

RUSSIAN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

---

State Scientific Center of the Russian Federation  
N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry (VIR)

---

**IDENTIFIED PLANT GENEPOOL  
AND  
BREEDING**

St. Petersburg  
2005

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

---

Государственный научный центр Российской Федерации  
Всероссийский научно-исследовательский институт  
растениеводства имени Н. И. Вавилова (ГНЦ РФ ВИР)

---

**ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЙ  
ГЕНОФОНД РАСТЕНИЙ  
И  
СЕЛЕКЦИЯ**

Санкт-Петербург  
2005

53. *Topping J. F., Wei W., Lindsey K.* Functional tagging of regulatory elements in the plant genome// *Development*. 1991. V. 112. P. 1009–1019.
54. *Topping J. F., Lindsey K.* Insertional mutagenesis and promotor trapping in plants for the isolation of genes and the study of development// *Transgen. Res.* 1995. V. 4. P. 291–305.
55. *Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., Van Montagu M.* Insertion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology// *Theor. Appl. Gen.* 1991. V. 81. P. 277–284.
56. *Walden R. et al.* Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in a plant growth and development// *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 26. P. 1521–1528.
57. *Walden R. et al.* The impact of Ti-plasmid-derived gene vectors on the study of the mechanism of action of phytohormones// *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997. V. 35. P. 45–66.
58. *Ward E. & Barnes W. M.* VirD2 protein of *A. tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA// *Science*. 1988. V. 242. P. 927–930.
59. *Yanofsky M. et al.* The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors// *Nature*. 1990. V. 346. P. 35–39.
60. *Zambryski P.* Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells// *Annu. Rev. Gen.* 1988. V. 22. P. 1–30.

#### СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ СОМАТИЧЕСКОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ\*

**Т. А. Гавриленко**, д-р биол. наук

В настоящее время для создания новых форм культурных растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, растений с повышенной пищевой ценностью, наиболее активно используются методы генетической инженерии. Однако не для всех селекционно ценных признаков известен генетический контроль, не все гены клонированы, а многие ценные признаки находятся под полигенным контролем. Поэтому по-прежнему актуальными остаются исследования по отдаленной гибридизации культурных растений с дикорастущими видами, обладающими ценными признаками.

Возможности традиционных исследований по отдаленной гибридизации значительно расширились с развитием методов клеточной инженерии и возникновением нового направления – соматической гибридизации. Соматическую гибридизацию можно определить как создание новых форм растений путем комбинирования ядерных, митохондриальных и пластидных генов разных растений на основе использования методов культивирования и слияния соматических клеток – протопластов (рис. 1, а–д). Вовлечение в гибридизацию соматических клеток вместо половых позволяет преодолевать нескрещиваемость отдаленных видов и предоставляет возможности для вовлечения в селекционный процесс полностью стерильных форм растений [4, 7, 89]. В исследованиях по соматической гибридизации растений невозможно достичь той же точности переноса генов, как в работах по генетической инженерии. В то же время методы слияния протопластов предоставляют возможности для переноса между видами признаков с неизвестным генетическим контролем, переноса полигенных признаков, цитоплазматических органелл, единичных хромосом и хромосомных фрагментов. Соматическая гибридизация растений позволяет решать следующие фундаментальные и прикладные задачи генетики и селекции растений.

1. Создание новых форм культурных растений, устойчивых к болезням, вредителям и абиотическим стрессам, обладающих повышенной пищевой ценностью, на основе интрогрессии селекционно-важных генов дикорастущих видов. Методы слияния протоплас-

\* Работы Т. А. Гавриленко с соавторами выполнены при частичной поддержке фонда U.S. CRDF, грант № ST-012-0.

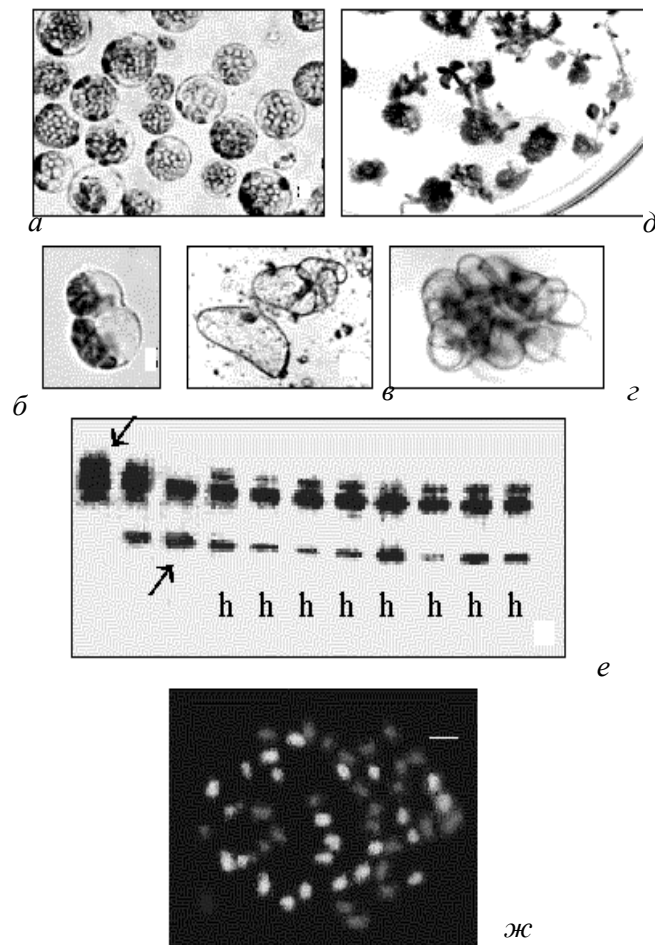


Рис. 1. Культивирование и слияние протопластов картофеля.

*a* – изолированные мезофильные протопласты картофеля, *б* – слияние протопластов разных видов рода *Solanum*, *в* – первые клеточные деления протопластов, регенерировавших клеточную стенку, *г* – клеточная колония после двух недель культивирования, *д* – регенерация побегов из протоклонов, *е* – RAPD-профили внутривидовых соматических гибридов картофеля (=h) и родительских дигаплоидных клонов, стрелки указывают специфичные фрагменты родительских форм дигаплоидов, *ж* – метафазная пластинка тетраплоидного соматического гибрида *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum*. В гибридной клетке хроматин томата выделяется по желтому сигналу флуоресценции вследствие гибридизации хромосом с геномной ДНК томата, меченной FITC (на фото – светлые хромосомы), а хроматин *S. tuberosum* окрашен пропидиум иодидом (на фото – темные хромосомы).

тов применяют на первом этапе интрогрессивной гибридизации для преодоления несовместимости культурных и дикорастущих видов. В дальнейшем используют традиционные методы отбора ценных генотипов в сериях возвратных скрещиваний соматических гибридов с растениями культурного вида.

2. Изучение генетического контроля признаков устойчивости дикорастущих видов к фитопатогенам, картирование, изоляция, клонирование соответствующих генов и последующее конструирование векторных систем, содержащих естественные собственные гены дикорастущих видов в целях генной инженерии широкого круга культурных видов растений.

3. Перенос генов пластид и митохондрий; получение аллоплазматических линий раз-

личных видов растений. Изучение взаимодействия и экспрессии ядерного, хлоропластного и митохондриального геномов.

4. Гибридизация стерильных генотипов с целью создания новых форм растений на основе комбинирования селекционно ценных признаков стерильных гаплоидов (дигаплоидов), а также для генетического анализа мутантов растений, дефектных в отношении морфогенеза или гаметогенеза.

5. Геномный анализ отдаленных нескрещиваемых видов. Соматическая гибридизация, являясь методом объединения генетического материала отдаленных видов, позволяет изучать особенности взаимодействия геномов нескрещиваемых видов растений. Данные исследования важны для изучения перспективы и механизмов интрогрессивной гибридизации, а также для выяснения филогенетических и таксономических связей видов.

Рассмотрим перечисленные выше направления исследований, подробнее останавливаясь на результатах наших работ.

