

АНЕУПОЛОИДИЯ ПРИ СКРЕЩИВАНИЯХ *FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH. × *POTENTILLA* ANSERINA L.

Батури С. О., Филипенко Е. А.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Россия, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10
e-mail: SO_baturin@mail.ru

ANEUPLOIDY IN INTERGENERIC CROSSES BETWEEN *FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH. × *POTENTILLA* ANSERINA L.

Baturin S. O., Filipenko E. A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10, Lavrentjeva Ave., Novosibirsk, 630090, Russia
e-mail: SO_baturin@mail.ru

В настоящее время таксономическое родство представителей *Fragaria* L. и *Potentilla* L. активно обсуждается на основе фило-генетического анализа по молекулярным маркерам и результатам гибридизации. Согласно опубликованным сведениям при скре-щивании *F. × ananassa* Duch. (8x) × *P. anserina* L. (4x) возника-ют гаплоиды, 8х-потомки партеногенетического происхождения и анеуплоиды. Жизнеспособных гибридов не было получено. Нами проводились многолетние исследования по гибридизации *F. × ananassa* × *P. anserina* с целью получения 8х-агамоспермного потомства и изучения в этом потомстве характера генетической из-менчивости. В одном из экспериментов при использовании в скре-щивании пыльцы *P. anserina* наряду с матроморфными потомка-ми с 2n = 56 был получен один сеянец (№ 89-3), который являлся полностью стерильным, фенотипически незначительно отличался от *F. × ananassa*, т. е. соответствовал *Fragaria*-типу. Подсчет чи-сел хромосом в клетках корневой меристемы этого сеянца показал 2n = 6x = 42 промежуточное число хромосом между скрещиваемыми родительскими формами. Отсутствие каких-либо морфологических признаков опылителя (*P. anserina*) инициировало нас на проведение молекулярно-генетического анализа, чтобы окончательно прояс-нить его происхождение. Проведен RFLP-анализ гена ингибитора полигалактуроназы, а также ITS внутреннего транскрибируемого спейсера, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК, который показал, что сеянец № 89-3 и партеногенетические потом-ки по молекулярным маркерам соответствовали материнской форме *F. × ananassa*, т. е. сеянец № 89-3 является анеуплоидом. В связи с этим наиболее вероятным сценарием формирования у исследуе-мого образца № 89-3 хромосомного набора 2n = 42 следует считать элиминацию 14 хромосом *P. anserina* и 14 хромосом *F. × ananassa* во время первых делений гибридного зародыша (2n = 70), который возник в результате оплодотворения нередуцированной яйцеклетки *F. × ananassa* (n = 56) редуцированным спермием *P. anserina* (n = 14). В итоге это событие исключило геномный материал лапчатки в со-матических клетках сеянца. Появление анеуплоидов и партеногене-тических 8х-потомков при скрещиваниях *F. × ananassa* × *P. anserina*, позволяет изучать дополнительные механизмы формирования из-менчивости в роде *Fragaria*. Репродуктивная изоляция анеуплоида, ввиду его полной стерильности, позволяет использовать его лишь как почвопокровное растение. Кроме того, его фитомасса может быть пригодна для производства ферментированных чайных напит-ков.

Ключевые слова: *Fragaria × ananassa*, *Potentilla anserina*, межродовая гибридизация, ПЦР, RFLP, межродовые гибриды, анеуплоидия, элиминация хромосом

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Благодарности: Работа выполнена по бюджетному проекту № 0324-2019-0039.

Батури С. О., Филипенко Е. А. Анеуплоидия при скрещиваниях *Fragaria × ananassa* Duch. × *Potentilla anserina* L. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 24-31. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-24-31

Baturin S. O., Filipenko E. A. Aneuploidy in intergeneric crosses between *Fragaria × ananassa* Duch. × *Potentilla anserina* L. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 24-31. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-24-31

Батури С. О. orcid.org/0000-0002-7003-6661
Филипенко Е. А. orcid.org/0000-0002-5244-2893

Taxonomic relationship between *Fragaria* L. and *Potentilla* L. representatives is actively discussed today in the context of phylogenetic analysis by molecular markers and hybridization results. According to the data published, crosses between *F. × ananassa* Duch. (8x) × *P. anserina* L. (4x) produce haploids, parthenogenetic seedlings (8x) and aneuploids. No viable progenies have been obtained. Our long-standing research in *F. × ananassa* × *P. anserina* hybridization was targeted at obtaining 8x agamospermic progenies and studying their genetic variability. In one of the experiments, when *P. anserina* pollen was used in crosses, along with 2n = 56 matromorphous seedlings, an absolutely sterile seedling No. 89-3 was produced, which insignificantly differed from *F. × ananassa* by its phenotype, thus matching the *Fragaria* type. Chromosome number in root apical meristem cells appeared to be 2n = 6x = 42, being intermediate between the crossed parental forms. The absence of any morphological traits of the pollen parent (*P. anserina*) showed the need to make molecular genetic analysis in order to prove its hybrid origin. Methods. To trace its origin, the techniques of Polygalacturonase Inhibitor Proteins (PGIPs) PCR and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) PCR analysis of internal transcribed spacer (ITS) were applied to *F. × ananassa* × *P. anserina* seedlings. The study showed that seedling No. 89-3 and the parthenogenetic progenies are identical and correspond to the mother form (*F. × ananassa*). Hence, eliminating 14 chromosomes of *F. × ananassa* and 14 chromosomes of *P. anserina* during the first divisions of a zygote (2n = 70) should be considered as the most likely scenario for the 2n = 42 chromosome number development in the studied No. 89-3, so the genetic material of *P. anserina* was absent in the embryo's somatic cells. Development of aneuploids and parthenogenetic seedlings (8x) in the crosses of *F. × ananassa* × *P. anserina* makes it possible to study additional mechanisms of variability appearing in the *Fragaria* genus. Reproductive isolation of an aneuploid, due to its complete sterility, limits its use solely to a cover plant's role. In addition, its herbage biomass may be used for making fermented tea.

