

На правах рукописи



АНТОНОВА Ольга Юрьевна

**ПОЛИМОРФИЗМ ОРГАНЕЛЬНЫХ ДНК
У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ, ВИДОВ РОДА *SOLANUM*
СЕКЦИИ *RETOTA* И МЕЖВИДОВЫХ
СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ**

Специальность 03.00.15 — «Генетика»

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург
2006**

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии ГНУ ГНЦ РФ ВИР им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН), г. С.-Петербург, Россия.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Гавриленко Татьяна Андреевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ризин Борис Викторович
кандидат биологических наук
Мироненко Нина Васильевна

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции

Защита состоится « 21 » апрель 2006 г. в 14 час. на заседании диссертационного совета Д 006.041.01 при ГНУ ГНЦ РФ Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н. И. Вавилова по адресу: 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44. Факс: (812) 571-87-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н. И. Вавилова

Автореферат разослан « 20 » апрель 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Э. А. Гончарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Наследование цитоплазматических ДНК при половой гибридизации у большинства видов растений осуществляется однопородно-матерински по материнской линии. Такой тип наследования препятствует свободному межвидовому обмену внеядерными генами и существенно ограничивает диапазон изменчивости признаков, кодируемых геномами органелл. В то же время, гены хлоропластной ДНК (хлДНК) и митохондриальной ДНК (мтДНК) участвуют в контроле таких фундаментальных биологических процессов, как фотосинтез и клеточное дыхание. Под контролем внеядерных генов находится и ряд селекционно важных признаков, например, цитоплазматическая мужская стерильность и устойчивость к ряду гербицидов. При изучении аллоплазматических линий разных видов растений выявлено влияние геномов органелл на продуктивность, морфогенетические потенции, фертильность, а также на фотосинтетические и респираторные параметры (Даниленко, Давыденко, 2003).

Исследования, направленные на расширение разнообразия цитоплазматических геномов, особенно актуальны для картофеля, большинство изученных сортов которого имеет один и тот же «культурный» тип пластидной и митохондриальной ДНК (Hosaka, 1986; Powell et al., 1993; Lössl et al., 1999). Разработанные к настоящему времени методы клеточной инженерии растений, основанные на слиянии протопластов, устраняют ограничения традиционной половой гибридизации и позволяют получать цитоплазматические гетерозиготы, предоставляя возможности для комбинирования генов хл- и мтДНК разных видов (Глеба, Ситник, 1984; Waaga, Glimelius, 1995; Гавриленко, 2005). Вовлечение в генетические и селекционные программы органелльных генов диких видов позволяет создавать принципиально новые формы культурных растений, представляющие интерес как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

Цель работы заключалась в изучении межвидового и внутривидового полиморфизма ряда локусов пластидной и митохондриальной ДНК у видов рода *Solanum* L. секции *Petota* Dumort, у селекционных и аборигенных чилийских сортов картофеля, а также в анализе особенностей наследования и реорганизации геномов органелл у межвидовых соматических гибридов.

Задачи работы:

- исследовать полиморфизм ряда последовательностей хл- и мтДНК у диких и культурных видов картофеля, а также у отдельных представителей некультурных видов рода *Solanum*;
- изучить полиморфизм ряда локусов хл- и мтДНК у селекционных сортов возделываемого картофеля и аборигенных чилийских форм *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*;
- определить особенности передачи геномов органелл соматических гибридов картофеля в зависимости от степени филогенетической близости родительских видов и от уровня их пloidности;

— изучить совместимость ядра и цитоплазмы сортов картофеля и различных диких видов рода *Solanum*, а также особенности реорганизации оргanelльных геномов у межвидовых соматических гибридов.

Научная новизна. Впервые проведено изучение полиморфизма последовательностей пластидного локуса *trnD/trnT* для 16 видов рода *Solanum*, а также 4-х локусов мтДНК для 13 видов. Это позволило выявить в изученных мт-локусах новые, ранее не описанные в литературе аллели. Кроме того, новые аллели были выявлены у изученных диких видов картофеля в пластидном локусе *atpE*. Впервые установлен низкий уровень полиморфизма последовательностей оргanelльной ДНК у сортов картофеля отечественной селекции. Впервые на больших выборках в разных межвидовых комбинациях слияния протопластов статистически достоверно доказаны различия в характере передачи оргanelл родительских видов у соматических гибридов картофеля: случайное наследование для пластид и неслучайное для митохондрий. Показано отсутствие эффектов несовместимости оргanelл разных видов, а также эффектов ядерно-цитоплазматической несовместимости у межвидовых соматических гибридов картофеля.

Практическое значение работы. При помощи ПЦР со специфичными праймерами выявлены значительные различия оргanelльных геномов ряда видов картофеля, что позволяет рекомендовать данный метод для анализа филогенетических взаимоотношений видов и изучения гибридных линий, полученных методами отдаленной гибридизации. Проведенная нами характеристика цитоплазматического состава сортов отечественной селекции и ряда аборигенных чилийских форм дает дополнительную информацию для генотипирования сортов картофеля и анализа их родословных. Полученные в результате скрещивания межвидовых соматических гибридов с селекционными сортами новые фертильные формы с чужеродной цитоплазмой могут быть использованы для создания аллоплазматических линий картофеля.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международных научных конференциях, включая EARP/EUCARPIA Олу, Финляндия, 2003; «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология», Минск, 2004; EARP, Бильбао, Испания, 2005; на III съезде ВОГиС, Москва, 2004; на 14-й конференции FESPB, Краков, Польша, 2004; на 5 Международном совещании по кариологии, кариосистематике и молекулярной систематике растений, С.-Петербург, 2005.

Публикации. По результатам работы опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 статьи, 1 статья отправлена в печать.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, приложение. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, включает 26 рисунков и 16 таблиц. Список литературы включает 237 наименований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-04-49259).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для работы послужили виды рода *Solanum*, сорта картофеля и межвидовые соматические гибриды. Всего было изучено 67 образцов 23-х диких и 6-ти культурных видов картофеля, относящихся к 13-ти сериям секции *Petota*, и два вида секций *Solanum* и *Basarthurum* (*S. nigrum* и *S. caripense* соответственно). Классификация видов и их геномный состав приведены согласно Хоксу (Hawkes, 1990). Также были исследованы 20 аборигенных чилийских сортов *S. tuberosum ssp. tuberosum* (в дальнейшем — *tbr*), 98 сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции из коллекций ВИР и Генбанка GLSK (Германия). Растения межвидовых соматических гибридов были получены и идентифицированы при помощи RAPD- и ядерных SSR-маркеров, методов цитофотометрического и, в некоторых комбинациях, GISH-анализа (Thieme et al., 2003; Gavrilenko et al., 2002, 2003) в совместных исследованиях с доктором Р. Тиме (BAZ, Германия). Гибриды картофеля и *S. nigrum* были любезно предоставлена доктором А. Щербаковой (Институт биохимии и биофизики ПАН, Польша) (Szczerbakowa et al., 2002). Всего в 10-ти комбинациях было проанализировано 413 соматических гибридов.

Выделение тотальной ДНК проводили из листьев растений по методу Винанда и Файкса (Wienand, Feix, 1980) с небольшими модификациями или при помощи набора фирмы «Invitex» согласно инструкции фирмы-изготовителя. Качество полученных препаратов контролировали спектрофотометрически и электрофорезом в 0,8% агарозном геле.

Проведение полимеразной цепной реакции. Анализ пластидных геномов проводили с использованием праймеров ALC_1/ALC_3, trnD/trnT и NTCP9, маркирующих локусы *atpE*, *trnD/trnT* и *trnG/trnR* соответственно (Loessl et al., 2000; Demesure et al., 1995; Brayan et al., 1999). Изучение митохондриальных ДНК проводили при помощи праймеров AL_Mt2/ALM_3, ALM_4/ALM_5, ALM_6/ALM_7 и rrmD (локусы *atp6*, *cob/rps10*, *cob*, *rps14/cob*) (Lössl et al., 1999, 2000; Bastia et al., 2001). Условия проведения ПЦР соответствовали протоколам авторов — разработчиков праймеров. Разделение продуктов амплификации проводили в агарозных гелях в буфере TBE, а также в 6–10 % ПААГ как в денатурирующих, так и в неденатурирующих условиях.

