными клонами *S. tuberosum*. В настоящем исследовании впервые удалось выделить диплоидные межвидовые гибриды, несущие геном В *S. stoloniferum*. Вероятность того, что отобранные генотипы являются гаплоидами дикого вида, образовавшимися в результате псевдогамии, очень низкая. Они заметно отличались от дикого родительского вида и триплоидных гибридов, имея более выраженные признаки культурного родительского вида. Для них было характерно относительно регулярное спаривание хромосом в мейозе материнских клеток пыльцы и, как результат, способность формировать жизнеспособную пыльцу (у четырех из пяти диплоидных гибридов), что сложно ожидать от гаплоидов. Аллотетраплоидный вид *S. stoloniferum* имеет дисомный тип наследования признаков: в мейозе образуются биваленты между гомологичными хромосомами соответствующих геномов. По мнению J. Dvorak [13], гомеологичная конъюгация хромосом супрессируется особыми генами, которые есть у аллотетраплоидных видов и отсутствуют у диплоидных видов. Выделенные нами диплоидные межвидовые гибриды имеют геном А, полученный от диплоидного клона культурного картофеля, у которого такой ген, очевидно, отсутствует. Это позволяет объяснить высокую частоту образования у них бивалентов между гомеологичными хромосомами геномов А и В. Факт наличия относительно регулярного мейоза у диплоидных гибридов с гомеологичными геномами (геномная формула АВ) позволяет рассчитывать на успешную интрогрессию в селекционный материал многообразия ценных генов дикого вида, локализованных на геноме В. Следует, однако иметь в виду, что при беккроссировании этих гибридов культурным картофелем возможно потребуется применение специальных приемов, повышающих эффективность гибридизации, так как их балансовое число эндосперма меньше двух. Первые попытки их гибридизации с фертильными диплоидными клонами *S. tuberosum* были неудачными.

Гибридное происхождение выделенных диплоидных семян подтверждает также факт отсутствия у некоторых из них отдельных маркеров гена *Rpi-stol*, которые были представлены у соответствующих триплоидных гибридов (табл. 2). Это могло произойти только в случае утраты одного из геномов дикого вида (генома А).

Предварительные результаты изучения особенностей интрогрессии маркеров генов устойчивости к РВУ и фитофторозу от дикого вида в диплоидные межвидовые гибриды позволили получить неожиданные результаты. Гены *Ryadg*, *R1*, *R3b* интрогрессированы в сорта картофеля от имеющих А-геном видов картофеля *S. andigenum* и *S. demissum*, а *Rysto* – от *S. stoloniferum* с помощью методов, предполагающих с большей вероятностью перенос генов, локализованных на геноме А. В настоящем исследовании маркеры названных генов передавались в диплоидные гибриды с геномом В дикого вида. Очевидно, получение межвидовых гибридов позволяет расширить возможности рекомбинации генов между гомеологичными хромосомами. Данные об относительно регулярном характере мейоза в материнских клетках пыльцы диплоидных межвидовых гибридов также свидетельствуют в пользу этого предположения.

Факт, что маркеры гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* (один или оба) не выявлены у диплоидных межвидовых гибридов, имеющих маркер генома В, говорит о том, что оба генома родительского клона дикого вида имели аллельные варианты этого гена. Следовательно, ценный для селекции ген высокой долговременной устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* может передаваться диплоидным межвидовым гибридам как с геномом А, так и геномом В дикого вида.