Keywords: *Fragaria × ananassa*, *Potentilla anserina*, intergeneric crosses, PCR, RFLP, intergeneric hybrids, aneuploidy, chromosome elimination

УДК: 575.222.73: 634.75

Поступила в редакцию: 12.10.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Введение

В настоящее время род *Fragaria* L. (Rosaceae) предлагается как удобная модель для исследований по экологической и эволюционной геномике (Liston et al., 2014), а также изучения естественных механизмов формообразовательного процесса. Этому способствуют наличие естественного полиплоидного ряда: $2n = 14, 28, 42, 56, 70$, при $x = 7$, позволяющего проводить межвидовую гибридизацию в различных направлениях, наличие полового полиморфизма и различных способов размножения: половой (гамоспермия и агамоспермия) и вегетативный. Помимо исследований по межвидовой гибридизации имеются успешные результаты и по межродовой гибридизации. При этом представители рода *Fragaria* использовались лишь в качестве материнской формы, а отцовской формой были представители родов *Potentilla* L. (Mangelsdorf, East, 1927; Asker, 1971; Barrientos, Bringham, 1973; Jelenkovic et al., 1984; Niemirowicz-Szczytt, 1987; Sukhareva, Baturin, 1985; Baturin, 1997), *Comarum* L. (Ellis, 1962; Asker, 1971); *Pentaphylloides* Duham. (Harland, 1957; Ellis, 1962; Asker, 1971; Jelenkovic et al., 1984; Niemirowicz-Szczytt, 1987; Sayegh, Hennerty, 1993; Kaczmarek, 2005) и *Duchesnea* (Smith) M. Shah & Wilcock. (Marta et al., 2004). Возможность получения растений при межродовой гибридизации *Fragaria* и *Potentilla*, пригодных для подсчета числа хромосом и анализа биоморфологических признаков, включая в отдельных случаях цветение, указывает на таксономическую близость данных родов. В настоящее время таксономическое родство представителей *Fragaria* и *Potentilla* активно обсуждается на основе филогенетического анализа с использованием молекулярных маркеров (Potter et al., 2000; Rousseau-Gueutin et al., 2009; DiMeglio et al., 2014; Faghir et al., 2014).

Нами проводятся многолетние исследования по гибридизации *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($8x$) × *P. anserina* L. ($4x$) с целью получения $8x$ -агамоспермного потомства для изучения характера генетической изменчивости в потомстве при агамоспермии (Sukhareva, Baturin, 1985; Baturin, 1997, 2001). В результате таких скрещиваний реализуется альтернативный путь развития зародыша, а именно из нередуцированной яйцеклетки по схеме псевдогамной диплоспории (Sukhareva, 1970; Kunz, Gröber, 1988; Baturin, 1997). При этом в семенном потомстве сохраняется материнское число хромосом ($2n = 56$), а численность потомства варьирует в зависимости от генотипа исходной материнской формы (Батурин, 1997). В агамоспермном потомстве проявляется генотипическая изменчивость по маркерным признакам, позволяющая судить о генотипе исходной материнской формы и глубине прохождения мейотических процессов при формировании нередуцированных женских гамет (Maletskii et al., 1994; Baturin et al., 1995). Жизнеспособные межродовые гибриды в семенных потомствах *F. × ananassa* при таких скрещива-

ниях отсутствуют, что делает межродовую гибридизацию удобным методом получения $8x$ -агамоспермных потомков. В одном из экспериментов при использовании в скрещиваниях пыльцы *P. anserina*, наряду с матроморфными потомками с $2n = 56$ был получен сеянец, который оказался полностью стерильным и фенотипически незначительно отличался от видовых признаков *F. × ananassa* (рис. 1). Подсчет чисел хромосом в клетках корневой меристемы этого сеянца показал $2n = 6x = 42$ – промежуточное число хромосом между скрещиваемыми родительскими формами. Сеянец был размножен вегетативно, зафиксирован как образец № 89-3 и предварительно зарегистрирован как «межродовой гибрид».

Однако отсутствие каких-либо морфологических признаков опылителя (*P. anserina*) инициировало нас на проведение молекулярно-генетического анализа, чтобы окончательно убедиться в его гибридном происхождении. Таким образом, целью исследования стал анализ происхождения сеянца № 89-3, полученного от межродового скрещивания *F. × ananassa* × *P. anserina*.

Материалы и методы

В эксперимент включены семенные потомки, полученные при опылении в полевых условиях *F. × ananassa* (гибрид № Л-11-51) × *P. anserina* ($4x$), а именно: образец № 89-3 ($6x$) и четыре фертильных партеногенетических ($8x$) потомка. Исходная материнская форма гибрид № Л-11-51 имела пестичный тип цветков, что исключило кастрацию. Тем не менее, во избежание посещения насекомыми опылителями раскрывающихся цветков, цветочек еще на стадии бутонизации был помещен в изолятор из прозрачного упаковочного целлофана. Цветки, опыленные пыльцой *P. anserina*, сразу были вновь помещены в изолятор и до созревания ягод изолятор не открывался. Опыление проводили однократно при помощи мягкой кисточки. Семена, полученные от скрещивания с *P. anserina*, после стратификации в холодильнике в течение 3-х месяцев при температуре $+3-4^{\circ}\text{C}$, проращивали в земляной смеси (1 часть дерновой земли, 1 часть торфяного перегноя, 1 часть чистого крупнозернистого речного песка), пикировали на стадии 3-4-х настоящих листочков и в фазе развития 6–8 листьев сеянцы высаживали на экспериментальном участке в подготовленную почву и регулярным поливом. Подсчет чисел хромосом у сеянцев проводили на кончиках корешков путем окрашивания хромосом лактопропионовым орсеином (Preeda et al., 2007).

Происхождение семенных потомков определяли, анализируя особенности строения гена ингибитора полигалактуроназы, а также ITS – внутреннего транскрибируемого спейсера, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК, характерные для каждого из скрещиваемых видов. Известно, что ген ингибитора полигалактуроназы у *P. anserina* короче аналогичного гена *F. × ananassa* на 83 пн вследствие имеющейся в нем делеции (данные Gene Bank).