Статистическая обработка результатов. (1) Кластерный анализ проводили с использованием алгоритма Варда, основанного на принципе минимизации внутрикластерной дисперсии. Наличие/отсутствие каждой аллели при составлении исходной базы данных кодировали цифрами 1 и 0. Все расчеты и графические построения осуществляли при помощи пакета программ SPSS, версия 11.5. (2) Для проверки соответствия эмпирических частот ожидаемым применяли критерий χ^2 (Лакин, 1980). (3) Оценку достоверности разности между выборочными долями проводили при помощи критерия t_{ϕ} (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Полиморфизм цитоплазматических ДНК видов картофеля и близких не клубненосных видов рода *Solanum*

Полиморфизм пластидных ДНК по локусу *atpE* (праймеры ALC_1/ALC_3). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК с праймерами ALC_1/ALC_3 в агарозных гелях выявило у исследованных видов два типа фрагментов, размерами примерно 380 и 620 п. о. Фрагменты данных размеров были описаны в литературе как маркеры так называемых «культурного» (Т) и «дикого» (W) типов хлДНК (Loessl et al., 2000). Было установлено, что хлДНК Т-типа (380 п. о., аллель 1) имели один образец *S. tarajense* и один образец *S. tuberosum* ssp. *andigena*. У остальных 66 образцов продукты амплификации в агарозных гелях демонстрировали одинаковую подвижность, соответствующую «дикому» W-типу (около 620 п. о.). Однако при электрофорезе в 6% неденатурирующем ПААГ нам удалось разделить их на 3 типа фрагментов, обозначенные от меньшего к большему как аллели W(2), W(3) и W(4) (рис. 1). При этом у большинства культурных и диких видов картофеля и у сортов подвиды *tuberosum* была выявлена аллель W(4) (табл. 1). Новые, не описанные ранее аллели W(2) и W(3) обнаружены в основном у отдаленных видов секций *Solanum* и *Basaribtrum* и серий *Pinnatisecta*, *Bulbocastana*, *Juglandifolia*, *Etuberosa* (табл. 1).

Полиморфизм пластидных ДНК по локусу *trnG/trnR* (праймер NTCP9). У изученных нами образцов видов рода *Solanum* в локусе *trnG/trnR* было выяв-

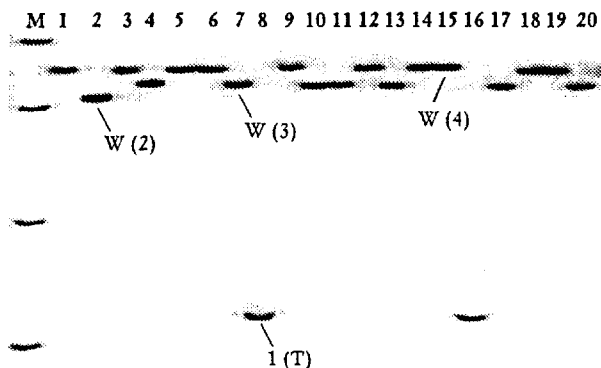


Рис. 1. Аллели пластидного локуса *atpE*, выявленные у изученных видов рода *Solanum*. Электрофорез в 6% ПААГ в неденатурирующих условиях

M — маркер	6 — <i>S. pbureja</i> 1	11 — <i>S. etuberosum</i> 1	17 — <i>S. pinnatisectum</i> 1
1 — <i>S. curtlobum</i> 4	7 — <i>S. demissum</i> 2	12 — <i>S. toralapanum</i> 1	18 — <i>S. maglia</i> 1
2 — <i>S. caripense</i> 1	8 — <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 4	13 — <i>S. brachistotrichum</i> 2	19 — <i>S. vernei</i> 1
3 — <i>S. goniocalyx</i> 1	9 — <i>S. ajanhuiri</i>	14 — <i>S. chacoense</i> 1	20 — <i>S. bulbocastanum</i> 1
4 — <i>S. rickii</i> 1	10 — <i>S. tarnii</i> 1	15 — <i>S. tarajense</i> 2	
5 — <i>S. commersonii</i>		16 — <i>S. tarajense</i> 1	

- 1 — *S. stoloniferum* 1
- 2 — *S. demissum* 5
- 3 — *S. demissum* 7
- 4 — *S. commersonii* 1
- 5 — *S. pbureja* 1
- 6 — *S. tuberosum*,
ssp. *andigena* 4
- 7 — *S. acaule* 1
- 8 — *S. pinnatisectum* 1
- 9 — *S. brevidens* 1
- 10 — *S. rickii* 1
- 11 — *S. etuberosum* 1
- 12 — *S. caripense* 1
- 13 — *S. nigrum* 1
- 14 — *S. tarnii* 1
- M — маркер

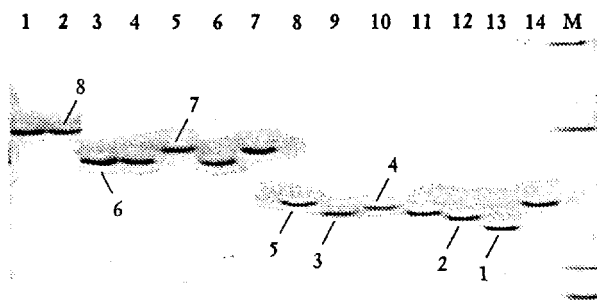


Рис. 2. Выявленные у изученных видов рода *Solanum* аллели пластидного локуса *trnG/trnR*. Электрофорез в 6% ПААГ в денатурирующих условиях

лено 8 различных аллелей (рис. 2), что соответствовало литературным данным (Bryan et al., 1999). Аллели 1–4, соответствующие фрагментам меньших размеров, были обнаружены только у не клубненосных видов серий *Etuberosa* и *Juglandifolia* и секций *Basartbrum* и *Solanum*. Для диких и культурных видов картофеля были характерны аллели 5–8 (табл. 1).

Полиморфизм пластидных ДНК по локусу *trnD/trnT* (праймер *pusB*). У всех изученных нами видов картофеля подсекции *Potatoe* и у не клубненосного вида *S. rickii* продукты ПЦР с праймером *pusB* имели один и тот же размер (800 п. о., аллель 1). У не клубненосных видов серии *Etuberosa* и секций *Basartbrum* и *Solanum* образовывался фрагмент размером около 1200 п. о. (аллель 2) (табл. 1).

Полиморфизм митохондриальных ДНК по локусу *rps10* (праймеры ALM_4/ALM_5). Использование праймеров ALM_4/ALM_5 для анализа мтДНК 31 вида рода *Solanum* позволило выявить девять различных аллелей локуса *rps10* (рис. 3, табл. 1). Три из них соответствовали аллелям α , β и γ , описанным ранее А. Лосслем у сортов европейской селекции (Lössl et al., 2000). Амплификационный фрагмент размером 2,4 т. п. о. (аллель 8 по нашей классификации, или α тип мтДНК) был найден у 13-ти образцов пяти диких видов (табл. 1). У вида *S. vernei* была выявлена аллель 0 (отсутствие ПЦР-продукта), что соответствовало γ -типу мтДНК по классификации Лоссля. Большинство образцов (47 из 61 изученного), представляющие 20 различных видов, обнаруживали ПЦР-продукты размером 1,6 т. п. о. По классификации Лоссля, такие фрагменты соответствовали «культурному» β -типу мтДНК (в нашей классификации аллель 6), который Лоссль выявил у большинства изученных им сортов картофеля. В наших исследованиях аллель 6 (или β -тип мтДНК) оказалась наиболее распространена не только среди культурных, но и среди диких видов картофеля (табл. 1). Следует отметить, что мт-геномы двух образцов *S. chacoense*, двух образцов *S. acaule*

- 1 — *S. nigrum* 1
- 2 — *S. rickii* 1
- 3 — *S. etuberosum* 1
- 4 — *S. curtilobum* 1
- 5 — *S. stenotomum* 1
- 6 — *S. commersonii* 1
- 7 — *S. chacoense* 3
- 8 — *S. bulbocastanum* 1
- 9 — *S. pinnatisectum* 2
- 10 — *S. demissum* 1
- 11 — *S. tarnii* 1
- 12 — маркер

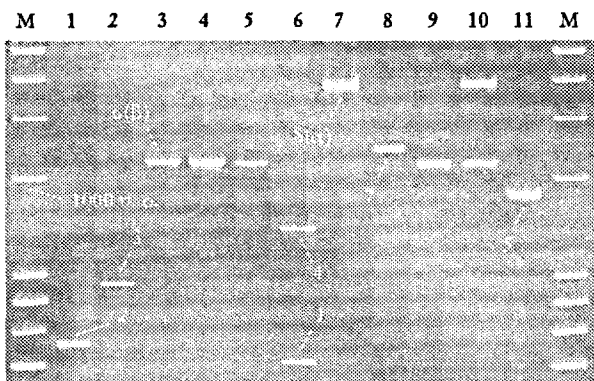


Рис. 3. Аллели митохондриального локуса *rps10*, выявленные у изученных видов рода *Solanum*. Электрофорез в 1,4% агарозном геле

и всех изученных образцов *S. demissum* содержали аллели 6 и 8 одновременно. Остальные аллели локуса *rps10* были выявлены нами впервые у отдаленных видов серий *Juglandifolia*, *Bulbocastana*, *Pinnatisecta* и *Commersoniana*, а также секций *Solanum* и *Basarthrum* (табл. 1, рис. 3).

