

РАЗНООБРАЗИЕ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА ОБРАЗЦОВ ЛУКА МНОГОЯРУСНОГО *ALLIUM* × *PROLIFERUM* (MOENCH) SCHRAD. EX WILLD. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ВИР

Пендинен Г.И.^{1*}, Чернов В.Е.²

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44;
✉ *pendinen@mail.ru

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194175, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6 лит. Ж

Актуальность. Лук многоярусный *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 (2n=2x=16) – вид, для которого характерно только вегетативное размножение: воздушными или подземными луковицами. Показано, что образцы этого вида являются гибридами *Allium cepa* и *Allium fistulosum* (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983; Puizina, Papes, 1999). В коллекции *in vitro* ВИР сохраняются образцы *A. × proliferum*, которые были получены из разных источников, однако, их родословная нам неизвестна. Поэтому существует необходимость определения уровня плоидности и геномного состава образцов, поддерживаемых в коллекции. **Материал и методы.** В исследовании использовали 13 образцов *A. × proliferum*, сохраняемых в коллекции *in vitro* ВИР. Для характеристики уровня плоидности и геномного состава образцов использовали методы молекулярной цитогенетики: FISH с хромосомоспецифичными маркерами: 5S и 18S/25S рДНК и GISH с дифференциально мечеными ДНК предполагаемых родительских видов: *A. cepa* и *A. fistulosum*. **Результаты.** GISH анализ показал, что все изученные образцы представляют собой гибриды *A. cepa* с *A. fistulosum*. Большая часть (10 из 13 изученных) образцов были определены как диплоидные гибриды, кариотип которых включает восемь хромосом *A. cepa* и восемь хромосом *A. fistulosum*. Образец К 3206 также представляет собой диплоидный 16-ти хромосомный гибрид с восемью хромосомами *A. cepa*, семью – *A. fistulosum* и одной перестроенной хромосомой. Образцы К 3205 и К 3202 представляют собой полиплоидные формы. У *A. × proliferum* К 3202 выявлено семь хромосом *A. cepa* и 16 хромосом *A. fistulosum*, одна из которых имеет локализованную терминально интрогрессию генетического материала *A. cepa*. Для образца К 3205 характерно наличие 16-ти хромосом *A. cepa* и 13 хромосом *A. fistulosum*. У этого образца выявлена только одна хромосома *Allium fistulosum* с локусом 5S рДНК. **Выводы.** Таким образом, в коллекции представлены образцы лука многоярусного, имеющие кариотипические различия.

Ключевые слова: лук многоярусный, *Allium* × *proliferum*, межвидовые гибриды, *in situ* гибридизация.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

DIVERSITY OF CHROMOSOMAL COMPOSITION IN TOP ONION *ALLIUM* × *PROLIFERUM* (MOENCH) SCHRAD. EX WILLD. ACCESSIONS FROM THE VIR *IN VITRO* COLLECTION

Pendinen G.I.^{1*}, Chernov V.E.²

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;
✉ *pendinen@mail.ru

² S. M. Kirov Military Medical Academy, 6 Zh, Acad. Lebedev Street, St. Petersburg, 194175, Russia;

Background. Top onion, *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 (2n=2x=16), is a species that is characterized by vegetative propagation by air or underground bulbs only. Accessions of this species have been shown to be hybrids of *Allium cepa* and *Allium fistulosum* (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983; Puizina and Papes, 1999). Accessions of *Allium* × *proliferum* were obtained from various sources and conserved in the *in vitro* collection of VIR. However, their pedigree was unknown, therefore there was a need to determine the ploidy level and genomic composition of these accessions. **Materials and Methods.** Thirteen *Allium* × *proliferum* accessions from the VIR *in vitro* collection were studied. To characterize the ploidy level and genomic composition of the accessions, the research employed FISH with chromosome-specific markers (5S and 18S/25S rDNA) and GISH with differentially labeled DNA of the putative parent species, i.e., *A. cepa* and *A. fistulosum*. **Results.** According to GISH, all the studied accessions were hybrids of *A. cepa* and *A. fistulosum*. Most (10 out of 13) accessions were determined as diploid hybrids with eight *A. cepa* and eight *A. fistulosum* chromosomes. The accession K 3206 turned out to be a diploid 16-chromosome hybrid with eight *A. cepa*, seven *A. fistulosum* chromosomes and one rearranged chromosome. Accessions K 3205 and K 3202 were found to be polyploids. The *A. × proliferum* accession K 3202 contained seven *A. cepa* and 16 *A. fistulosum* chromosomes. The accession K 3205 is characterized by the presence of 16 chromosomes hybridizing with *A. cepa* DNA and 13 chromosomes hybridizing with *A. fistulosum* DNA. Only one chromosome of *A. fistulosum* in this accession was revealed to have a 5s rDNA locus. **Conclusions.** The above shows that the collection contains top onion accessions with karyotypic differences.