В дополнение к этому последовательности исследуемого фрагмента гена у *F. × ananassa* и *P. anserina* содержат разное число сайтов рестрикции *TaqI*, расположенных в разных позициях, что позволяет использовать RFLP для эффективной дискриминации ДНК изучаемых видов растений. Эти характеристики определили выбор данного гена в качестве молекулярного маркера в нашем исследовании. ДНК из листьев изучаемых образцов была выделена с помощью набора для выделения Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas. Для проведения ПЦР с геном ингибитора полигалактуроназы были использованы специфические праймеры:

MarFxAPA_F 5'-CAAATCTAGCATGTTCTGGACAAATC-3'

MarFxAPA_R 5'-CTCAGTCCCTGACTTCTTCAGC-3'.

Для амплификации фрагментов ITS:

P1 5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'

и P2 5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3'

Далее амплифицированные фрагменты гена ингибитора полигалактуроназы были подвергнуты обработке эндонуклеазой рестрикции *TaqI*, а ПЦР-фрагменты ITS – *BsuRI* или *MspI*, в буферах и при температурах, оптимальных для каждого из перечисленных ферментов. Электрофоретическое разделение получившихся рестрикционных фрагментов проводили в 6% акриламидном геле.

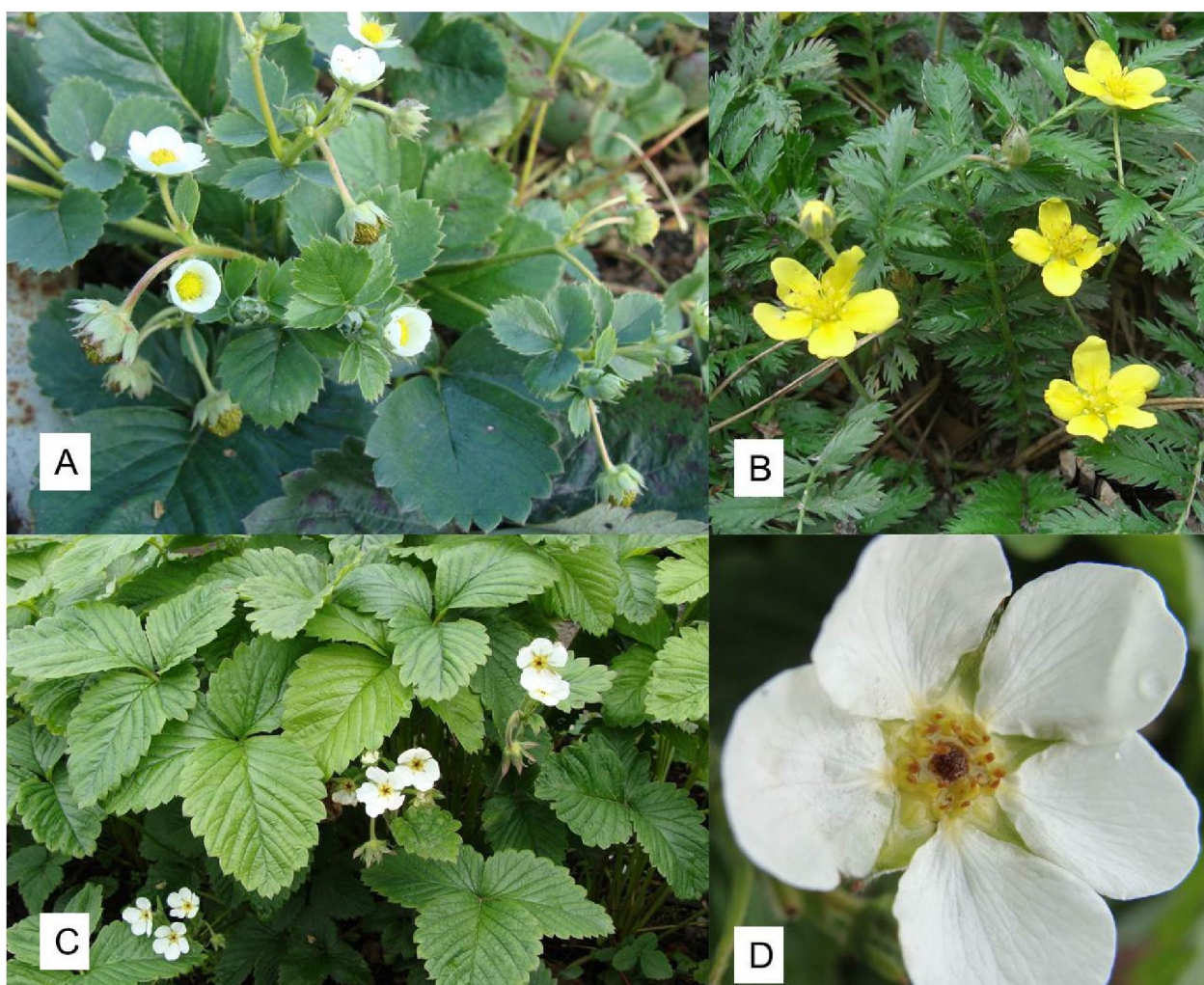


Рис. 1. Материнская форма *F. × ananassa* Duch. № L-11-51 ($2n = 56$) (A), отцовская форма *P. anserina* L. ($2n = 28$) (B) и их семенной потомок образец № 89-3 ($2n = 42$) (C). Полностью стерильный цветок образца № 89-3 (D).

Fig. 1. The maternal form *F. × ananassa* Duch. № L-11-51 ($2n = 56$) (A), paternal form *P. anserina* L. ($2n = 28$) (B) and their seed descendant specimen № 89-3 ($2n = 42$) (C). Fully sterile flower specimen № 89-3 (D).