#### ИНТРОГРЕССИЯ СЕЛЕКЦИОННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ С ПОМОЩЬЮ МЕЖВИДОВОЙ СОМАТИЧЕСКОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

Соматическая гибридизация позволяет преодолевать барьеры нескрещиваемости, обуславливая возможность объединения генетического материала видов, принадлежащих к разным родам, трибам, семействам, классам и даже царствам живых организмов. На этапе слияния протопластов барьеров несовместимости не существует. Таким образом получены межклассовые гибридные клеточные колонии в комбинациях слияния протопластов: рис (+) соя\* [60], ячмень (+) табак [78] и даже гибридные клетки в комбинации слияния растительных протопластов с клетками животных: табак (+) мышь [50]. Как правило, в таких отдаленных комбинациях наблюдают высокий уровень цитогенетической нестабильности: быструю элиминацию хромосом и(или) целых геномов одного из родительских видов; образование хромосомных фрагментов, кольцевых хромосом, множественных транслокаций и другие типы перестроек [4, 64]. Межклассовые и межсемейственные гибриды существуют *in vitro* на уровне клеточных колоний, неспособных к регенерации растений. Гибридные растения получены в межтрибных комбинациях: арабидопсис (+) *Brassica napus* L., *B. campestris* L. [4, 29]; *Nicotiana tabacum* L. (+) *Solanum tuberosum* L. [4]; табак (+) *Atropa belladonna* L. [30]. Однако подавляющее число межтрибных гибридов обнаруживали частичную или полную нефункциональность и были стерильными растениями. Необходимо отметить, что прикладные аспекты, присутствующие в работах по отдаленной гибридизации, в таких отдаленных комбинациях реализовать не удалось.

Практически значимые результаты получены в исследованиях по межродовой и межвидовой соматической гибридизации растений (табл. 1). Так, в селекционных программах используется потомство возвратных скрещиваний: межвидовых соматических гибридов картофеля, устойчивых к бактериальным гнилям [37, 52], фитофторозу [38], нематодам [12], вирусам, тле [28, 62] и кратковременным заморозкам [13, 14]; межвидовых соматических гибридов капусты и рапса, устойчивых к бактериальным [34, 68] и грибным болезням [76, 77]; межродовых соматических гибридов рапса и *Eruca sativa* Mill. с измененным химическим составом жирных кислот [19]; устойчивые к засолению гибриды риса и *Porteresia coarctata* L. [43] (см. табл. 1).

Цель традиционных исследований по отдаленной гибридизации – интрогрессия в геном культурных растений единичных признаков дикорастущего вида. Поэтому при половой гибридизации необходимо получение фертильных форм гибридов и несколько поколений насыщающих скрещиваний для освобождения гибридов от нежелательных признаков

\*Знак (+) обозначает соматическую гибридизацию.

Таблица 1. Примеры получения новых форм растений, обладающих селекционно ценными признаками, с использованием соматической гибридизации

Комбинация	Наследуемые признаки	Литература
<b>Brassicaceae:</b>		
<i>B. napus</i> (+) <i>Diplotaxis harra</i> , <i>Eruca sativa</i> , <i>Sinapsis alba</i> , <i>S. pubescens</i>	ЦМС, устойчивость к тле, засухе, нематодам	[44, 19, 47]
<i>B. oleracea</i> (+) <i>B. napus</i> , <i>B. oleracea</i> (+) <i>Sinapsis alba</i>	Устойчивость к различным заболеваниям	[34, 61, 68]
<i>B. napus</i> (+) <i>B. nigra</i> , <i>B. juncea</i> , <i>B. carinata</i>	Устойчивость к грибным заболеваниям	[76, 77]
<b>Solanaceae:</b>		
<i>Solanum tuberosum</i> (+) <i>S. bulbocastanum</i>	Устойчивость к нематоду и фитофторозу	[12, 38, 57, 58]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. brevidens</i>	Устойчивость к вирусным, бактериальным болезням	[37, 52]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. nigrum</i>	Устойчивость к фитофторозу	[41]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. commersonii</i>	Холодостойкость	[13, 14]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>	Устойчивость к вирусным заболеваниям и тле	[28, 62, 82]
<i>Lycopersicon esculentum</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	ЦМС	[54]
<i>Nicotiana tabacum</i> (+) <i>N. repanda</i> , <i>N. rustica</i>	Устойчивость к различным заболеваниям	[10, 63]
<b>Fabaceae:</b>		
<i>Medicago sativa</i> (+) <i>Onobrychis vicifolia</i>	Изменение содержания пенообразующих веществ, вызывающих тимпанию	[48]
<i>M. sativa</i> (+) <i>M. coerulea</i> , <i>M. intertexta</i> , <i>M. falcate</i>	Устойчивость к различным заболеваниям	[55]
<b>Poaceae:</b>		
<i>Oryza sativa</i> (+) <i>Porteresia coarctata</i>	Солеустойчивость	[43]
<i>O. sativa</i> (+) <i>O. perrieri</i> , <i>O. officinalis</i> , <i>O. eichingeri</i> , <i>O. minuta</i>	Устойчивость к различным заболеваниям	[35, 51]
<b>Rutaceae:</b>		
<i>Citrus sinensis</i> (+) <i>Fortunella</i> sp., <i>Severinia disticha</i> , <i>C. unshiu</i>	Устойчивость к различным заболеваниям, холодостойкость	[32, 40]
<i>Citrus unshiu</i> (+) <i>C. jambhiri</i> , <i>C. junos</i>		
<b>Asteraceae:</b>		
<i>Cichorium intybus</i> ( <i>Chicory</i> ) (+) <i>Helianthus annuus</i>	ЦМС	[66]

дикаря. Соматическая гибридизация позволяет существенно сократить сроки получения высоко асимметричных форм гибридов, у которых присутствует лишь небольшая часть чужеродного ядерного материала (единичные хромосомы или хромосомные фрагменты дикорастущего вида-донора) или только цитоплазмона вида-донора. Направленная элиминация генетического материала дикого вида может быть достигнута облучением протопластов дикаря непосредственно перед слиянием с интактными протопластами культурного вида [9, 18, 33, 75]. Облучение протопластов дикого вида различными дозами  $\gamma$ -, X- и ультрафиолетовых лучей приводит к фрагментации хромосом вида-донора и последующей элиминации чужеродного генетического материала в гибридных клетках. Эксперименты, в которых происходит направленная элиминация генетического материала одного

из родительских видов, называют соматической асимметричной или  $\gamma$ -гибридизацией [9, 18, 33, 75]. Так, например, в экспериментах по асимметричной соматической гибридизации ярового рапса *Brassica napus* L. с дикорастущими видами (*B. juncea* L., *B. nigra* L., *B. carinata* L.), устойчивыми к грибному заболеванию черной ножке, возбудителем которого является *Phoma lingam*, удалось получить гибриды, устойчивые к данному заболеванию. Цитологический и молекулярный анализы асимметричных гибридов выявили наличие ограниченного количества чужеродного ядерного материала в геноме рапса. В возвратных скрещиваниях асимметричных соматических гибридов комбинации *B. napus* (+) *B. nigra* с рапсом выделена устойчивая к черной ножке моносомная дополненная линия, несущая 38 хромосом рапса и одну (IV) хромосому *B. nigra* [76–77].

Наиболее значительных успехов в межвидовой соматической гибридизации достигли для представителей семейств *Solanaceae* Juss. и *Brassicaceae* Burnett (см. табл. 1) [88], однако в последние годы успешные результаты получены и для видов семейств *Fabaceae* Lindl. и *Poaceae* Barnhart., появились сообщения об успешной межвидовой соматической гибридизации древесных плодовых культур (см. табл. 1).

В нашей работе методы соматической гибридизации использованы для создания новых форм культурных растений семейства пасленовых (картофель, томат) с устойчивостью к различным фитопатогенам [3, 22, 24, 27, 28, 41, 82–84]. Из более чем 200 дикорастущих и культурных видов картофеля в половую гибридизацию с *Solanum tuberosum* L. вовлечено лишь около 10 % близкородственных видов [1]. Барьеры про- и постгамной несовместимости ограничили вовлечение в гибридизационный процесс с культурным картофелем *S. tuberosum* (А-геном) дикорастущих южноамериканских не клубненосных видов *S. etuberosum* Lindl., *S. brevidens* Phil. (серия *Etuberosa*, кластер Е-геномов), устойчивых к важнейшим вирусным заболеваниям, к их переносчикам [36, 85–87] и устойчивых к мокрым гнилям, возбудителем которых являются различные виды *Erwinia* subsp. (van Hall) Dye [36, 52, 71]. С использованием методов слияния протопластов преодолена межвидовая несовместимость и получены соматические гибриды в комбинациях: 1) картофель, *S. tuberosum* (геном А) (+) *S. etuberosum* (геном Е), 2) картофель, *S. tuberosum* (геном А) (+) *S. brevidens* (геном Е) [3].