Полиморфизм митохондриальных ДНК по локусу *atp6* (праймеры AL_Mt2/ALM_3). Митохондриальные геномы подавляющего большинства проанализированных в нашей работе диких видов имели нулевую аллель локуса *atp6* (отсутствие продуктов реакции было подтверждено в трех независимых экспериментах). Аллель 1, соответствующая ПЦР-продукту размером 620 п. о., была найдена только у трех образцов вида *S. demissum* и у двух образцов *S. tuberosum ssp. andigena*. У вида *S. stoloniferum* нами впервые была обнаружена аллель 2 — ПЦР-продуктоколо 650 п. о. (табл. 1).

Полиморфизм митохондриальных ДНК по локусу *rps14/cob* (праймер *rps14*). ПЦР с праймером *rps14* выявила у изученных нами видов рода *Solanum* три различные аллели (табл. 1). Большинство видов секции *Petota* содержали аллель 3 (ПЦР-продукт размером примерно 1500 п. о.). У не клубненосных видов серии *Etuberosa* была обнаружена аллель 2 (ПЦР-продукт размером около 1200 п. о.), оказавшаяся специфичной для видов этой серии. Данные аллели были ранее описаны в литературе (Bastia et al., 2001). В нашей работе впервые выявлена аллель 1 у видов серий *Bulbocastana*, *Pinnatisecta*, *Yungasensa*, *Longipedicellata* и *Commersoniana*. Размер продуктов амплификации в этом случае составил около 550 п. о. У ряда образцов серий *Pinnatisecta*, *Yungasensa*, *Longipedicellata* мт-геномы содержали одновременно аллели 1 и 3 (табл. 1).

Полиморфизм митохондриальных ДНК видов по локусу *cob* (праймеры ALM_6/ALM_7). У изученных видов нами были обнаружены три различные ал-

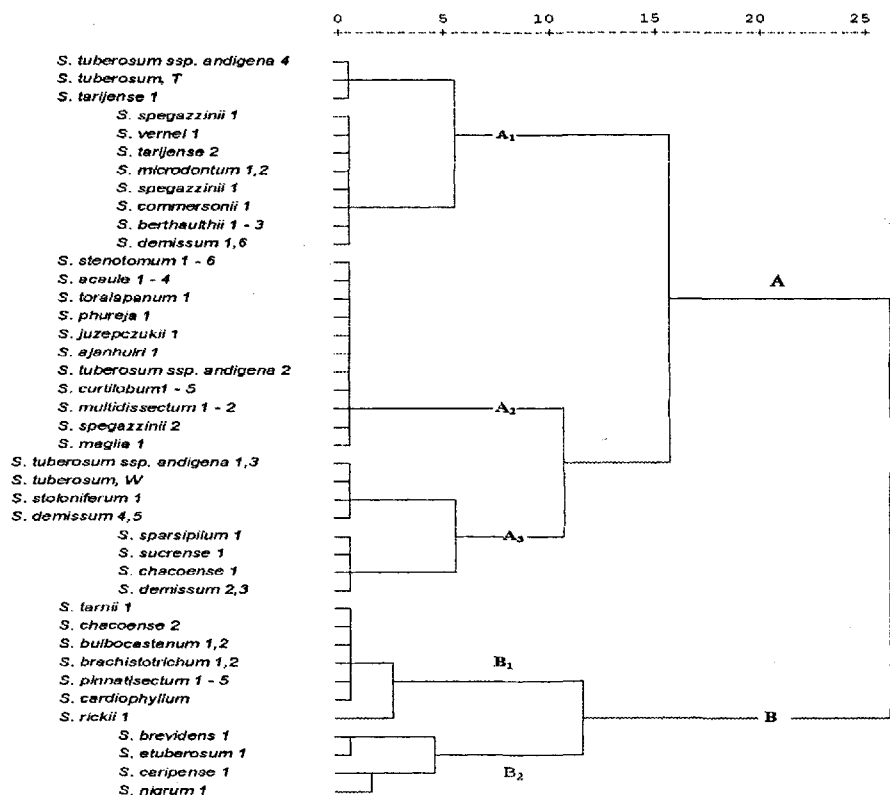


Рис. 4. Распределение видов рода *Solanum* на дендрограмме, построенной по результатам анализа полиморфизма последовательностей их пластидных ДНК

лели данного локуса (табл. 1). Аллель 1 (ПЦР-продукт размером около 1,5 т. п. о.) встречалась только у не клубненосных видов *S. brevidens* и *S. etuberosum*, т. е. была специфична для серии *Etuberosa*. Митохондриальные геномы всех остальных изученных видов секции *Petota* содержали аллель 2 (ПЦР-продукт размером 2,2 т. п. о.). Аллель 0 (отсутствие ПЦР-продукта) была найдена у образцов видов секций *Basartbrum* и *Solanum*.

Таким образом, у проанализированных нами образцов видов рода *Solanum* было обнаружено 14 аллелей пластидных и 18 аллелей митохондриальных локусов. Сочетания этих аллелей давали 11 различных гаплотипов хлДНК и 16 различных гаплотипов мтДНК (табл. 1).

Таблица 1. Результаты анализа полиморфизма
цитоплазматических геномов картофеля и некоторых не клубненосных видов рода *Solanum*

Серия	Вид, изученные образцы*	Аллели, выявленные в локусах**						
		пластидных			митохондриальных			
		<i>atpE</i>	<i>trnG/ trnR</i>	<i>trnD/ trnT</i>	<i>rps14/ cob</i>	<i>atp6</i>	<i>rps10</i>	<i>cob</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Секция <i>Basaribrium</i>	<i>S. caripense</i> 1	W (2)	2	2	3	0	2	0
Секция <i>Solanum</i>	<i>S. nigrum</i> 1	W (2)	1	2	3	0	2	0
Секция <i>Petota</i> , подсекция <i>Estolonifera</i>								
Диплоидные виды кластера ядерных E-геномов								
<i>fuglandifolia</i>	<i>S. rickii</i> 1	W (3)	4	1	3	0	3	2
<i>Etuberosa</i>	<i>S. brevidens</i> 1	W (3)	3	2	2	0	6 (β)	1
	<i>S. etuberosum</i> 1	W (3)	3	2	2	0	6 (β)	1
Секция <i>Petota</i> , подсекция <i>Potatoe</i>								
Диплоидные виды кластера ядерных B-геномов								
<i>Bulbocastana</i>	<i>S. bulbocastanum</i> 1, 2	W (3)	5	1	1	0	7	2
<i>Pinnatisecta</i>	<i>S. brackistotrichum</i> 1, 2	W (3)	5	1	1+3	0	6 (β)	—
	<i>S. cardiophyllum</i> 1	W (3)	5	1	1+3	0	8 (α)	2
	<i>S. pinnatisectum</i> 1-3	W (3)	5	1	1	0	6 (β)	2
	<i>S. pinnatisectum</i> 4, 5	W (3)	5	1	1+3	0	6 (β)	2
	<i>S. tarnii</i> 1	W (3)	5	1	1	0	5	2
Аллополиплоидные виды с ядерными геномами A, B и D								
<i>Demissa</i>	<i>S. demissum</i> 1	W (4)	6	1	3	0	6+8	2
	<i>S. demissum</i> 2, 3	W (4)	5	1	—	—	—	—
	<i>S. demissum</i> 4, 5	W (4)	8	1	3	1	6+8	2
	<i>S. demissum</i> 6	W (4)	6	1	3	1	6+8	2
<i>Longipedicellata</i>	<i>S. stoloniferum</i> 1, 2	W (4)	8	1	1+3	2	8 (α)	—
Виды кластера ядерных A-геномов								
<i>Yungasensa</i>	<i>S. chacoense</i> 1	W (4)	5	1	—	—	—	—
	<i>S. chacoense</i> 2	W (3)	5	1	1+3	0	6+8	—
	<i>S. chacoense</i> 3	W (4)	5	1	1+3	0	8 (α)	—
	<i>S. chacoense</i> 4	W (4)	5	1	1+3	0	6+8	—
	<i>S. tarijense</i> 1	T (1)	6	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. tarijense</i> 2	W (4)	6	1	3	0	6 (β)	—