Результаты

Результаты RFLP-анализа структуры гена ингибитора полигалактуроназы у родительских форм *F. × ananassa* и *P. anserina* и их потомков представлены на рисунке 2. В результате амплификации родительских ДНК у *F. × ananassa* (трек 2) синтезировалось два фрагмента вместо ожидаемого одного. В дополнение к ожидаемому фрагменту, характерному для материнского генома, синтезировался второй, более короткий, по размеру совпадающий с ПЦР-фрагментом *P. anserina* (трек 12). Возможной причиной расхождения ожидаемого и полученного результатов ПЦР следует считать недостаточную информацию об особенностях организации исследуемого гена. Кроме того, возможно наличие в геноме *F. × ananassa* дополнительных гомологичных районов с используемыми

для ПЦР олигонуклеотидными праймерами. Для всех потомков обеих групп характерно наличие двух ПЦР-фрагментов, один из которых (более длинный) свидетельствует о вкладе материнского генома, в то время как происхождение короткого, совпадающего по длине с отцовским, невозможно однозначно интерпретировать (треки 4, 6, 8 и 10). Тем не менее, полученные *TaqI* – рестрикционные профили ПЦР-фрагментов семенного потомства *F. × ananassa* × *P. anserina*, т. е. образца № 89-3 (трек 9) и партеногенетических потомков (треки 3, 5 и 7) выявили их идентичность материнской форме *F. × ananassa* (трек 1), тогда как после обработки эндонуклеазой рестрикции у *P. anserina* был выявлен фрагмент (трек 11), присущий лишь ему, а у других образцов он отсутствовал. Результат анализа гена ингибитора полигалактуроназы указывает на отсутствие у потомков генетического материала *P. anserina*, включая исследуемый образец № 89-3.

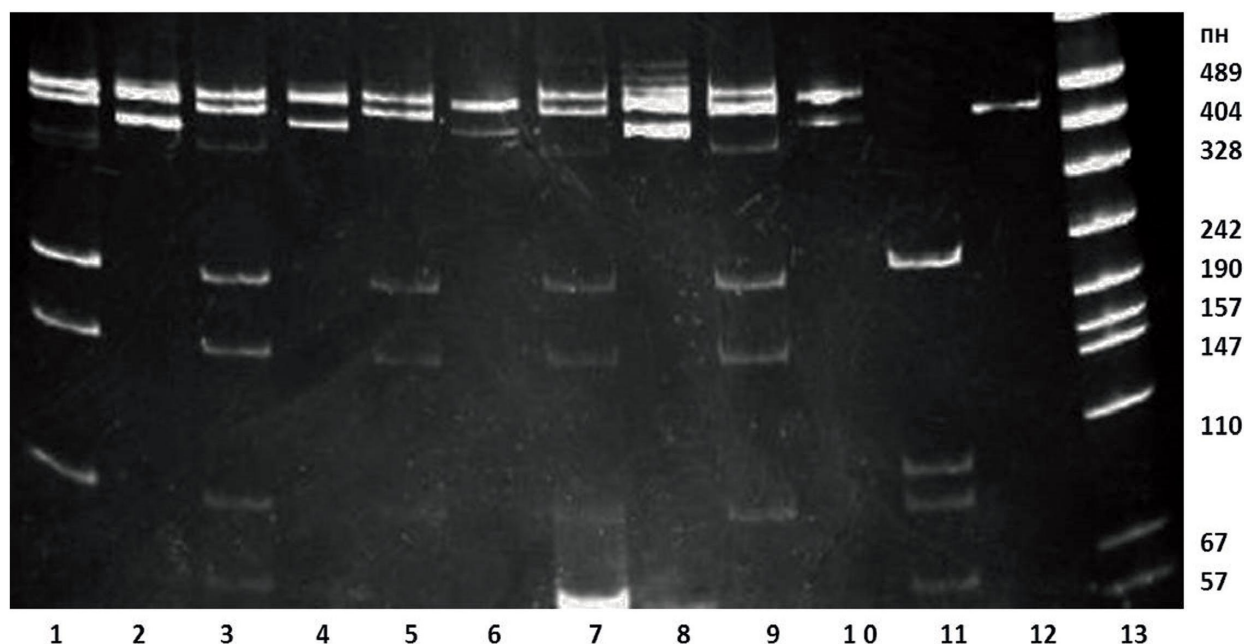


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР фрагментов (четные треки) и рестрикционных фрагментов после обработки эндонуклеазой рестрикции *TaqI* (нечетные треки): *F. × ananassa* Duch. (треки 1 и 2), партеногенетические потомки *F. × ananassa* (треки 3–7, 10 – разные генотипы), образец № 89-3 (треки 8, 9), *P. anserina* L. (треки 11, 12), ДНК pBluescript/*MspI* (трек 13).

Fig. 2. The electrophoregram of PCR fragments (even tracks) and the restriction fragments after the treatment with *TaqI* restriction endonuclease (odd tracks): *F. × ananassa* Duch. – maternal form (tracks 1, 2), parthenogenetic seedlings of *F. × ananassa* (tracks 3–7 and 10 different genotypes); specimen № 89-3 (tracks 8, 9); *P. anserina* L. – paternal form (tracks 11, 12), DNA marker pBluescript / *MspI* (track 13).

В продолжение эксперимента с выяснением происхождения образца № 89-3 был дополнительно проведен молекулярно-генетический анализ с использованием транскрибируемого спейсера ITS, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК. В настоящее время считается общепринятым, что последовательности спейсера, расположенные между структурными генами рРНК, обладают всеми характеристиками молекулярного маркера, поскольку ITS имеются в геномах всех представителей исследуемого таксона (в нашем случае семейства Rosaceae) и ITS достаточно вариабельны для того, чтобы выявлять различия у разных представителей внутри исследуемой группы. Достаточно информативным представляется ПЦР фрагмента спейсера ITS с последующей обработкой синтезированного фрагмента одной из «чаштощепящих» эндонуклеаз рестрикции, образующей полиморфные по длине фрагменты ДНК, которые визуализируются на электрофореграмме. Полное совпадение по

длине и количеству *MspI*- и *BsuRI*-фрагментов у потомков (треки 7 и 8, 1 и 2) и *F. × ananassa* (треки 9, 3) (рис. 3) согласуется с результатом генетического исследования о том, что потомки являются партеногенетическими, а значит, содержат только материнскую ДНК, и свидетельствует о достоверности результата, полученного молекулярными методами. Расположение и длина *MspI*-фрагментов у сеянца № 89-3 (трек 10) идентичны партеногенетическим потомкам и *F. ananassa*. Обращают на себя внимание *BsuRI*-рестрикционные фрагменты сеянца № 89-3, которые совпадают по длине с таковыми у других исследуемых потомков и матери, кроме одного дополнительного, имеющегося только у него одного (трек 4). Однако этот фрагмент отсутствует у *P. anserina* (трек 5), а один из фрагментов уникален для *P. anserina*, и отсутствует у других образцов, включая № 89-3. Таким образом, это дает нам основание исключить присутствие генетического материала *P. anserina* в геноме сеянца № 89-3