Гибриды между картофелем и дикорастущим видом *S. etuberosum* высокоустойчивы к вирусному заражению. Так, по данным ELISA теста (Enzyme-linked immunosorbent assay), вирус Y (штамм Y<sup>N</sup>) не выявлен у межвидовых соматических гибридов после заражения растений методами механической инокуляции, через прививку и через тлю [3, 83]. Соматические гибриды, обладающие крайней устойчивостью к вирусу Y, вовлекали в возвратные скрещивания с культурным картофелем. Необходимо отметить, что высокоустойчивые к вирусному заражению фертильные формы гибридов, объединяющие А- и Е-геномы видов *S. tuberosum* и *S. etuberosum*, получили впервые [28, 83].

Как в лабораторных, так и в полевых тестах дикорастущий вид *S. etuberosum*, а также отдельные межвидовые гибриды *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum* характеризовались устойчивостью к разным видам тли – переносчикам большинства вирусов картофеля. Как показали результаты EPG (Electronic Penetration Graph) анализа, высокая смертность популяций тли, поддерживаемых на растениях устойчивых генотипов, связана с особенностями пищевого поведения насекомых [84, 85]. Эти данные указывают на наличие в листьях дикорастущего вида *S. etuberosum* специфичных вторичных метаболитов, оказывающих сильное физиологическое воздействие на насекомых. Известно, что у многих видов картофеля устойчивость к насекомым, нематоде, бактериям и грибам связана с высоким содержанием и(или) с измененным составом стероидных гликоалкалоидов [6]. Также известны антивирусные свойства стероидных гликозидов [15]. В то же время повышенное содержание и(или) качественные изменения состава алкалоидов

могут быть токсичными для человека [6]. В целях изучения характера взаимодействия растений и насекомых (тли), для выяснения возможностей получения устойчивых форм растений с безопасным содержанием гликоалкалоидов, у межвидовых гибридов и у их потомства определены состав и относительное содержание различных агликонов [46]. С помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии показано, что дигиплоиды культурного картофеля обладали соланидином, в то время как дикорастущие виды кластера Е-геномов (*S. brevidens* и *S. etuberosum*) характеризовались наличием томатидина. У межвидовых соматических гибридов выявлены алкалоиды обоих родительских видов, хотя содержание соланидина оказалось значительно ниже количества агликонов дикорастущего типа. Кроме томатидина у гибридов появлялся новый тип алкалоидов – демиссидин, отсутствующий у родительских видов [46]. В то же время в потомстве соматических гибридов наблюдали значительное повышение содержания агликона культурного картофеля (по сравнению с соматическими гибридами количество соланидина возрастало в 2–3 раза) наряду со снижением алкалоидов дикорастущих видов. Эти изменения в гибридном потомстве объясняются увеличением доли А-генома культурного картофеля и снижением доли генома Е дикорастущих видов. Сопоставление полученных данных с результатами тестирования гибридов на устойчивость к патогенам показало отсутствие корреляции между уровнем устойчивости и повышенным количеством либо измененным составом агликонов гликоалкалоидов [46]. По-видимому, изменения содержания тех или иных алкалоидов не являются основным фактором, определяющим устойчивость данных гибридов к патогенам.

В комбинации *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* выявили высокую вариабельность гибридных генотипов по уровню устойчивости к мокрой гнили клубней – бактериальному заболеванию, возбудителем которого является *Erwinia carotovora* subsp. [27, 71]. Оценка устойчивости растений к *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, проведенная в лабораторных тестах, выявила в потомстве соматических гибридов единичные генотипы с высоким уровнем устойчивости к этому патогену [71].

Следующая серия наших экспериментов была направлена на преодоление межвидовой несовместимости и получение соматических гибридов культурного картофеля *S. tuberosum* (геном А) и дикорастущих диплоидных мексиканских видов *S. pinnatisectum* Dun., *S. tarnii* Hawkes et Hjerting, *S. bulbocastanum* Dun. (серии *Pinnatisecta* и *Bulbocastana*, кластер В-геномов), обладающих высоким уровнем полевой устойчивости к фитофторозу [3, 82, 84]. Гибридная природа регенерантов, полученных в экспериментах по слиянию протопластов, подтверждена изоферментным и RAPD-анализами; в молекулярных спектрах гибридов выявлены видоспецифичные компоненты обоих родительских видов [82]. Синтезированные формы межвидовых гибридов в подавляющем большинстве случаев оказались вполне стабильными и функциональными растениями. Анализ гибридных растений на устойчивость к фитофторозу проводили с использованием искусственного заражения отдельных листьев суспензией сложной вирулентной расы фитофторы. Степень поражения оценивали по стандартной методике в трех повторностях по 9-балльной шкале: 1 – восприимчивые растения, пораженная площадь занимает всю поверхность листа, спороношение очень обильное, 9 – отсутствие симптомов болезни, устойчивость очень высокая. Выявлено около 10 % высокоустойчивых и 15 % среднеустойчивых гибридов. Разнообразие использованных в лабораторных тестах рас *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (10 генов вирулентности) позволяет предполагать неспецифическую устойчивость гибридных растений. В то же время большинство гибридов (75%) характеризовалось промежуточным уровнем устойчивости (балл 4–5). Принимая во внимание высокую поражаемость фитофторой родительских форм дигиплоидов *S. tuberosum* (балл 2–3), можно сказать, что дикорастущие мексиканские виды в той



или иной степени передают свою устойчивость (балл 9) большинству соматических гибридов. Изменчивость гибридных растений по уровню плоидности и числу хромосом может объяснять различия в их уровне устойчивости [82]. Три высокоустойчивых соматических гибрида успешно беккроссированы культурным картофелем; их потомство можно использовать в селекционных и генетических программах, направленных на расширение генетического разнообразия картофеля и создание новых сортов с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу.

#### КАРТИРОВАНИЕ, ИЗОЛЯЦИЯ, КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ

Фитофтороз (возбудитель *Ph. infestans*), завезенный в Европу из Мексики, является наиболее серьезным заболеванием картофеля. Дикорастущий мексиканский вид *S. bulbocastanum*, обладающий высоким уровнем нерасоспецифической устойчивости к фитофторозу, часто вовлекают в соматическую гибридизацию. В экспериментах по соматической гибридизации, проведенных группой профессора Дж. Хелгесона (США), сконструированы фертильные соматические гибриды культурного картофеля и *S. bulbocastanum* [38]. При испытании в Мексике данные гибриды были высокоустойчивы к разным популяциям и расам *Ph. infestans* [38, 58]. С целью изучения генетического контроля устойчивости к фитофторозу дикорастущего вида *S. bulbocastanum*, а также последующего картирования и выделения генов, контролирующей устойчивость к *Ph. infestans*, получено потомство от возвратных скрещиваний межвидовых соматических гибридов. Расщепление 1 : 1 (устойчивые : восприимчивые) в популяциях BC<sub>1</sub> указывает, что полевая устойчивость к фитофторозу у *S. bulbocastanum* либо находится под моногенным контролем, либо контролируется кластером тесно сцепленных генов. Косегрегационный анализ устойчивости популяций BC<sub>1</sub> и BC<sub>2</sub> с использованием хромосомоспецифичных полиморфных ПДРФ-маркеров позволил локализовать в длинном плече 8 хромосомы *S. bulbocastanum* кластер тесно сцепленных генов, контролирующей нерасоспецифическую устойчивость к *Ph. infestans* [58]. На следующем этапе была сконструирована геномная библиотека *S. bulbocastanum* и с использованием фланкирующих ПДРФ-маркеров выделено семейство ВАС-клонов, содержащих геномные сегменты *S. bulbocastanum* с фрагментами данного кластера генов [59]. Профессор Дж. Хелгесон с сотрудниками провели работы по физическому картированию района, содержащего доминантные гены устойчивости к фитофторозу, анализ структуры и изоляцию данного кластера генов. Показано, что данный RB кластер содержит 4 гена. Проведено конструирование векторных систем, содержащих собственные гены дикорастущего вида *S. bulbocastanum*, для трансгенеза широкого круга культурных видов, поражаемых фитофторой [39,79].