В качестве возможных механизмов образования диплоидных гибридов между аллотетраплоидными дикими видами картофеля и диплоидными клонами *S. tuberosum* рассматриваются: (1) образование диким видом дважды редуцированных гамет ($n = x = 12$), несущих предположи-

тельно один из геномов; (2) избирательная элиминация одного из геномов дикого вида у первоначально триплоидных межвидовых гибридов на ранних этапах эмбриогенеза [2]. Цитологический механизм образования моноплоидных яйцеклеток у тетраплоидных видов не известен. Тем не менее, именно этот механизм рассматривался нами как наиболее вероятный, так как все полученные ранее диплоидные межвидовые гибриды имели геном А дикого вида и хорошо скрещивались с диплоидными клонами *S. tuberosum* (2x, 2 EBN). **Вероятность образования диплоидных гибридов, несущих геном В дикого вида, с помощью этого механизма очень низкая из-за несбалансированности эндосперма гибридных семян при таком сочетании гамет.**

Согласно теории балансового числа эндосперма [14], каждому виду картофеля предписан специфический показатель (его EBN, эффективная ploидность), значение которого определяет поведение вида при межвидовой гибридизации. Соотношение EBN женского и мужского партнера по скрещиваниям должно быть в эндосперме 2 : 1, чтобы эндосперм, а следовательно, и семя развивалось нормально. Виды картофеля объединены по группам скрещивания: 2x (1 EBN), 2x (2 EBN), 4x (2 EBN), 4x (4 EBN) и 6x (4 EBN). Аллотетраплоидные (4x, 2 EBN) дикие виды картофеля не способны образовывать семена в скрещиваниях с сортами культурного картофеля *S. tuberosum* (4x, 4 EBN) **из-за различий в их эффективной ploидности. Однако их можно скрестить с диплоидами *S. tuberosum* (2x, 2 EBN) и многими диплоидными (2 EBN) видами картофеля с образованием триплоидных гибридов.**

В соответствии с этой теорией гипотетические моноплоидные яйцеклетки, несущие геном А дикого аллотетраплоидного вида, соответствуют по EBN мужским гаметам диплоидных клонов *S. tuberosum*. Поэтому возможно получение с их участием диплоидных межвидовых гибридов, имеющих 2 EBN, которые скрещиваются с диплоидными клонами *S. tuberosum*. Напротив, семязачки с яйцеклетками, несущими геном В дикого вида, не способны давать начало жизнеспособным семенам из-за несбалансированного развития эндосперма. Тот факт, что нам удалось получить диплоидные гибриды, несущие геном В дикого вида, с одной стороны, ставит под сомнение механизм образования диплоидных межвидовых гибридов за счет формирования моноплоидных яйцеклеток дикого вида. С другой стороны, можно предположить, что диплоидные гибриды могут быть получены вопреки правилу EBN. В пользу этого говорит низкая частота образования диплоидных гибридов с геномом В дикого вида в настоящем исследовании, а также получение нами пентаплоидного гибрида. Появление этого гибрида очевидно связано с оплодотворением нередуцированной яйцеклетки *S. stoloniferum* (4x) нормальной пылью диплоидного клона *S. tuberosum*. Соотношение EBN родителей при формировании такого гибридного семени 4 : 1, что должно было бы привести к остановке развития эндосперма. Тем не менее, получен не описанный ранее межвидовой гибрид, имеющий нередуцированный геном дикого вида (AABV) и один геном А культурного картофеля, который представляет интерес для селекции. Для вовлечения этого гибрида в селекцию необходимо решить проблему его беккроссирования культурным картофелем, так как он существенно отличается от обычных пентаплоидных гибридов, которые получают в результате беккроссирования культурным картофелем полиплоидных форм дикого вида или гибридов на его основе.

Принимая во внимание приведенные рассуждения, заслуживает серьезного рассмотрения второй возможный механизм образования диплоидных межвидовых гибридов – за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития зародыша изначально триплоидных межвидовых гибридов. В литературе представлены примеры элиминации генома одного из родительских видов в процессе развития межвидовых гибридов [1]. Это явление используется в селекции для получения гаплоидов. В частности, дигаплоиды сортов картофеля получают путем их опыления специально созданными гаплопродюсерами *S. phureja*. Хотя считается, что дигаплоиды образуются преимущественно в результате псевдогамии, приведены доказательства, что они могут также формироваться благодаря элиминации генома гаплопродюсера в процессе развития гибридных зародышей [15]. Следует, однако, иметь в виду, что образование диплоидных межвидовых гибридов при опылении аллотетраплоидных видов картофеля пылью диплоидных клонов *S. tuberosum* – особый случай. В отличие от получения гаплоидов при их формировании происходит избирательная элиминация лишь одного из геномов (а не полного генома) одного из родительских видов (дикого аллотетраплоидного вида).