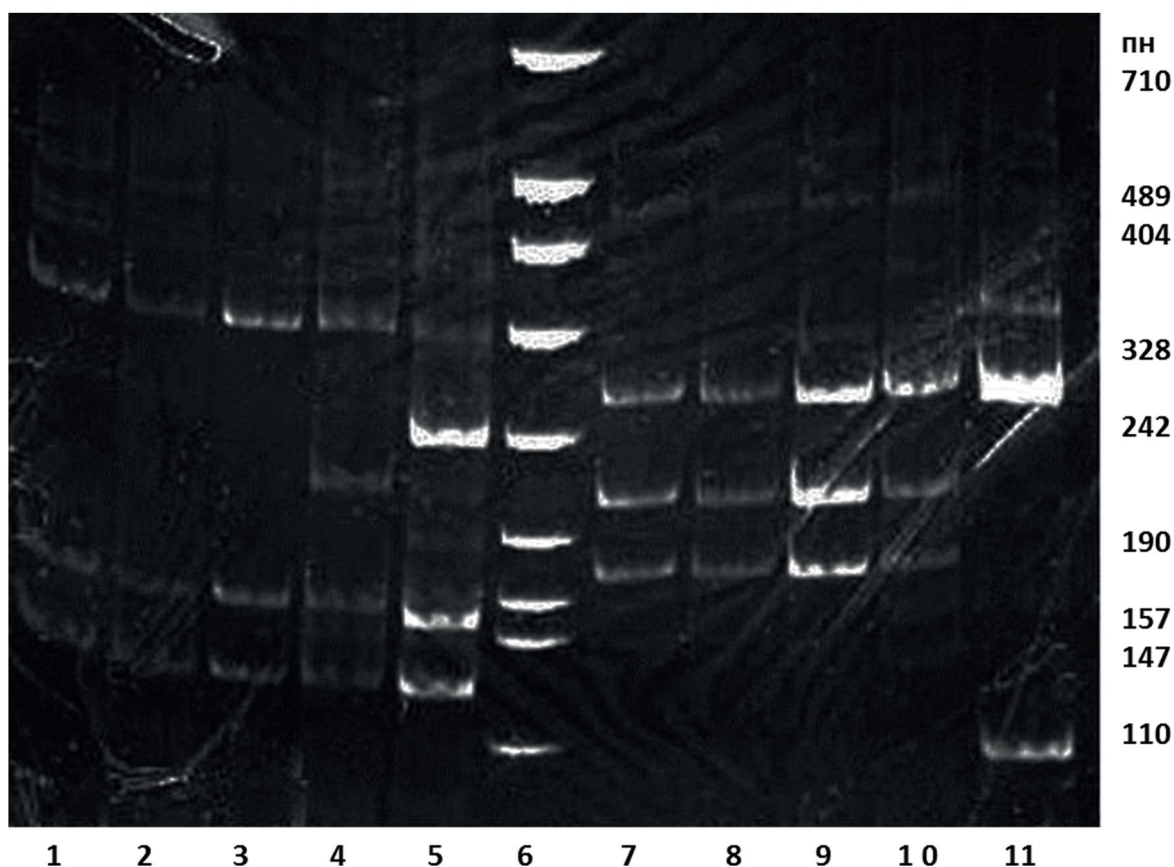


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК, подвергнутых обработке эндонуклеазами рестрикции *BsuRI* (треки 1-5) и *MspI* (треки 7-11): *F. × ananassa* Duch. – материнская форма (треки 3 и 9); партеногенетические потомки (треки 1, 2, 7, 8); образец № 89-3 (треки 4 и 10); *P. anserina* L. – отцовская форма (треки 5 и 11); ДНК-маркер pBluescript/*MspI* (трек 6).

Fig. 3. The electrophoregram of DNA amplification products subjected to *BsuRI* restriction processing (tracks 1-5) and *MspI* (tracks 7-11): *F. × ananassa* Duch. – maternal form (tracks 3 and 9); parthenogenetic seedlings of *F. × ananassa* (tracks 1, 2, 7, 8); specimen № 89-3 (tracks 4 and 10); *P. anserina* L. – paternal form (tracks 5, 11); DNA marker pBluescript / *MspI* (track 6).

Обсуждение

Наиболее простым молекулярно-генетическим методом, позволяющим выявлять происхождение потомков при отдаленной гибридизации, является выявление особенностей строения одного и того же гена у материнской и отцовской формы, а также у их потомков. Однако это не всегда является возможным вследствие того, что в настоящее время первичная нуклеотидная последовательность всего генома определена лишь у небольшого числа растений. Особенно сложно проводить дифференциальный анализ генов у видов, геномы которых являются полиплоидными как у *F. × ananassa*.

Использование при отдаленной гибридизации полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, обладающих видоспецифичностью, в качестве маркерных систем, позволяет безошибочно выявлять в семенном потомстве межвидовые и межродовые гибриды. Одним из таких молекулярных маркеров является внутренний транскрибируемый спейсер ITS. Показано, что ITS как некодирующие последовательности эволюционируют с высокой скоростью и могут существенно отличаться даже у близкородственных видов. Эти характеристики позволяют использовать ITS для филогенетических исследований и классификации растений на разных таксономических уровнях — родовом, видовом и подвидовом (Feliner, Rosselló, 2007). Важным отличием внутренних транскрибируемых спейсеров является двуродительское наследование ITS, поскольку в случае однородительского (цитоплазматического, агамоспермного) наследования маркера невозможно точно идентифицировать недавно возникшие гибриды (Alvarez, Wendel, 2003). Проведенный нами анализ ПЦР фрагментов ITS с последующей их обработкой эндонуклеазами рестрикции показал, что в геноме предполагаемого «межродового гибрида» (образец № 89-3) отсутствует генетический материал *P. anserina*. Проанализированные потомки от скрещивания *F. × ananassa* и *P. anserina* — образец № 89-3 и партеногенетические сеянцы, по ITS соответствуют материнской форме *F. × ananassa*. Дополнением к полученному результату явился анализ особенностей строения гена ингибитора полигалактуроназы у родительских видов *P. anserina* и *F. × ananassa*, а также партеногенетических потомков и предполагаемого «межродового гибрида» — образца № 89-3. Данный анализ также подтвердил отсутствие генетического материала *P. anserina* в геноме образца № 89-3, что в конечном итоге позволяет идентифицировать образец № 89-3 как анеуплоид, а не межродовой гибрид. Появление дополнительных сайтов рестрикции *BsuRI*, в результате чего образовался новый фрагмент после обработки эндонуклеазой рестрикции в исследуемом районе сеянца № 89-3 — предмет дальнейших исследований. Одной из причин его появления можно предположить наличие

внутривидового и внутриорганизменного полиморфизма ITS района (Alvarez, Wendel, 2003).