#### ПЕРЕНОС ГЕНОВ ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ, ПОЛУЧЕНИЕ АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

При половой гибридизации у подавляющего большинства покрытосеменных растений маркеры митохондрий и пластид наследуются однопородительски – по материнскому типу. В исследованиях по соматической гибридизации возможно получение цитоплазматических гетерозигот для всех видов растений, поскольку после слияния протопластов образуются гетероплазматические клетки. Возможность переноса цитоплазматических генов от одних видов растений к другим впервые показана Ю. Ю. Глеба с сотрудниками [4, 5], которые продемонстрировали передачу цитоплазматических маркеров органелл соматическим гибридам растений от обоих родительских видов. Состояние цитоплазматической гетерозиготности может быть стабильным, передаваясь от соматических гибридов их половому потомству, и нестабильным [4, 45]. В последнем случае в результа-

те рассортировки органелл в процессе митотических делений клеток происходит выщепление того или иного типа органелл, что может привести к однородительскому наследованию цитоплазматических маркеров или к уникальному сочетанию хлоропластных и митохондриальных генов родительских видов [4, 7, 45]. Состояние цитоплазматической гетерозиготности обуславливает возможность рекомбинации цитоплазматических генов. Митохондриальный геном соматических гибридов характеризуется выраженной нестабильностью; рекомбинация и перестройки митохондриальной ДНК часто наблюдались как в близкородственных, так и в отдаленных гибридных комбинациях [11]. В противоположность митохондриальному геному случаи рекомбинации пластидной ДНК чрезвычайно редки [53]. Таким образом, в результате слияния протопластов возможно получить генетически разнообразные гибридные формы: растения, гетерозиготные по внеядерным генам; растения, содержащие ядро одного из родителей наряду с цитоплазмой обоих (или другого) родителей; гибриды с пластомом одного родителя и митохондрионом другого; растения с рекомбинантными комбинациями внеядерных генов [4, 45, 65]. Такое генетическое разнообразие соматических гибридов из одной и той же комбинации является удобной моделью для изучения ядерно-цитоплазматических взаимодействий.

В исследованиях по асимметричной соматической гибридизации растений было показано, что высокие дозы  $\gamma$ -облучения (порядка 1000 Грей) протопластов растений приводят к полной деградации ядерного материала, но не затрагивают цитоплазм. В экспериментах по слиянию облученных такими дозами протопластов дикаря с интактными протопластами культурного вида возможно получение гибридов, несущих ядро культурного вида и гибридную цитоплазму, или растений с ядром культурного вида и органеллами дикорастущего вида – гибридов [31, 88, 90]. Таким образом, цитоплазматические гены можно перенести от дикорастущих видов к культурным растениям за один этап слияния протопластов. В практическом плане данный подход использовали для передачи локусов, контролирующей цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС), которые, как известно, локализованы в митохондриальной ДНК, а у некоторых видов – в митохондриальных плаزمиде. Так, в экспериментах по асимметричной соматической гибридизации признак ЦМС перенесен от дикорастущих видов к табаку [90], петунии [42], рапсу [44], рису [8] и другим видам культурных растений (см. табл. 1). В этих работах продемонстрирована возможность существенного ускорения селекционного процесса, поскольку для создания аллоплазматических линий потребовалось получение только одного поколения – растений-регенерантов. С использованием традиционных методов сначала получают половые гибриды между реципиентом и донором цитоплазмы, затем необходимо проведение многих поколений возвратных скрещиваний для замещения всех хромосом донора цитоплазмы и создания ЦМС-линий. В настоящее время ЦМС-линии, полученные методом асимметричной соматической гибридизации, используют в селекционных программах по получению гетерозисных гибридов риса и рапса.

#### ВНУТРИВИДОВАЯ СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ

Идея внутривидовой соматической гибридизации, основанная на комбинировании методов клеточной инженерии и традиционных методов селекции, принадлежит профессору Г. Венцелю, который разработал новое направление в селекционно-генетических исследованиях картофеля [89] (рис. 2). Высокий уровень гетерозиготности и тетраплоидная природа существенно осложняют селекционные и генетические исследования культурного картофеля – *S. tuberosum* ( $2n = 4x = 48$ ). Более контролируемую селекцию возможно провести на диплоидном уровне с дигиплоидными клонами картофеля, имеющими более высокий уровень гомозиготности. Традиционно дигиплоиды ( $2n = 2x = 24$ ) получают путем опыления тетраплоидных форм картофеля пыльцой дикорастущего вида *S. phureja*

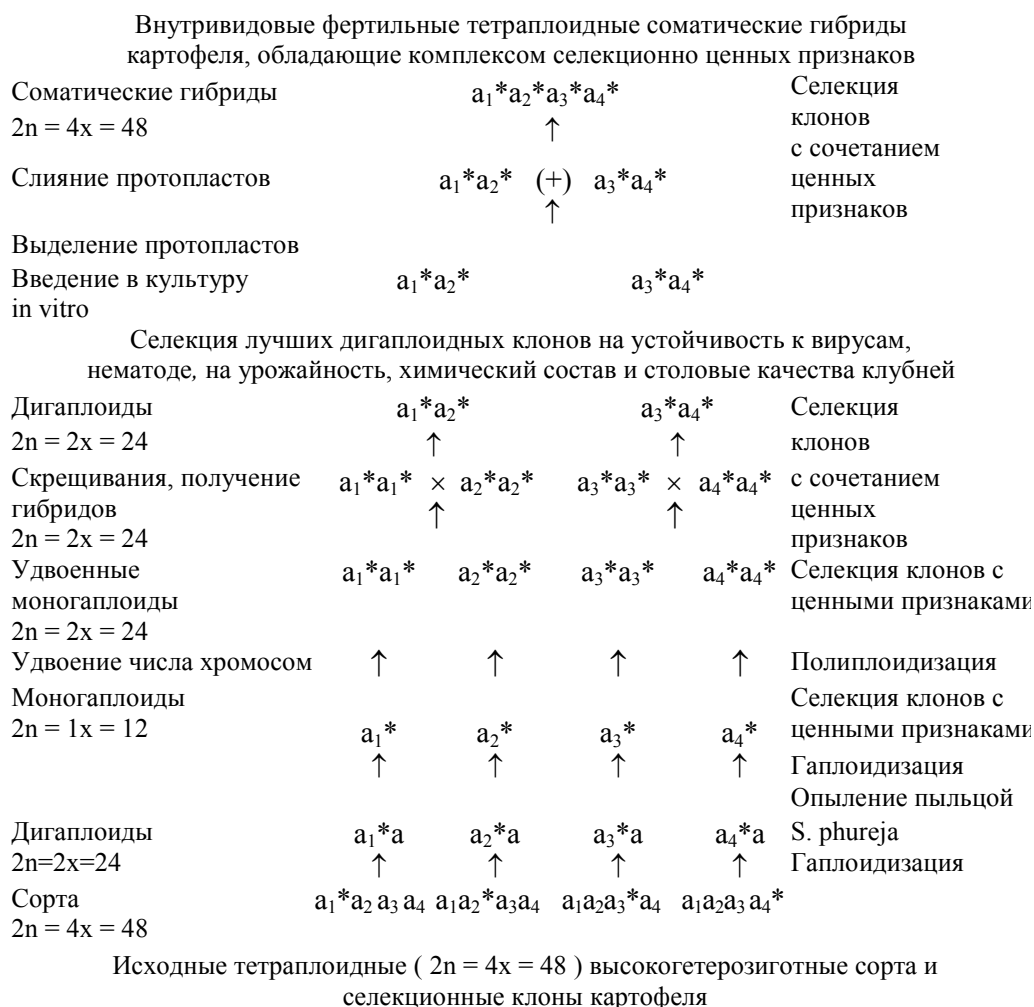


Рис. 2. Аналитическая схема селекционно-генетических исследований картофеля на ди- и тетраплоидном уровнях, включающая традиционные подходы и методы культуры клеток in vitro [по: 89].

Примечание. а – гаплоидный геном картофеля ( $n = x = 12$ ).

\* Генетические факторы, контролирующие различные (1–4) селекционно ценные признаки.