Таблица 1 (окончание). Результаты анализа полиморфизма
цитоплазматических геномов картофеля и некоторых неклубненосных видов рода *Solanum*

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Megistacroloba</i>	<i>S. toralapanum</i> 1	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	—
<i>Commersoniana</i>	<i>S. commersonii</i> 1	W (4)	6	1	1	0	1+4	—
<i>Maglia</i>	<i>S. maglia</i> 1	W (4)	7	1	—	—	—	—
<i>Tuberosa</i> (wild)	<i>S. berthaultii</i> 1–3	W (4)	6	1	3	0	6 (β)	2
	<i>S. microdontum</i> 1–2	W (4)	6	1	—	—	—	—
	<i>S. multidissectum</i> 1, 2	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	2
	<i>S. sparsipilum</i> 1	W (4)	5	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. spegazzinii</i> 1	W (4)	6	1	1+3	0	6 (β)	—
	<i>S. spegazzinii</i> 2	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. sucrense</i> 1, 2	W (4)	5	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. vernei</i> 1	W (4)	6	1	1+3	0	0 (γ)	2
	<i>S. ajanbui</i> 1	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	—
<i>Tuberosa</i> (cult.)	<i>S. stenotomum</i> 1, 2, 4	W (4)	7	1	1+3	0	6 (β)	—
	<i>S. stenotomum</i> 3	W (4)	7	1	1	0	6 (β)	—
	<i>S. stenotomum</i> 5, 6	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. phureja</i> 1	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	—
	<i>S. × juzepczukii</i> 1	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	2
	<i>S. × curtisii</i> 1–5	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	2
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 1	W (4)	8	1	3	1	8 (α)	2
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 2	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	2
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 3	W (4)	8	1	3	1	8 (α)	2
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 4	T (1)	6	1	—	—	—	—
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> W	W (4)	8	1	3	1	8 (α)	2
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> T	T (1)	6	1	3	0	6 (β)	2
<i>Acaulia</i>	<i>S. acaule</i> 1, 2	W (4)	7	1	3	0	6+8	2
	<i>S. acaule</i> 3, 4	W (4)	7	1	3	0	6 (β)	2

Примечание: ← — не изучено;

* номера образцов по каталогу ВИР и GLSK приведены в тексте диссертации;

** для локуса *rps10* в скобках приведены обозначения аллелей по классификации Лоссля.

Кластерный анализ. По данным ПЦР-анализа изученных локусов хлДНК был проведен кластерный анализ, результаты которого представлены на рис. 4 в виде дендрограммы. Все изученные виды разделились на два кластера. Кластер В объединил не клубненосные виды *S. caripense*, *S. nigrum*, *S. etuberosum*, *S. brevidens*, *S. rickii* и дикие мексиканские диплоидные виды картофеля серий *Bulbocastana* и *Pinnatisecta* с ядерными В-геномами. При этом не клубненосные виды кластера ядерных Е-геномов серии *Etuberosa* (*S. brevidens* и *S. etuberosum*), обладающие рядом специфичных аллелей, оказались ближе к видам секции *Basarthurum* и *Solanum* (подкластер В₂), чем к видам картофеля секции *Petota* (подкластер В₁). Полученные данные свидетельствуют в пользу современной классификации данных таксонов, построенной на основе изучения ПДРФ хлДНК (Spooner et al., 1993), в которой серия *Etuberosa* выносится за пределы секции *Petota* и определяется в ранге отдельной секции *Etuberosum*.

Кластер А объединил диплоидные (А₁А₂) и полиплоидные виды картофеля из Южной Америки с различными вариантами ядерных А-геномов, а также мексиканские аллополиплоидные виды картофеля — *S. demissum* (ААВВВВ или ААААВВВ) и *S. stoloniferum* (ААВВ). Соответствия между совместной кластеризацией этих видов и их таксономической принадлежностью к разным сериям выявлено не было. Следует отметить совместную кластеризацию видов *S. acaule*, *S. × juzepczukii* и *S. × curtii*. Согласно Букасову (1938) и Хоксу (Hawkes, 1990), вид *S. × curtii* произошел в результате межвидовой гибридизации с участием *S. × juzepczuki*, который, в свою очередь, берет свое начало от межвидового гибрида с участием *S. acaule*.

Таким образом, наши данные достаточно хорошо согласуются с другими исследованиями по филогении картофеля (Hosaka, 1984; Spooner, 1992), в которых выявлена корреляция между генетической дифференциацией пластидных геномов и принадлежностью видов к группам, содержащим ядерные Е-, В- и А-геномы.

2. Определение цитоплазматического состава аборигенных чилийских и селекционных сортов картофеля

Анализ полиморфизма цитоплазматических ДНК культурных и диких видов серии *Tuberosa*, к которой принадлежит и *S. tuberosum ssp. tuberosum*, показал, что полиморфные фрагменты образовывали только 4 из 7 изученных пар праймеров (табл. 1). Поэтому для анализа полиморфизма сортов картофеля были использованы именно эти 4 пары праймеров, специфичные к локусам *atpE* и *trnG/trnR* хлДНК и *rps10* и *atp6* мтДНК. Результаты представлены в табл. 2 и 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, по сравнению с видами, сортам картофеля в целом был свойственен более низкий уровень полиморфизма оргanelльных ДНК. Так, в пластидном локусе *atpE* из 4-х возможных аллелей были выявлены только две, а именно Т(1) и W(4). Большинство изученных нами сортов (78 из 118 или 66,1%) обладали Т-типом хлоропластной ДНК, который

Таблица 2. Частота встречаемости аллелей цитоплазматических локусов среди сортов картофеля различного происхождения

Локус	Аллель	Число сортов (%), содержащих определенные аллели цитоплазматических локусов				Всего (118)
		отечественных (63)	зарубежных (35)	аборигенных чилийских (20)		
<i>atpE</i> (хлДНК)	T (1)	40 (63,5%)	23 (65,7%)	15 (75,0%)	78 (66,1%)	
	W (4)	23 (36,5%)	12 (34,3%)	5 (25%)	40 (33,9%)	
<i>trnG/trnR</i> (хлДНК)	6	42 (66,7%)	23 (65,7%)	15 (75,0%)	80 (67,8%)	
	7	0 (0%)	1 (2,9%)	0 (0%)	1 (0,8%)	
	8	21 (33,3%)	11 (31,4%)	5 (25%)	37 (31,4%)	
<i>rps10</i> (мтДНК)	(6)	42 (66,7%)	24 (68,6%)	15 (75,0%)	81 (68,6%)	
	(8)	20 (31,7%)	10 (28,6%)	3 (27,3%)	33 (28,0%)	
	(0)	1 (1,6%)	1 (2,8%)	2 (3,8%)	4 (3,4%)	
<i>atp6</i> (мтДНК)	0	42 (66,7%)	23 (65,7%)	15 (75,0%)	80 (67,8%)	
	1	21 (33,3%)	12 (34,3%)	5 (25%)	38 (32,2%)	

обозначается в литературе как «культурный», характерный для *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. 33,9% сортов обладали «диким» W типом пластид (табл. 2).

В пластидном локусе *trnG/trnR* были обнаружены только три аллели, а именно 6, 7 и 8. Из 118 сортов 80 (67,8%) содержали аллель 6, и 37 сортов (31,4%) — аллель 8. Аллель 7 была выявлена лишь у сорта Flourball (0,8%) (табл. 2).