Следует отметить, что скрещивания *F. × ananassa* с участием пыльцы *P. anserina* (4х) предпринимались неоднократно. Первые упоминания об использовании пыльцы *P. anserina* в скрещиваниях с представителями *Fragaria* приводятся в работе J. K. Jones (1955). Однако ни один из полученных проростков не достиг полноценного развития. В опытах Г. Н. Шангина-Березовского (Shangin-Berezovsky, 1962) по скрещиванию *F. × ananassa* × *P. anserina*, все полученные сеянцы в своем развитии достигли лишь фазы 1–2 настоящих листочков и затем погибли. Осталось неясным, были ли это гибриды или гаплоиды. S. Asker (1971) получил жизнеспособные сеянцы, однако они оказались агамоспермного происхождения, т.е. содержали $2n = 8x = 56$. Автор предполагает происхождение октоплоидного набора хромосом у сеянцев благодаря редупликации яйцеклетки, развивающейся партеногенетически. Исследователи F. Barrientos и R. Bringham (1973) при скрещивании крупноплодной земляники сорта Tioga с *P. anserina* из 34 семян получили 2 сеянца. Один из них оказался тетраплоидом ($2n = 28$), цвел и образовывал столоны, другой был полустерильным октоплоидом ($2n = 56$). При опылении сортов крупноплодной земляники пыльцой *P. anserina* H. Hughes и J. Janick (1974) получили гаплоидные и октоплоидные сеянцы, а G. Jelenkovic с соавторами (1984) получили 6 матроморфных сеянцев (8х) с изменчивостью по многим признакам. Гибридов получить не удалось. Таким образом, из опубликованных сведений по гибридизации *Fragaria × Potentilla* использование в качестве опылителя *P. anserina* не дало положительного результата в получении межродовых гибридов.

Следует отдельно остановиться на одном из самых объемных экспериментов по скрещиванию различных сортов *F. × ananassa* с представителями *Potentilla* (19 видов), который был осуществлен K. Niemirowicz — Szczytt (1987). За период 1977–1980 гг. ею было получено 99 194 семян при межродовой гибридизации *Fragaria × Potentilla*. Большая часть семян оказалась невосхожей. Всхожие семена были получены лишь при использовании пыльцы диплоидных видов *P. geoides* Bieb., *P. rupestris* L., *P. purpureoides* L., *P. glandulosa* Lindl., *P. fruticosa* L. и гексаплоидного вида *P. fragiformis* Willd. В комбинациях скрещиваний с участием этих видов автору удалось получить 153 растения, пригодных для определения числа хромосом. Из них большая часть растений (41%) были тетраплоиды — 63 шт., пентаплоиды — 29 шт., гексаплоиды — 27 шт., октоплоиды — 13 растений, триплоиды — 9, по одному растению указано в группе диплоидов и гептаплоидов и 10 растений отнесены к миксоплоидам и анеуплоидам. Тщательный биоморфологический анализ 123 растений из этой группы не выявил присутствия у них каких-либо признаков *Potentilla*. Автор заключает, что все растения, полученные в результате опыления земляники пыльцой *Potentilla*, характеризовались признаками, присущими

только материнским формам (Niemirówicz-Szczytt, 1987). Таким образом, в выводах автора нет однозначного утверждения о гибридном происхождении 29 пентаплоидов, полученных в комбинациях скрещиваний $8x \times 2x$.

Схожий результат был получен W. Macfarlane и J. Jones (1985) в скрещиваниях *F. moschata* Duch. ($2n=42$) с *P. fruticosa* ($2n=14$). Из 554 семян было получено лишь 9 взрослых растений. Пять растений погибло до цветения, а остальные четыре были мощными, но стерильными. Четыре растения имели ожидаемое для гибрида число хромосом ($2n=28$), одно растение имело ($2n=21$) в соматических клетках, а четыре были анеуплоидами с 23, 24, 25 и 27 хромосомами в соматическом наборе соответственно. Авторы полагают, что все девять растений произошли от нормального оплодотворения, которое в некоторых случаях сопровождалось устранением хромосом на ранней стадии развития эмбриона.

Итак, анализируемый образец № 89-3 не обнаруживает морфологических признаков опылителя – *P. anserina*, хотя и содержит промежуточное число хромосом $2n = 6x = 42$, ожидаемое для межродового гибрида. Анализ его происхождения по молекулярным маркерам подтвердил отсутствие генетического материала опылителя. В таком случае возникает вопрос о происхождении промежуточного числа хромосом для гибрида у этого образца. Показано, что в скрещиваниях *Fragaria* $\times$ *Potentilla* пыльцевые трубки представителей *Potentilla* прорастают сквозь ткани столбика и достигают зародышевого мешка (Niemirówicz-Szczytt, 1987; Baturin, 1997). Кроме того, возможность оплодотворения в скрещиваниях *Fragaria* $\times$ *Potentilla* подтверждается наличием немногочисленных межродовых гибридов в скрещиваниях *F.* $\times$ *ananassa* $\times$ *P. fruticosa* (Harland, 1957; Ellis, 1962; Jelenkovic et al., 1984; Sayegh, Hennerty, 1993); *F.* $\times$ *ananassa* $\times$ *P. palustris* L. (Ellis, 1962); *F. moschata* $\times$ *P. fruticosa* (Asker, 1970) и др. Причем в оплодотворении могут принимать участие как нередуцированные женские гаметы (Bringhurst, Gill, 1970; Sukhareva, 1978; Nosrati et al., 2013), так и мужские нередуцированные гаметы (Sukhareva, 1970, 1978; Yanagi et al., 2010), образуя алополиплоиды и анеуплоиды при гетероплоидных скрещиваниях. В связи с этим мы полагаем, что наиболее вероятным сценарием формирования у исследуемого образца № 89-3 хромосомного набора $2n = 42$ следует считать элиминацию 14 хромосом *P. anserina* и 14 хромосом *F.* $\times$ *ananassa* во время первых митотических делений зиготы ($2n = 70$), образовавшейся при оплодотворении нередуцированной яйцеклетки *F.* $\times$ *ananassa* ($n = 56$) редуцированным спермием *P. anserina* ($n = 14$). В итоге геномный материал гусиной лапчатки в последующих делениях зародыша отсутствовал, и сеянец проявляет лишь признаки *F.* $\times$ *ananassa*. Подобное преобразование гибридного генома вплоть до уменьшения размера генома (Eilam et al., 2008), в настоящее время интерпретируется как проявление «геномного шока», присущего постзиготической несовместимости при отдаленной