Juz. et Buk., стимулирующей галопартеногенез у картофеля. В последние годы появились сообщения о регенерации диплоидных андрогенных дигаплоидов, полученных через культуру in vitro изолированных пыльников тетраплоидных сортов картофеля [70]. Подавляющее число дигаплоидов картофеля характеризуются мужской стерильностью, которую связывают с нарушениями мейоза и(или) с нарушениями развития генеративных органов. Поэтому первоначально предполагаемый путь использования дигаплоидов – скрещивание их между собой в целях комбинирования селекционно ценных признаков либо проведения генетического анализа – оказался практически неосуществим. Методы слияния протопластов позволяют вовлекать в гибридизацию стерильные дигаплоидные клоны, переходить с диплоидного уровня на тетраплоидный, минуя мейотическую сегрегацию, и комбинировать ценные признаки дигаплоидов (см. рис. 2).

В результате нашей работы с немецкими коллегами [23] в качестве исходных родительских форм для внутривидовой гибридизации отобрано 10 стерильных дигаплоидных клонов картофеля (Т14, Т17, Т18, Т23, Т67, Т75, Т76, Т83, Т89, Т95), обладающих различными селекционно ценными признаками: устойчивостью к вирусам, нематоде, высокой урожайностью и ценным химическим составом клубней. В восьми комбинациях слияния протопластов получено около 350 гибридных регенерантов, идентификацию которых проводили с использованием изоферментного и RAPD-анализов (см. рис. 1, е) [23]. Среди внутривидовых соматических гибридов большинство составляли тетраплоиды (эуплоидные формы  $2n = 4x = 48$ ); кроме того, практически во всех комбинациях выявлены полиплоиды, миксо- и анеуплоиды, возникшие, вероятно, в результате множественных слияний протопластов и(или) соматической изменчивости.

В течение трех лет (1995–1998 гг.) в полевых условиях проводили оценку 22 морфологических и агрономических признаков гибридов. Установлено, что геномные изменения гибридов (поли- и миксоплоидия) привели к изменению большинства морфологических признаков и депрессии всех изученных нами агрономических характеристик [23]. Напротив, эуплоидные тетраплоидные формы ( $2n = 4x = 48$ ) внутривидовых соматических гибридов имели максимальные значения продуктивности. Гетерозис по продуктивности (средняя масса клубней на куст) отмечен во всех комбинациях; превышение значений продуктивности у гибридов над соответствующими показателями родительских форм дигаплоидов в зависимости от комбинации варьировало от 53 до 144 % (табл. 2).

Внутривидовые соматические гибриды ( $2n=4x=48$ ), полученные в результате слияния протопластов стерильных дигаплоидных клонов, завязывали ягоды с семенами (см. табл. 2) [3, 23]. Восстановление фертильности у междигаплоидных  $4x$  соматических гибридов, очевидно, связано с повышением уровня гетерозиготности и представляет интерес для их дальнейшего использования в селекционных программах. На основе методов слияния протопластов получены внутривидовые гибриды картофеля со следующими комбинациями ценных признаков родительских форм дигаплоидов: устойчивостью к различным вирусам [80]; устойчивостью к нематоде и высокой урожайностью [16, 67]; повышенным содержанием крахмала и высокой урожайностью [49, 56]. В настоящее время данную технологию используют в работе селекционные фирмы Германии и Финляндии.

Второй пример касается применения внутривидовой соматической гибридизации в качестве метода генетического анализа растений, дефектных в отношении морфогенеза или гаметогенеза. В таких случаях перевод мутаций в гетерозиготное состояние возможен только через слияние протопластов. Так, был проведен анализ аллельных отношений среди стерильных ауксотрофных мутантов табака [74].

#### ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

С развитием клеточной инженерии возникли новые возможности геномного анализа растений. Вовлечение в гибридизацию соматических клеток вместо половых позволило объединять геномы нескрещиваемых видов растений и исследовать характер их взаимодействия. В наших исследованиях синтезированные на основе методов слияния протопластов новые формы гибридов послужили основой для проведения геномного анализа видов трибы *Solaneae*, родов *Solanum* и *Lycopersicon*, изучения механизмов интрогрессии и выяснения филогенетических взаимосвязей видов. Из-за барьеров нескрещиваемости сведения о характере взаимодействия геномов культурного картофеля и томата с дикорастущими видами рода *Solanum* очень ограничены. Противоречивы концепции о механизмах видообразования и филогенетических связях видов родов *Solanum* и *Lycopersicon*.

Таблица 2. Оценка урожая (масса клубней, г на 1 растение) и фертильности исходных родительских форм дигаллоидов и внутривидовых тетраплоидных соматических гибридов картофеля ( $2n = 4x = 48$ ) [по: 23]

Комбинация	Урожай родительских форм дигаллоидов	MPV*	Урожай гибридов (min – max)	Фертильность гибридов	
				Жизнеспособность пыльцы, %	возвратные** скрещивания ягоды / семена (min – max)
T 14 (+) T 17 N (***)	895 472	684	1030 (525–1303) 8 (6)	49,4 (34,0–75,2)	1–3 / 21–84
T 18 (+) T 23 N	532 395	464	1073 (630–1485) 5 (4)	39,0 (12,4–77,3)	2–8 / 20–31
T 17 (+) T 23 N	472 395	550	645 (525–725) 4 (0)	–	–
T 75 (+) T 89 N	481 623	552	958 (833–1143) 3 (1)	–	–
T 75 (+) T 83 N	481 347	414	698 (207–946) 13 (0)	–	–
T 75 (+) T 95 N	481 435	458	1206 (546–1360) 5 (4)	–	–
T 75 (+) T 67 N	481 331	406	748 (269–1007) 12 (0)	–	–

\*MPV – средний показатель урожайности (г/растение) исходных родительских форм дигаллоидов.

\*\*Ягоды / семена – среднее число завязавшихся ягод на растение / среднее число семян на ягоду, в возвратных скрещиваниях внутривидовых соматических гибридов с картофелем.

\*\*\*N – число проанализированных гибридов (каждый гибрид представлен 10 растениями); в строчке в скобках указано число генотипов с урожаем выше, чем у стандартного сорта Адretta (1077 г/куст, 1995–1997 гг.). Родительские клоны дигаллоидов представлены стерильными растениями с различными нарушениями формирования цветка или нарушениями гаметогенеза.

Существующие таксономические системы также противоречивы и различаются трактовкой родов, подродов, секций и серий [2, 17, 36, 69, 80].

Развитие исследований по геномному анализу и хромосомной инженерии видов семейства пасленовых также ограничено слабой разработкой и значительными методическими трудностями цитологического анализа. Эти ограничения обусловлены небольшим размером хромосом и низким уровнем кариотипической дифференциации видов. Современные методы молекулярной цитогенетики дают возможность решить эту проблему. Использованный нами метод геномной *in situ* гибридизации хромосом (GISH) [73] позволил однозначно идентифицировать хромосомы родительских видов в ядре межродовых соматических гибридов томата (см. рис. 1, ж) [25], а также в различных комбина-

циях межвидовых соматических гибридов картофеля [26, 28, 41]. Так, геномный анализ межродовых соматических гибридов томата *Lycopersicon esculentum* Mill. ( $2n = 2x$ , геном LL) и дикорастущего не клубненосного вида *S. etuberosum* ( $2n = 2x$ , геном EE) проведен с использованием геномной *in situ* гибридизации хромосом [25]. GISH анализ мейоза соматических гибридов томат (+) *S. etuberosum* (геном LLEE) показал, что у межродовых гибридов конъюгация хромосом происходит по типу автосиндеза. В метафазе I гибридов конъюгируют в основном гомологичные хромосомы, частота межгеномных ассоциаций хромосом достигает лишь 0,05 на мейоцит, что указывает на низкую степень гомологии хромосом L-генома томата и хромосом E-генома *S. etuberosum* [25].