Митохондриальный локус *rps10* представлен тремя аллелями, соответствовавшими описанным Лосслем α -, β - и γ -типам мтДНК. В литературе β -тип мтДНК называют «культурным», поскольку он наиболее часто встречается у сортов картофеля, а менее распространенные α - и γ -типы называют «дики-ми» (Lössl et al., 1999, 2000). Среди изученных нами селекционных сортов отече-

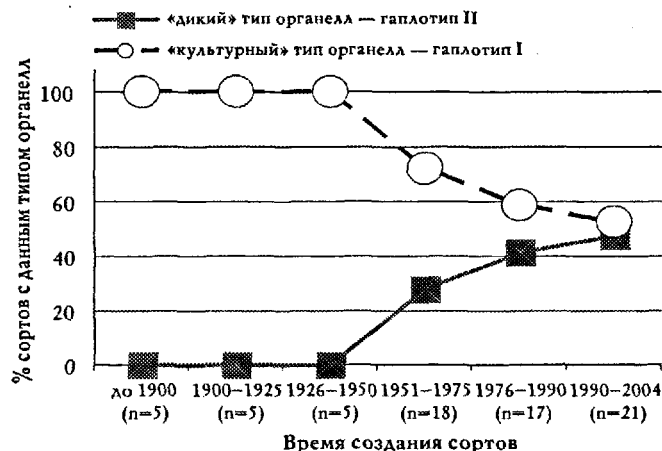


Рис. 5. Частота встречаемости сортов с «диким» типом цитоплазмы в зависимости от времени их создания

ственной и зарубежной селекции и среди местных чилийских сортов β -тип мтДНК также оказался наиболее распространенным (табл. 2). Доля сортов с «дикими» типами мт-геномов среди 118 изученных сортов составила 31,4%.

В митохондриальном локусе *atp6* у проанализированных сортов были обнаружены две аллели. Аллель 1 имели 38 сортов из 118 изученных (32,2%), остальные 77 сортов содержали нулевую аллель данного локуса (табл. 2).

Частоты встречаемости различных аллелей всех изученных локусов хл и мтДНК в группах отечественных, зарубежных и аборигенных чилийских сортов статистически не различались.

При анализе полученных результатов было обнаружено, что как пластидные, так и митохондриальные геномы сортов характеризуются устойчивыми сочетаниями аллелей. Так, у подавляющего большинства сортов (113 из 118 изученных) при наличии в пластидном локусе *atpE* аллели W(4) второй пластидный локус *trnG/trnR* содержал аллель 8, а при наличии аллели T(1) — аллель 6. Аналогично, у большинства сортов наличие в локусе *atp6* аллели 0 коррелировало с β -типом мтДНК, определенным по локусу *rps10*, а наличие аллели 1 совпадало с «диким» α или γ -типом (табл. 3).

Сопоставление результатов анализа оргanelльных ДНК по всем четырем изученным локусам позволило выявить восемь цитоплазматических гаплотипов (табл. 3). Оказалось, что у большинства сортов (77 или 65,3%) наличие хлДНК «культурного» T-типа коррелировало с присутствием мтДНК также «культурного» β -типа (гаплотип I). У трети изученных сортов (27,1%, или 32 сорта) присутствие хлДНК «дикого» W-типа совпадало с наличием «дикого» α -типа

Таблица 3. Выявленные типы цитоплазматических геномов и их представленность у сортов различного происхождения

Гаплогенотип	Аллели, выявленные в локусах				Число сортов (%) с данным гаплотипом среди:			
	пластидных		митохондриальных		отечественных	зарубежных	чилийских	Всего
	<i>atpE</i>	<i>trnG/trnR</i>	<i>rps10*</i>	<i>atp6</i>				
I	T (1)	6	(6)	0	40 (63,5%)	22 (62,8%)	15 (75,0%)	77 (65,3%)
II	W (4)	8	(8)	1	20 (31,7%)	9 (25,6%)	3 (15,0%)	32 (27,1%)
III	W (4)	8	(0)	1	1 (1,6%)	0	2 (10,0%)	3 (2,5%)
IV	W (4)	6	(0)	1	0	1 (2,9%)	0	1 (0,85%)
V	W (4)	6	(6)	0	2 (3,2%)	0	0	2 (1,70%)
VI	W (4)	8	(8)	0	0	1 (2,9%)	0	1 (0,85%)
VII	W (4)	7	(6)	1	0	1 (2,9%)	0	1 (0,85%)
VIII	T (1)	8	(6)	1	0	1 (2,9%)	0	1 (0,85%)
Итого сортов:					63	35	20	118

* В локусе *rps10* буквами обозначены аллели по классификации Лоссля, а цифрами — по нашей классификации.

мтДНК (гаплотип II). Это позволило нам называть два преобладающих гаплотипа I и II «культурным» и «диким» типами цитоплазмы соответственно. Гаплотип III (сочетание «дикого» W-типа пластид и «дикого» γ-типа мтДНК) был обнаружен только у трех сортов. И, наконец, лишь у единичных сортов были найдены пять редких гаплотипов (IV–VIII) с необычными сочетаниями аллелей пластидных и/или митохондриальных локусов (табл. 3).

Суммируя полученные результаты, следует отметить незначительный уровень изменчивости цитоплазматических геномов сортов картофеля: у изученной выборки сортов преобладает один гаплотип (гаплотип I) (табл. 3). В работах зарубежных ученых также было выявлено преобладание «культурных» типов хл- и мтДНК среди европейских селекционных сортов (Hosaka et al., 1988; Lössl et al., 1999; Waugh et al., 1990; Powell et al., 1993; Provan et al., 1999). По частоте встречаемости основных гаплотипов (I и II) сорта отечественной и зарубежной селекции не отличались друг от друга (табл. 3), однако процент необычных гаплотипов у отечественных сортов по сравнению с зарубежными был несколько ниже (4,8% и 11,4% соответственно). Среди чилийских аборигенных форм, сформировавшихся в центре происхождения подвида *tuberosum*, не было выявлено ни одной формы с редкими гаплотипами IV–VIII (табл. 3). В то же время, у чилийских сортов была наиболее высокой частота встречаемости «культурного» гаплотипа I (75%) и наиболее низкой частота встречаемости «диких» гаплотипов II и III (15% и 10% соответственно).

Сопоставление типов цитоплазмы селекционных сортов и времени их создания показало, что, начиная с середины XX в., относительная частота сортов с органеллами «культурного» типа снижается, а процент сортов с органеллами «дикого» типа возрастает (рис. 5). Полученные результаты отражают возрастание роли межвидовой гибридизации в создании новых сортов картофеля.

Проведенный нами анализ родословных показал, что по материнской линии селекционные сорта с «дикими» типами цитоплазмы обычно восходят к видам серий *Tuberosa* (*S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. stenotomum*, *S. vernei* и др.) и *Demissa* (*S. demissum*). Следует, однако, отметить, что повторные привлечение диких видов этих серий в скрещивания с культурным картофелем не могут существенно расширить пул цитоплазматических аллелей селекционных сортов, поскольку такие аллели уже присутствуют в их генофонде (табл. 1). Потенциальным источником новых аллелей хл- и мтДНК являются отдаленные виды, например, виды серий *Pinnatisecta*, *Bulbocastana*, *Etuberosa*. Однако половая гибридизация видов этих серий и культурного картофеля чрезвычайно ограничена из-за барьеров нескрещиваемости. Перспективным путем для передачи культурному картофелю органелл отдаленных видов может стать соматическая гибридизация с последующим созданием аллоплазматических линий.

3. Наследование оргanelльной ДНК у соматических гибридов

Характер сегрегации оргanelл. В 9-ти из 10-ти изученных комбинаций хлДНК передавалась гибридам случайным образом, независимо от генотипа, степени филогенетической близости и уровня пloidности родительских видов (табл. 4, рис. 6). Однако в случае мт-геномов в большинстве комбинаций соотношение гибридов с мтДНК *S. tuberosum* и мтДНК дикого вида достоверно отличалось от случайного 1:1 ($P \leq 0,05$). При этом у подавляющего большинства соматических гибридов была выявлена мтДНК полиплоидного родительского вида (рис. 7, табл. 5). Например, из 20 проанализированных гибридов *S. nigrum* ($2n=6x=72$) и дигиплоида *S. tuberosum* Zel ($2n=2x=24$) 18 гибридов имели мтДНК гексаплоидного вида, и не было найдено ни одной формы с митохондриями диплоидной формы *S. tuberosum*. При слиянии протопластов разных уровней пloidности в гибридном ядре преобладают хромосомные наборы полиплоидного родителя. Такая ситуация может обуславливать специфические ядерно-цитоплазматические отношения, которые, в свою очередь, могут приводить к элиминации митохондрий диплоидного вида и обеспечивать селективное преимущество митохондриям полиплоидного родителя.