гибридизации. Согласно Л. А. Першиной и Н. В. Трубацеевой (Pershina, Trubacheeva, 2016) при отдаленной гибридизации: «Ранние этапы постзиготического периода являются критическими для развивающихся гибридных семян из-за гибели зародышей, в том числе связанной с однородительской элиминацией хромосом из гибридных клеток и аномальным развитием эндосперма». Обсуждая перспективы практического использования образца № 89-3, первоначально стоит отметить его высокую зимостойкость (0 баллов подмерзания), плотную облиственность, высокую силу роста и обилие усов, которые он показывает в течение многих лет наблюдения за ним (с 2010 года) при выращивании в открытом грунте. Эти качества анеуплоида в совокупности с наличием в листьях каротиноидов и хлорофиллов «а» и «в» на уровне содержания таковых в листьях фармакопейного лекарственного растения *Fragaria vesca* L. (неопубликованные данные) обуславливают перспективность его использования для производства ферментированных чайных напитков (Baturin et al., 2001). Безусловно, наличие у образца полной стерильности исключает его непосредственное использование в селекционных программах. Тем не менее, он может быть перспективен для использования в проектах по озеленению как почвопокровное растение.

Заключение

Скрещивания *F.* $\times$ *ananassa* ($8x$) $\times$ *P. anserina* ($4x$) представляют собой привлекательную модель изучения геномных взаимодействий. При таких скрещиваниях наличие $8x$ -потомков указывает на агамоспермный путь их происхождения, а отсутствие межродовых гибридов – на постзиготический характер несовместимости при объединении в зиготе геномов родительских форм. Однако появление $6x$ -анеуплоида следует рассматривать как возможность преодоления постзиготического барьера несовместимости при отдаленных скрещиваниях за счет элиминации части генома зиготы, включающего хромосомы отцовского родителя. Репродуктивная изоляция анеуплоида, ввиду его полной стерильности, обуславливают перспективность использования его лишь как почвопокровное растение, а также получения фитомассы для производства ферментированных чайных напитков.

References/Литература

- Alvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*; 29: 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Asker S (1970) An intergeneric *Fragaria* $\times$ *Potentilla* hybrid. *Hereditas* 64: 135–139. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1970.tb02281.x>
- Asker S (1971) Some viewpoints on *Fragaria* $\times$ *Potentilla* intergeneric hybridization. *Hereditas* 67: 181–190. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1971.tb02372.x>
- Barrientos F, Bringhurst RS (1973) A haploid of an octoploid strawberry cultivar. *Hort. Science*; 8: 44.
- Baturin SO (1997) Experimental apomixis in garden strawberries (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.) (Eksperimental'nyj apomiksiz u sadovoj zemlyaniki (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.)) : Extended