В следующей серии экспериментов проведен анализ геномного состава соматических гибридов между дигаплоидами культурного картофеля *S. tuberosum* (AA-геном) и дикорастущими диплоидными видами кластера E-геномов (*S. etuberosum*, *S. brevidens*,  $2n = 2x$ , геном EE) [26, 28]. Большинство гибридов обладали теоретически ожидаемым геномным составом и числом хромосом [26, 28]. У межвидовых соматических гибридов картофеля выявлена преимущественная элиминация соматических хромосом E-генома дикорастущих видов *S. etuberosum* и *S. brevidens*. Так, у анеуплоидных форм гибридов отмечена потеря от одной до шести хромосом E-генома дикорастущих видов [26, 28]. Различия в уровне пloidности, числе хромосом и геномном составе растений-регенерантов из культуры протопластов объясняют широкое разнообразие соматических гибридов, полученных в одной и той же комбинации, по морфологическим, агрономическим и биохимическим характеристикам, а также уровню устойчивости к патогенам.

В возвратных скрещиваниях картофеля ( $2n = 4x$ , геном AAAA) с соматическими гибридами *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* получено половое потомство. GISH анализ  $BC_1$  и  $BC_2$  гибридов не выявил генотипов с рекомбинантными хромосомами. Полученные результаты указывают на возможность отбора дополненных и(или) замещенных линий в потомстве  $BC_3$ – $BC_4$  гибридов [28]. Можно полагать, что вероятным механизмом интрогрессии генетического материала дикорастущих видов кластера E-геномов рода *Solanum* в геном культурного томата и в геном культурного картофеля может быть синтез замещенных и(или) дополненных линий либо индуцирование соматических транслокаций [3].

Спонтанная видоспецифичная элиминация хромосом одного из родительских видов (томата) отмечена в межродовых комбинациях томат (+)  $4x$  картофель *S. tuberosum*, благодаря чему уже во втором поколении возвратных скрещиваний межродовых соматических гибридов с культурным картофелем удалось отобрать моносомные и дисомные дополненные линии, несущие единичные хромосомы томата в генетическом бекграунде культурного картофеля [20, 21].

Выше рассмотрены примеры геномного анализа экспериментальных аллополиплоидов, полученных методами слияния протопластов разных видов растений. Необходимо остановиться и на примерах изучения природных аллополиплоидных видов. Так, например, с помощью слияния протопластов ресинтезированы природные аллополиплоиды рода *Brassica*: а) *B. juncea* L. – сарептская горчица, геном АВ (*B. campestris* L. – китайская капуста, А-геном (+) *B. nigra* L. – горчица черная, В-геном); б) *B. napus* L. – рапс, геном АС (*B. campestris* L. – китайская капуста, А-геном (+) *B. oleracea* L. – капуста кочанная, С-геном) [72]; в) *B. carinata* L. – абиссинская горчица, геном ВС (*B. nigra* L. – горчица черная, В-геном (+) *B. oleracea* L. – капуста кочанная, С-геном) [31, 88]. Ресинтез этих видов был осуществлен ранее и на основе половой гибридизации, однако преимуществом гибридизации соматической явилось создание неизвестных в природе новых комбинаций ядерных и цитоплазматических генов, что привело к созданию нового исходного материала в селекции рапса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Только за последние два десятилетия в результате развития соматической гибридизации растений получен новый ценный материал, являющийся основой для работ как фундаментальных, так и прикладных. С использованием методов слияния протопластов получены:

1. Серии моносомных дополненных линий различных видов пасленовых, используемые для картирования ряда признаков и изучения генетического контроля конъюгации гомеологичных хромосом.
2. Гибридные линии с межвидовыми транслокациями.
3. Аллоплазматические линии различных видов, в том числе и линии с ЦМС.
4. Новые экспериментальные данные, способствующие более глубокому пониманию процессов видообразования.
5. В селекционные программы внедрен метод беккроссов межвидовых соматических гибридов с устойчивостью к различным патогенам и абиотическим стрессам.
6. Создана и используется на практике технология внутривидовой соматической гибридизации дигаплоидов картофеля.

В ВИРе в условиях *in vitro* сохраняется коллекция межродовых, межвидовых и внутривидовых соматических гибридов пасленовых (50 генотипов).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Будин К. З., Гавриленко Т. А. Генетические основы отдаленной гибридизации картофеля// Генетика. 1994. Т. 30. С. 1413–1422.
2. Букасов С. М. Систематика видов картофеля секции *Tuberosum* (Dun.) рода *Solanum* L.// Труды по прикл. бот., ген. и сел. 1971. Т. 46. С. 3–44.
3. Гавриленко Т. А. Межродовая, межвидовая, внутривидовая гибридизация пасленовых: Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук. СПб., 2000. 40 с.
4. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. Киев, 1984. 160 с.
5. Глеба Ю. Ю., Пивень Н. М., Комарницкий И. К., Сытник К. М. Парасексуальные цитоплазматические гибриды *N. tabacum* (+) *N. debneyi*, полученные слиянием протопластов// Докл. АН СССР. 1978. Т. 240. С. 1223–1226.
6. Оверчук В. И., Мицко В. Н. Гликоалкалоиды картофеля. М.: ВНИИТЭИСХ, 1975. 39 с.
7. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев, 1985. 132 с.
8. Akagi H. Hybridization in *Oryza sativa* L.// Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2001. P. 17–34.
9. Bates G., Nea L., Hasenkampf C. Elektrofusion and plant somatic hybridization// Cell Fusion. Sowers A. (ed.). New York: Plenum Press, 1987. P. 479–496.
10. Bates G. Asymmetric hybridization between *N. tabacum* and *N. repanda* by donor recipient protoplast fusion: transfer of TMV resistance// Theor. Appl. Gen. 1990. V. 80. P. 481–487.
11. Bonnema A., O'Connell M. Molecular analysis of the nuclear organellar genotype of somatic hybrid plants between tomato *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon chilense*// Plant Cell Reports. 1992. V. 10. P. 629–632.
12. Brown C., Yang C.-P., Mojtahedi H., Santo G., Masuelli R. RFLP-analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC<sub>2</sub> population// Theor. Appl. Gen. 1996. V. 92. P. 572–576.
13. Cardi T., D'Ambrosio F., Consoli D., Puite K., Ramulu K. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants// Ibid. 1993. V. 87. P. 193–200.
14. Chen Y.-K. H., Palta J., Bamberg J., Kim H., Geraldin T., Haberlach G., Helgeson J. P. Expression of non-acclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity in somatic hybrids between hardy wild *Solanum* species and cultivated potato// Euphytica. 1999. V. 107. P. 1–8.
15. Choban I., Dimoylo I., Bersuker I., Balashova I., Kintya P. Structure-activity correlations for antiviral properties of steroidal glycosides// 3rd Intern. Conf. on Chem. and Biotechnol. of Biol. active natural