Динамика сегрегации различных типов оргanelл. В восьми из десяти изученных комбинаций были выявлены гетероплазматические формы, содержащие либо пластиды, либо митохондрии обоих родительских видов. Частота встречаемости гибридов с двуродительским наследованием пластид варьировала в зависимости от комбинации от 0,2% до 9,1% и в среднем составляла 2,9%. Доля гетерохондриомных гибридов оказалась значительно выше — в среднем 20,3% (таблицы 4 и 5). По частоте встречаемости этих форм были выявлены значительные различия между разными комбинациями. Особенно высокий процент

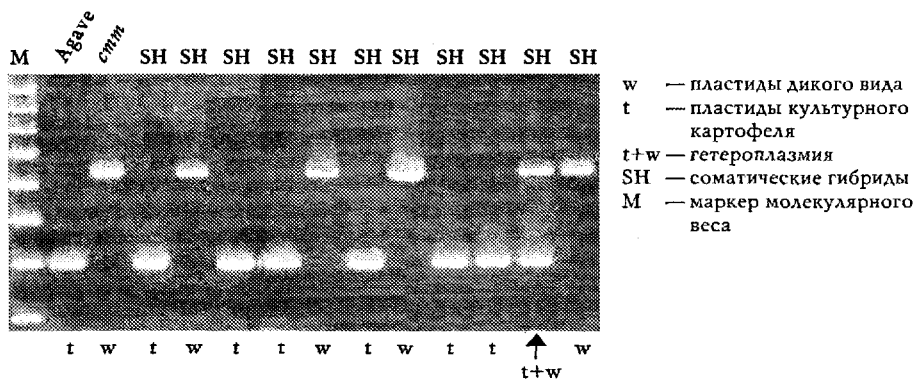


Рис. 6. Наследование пластидных геномов родительских видов у гибридов комбинации *S. commersonii* (+) *S. tuberosum*, сорт Agave (локус *atpE*). Электрофорез в 1,2% агарозном геле

гетероплазмии по мтДНК (90,4%) был обнаружен в комбинации *S. tarnii* (+) *S. tuberosum*, Delikat – мтДНК обоих родителей была выявлена у 47 гибридов из 52 изученных (табл. 5). Большее количество гибридных растений с двуродительским сочетанием митохондрий по сравнению с незначительным числом гетеропластидных форм свидетельствует о разной скорости сегрегации пластид и митохондрий после образования гибридной клетки.

Для двух комбинаций это предположение удалось проверить путем повторного анализа состава органелл гетероплазматических форм через три года поддержания гибридных растений в культуре *in vitro*. Оказалось, что гетерохондриомное состояние гибридов оставалось стабильным, в время как гетеропластидные формы сохранили хлДНК только одного из родительских видов. Очевидно, что сегрегация пластид происходила достаточно быстро и практически заканчивалась на стадии формирования регенерантов. У немпогих растений, сохранивших на этапе регенерации оба типа пластид, их сегрегация завершилась через три года. Сегрегация же митохондрий происходила настолько медленно, что состояние гетероплазмии по мтДНК оставалось стабильным и через значительный промежуток времени.

Реорганизация оргanelльных ДНК у соматических гибридов. В трех комбинациях были выявлены гибриды с перестройками мтДНК. У ряда гибридов были обнаружены новые амплификационные фрагменты, не встречающиеся у родительских форм (рис. 8, табл. 5). Амплифицированные *de novo* фрагменты стабильно воспроизводились при проведении ПЦР на препаратах ДНК, выделенных из одних и тех же растений с интервалом 3 года. Больше всего гибридов с такими новыми компонентами было найдено в комбинации *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum*, Delikat. Частота встречаемости *de novo*-амплифицированных фрагментов по локусу *rps14/cob* в этой комбинации составила 12,9%, а по локусу *rps10* — 6,45%. В этой же комбинации были обнаружены гибриды, имеющие

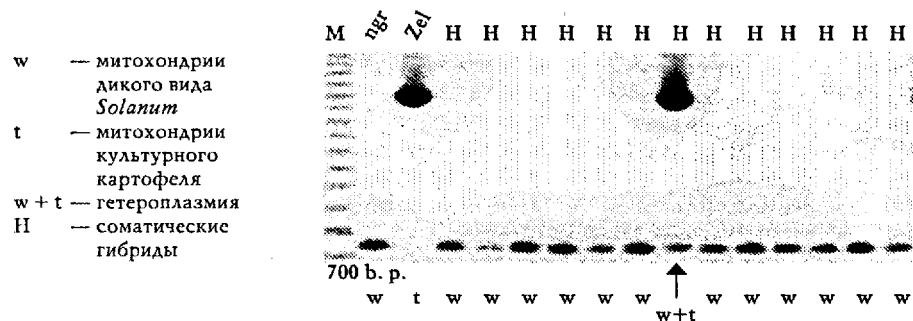


Рис. 7. Наследование митохондриальных геномов у гибридов комбинации *S. nigrum* (+) *S. tuberosum*, Zel (локус *rps 10*). Электрофорез в 1,2% агарозном геле

в одном локусе мтДНК аллель дикого вида, а в другом локусе мтДНК — аллель культурного картофеля. Возможными объяснениями появления таких гибридов могут быть рекомбинация между мтДНК родительских видов или преимущественная амплификация.

В случае пластидных геномов среди 413 соматических гибридов не найдено ни одного генотипа с перестройками хлДНК.

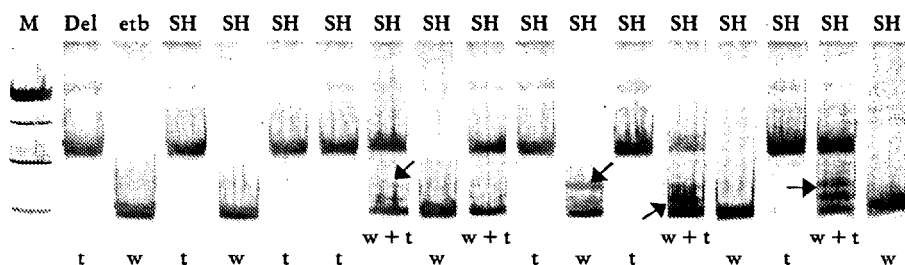
Таким образом, в нашей работе на больших выборках гибридов разных комбинаций выявлены различия в характере передачи хл- и мтДНК родительских видов, которые заключаются в следующем: 1) сегрегация пластид происходит случайным образом, тогда как характер передачи митохондрий зависит от уровня плоидности родителей и от видовой комбинации. Степень филогенетической близости родительских видов в пределах секции *Petota*, по нашим данным, не оказывает существенного влияния на характер передачи органелл; 2) скорость сегрегации пластид и митохондрий различна — состояние гетероплазмии по мтДНК является более продолжительным, тогда как «рассортировка» пластид родительских видов происходит достаточно быстро; 3) амплификационные

Таблица 4. Наследование пластидных ДНК у соматических гибридов

	Комбинация слияния протопластов культурного картофеля (<i>ibr</i>) с:	Уровень плоидн	Всего изучено гибридов	Число гибридов с пластидами			χ^2 (1:1)
				w	t	w + t	
видами серии <i>Commersoniana</i>							
1.	<i>S. commersonii</i> (+) <i>ibr</i> , Delikat	2x + 4x	58	22	33	3	2,20
2.	<i>S. commersonii</i> (+) <i>ibr</i> , Agave	2x + 4x	85	40	42	3	0,05
видами серии <i>Pinnatisecta</i>							
3.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) <i>ibr</i> , Delikat	2x + 4x	32	13	18	1	0,81
4.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) <i>ibr</i> , Agave	2x + 4x	37	16	21	0	0,68
5.	<i>S. tarnii</i> (+) <i>ibr</i> , Delikat	2x + 4x	52	20	30	2	2,00
видами серии <i>Bulbocastana</i>							
6.	<i>S. bulbocastanum</i> (+) <i>ibr</i> , Rasant	2x + 4x	22	13	7	2	1,80
видами серии <i>Etuberosa</i>							
7.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>ibr</i> , T67	2x + 2x	18	7	11	0	0,89
8.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>ibr</i> , Delikat	2x + 4x	31	20	11	0	2,61
9.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>ibr</i> , Agave	2x + 4x	58	36	18	4	6,00*
видами секции <i>Solanum</i>							
10.	<i>S. nigrum</i> (+) <i>ibr</i> , Zel	6x + 2x	20	9	11	0	0,20

Примечание: w — пластиды дикого вида; t — пластиды культурного картофеля; w+t — сочетание пластид родительских видов;

* — соотношение гибридов с пластидами культурного и дикого вида достоверно отличается от 1:1 при $P \leq 0,05$.



w — митохондрии дикого вида *Solanum*; t — митохондрии культурного картофеля; w + t — гетероплазмия; SH — соматические гибриды. Стрелками обозначены фрагменты, амплифицированные *de novo*.