Заклучение. Таким образом, нами впервые выявлены диплоидные гибриды между аллотетраплоидным диким видом картофеля *S. stoloniferum* и фертильным диплоидным клоном *S. tuberosum*, которые сохранили геном В дикого вида. Несмотря на наличие у таких гибридов гомеологичных геномов (геномная формула АВ) они имели относительно регулярный мейоз в материнских клетках пыльцы. Это позволяет рассчитывать на успешную интрогрессию в селекционный материал многообразия ценных генов дикого вида, локализованных на геноме В. Из-за пониженного балансового числа эндосперма диплоидных межвидовых гибридов с геномом В, возможно, потребуется применение специальных приемов, повышающих эффективность гибридизации при их беккроссировании культурным картофелем. Получение гибридов с геномом В делает приоритетной версию о возможном механизме их формирования за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития изначально триплоидных межвидовых гибридов.

При гибридизации *S. stoloniferum* с диплоидным клоном *S. tuberosum* получен не описанный ранее пентаплоидный межвидовой гибрид. Возможный механизм его образования – оплодотворение нередуцированной яйцеклетки дикого вида ($4x$) спермием нормальной ploidy (x) *S. tuberosum*. Геномная формула гибрида ААВВА (сесквиплоид). Гибрид представляет интерес для селекции, так как он существенно отличается от обычных пентаплоидных гибридов, которые получают в результате беккроссирования культурным картофелем полиплоидных форм дикого вида или гибридов на его основе.

Благодарности. Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б16Р-103).

Aknowledgements. This research has been supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant Б16Р-103).

Список использованных источников

1. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding / K. Tonosaki [et al.] // *Breed. Sci.* – 2016. – Vol. 66, N 3. – P. 333–349. doi.org/10.1270/jsbbs.15114
2. Воронкова, Е. В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schldl. и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е. В. Воронкова, В. М. Лисовская, А. П. Ермишин // *Генетика.* – 2007. – Т. 43, № 8. – С. 882–890.
3. Ермишин, А. П. Представленность специфических RAPD-локусов родительских видов у триплоидных и диплоидных гибридов между аллотетраплоидными видами картофеля и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2014. – Т. 58, № 2. – С. 97–103.
4. Ермишин, А. П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции / А. П. Ермишин // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – № 1. – С. 23–31.
5. Гавриленко, Т. А. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты / Т. А. Гавриленко, А. П. Ермишин // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2017. – Т. 21, № 1. – С. 16–29. doi 10.18699/VJ17.220
6. Представленность ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу и к PVY у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* / В. А. Левый [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 2. – С. 46–54.
7. Hosaka, K. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections / K. Hosaka, R. Sanetomo // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 125, N 6. – P. 1237–1251. doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4
8. Pallais, N. Research on the physiology of potato sexual seed production / N. Pallais, N. Fong, D. Berrios // *Innovative methods for propagating potatoes: CIP Rep. 28th Planning Conf., CIP, Lima, 1984.* – Lima, 1984. – P. 149–168.
9. Соколова, Е. А. Молекулярные маркеры генов устойчивости и геномов-доноров устойчивости картофеля к фитофторозу: методические указания / Е. А. Соколова, О. А. Фаина, Э. Е. Хавкин. – Москва, 2013. – 25 с.
10. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes / K. Kasai [et al.] // *Genome.* – 2000. – Vol. 43, N 1. – P. 1–8. doi.org/10.1139/gen-43-1-1
11. Song, Y.-S. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Rysto*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars / Y.-S. Song, A. Schwarzfischer // *Amer. J. Potato Res.* – 2008. – Vol. 85, N 2. – P. 159–170. doi.org/10.1007/s12230-008-9012-8
12. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species: PhD-thesis / M. Wang. – Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit, 2007. – P. 43–58.
13. Dvorak, J. Evidence for genetic suppression of heterogenetic chromosome pairing in polyploid species of *Solanum*, sect. *Petota* / J. Dvorak // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1983. – Vol. 25, N 5. – P. 530–539. doi.org/10.1139/g83-080
14. Hanneman, R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding / R. E. Hanneman Jr. // *Potato Res.* – 1999. – Vol. 42, N 2. – P. 283–312. doi.org/10.1007/bf02357859
15. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes / S. A. Clulow [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – Vol. 82, N 5. – P. 545–551. doi: 10.1007/BF00226789