- products. Bulgaria, 1985. V. 5. P. 431–435.
16. Cooper-Bland S., De Maine M., Fleming M., Phillips M., Powell W., Kumar A. Synthesis of intraspecific somatic hybrids of *Solanum tuberosum*: assessments of morphological biochemical and nematode (*Globodera pallida*) resistance characteristics// J. Exp. Bot. 1994. V. 45. P. 1319–1325.
  17. Correll D. The potato and its wild relatives. USA, Texas: Renner, 1962. 606 p.
  18. Dudits D., Fejer O., Hadlaczký G., Koncz C., Lazar G., Hovrath G. Intergeneric gene transfer mediated by protoplast fusion// MGG. 1980. V. 179. P. 283–288.
  19. Fahleson J., Lagercrantz I., Eriksson I., Glimelius K. Genetic and molecular analysis of sexual progenies from somatic hybrids between *Eruca sativa* and *Brassica napus*// Dissertation. ISBN. Swedish Univ. of Agric. Sci. 1993.
  20. Garriga-Calderé F., Huigen D. J., Filotico F., Jacobsen E., Ramanna M. Identification of alien chromosomes through GISH and RFLP analysis and the potential for establishing potato lines with monosomic additions of tomato chromosomes// Genome. 1997. V. 40. P. 666–673.
  21. Garriga-Calderé F., Huigen D. J., Angrisano A., Jacobsen E., Ramanna M. Transmission of alien tomato chromosomes from BC<sub>1</sub> to BC<sub>2</sub> progenies derived from backcrossing potato (+) tomato fusion hybrids to potato// Theor. Appl. Gen. 1998. V. 96. P. 155–163.
  22. Gavrilenko T., Barbakar N., Pavlov A. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series// Plant Sci. 1992. V. 86. P. 203–204.
  23. Gavrilenko T., Thieme R., Tiemann H. Assessment of genetic and phenotypic variation in intraspecific potato somatic hybrids// Plant Breed. 1999. V. 118. P. 205–213.
  24. Gavrilenko T. Somatic Hybridization Between *Lycopersicon esculentum* Mill. (Tomato) and Wild Non-tuberous *Solanum* Species// Biotechnol. Agric. Forestry. Berlin, 2001. V. 49. P. 188–198.
  25. Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.-M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their androgenic regenerants// Theor. Appl. Gen. 2001. V. 103. P. 231–239.
  26. Gavrilenko T., Larkka J., Pehu E., Rokka V.-M. Identification of mitotic chromosomes of tuberous and non-tuberous *Solanum* species (*Solanum tuberosum* and *S. brevifolium*) by GISH in their interspecific hybrids// Genome. 2002. V. 45. P. 44–49.
  27. Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme T. Transfer of diseases resistance from wild species of the genus *Solanum* to potato through somatic hybridization// Abstract of the Intern. Symp. Ukraine, Yalta, 2002. P. 66–67.
  28. Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme T. 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.
  29. Gleba Y., Hoffman F. 'Arabidobrassica': Plant-genome engineering by protoplast fusion// Naturwissenschaften. 1979. Bd 66. S. 547–554.
  30. Gleba Y., Hinnisdaels S., Sidorov V., Kaleda A., Parokony A., Borisjuk N., Cherep N., Negrutiu I., Jacobs M. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by «gamma-fusion»// Theor. Appl. Gen. 1988. V. 76. P. 760–766.
  31. Glimelius K., Fahleson G., Landgren M., Sjodin C., Sundberg E. Gene transfer via somatic hybridization in plants// Trends in Biotechnol. 1991. V. 9. P. 24–30.
  32. Grosser J.W., Mourao-Fo F., Gmitter Jr. F., Louzada E., Jiang J., Baergen K., Quiros A., Cabasson C., Chandler J. Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization// Theor. Appl. Gen. 1996. V. 92. P. 577–582.
  33. Gupta P., Schieder O., Gupta M. Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric fusion// MGG. 1984. V. 197. P. 30–35.
  34. Hansen L., Earle E. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion// Theor. Appl. Gen. 1995. V. 91. P. 1293–1300.
  35. Hayashi Y., Kyojuka J., Shimamoto K. Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion// MGG. 1988. V. 214. P. 6–10.
  36. Hawkes J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships// Potato Gen. UK: CAB Intern., 1994. P. 3–42.
  37. Helgeson J. P., Hunt G. J., Haberlach G. T., Austin S. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevifolium*: potential for use in breeding programs// Am. Potato J. 1993. V. 70. P. 437–452.
  38. Helgeson J., Pohlman J., Austin S., Haberlach G., Wielgus S., Ronnis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J., James R., Stevenson W. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight// Theor. Appl. Gen. 1998. V. 96. P. 738–742.



39. Helgeson J. P., Naess S., Bradeen J., Song J., Jiang J. Toward cloning a durable gene for resistance to late blight from *Solanum bulbocastanum*// Abstracts for papers of the 15th Trien. Conf. of EAPR. Germany, Hamburg, 2002. P. 111.
40. Hidaka T., Omura M. Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and rough lemon (*C. jambhiri*) or yuzu (*C. junos*)// *Jpn. J. Breed.* 1992. V. 42. P. 79–89.
41. Horsman K., Gavrilenko T., Bergervoet J. E. M., Huigen D.-J., Wong Joe A., Jacobsen E. Alteration of the genomic composition of *Solanum nigrum* (+) potato backcross derivatives by somatic hybridization// *Plant Breed.* 2001. V. 120. P. 201–207.
42. Izhar S., Tabib Y. Interspecific transfer of cytoplasmic male-sterility by asymmetric fusion to *Petunia hybrida*// *Theor. Appl. Gen.* 1980. V. 57. P. 241–246.
43. Jelodar N. B., Blackhall N. W., Hartman T. P., Brar D. S., Khush G., Cocking E. C. Intergeneric somatic hybrids of rice and *Porteresia coarctata*// *Ibid.* 1999. V. 99. P. 570–577.
44. Klimaszewska K., Keller W. Regeneration and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Diplotaxis harra*// *Plant Sci.* 1988. V. 58. P. 211–222.
45. Kumar A., Cocking E. Protoplast fusion: A novel approach to organelle genetics in higher plants// *Amer. J. Bot.* 1987. V. 74. P. 1289–1303.
46. Laurila J., Laakso I., Larkka J., Gavrilenko T., Rokka V.-M., Pehu E. Proportions of glycoalkaloid aglycones are dependent on genome constitutions of interspecific hybrids between two *Solanum* species (*S. tuberosum* and *S. brevidens*)// *Plant Sci.* 2001. V. 161. P. 677–683.
47. Lelivelt C., Leunissen E., Frederiks H., Helsper J., Krens F. Transfer of resistance to the beet cyst nematode from *Sinapsis alba* to *Brassica napus* gene pool by means of sexual and somatic hybridization// *Theor. Appl. Gen.* 1993. V. 85. P. 688–696.
48. Li Y., Tanner G., Delves A., Larkin P. Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*// *Ibid.* V. 87. P. 455–463.
49. Lössl A., Frei U., Wenzel G. Interaction between cytoplasmic composition and yield parameters in somatic hybrids of *S. tuberosum* L.// *Ibid.* 1994. V. 89. P. 873–878.
50. Makonkawkeyoon S., Smitamana C., Hirunpetcharat N., Maneekarn. Production of mouse immunoglobulin G by a hybrid plant derived from tobacco-mouse cell fusions// *Expertia.* 1995. P. 19–25.
51. Mariam A., Zakri A., Mahani M., Normah M. Interspecific hybridization of cultivated rice *Oryza sativa* L. with the wild rice *O. minuta* Presl.// *Theor. Appl. Gen.* 1996. V. 93. P. 664–671.
52. McGrath J., Williams C., Haberalach G., Wielgus S., Uchytel T., Helgeson J. P. Introgression and stabilization of *Erwinia tuber soft rot* resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*// *Am. J. Potato Res.* 2002. V. 79. P. 19–24.
53. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrids// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985. V. 82. P. 6960–6964.
54. Melchers G., Mohri Y., Watanabe K., Wakkabayashi S., Harada K. One-step generation of cytoplasmic male-sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts// *Ibid.* USA, 1992. V. 89. P. 6832–6836.
55. Mendis M. H., Power J. B., Davey M. R. Somatic hybrids of the forage legumes *Medicago sativa* and *M. falcata*// *J. Exp. Bot.* 1991. V. 42. P. 1565–1573.
56. Möllers C., Frei U., Wenzel G. Field evaluation of tetraploid somatic potato hybrids// *Theor. Appl. Gen.* 1994. V. 88. P. 147–152.
57. Mojtahedi H., Brown C., Santo C. Characterization of resistance in a somatic hybrid of *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* to *Meloidogyne chitwoodi*// *J. of Nematol.* 1995. V. 27. P. 86–93.
58. Naess S., Bradeen J., Wielgus S., Haberalach G., McGrath J., Helgeson J. P. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8// *Theor. Appl. Gen.* 2000. V. 101. P. 697–704.
59. Naess S., Bradeen J., Wielgus S., Haberalach G., McGrath J., Helgeson J. P. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines// *MGG.* 2001. V. 265. P. 694–704.
60. Niizeki M., Tanaka M., Akada S., Hirai A., Saito K. Callus formation of somatic hybridization of rice and soybean// *Jpn. J. Gen.* 1985. V. 60. P. 81–92.
61. Nothnagel T., Budahn H., Straka P., Schrader O. Successful backcrosses of somatic hybrids between *Synapsis alba* and *Brassica oleracea* with *Brassica oleracea* parent// *Plant Breed.* 1997. V. 116. P. 89–97.
62. Novy R., Nasruddin A., Ragsdale D. W., Radcliffe E. B. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y and green peach aphid in progeny of *Solanum tuberosum*// *Am. J. Potato Res.* 2002. V. 79. P. 9–18.
63. Pandeya R., Douglas G., Keller W., Setterfield G., Patrick Z. Somatic hybridization between *Nicotiana*