- Abstract of Cand. Sci. Dissertation. Novosibirsk, 1997. 16 p. [in Russian] (Батури́н С. О. Экспериментальный апоми́ксис у садовой земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1997. 16 с.).
- Baturin SO (2001) The morphology of apomictic progenies of *Fragaria* × *ananassa* Duch. analysis. *Agricultural Biology*, 1: 39–43 [in Russian] (Батури́н С. О. Сравнительно-морфологический анализ апомиктического потомства крупноплодной земляники. Сельскохозяйственная биология. 2001. № 1. С. 39–43).
- Baturin SO, Sukhareva NB, Bagautdinov RG, Kondratieva IV (2001) Prospects for utilization and ways to increase the productivity of strawberry phytomass (Perspektivy utilizatsii i puti povysheniya produktivnosti fitomassy zemlyaniki). In : Mater. mezh. nauchno-prakt. konf. "Pishcha. Ekologiya. Kachestvo". In : Mater. of the intern. scien.-pract. conf. "Food. Ecology. Quality". Novosibirsk: 56–58 [in Russian] (Батури́н С. О., Сухарева Н. Б., Багавтудинов Р. Г., Кондратьева И. В. Перспективы утилизации и пути повышения продуктивности фитомассы земляники – В Сб. матер. межд. научно-практ. конф. «Пища. Экология. Качество.» Новосибирск, 2001. С. 56–58).
- Baturin SO, Sukhareva NB, Maletskii SI (1995) Application of apomixis for studying inheritance of everbearing habit in garden strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Russian Journal of Genetics*, 31(10): 1207–1212 [in Russian] (Батури́н С. О., Сухарева Н. Б., Малецкий С. И. Использование апомиксиса для изучения наследования ремонтантности у Земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1995. Т. 31, № 10. С. 1418–1424).
- Bringham RS, Gill T (1970) Origin of *Fragaria* polyploids. II Unreduced and doubled-unreduced gametes. *J. Bot.* 57(8): 969–976.
- DiMeglio LM, Staudt G, Yu H, Davis TM (2014) A phylogenetic analysis of genus *Fragaria* (strawberry) using intron-containing sequence from the *ADH-I* gene. *PloS ONE*, 9(7):e102237. doi: 10.1371/journal.pone.0102237
- Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M (2008) Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*, 51: 616–627. DOI: 10.1139/G08-043
- Ellis JR *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria* (1962). *Proc. Linn. Soc. Lond.*; 173: 99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1962.tb01300.x>
- Faghir MB, Attar F, Farazmand A, Kazempour Osaloo S (2014) Phylogeny of the genus *Potentilla* (Rosaceae) in Iran based on nrDNA ITS and cpDNA *trnL-F* sequences with a focus on leaf and style characters' evolution. *Turk. J Bot.*; 38: 417–429. DOI:10.3906/bot-1303-67
- Feliner GN, Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // *Mol. Phylogenet. Evol.*; 44(2): 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.013>
- Jelenkovic G, Wilson ML, Harding PJ (1984) An evaluation of intergeneric hybridization of *Fragaria* spp. × *Potentilla* spp. as a means of haploid production. *Euphytica*, 33: 143–152. <https://doi.org/10.1007/BF00022760>
- Jones JK Cytogenetic studies in the genera *Fragaria* and *Potentilla* (1955) Ph. D. thesis. Univ. of Manchester, UK.
- Harland SC (1957) Cytogenetical investigations on soft fruits. *Progr. Rep. for the period ending 31 May 1957*, Univ. Manchester, Dep. Bot., A.R.C. 57: 347.
- Hughes HG, Janick J (1974) Production of tetrahaploids in the cultivated strawberry. *Hort. Science*, 9(5): 442–444.
- Kaczmarzka E (2005) Ocena zróżnicowania genetycznego potomstwa *Fragaria moschata* × *Potentilla fruticosa* przy użyciu markerów RAPD. *Annales Univ. Maria Curie-Skłodowska. Lublin-Polonia*. XV: 145–155.
- Kunz E, Gröber K (1988) Über das Vorkommen meiotischer und apomeiotischer Embryosacke in der Gattung *Fragaria* (L.). *Kulturpflanze* 36(3): 317–330. <https://doi.org/10.1007/BF02034814>
- Liston A, Crown R, Ashman T (2014) *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *Amer. J. of Bot.*; 101(10): 1686–1699. DOI: 10.3732/ajb.1400140
- Macfarlane Smith WH, Jones JK (1985) Intergeneric crosses with *Fragaria* and *Potentilla*. I. Crosses between *Fragaria moschata* and *Potentilla fruticosa*. II. Crosses between the progeny of *Fragaria moschata* × *Potentilla fruticosa* and the original parents. *Euphytica*, 34(3): 725–744. <https://doi.org/10.1007/BF00035410>
- Maletskii SI, Sukhareva NB, Baturin SO (1994) Sex inheritance in apomictic seedlings of the garden strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Russian Journal of Genetics*, 30(2): 214–219 [in Russian] (Малецкий С. И., Сухарева Н. Б., Батури́н С. О. Наследование пола у апомиктических сеянцев Земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 237–243).
- Mangelsdorf AJ, East EM (1927) Studies on the genetics of *Fragaria*. *Genetics*, 12: 307–339.
- Marta A, Camadro E, Díaz-Ricci J, Castagnaro A (2004) Breeding barriers between the cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa* and related wild germplasm. *Euphytica*, 136(2): 139–150. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000030665.95757.76>
- Niemirówicz-Szczyt K (1987) Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) haploids and their generative progeny. Induction and characteristics. Warsaw Agricultural University Press, 71.
- Nosrati H, Price AH, Gerstberger P, Wilcock CC (2013) The first report of an alloheptaploid from the genus *Fragaria* (Rosaceae) // *New Journal of Botany*, 3(3): 205–209. DOI: 10.1179/2042349713Y.0000000033
- Pershina LA, Trubacheeva NV (2016) Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 20(4): 416–425 [in Russian] (Першина Л. А., Трубащева Н. В. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. 20. № 4. С. 416–425). DOI 10.18699/VJ16.082
- Potter D, Luby JJ, Harrison RE (2000) Phylogenetic relationship among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Syst. Bot.*; 25(2): 337–348. <https://doi.org/10.2307/2666646>
- Preeda N, Yanagi T, Sone K, Taketa S, Okuda N (2007) Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries. *Scientia Horticulturae*, 114(2): 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.001>
- Rousseau-Guettin M, Gaston A, Ainouche A, Ainouche ML, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B (2009) Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylog. Evol.*; 51: 515–530. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.12.024
- Sayegh AJ, Hennerty MJ (1993) Intergeneric hybrids of *Fragaria* and *Potentilla*. *Acta Horticulturae*, 348: 151–154. <https://doi.org/10.17660/ActaHort.1993.348.19>
- Shangin-Berezovsky GN (1962) The maternal inheritance in strawberries (O materinskoy nasledovaniy u zemlyaniki). *Trudy Instituta genetiki – Proceedings of the Institute of Genetics*, 26: 68–84 [in Russian] (Шангин-Березовский Г. Н. О материнском наследовании у земляники // Тр. Ин-та генетики. 1962. 26. С. 68–84).
- Sukhareva NB (1970) Elements of apomixis in strawberries (Elementy apomiksisa u zemlyaniki). In: Apomixis i selektsiya – In: Apomixis and Selection. Novosibirsk: 116–120 [in Russian] (Сухарева Н. Б. Элементы апомиксиса у земляники В кн.: Апомиксис и селекция. Новосибирск, 1970. С. 116–120).
- Sukhareva NB (1978) The value of unreduction of gametes in *Fragaria* (Znachenie neredukttsii gamet u *Fragaria*). In : Apomixis u rastenij i zhivotnykh – In : Apomixis in plants and animals. Novosibirsk: 118–128 [in Russian] (Сухарева Н. Б. Значение нередуции гамет у *Fragaria*. В кн. : Апомиксис у растений и животных. Новосибирск, 1978. С. 118–128).
- Sukhareva NB, Baturin SO (1985) Intergeneric crossings in *Fragaria* (O mezhrodovyykh skreshhivaniyakh *Fragaria*). In: Teoreticheskiye osnovy selektsii – Theoretical bases of selection. Novosibirsk: 151–162 [in Russian] (Сухарева Н. Б., Батури́н С. О. О межродовых скрещиваниях *Fragaria*: Теоретические основы селекции. Новосибирск, 1985. С. 151–162).
- Yanagi T, Hummer KE, Iwata T, Sone K, Nathewet P, Takamura T (2010) Aneuploid strawberry ($2n = 8x + 2 = 58$) was developed from homozygous unreduced gamete ($8x$) produced by second division restitution in pollen // *Scientia Horticulturae*, 125(2): 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.015>