References

1. Tonosaki K., Osabe K., Kawanabe T., Fujimoto R. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breeding Science*, 2016, vol. 66, no. 3, pp. 333–349. doi.org/10.1270/jsbbs.15114
2. Voronkova E. V., Lisovskaja V. M., Yermishin A. P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schltld. and dihaploids of *S. tuberosum* L. *Russian Journal of Genetics*, 2007, vol. 43, no. 8, pp. 882–889. doi.org/10.1134/s102279540708008x
3. Yermishin A. P., Voronkova E. V. Representability of the RAPD-loci specific for the parental species of triploid and diploid hybrids between allotetraploid potato species and dihaploids of *Solanum tuberosum* L. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2014, vol. 58, no. 2, pp. 97–103 (in Russian).
4. Yermishin A. P. Genetic peculiarities of wild allotetraploid potato (*Solanum*) species the as object of breeding. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, no. 1, pp. 23–31 (in Russian).
5. Gavrilenko T. A., Yermishin A. P. Interspecific hybridization of potatoes: theoretical and applied aspects. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 16–29. doi.org/10.18699/vj17.220 (in Russian).
6. Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Yermishin A. P. Representativeness of DNA-markers of late blight and PVY-resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 2, pp. 46–54 (in Russian).
7. Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, vol. 125, no. 6, pp. 1237–1251. doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4
8. Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. *Innovative methods for propagating potatoes. CIP Rep. 28th Planning Conf. CIP, Lima, 1984*. Lima, 1984, pp. 149–168.
9. Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. *Molecular markers of resistance genes and genomes that are donors of resistance of potatoes to late blight*. Moscow, 2013. 25 p. (in Russian).
10. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. A., Valkonen J. P. T., Gebhardt C., Watanabe K. N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 2000, vol. 43, no. 1, pp. 1–8. doi.org/10.1139/gen-43-1-1
11. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Rysto) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*, 2008, vol. 85, no. 2, pp. 159–170. doi.org/10.1007/s12230-008-9012-8
12. Wang M. *Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing Solanum species*. PhD-thesis. Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit, 2007, pp. 43–58.
13. Dvorak J. Evidence for genetic suppression of heterogenetic chromosome pairing in polyploid species of *Solanum*, sect. *Petota*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1983, vol. 25, no. 5, pp. 530–539. doi.org/10.1139/g83-080
14. Hanneman R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research*, 1999, vol. 42, no. 2, pp. 283–312. doi.org/10.1007/bf02357859
15. Clulow S. A., Wilkinson M. J., Waugh R., Baird E., De Maine M. J., Powell W. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, vol. 82, no. 5, pp. 545–551. doi.org/10.1007/bf00226789

Информация об авторах

Ермишин Александр Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Ermishin@igc.by.

Левый Александр Васильевич – аспирант. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: A30413@mail.ru.

Воронкова Елена Васильевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Полюхович Юлия Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Лушка Виктория Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Агеева Анастасия Сергеевна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastya_ageeva95@mail.ru.

Information about the authors

Yermishin Alexander Petrovich – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Ermishin@igc.by.

Levy Alexander Vasilievich – Postgraduate student. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A30413@mail.ru.

Voronkova Elena Vasilievna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Polyukhovich Yulia Vladimirovna – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Luksha Victoria Ivanovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Ageeva Anastasiya Sergeevna – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya_ageeva95@mail.ru.