- rustica and *N. tabacum*// *Z. Pflanzenzüchtg.* Bd 96. S. 346–352.
64. Parokony A., Kenton A., Gleba Y., Bennett M. D. The fate of recombinant chromosomes and genome interaction in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids and their sexual progeny// *Theor. Appl. Gen.* 1994. V. 89. P. 488–497.
65. Perl A., Aviv D., Galun E. Protoplast-fusion-derived *Solanum* hybrids: application and phylogenetic limitations// *Ibid.* 1990. V. 79. P. 632–640.
66. Rambaud C., Vasseur J. Somatic hybridization in *Cichorium intybus* L. (Chicory)// In: *Biotechnol. in Agric. and Forestry*. 2001. P. 112–123.
67. Rasmussen J. O., Nepper J. P., Rasmussen O. S. Analysis of somatic hybrids between two sterile dihaploid *Solanum tuberosum* L. breeding lines. Restoration of fertility and complementation G. pallida Pa2 and Pa3 resistance// *Theor. Appl. Gen.* 1996. V. 92. P. 403–410.
68. Ren J., Dickson M., Earle E. Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*// *Theor. Appl. Gen.* 2000. V. 100. P. 810–819.
69. Rick C. Biosynthetic studies of *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*// In: *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. N. Y., London: Acad. Press, 1979. P. 667–668.
70. Rokka V.-M., Pietila L., Pehu E. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*) clones// *Am. Potato J.* 1996. V. 73. P. 1–13.
71. Rokka V.-M., Valkonen J. P. T., Tauriainen A., Pietilä L., Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E., Pehu E. Production and characterization of 'Second Generation' somatic hybrids derived from protoplast fusion between interspecific somatohaploid and dihaploid *Solanum tuberosum* L.// *Amer. J. Potato Res.* 2000. V. 77. P. 149–159.
72. Schenck H., Robbelen G. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*// *Z. Pflanzenphysiol.* 1982. Bd 92. S. 278–288.
73. Schwarbacher T., Heslop-Harrison J. Direct fluorochrome labelled DNA probes for direct fluorescent in situ hybridization to chromosomes// *Methods in Molecular Biology*. Totowa NJ.: Humana Press Inc., 1994. P. 8–17.
74. Sidorov V., Maliga P. Fusion-complementation analysis of auxotrophic and chlorophyll-deficient lines isolated in haploid *Nicotiana plumbaginifolia* protoplast culture// *MGG*. 1982. V. 186. P. 332–382.
75. Sidorov V., Zubko M., Kuchko A., Komarnitzky J., Gleba Y. Somatic hybridization in potato: use of  $\gamma$ -irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction// *Theor. Appl. Gen.* 1987. V. 74. P. 364–368.
76. Sjodin C., Glimelius K. *Brassica napus*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*// *Ibid.* 1989. V. 77. P. 651–656.
77. Sjodin C., Glimelius K. Transfer of resistance against *Phoma lingam* to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection// *Ibid.* 1989. V. 78. P. 513–520.
78. Somers D., Narayanan K., Kleinhofs A., Cooper-Bland S., Cocking E. Immunological evidence for transfer of the barley nitrate reductase structural gene to *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion// *MGG*. 1986. V. 204. P. 296–301.
79. Song J., Bradeen J., Naess K., Raasch A., Wielgus S., Haberlach G., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell C., Helgeson J. P., Jiang J. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight// *PNAS*. 100. 2003. V. 16. P. 9128–9133.
80. Spooner D., Anderson G., Jansen R. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (*Solanaceae*)// *Am. J. Bot.* 1993. V. 80. P. 676–688.
81. Thach N., Frei U., Wenzel G. Somatic fusion for combining virus resistances in *Solanum tuberosum* L.// *Theor. Appl. Gen.* 1993. V. 85. P. 863–867.
82. Thieme R., Darsow U., Gavrilenko T., Dorokhov D., Tiemann H. Production of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species// *Euphytica*. 1997. V. 97. P. 189–200.
83. Thieme R., Gavrilenko T., Thieme T., Heimbach U. Production of potato genotypes with resistance to Potato Virus Y (PVY) by biotechnological methods// *Plant Biotechnol. and In Vitro Biol. in the 21st Century*. Jerusalem: Kluw. Acad. Publ., 1999. P. 557–560.
84. Thieme R., Dinu I., Darsow U., Rakosy-Tican L., Kang Z., Gavrilenko T., Antonova O., Heimbach U., Thieme T. Use of somatic hybridization to transfer resistance to late blight and Potato Virus Y (PVY) into cultivated potato// *Plant Breeding and Seed Science (PBSS)*. 2004, V. 50. P. 113–118.
85. Thieme T., Thieme R. Evaluation of resistance to Potato Virus Y (PVY) in wild species and potato breeding clones of the genus *Solanum*// *Aspects Appl. Biol.* 1998. V. 52. P. 355–359.

86. 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. 1992. V. 20. P. 301–313.
87. Valkonen J., Brigneti G., Pehu E. Resistance to Myzus persicae (Suls.) in wild potatoes of the series Etuberosa// Acta Agric. Scand. 1992. V. 42. P. 118–127.
88. Waara S., Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding// Euphytica. 1995. V. 85. P. 217–233.
89. Wenzel G., Schieder O., Przewzny T., Sopory S., Melchers G. Comparison of single-cell-culture-derived Solanum tuberosum L. plants and a model for their application in breeding programs// Theor. Appl. Gen. 1979. V. 55. P. 49–55.
90. Zelcer A., Aviv D., Galun E. Interspecific transfer of cytoplasmic male-sterility by fusion between protoplasts of normal Nicotiana sylvestris and X-ray irradiated protoplasts of male-sterile N. tabacum// Z. Pflanzenphysiol. 1978. Bd 90. S. 397–407.

### СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСАМ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ОСНОВЕ ТРАДИЦИОННЫХ ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ\*

**Т. А. Гавриленко**, д-р биол. наук; **Е. В. Рогозина**, канд. биол. наук;  
**О. Ю. Антонова**, науч. сотрудник

#### ВИРУСЫ КАРТОФЕЛЯ

Картофель занимает четвертое место в мире среди продовольственных культур и является одним из основных продуктов питания в нашей стране. Вирусные заболевания приводят к значительным потерям урожая картофеля. Известно более 30 поражающих его вирусов, из них повсеместно в мире распространены: вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК), вирус картофеля Y (YVK), вирус картофеля X (ХВК) и вирус картофеля А (АВК) [55, 97]. Остальные – имеют локальное распространение. Наиболее вредоносны в мировом масштабе YVK и ВСЛК, из-за которых потери урожая восприимчивых сортов достигают 80 % [97]. По данным Р. Койма и Х. Лапьерре, ежегодный ущерб урожая, вызванного ВСЛК, составляет 20 млн т [59]. На территории Российской Федерации и других стран СНГ наиболее часто идентифицируют вирусы Y, X, ВСЛК, S, M, реже встречаются F и A. Распространение и вредоносность различных вирусов определяют в системе взаимодействия патогена, растения-хозяина и условий окружающей среды. Так, на Дальнем Востоке ВСЛК снижал урожайность картофеля в 3–5 раз [10]. В Белоруссии при поражении восприимчивых сортов вирусами Y, X, M снижение урожая достигало 68, 34 и 25 %, соответственно [1].

В естественных условиях трансмиссию вирусов в растения картофеля могут осуществлять насекомые-переносчики (тли, белокрылки, цикадки) и нематоды. Некоторые вирусы (ХВК и ВТМ) передаются только контактным путем. Также известны случаи переноса вирусов пыльцой и через семена (табл. 1).

подавляющее большинство известных в настоящее время вирусов картофеля имеют геном, представленный одонитевой (ss) РНК, плюс-полярности. Из вирусов, инфицирующих картофель, только два являются ДНК (ss)-содержащими (см. табл. 1).

#### ТИПЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ВИРУСАМ

Различия в терминологии, критериях и обозначениях различных типов устойчивости к вирусам [2, 78, 84–86, 93, 97] объясняются огромным разнообразием видов и сортов картофеля, обуславливающим широкий диапазон реакций растений на вирусные инфекции, наличием большого числа штаммов вирусов, а также влиянием условий среды на экспрессию разных генов устойчивости.

\* Работа выполнена при поддержке гранта CRDF-Минобразования РФ ST-012-0.