Рис. 8. Образование *de-novo*-амплифицированных фрагментов мтДНК (локус *rps14/cob*) у соматических гибридов комбинации *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum*, сорт *Delikat*. Электрофорез в 10% ПААГ в неденатурирующих условиях

Таблица 5. Наследование митохондриальных ДНК у соматических гибридов

	Комбинация слияния протопластов культурного картофеля (<i>tbr</i>) с:	Уровень плоидн	Всего изучено гибридов	Число гибридов с митохондриями			χ^2 (1:1)
				w	t	w + t	
видами серии <i>Commersoniana</i>							
1.	<i>S. commersonii</i> (+) <i>tbr</i> , Delikat	2x + 4x	58	25 (0)	11 (0)	22 (0)	9,0*
2.	<i>S. commersonii</i> (+) <i>tbr</i> , Agave	2x + 4x	85	18 (0)	64 (0)	3 (0)	25,8*
видами серии <i>Pinnatisecta</i>							
3.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) <i>tbr</i> , Delikat	2x + 4x	—	—	—	—	—
4.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) <i>tbr</i> , Agave	2x + 4x	37	3 (0)	34 (2)	0	25,9*
5.	<i>S. tarnii</i> (+) <i>tbr</i> , Delikat	2x + 4x	52	5 (0)	0	47 (0)	5,0*
видами серии <i>Bulbocastana</i>							
6.	<i>S. bulbocastanum</i> (+) <i>tbr</i> , Rasant	2x + 4x	22	1 (0)	21 (0)	0	18,9*
видами серии <i>Etuberosa</i>							
7.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>tbr</i> , T67	2x + 2x	18	13 (0)	5 (0)	0	3,56
8.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>tbr</i> , Delikat	2x + 4x	31	14 (4)	8 (3)	9 (9)	1,64
9.	<i>S. etuberosum</i> (+) <i>tbr</i> , Agave	2x + 4x	58	21 (0)	30 (0)	7 (4)	1,59
видами секции <i>Solanum</i>							
10.	<i>S. nigrum</i> (+) <i>tbr</i> , Zel	6x + 2x	20	18 (0)	0	2 (0)	18,0*

Примечание: w — митохондрии дикого вида; t — митохондрии культурного картофеля; w + t — сочетание митохондрий родительских видов; «—» — не изучали. В скобках указано число рекомбинантных форм;

* — соотношение гибридов с митохондриями культурного и дикого вида достоверно отличается от 1:1 при $P \leq 0,05$.

фрагменты хлДНК у соматических гибридов были идентичны родительским, в то время как перестройки мтДНК встречались достаточно часто.

Совместимость пластид и митохондрий разных видов в клетках гибридных растений. В большинстве комбинаций были выявлены гибриды со всеми четырьмя возможными вариантами сочетаний пластид и митохондрий: (1) органеллы только дикого вида, (2) органеллы только культурного вида, (3) пластиды дикого вида и митохондрии культурного и (4) пластиды культурного и митохондрии дикого вида (табл. 6). В четырех комбинациях соотношение гибридов с возможными вариантами сочетаний органелл статистически не отличалось от случайного 1:1:1:1. В ряде комбинаций наиболее многочисленной группой оказались гибриды с неродительским сочетанием органелл (пластиды дикого вида и митохондрии культурного или наоборот). Равные соотношения гибридов с разными сочетаниями органелл родительских видов указывают на совместимость органелл разных видов картофеля.

Соматические гибриды комбинации *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum*, клон Т67 были вовлечены в скрещивания с культурным картофелем в качестве материнской формы (табл. 6). При этом было показано, что гибриды и с родительскими (вариант 1), и с неродительскими (варианты 3 и 4) сочетаниями органелл стабильно передавали свою цитоплазму половым потомкам поколений ВС₁ и ВС₂.

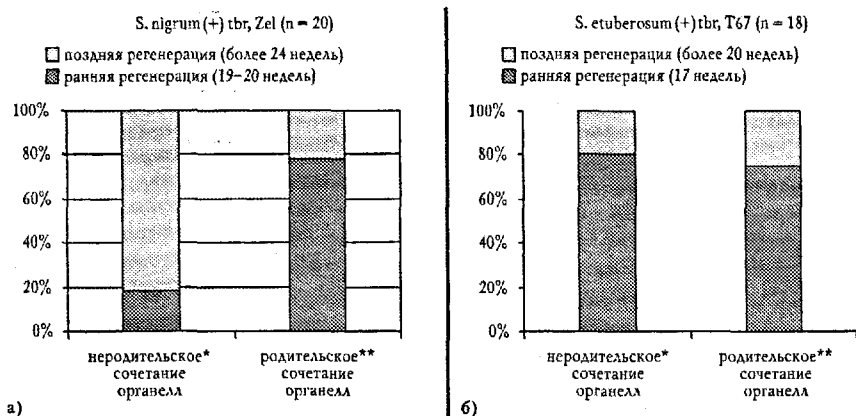


Рис. 9. Частота встречаемости гибридов с ранними сроками регенерации в зависимости от типа их цитоплазмы и филогенетической близости родительских видов: а) гибриды между видами разных секций: *Petota* и *Solanum*; б) гибриды между видами разных серий секции *Petota*

* — неродительское сочетание органелл — гибриды сочетают пластиды одного родительского вида и митохондрии другого (хл w/ мт t или хл t/ мт w);

** — родительское сочетание органелл — гибриды имеют органеллы одного из родительских видов (хл w/ мт w или хл t/ мт t).

Таблица 6. Сочетание органелл родительских видов у соматических гибридов разных комбинаций слияния протопластов

№ п/п	Комбинация слияния протопластов	Число гибридов с сочетанием органелл:				Гете- роплаз- мия	χ^2 (1:1:1:1)
		хл w/ мт w	хл t/ мт t	хл w/ мт t	хл t/ мт w		
Гибриды с видами серии <i>Commersoniana</i>							
1.	<i>S. commersonii</i> (+) tbr, Delikat	15	5	5	13	24	6,0
2.	<i>S. commersonii</i> (+) tbr, Agave	12	6	27	36	4	27,9**
Гибриды с видами серии <i>Pinnatisecta</i>							
3.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) tbr, Delikat	—	—	—	—	—	—
4.	<i>S. cardiophyllum</i> (+) tbr, Agave	3	21	13	0	0	29,9**
5.	<i>S. tarnii</i> (+) tbr, Delikat	2	0	0	2	48	4,0
Гибриды с видами серии <i>Bulbocastana</i>							
6.	<i>S. bulbocastanum</i> (+) tbr, Rasant	0	6	13	1	2	21,2**
Гибриды с видами серии <i>Etuberosa</i>							
7.	<i>S. etuberosum</i> (+) tbr, T67	5*	3	2*	8*	0	4,7
8.	<i>S. etuberosum</i> (+) tbr, Delikat	10	2	6	4	9	1,7
9.	<i>S. etuberosum</i> (+) tbr, Agave	15	10	19	4	10	10,5**
Гибриды с видами секции <i>Basartbrum</i>							
10.	<i>S. nigrum</i> (+) tbr, Zel	9	0	0	9	2	18,0**

Примечание: w — органеллы дикого вида *Solanum*; t — органеллы культурного картофеля;

* — от гибридов с данным сочетанием органелл было получено половое потомство BC₂;

** — соотношение классов гибридов с четырьмя возможными типами сочетания органелл статистически значимо отличается от (1:1:1:1) при $P \leq 0,05$ ($\chi^2_{\text{кр}} = 7,8$).

В шести комбинациях было также изучено влияние цитоплазматического состава гибридов на скорость регенерации (время от момента слияния протопластов до появления регенерантов), которая рассматривалась нами как показатель скорости протекания физиологических процессов и, таким образом, как свидетельство нормальной работы клетки при совмещении в ней органелл разных видов. Оказалось, что в комбинации между филогенетически отдаленными видами — культурный картофель *S. tuberosum* и паслен черный *S. nigrum* (секция *Solanum*) формирование регенерантов у гибридов с неродительскими сочетаниями органелл (варианты 3 и 4) происходило значительно медленнее, чем у гибридов, имеющих органеллы только одного из родительских видов. В то же время, у гибридов между филогенетически более близкими видами (в пределах секции *Petota*) новые типы цитоплазмы не оказывали заметного влияния на сроки регенерации растений (рис. 9).

Отсутствие различий в скорости регенерации у гибридов с разными сочетаниями органелл родителей указывает на отсутствие явных эффектов ядерно-цитоплазматической несовместимости в пределах секции *Petota*. Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о возможности существенного расширения генетического разнообразия цитоплазматических геномов селекционных сортов картофеля на основе соматической гибридизации.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен значительный полиморфизм последовательностей цитоплазматических ДНК у 63-х изученных видов рода *Solanum* L. В пластидном локусе *atpE* и во всех проанализированных митохондриальных локусах выявлены новые аллели.

2. Показана высокая обособленность неклонебносных видов серии *Etuberosa*, обладающих рядом специфичных аллелей. Мексиканские диплоидные виды серий *Pinnatisecta* и *Bulbocastana* на дендрограмме, построенной по результатам анализа полиморфизма пластидных ДНК также выделились в отдельную группу. Не выявлено соответствия между распределением по кластерам мексиканских полиплоидных, диких и культурных видов картофеля Южной Америки и принадлежностью этих видов к таксономическим сериям.

3. Установлен низкий уровень полиморфизма оргanelльных ДНК и преобладание «культурного» гаплотипа I в группах сортов зарубежной селекции, абorigенных чилийских и впервые — у отечественных сортов. Показано, что в современном сорimente частота встречаемости «культурного» гаплотипа значительно снижена, однако он остается преобладающим.

4. Выявлены различия в характере передачи соматическим гибридам пластидных и митохондриальных ДНК родительских видов:

— показано, что сегрегация пластид происходит случайным образом, тогда как передача митохондрий носит неслучайный характер. В большинстве комбинаций основная часть соматических гибридов наследует митохондрии от полиплоидного родительского вида; митохондрии от диплоидного вида получает лишь незначительная часть гибридов;

— выявлена различная скорость сегрегации пластид и митохондрий в процессе формирования гибридных растений — регенерантов;

— показана стабильность молекул хлДНК соматических гибридов, и выявлены формы с перестройками мтДНК.

5. Соотношение 1:1:1:1 соматических гибридов с разными вариантами сочетаний оргanelл родительских видов, выявленное в ряде комбинаций, а также одинаковая скорость регенерации таких гибридов указывают на отсутствии эффектов ядерно-цитоплазматической несовместимости и эффектов несовместимости пластид и митохондрий разных видов в пределах секции *Petota*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Антонова О. Ю. / Изучение наследования цитоплазматических геномов у соматических гибридов пасленовых / Гавриленко Т. А. // Материалы VIII Международной конференции «Биология растительных клеток *in vitro* и биотехнология». — Саратов, 2003. — С. 27.

2. Antonova O. / Somatic hybrids between *Solanum tarnii* and potato: a new source of resistance to virus diseases and late blight / Thieme R., Dinu I., Darsow U., Rakosy-Tican L., Kang Z., Gavrilenco T., Heimbach U. Thieme T. // Abstracts of Papers and Posters EAPR-EUCARPIA-Conference, Oulu, Finland. — 2003. — P. 49.

3. Antonova O. / Erschließung neuer Quellen für Virus-, Kraut und Braunfäule-Resistenz bei der Kartoffel durch biotechnologische Methoden. / Thieme R., Dinu I., Darsow U., Rakosy-Tican L., Kang Z., Gavrilenko T., Heimbach U., Thieme T. // Vortragstagung „Pflanzenbiotechnologie im Spannungsfeld von Forschung, Anwendung und fundamentaler Ablehnung“, Geisenheim am Rhein, Germany. — 2003. — P. 67–68.

4. Антонова О. Ю. / Анализ наследования цитоплазматических геномов у межвидовых соматических гибридов картофеля / Тиме Р., Щербакова А., Гавриленко Т. А. // Материалы III съезда ВОГиС. — Москва, 2004. — С. 146.

5. Антонова О. Ю. / Анализ наследования оргanelльной ДНК у межвидовых соматических гибридов картофеля / Тиме Р., Щербакова А., Федорина Я., Гавриленко Т. А. // Материалы международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». — Минск, 2004. — С. 292–293.

6. Antonova O. / Organelle DNA analyses in interspecific somatic hybrids of potato / Thieme R., Szczerbakowa A., Fedorina J., Wielgat B., Gavrilenko T. // Book of abstracts the 14th FESPB Congress, Cracow, Poland. — 2004. — P. 139.

7. Antonova O. / Organelle transmission in interspecific somatic hybrids of *Solanaceae* crops and wild non-tuberos *Solanum* species / Szczerbakowa A., Wielgat B., Gavrilenko T. // Book of abstracts the 14th FESPB Congress, Cracow, Poland. — 2004. — P. II.50.

8. Антонова О. Ю. / Полиморфизм оргanelльных ДНК у видов рода *Solanum* L. секции *Petota* Dumort. / Федорина Я., Гавриленко Т. А. // Материалы Пятитого международного совещания по кариологии, кариосистематике и молекулярной систематике растений. — СПб., 2005. — С. 9–10.

9. Antonova O. / Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNAs in interspecific somatic hybrids of potato / Gavrilenko T., Thieme R., Szczerbakowa A. and Wielgat B. // Abstracts of Papers and Posters EAPR-Conference, Bilbao, Spain. — Vol. 17. — P. 632–634.

10. Antonova O. / Utilization of the resistance to pathogens and pests in wild species of *Solanum* for breeding potatoes / Thieme R., Rakosy-Tican L., Gavrilenko T., Heimbach U., Schubert J., Nachtigall M. and Thieme T. // Abstracts of Papers and Posters EAPR-Conference, Bilbao, Spain. — 2005. — Vol. 17. — P. 246–250.

11. Антонова О. Ю. Изучение генетического полиморфизма диких видов картофеля на основе ПЦР-анализа оргanelльных ДНК / Гавриленко Т. А. // Материалы Научно-Практической Конференции «Современное Состояние и Перспективы Развития Селекции и Семеноводства Картофеля (к 75-летию ВНИИХ им. А. Г. Лорха)», 16–17 февраля 2006, Коренево // Вопросы картофелеводства. — М., 2006. — С. 248–259.

12. Антонова О. Ю. / Анализ типов цитоплазмы у селекционных сортов картофеля / Костина Л. И., Гавриленко Т. А. // Материалы Научно-Практической Конференции «Современное Состояние и Перспективы Развития Селекции и Семеноводства Картофеля (к 75-летию ВНИИХ им. А. Г. Лорха)», 16–17 февраля 2006, Коренево. — Вопросы картофелеводства, М. — 2006. — С. 235–242.

13. Антонова О. Ю. / Полиморфизм ядерной и цитоплазматических ДНК у аборигенных чилийских сортов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* / Швачко Н. А., Костина Л. И., Гавриленко Т. А. // Материалы Научно-Практической Конференции «Современное Состояние и Перспективы Развития Селекции и Семеноводства Картофеля (к 75-летию ВНИИХ им. А. Г. Лорха)», 16–17 февраля 2006, Коренево. — Вопросы картофелеводства, М. — 2006. — С. 205–211.

14. Антонова О. Ю. / Полиморфизм последовательностей оргanelльных ДНК видов картофеля и близких несеклубных видов рода *Solanum* / Гавриленко Т. А. // Экологическая генетика. — 2006. — № 1. — В печати.

Издательство «Петербургский институт печати»

Подписано в печать 03.03.2006.

Формат 60 x 84 $\frac{1}{16}$. Усл. печ. л. 1,62. Уч.-изд. л. 1,44.

Тираж 100 экз. Заказ № 10.

Отпечатано с оригинал-макета

в Издательско-полиграфическом центре СПБИ МГУП

191180, Санкт-Петербург, пер. Джамбула, 13

тел. (812) 315-91-32