Key words: top onion, *Allium* × *proliferum*, interspecific hybrids, *in situ* hybridization.

Для цитирования: Пендинен Г.И., Чернов В.Е. Разнообразие хромосомного состава образцов лука многоярусного *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd. из коллекции *in vitro* ВИР. Биотехнология и селекция растений. 2019;2(3):6-14. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-o2

For citation: Pendinen G.I., Chernov V.E. Diversity of chromosomal composition in top onion (*Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd.) accessions from the VIR *in vitro* collection. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):6-14. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-o2

ORCID:

Pendinen G.I. <https://orcid.org/0000-0003-2814-7074>

УДК 575.222.7:635.25/26

Поступила в редакцию: 10.10.2019

Принята к публикации: 17.11.2019

Введение

Лук многоярусный *Allium × proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 – многолетнее растение, размножающееся только вегетативно: воздушными или подземными луковицами. Его характерной особенностью является образование на семенных стрелках луковиц вместо цветков в 2, 3 и даже в 4 яруса. Наряду с луковицами, в соцветиях могут формироваться стерильные цветки (Puizina, 2013). В литературе можно встретить этот вид под названиями *A. aobatum* Araki и *A. wakegi* Araki – для образцов восточно-азиатской группы, или *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef и *A. cepa* var. *proliferum* (Moench) Schrad. – для образцов евразийской группы (Fritsch, Friesen, 2002). Изначально его классифицировали как разновидность лука репчатого (Helm, 1956). Это диплоидный вид ($2n=4x=16$), однако кариотип лука многоярусного является псевдодиплоидным. На основании результатов сравнительного морфологического анализа хромосом *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef, *A. cepa* L. и *A. fistulosum* L. было выдвинуто предположение о гибридной природе лука многоярусного (Bozzini, 1964). Позднее это было подтверждено в ряде исследований с использованием методов дифференциального окрашивания хромосом (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983). Основываясь на данных, подтверждающих гибридную природу лука многоярусного, Шуберт с соавторами вводят название вида *Allium × proliferum* (Moench) Schrad. (Schubert et al., 1983). В дальнейшем при изучении различных образцов посредством геномной *in situ* гибридизации (GISH) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием в качестве проб (зондов) 5S и 18S рДНК было подтверждено, что лук многоярусный и *A. wakegi* Araki являются межвидовыми гибридами между *A. cepa* L. и *A. fistulosum* L. (Friesen, Klaas, 1998; Puizina, Papes, 1999; Hizume, 1994; Khrustaleva et al., 2010). Анализ разнообразия *A. × proliferum* с использованием пяти систем изоферментов подтвердил гибридную природу этого вида, а также выявил его политопическое происхождение (Maass, 1997).

Лук многоярусный не является столь широко возделываемой и экономически значимой культурой, как лук репчатый *A. cepa* или чеснок *A. sativum*. Тем не менее, культивирование этого многолетнего вида широко распространено на приусадебных и дачных участках в Европе, Северной Америке, Северо-Восточной Азии (Fritsch, Friesen, 2002) для использования в пищу зеленых листьев, которые отрастают, начиная с весны и до осенних холодов. Это холодостойкая культура, выдерживающая мороз до 45 градусов под снежным покровом без дополнительного укрытия (Avrov, 1961). Один из родителей лука многоярусного – лук батун *A. fistulosum* является источником ряда ценных признаков, таких как устойчи-

вость к ряду патогенов, таких как возбудители антракноза *Colletotrichum gloeosporioides* (Galvan et al, 1997), листовой гнили *Botrytis squamosa* (Curran, Maude, 1984), розовой корневой гнили *Purenjchaeta terrestris* (Netzer et al, 1985). Поэтому батун привлекают в межвидовые скрещивания с луком репчатым. Описаны формы, полученные на основе межвидовых гибридов, обладающие устойчивостью к таким патогенам, как возбудитель пероноспороза *Peronospora destructor*, возбудитель стемфилиоза лука *Stemphylium vesicarium*, полученные на основе межвидовых гибридов (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019).

Существуют данные о получении растений, сходных с луком многоярусным, в экспериментах по межвидовой гибридизации. Так, Ершов и Юрьева сообщают, что при скрещивании *A. vavilovii* с *A. fistulosum* среди растений F_1 была выявлена форма, сходная по фенотипическим характеристикам с луком многоярусным: на стрелках образовывались воздушные луковицы, цветки в соцветиях не развивались, в последующих вегетативных поколениях признаки многоярусного лука сохранялись (Ershov, Yureva, 1985). В этой же публикации авторы приводят информацию о выявлении растения с признаками лука многоярусного среди растений поколения F_3 гибрида лука репчатого и батун. У форм, выщепляющихся в поколениях более поздних, чем F_1 , и фенотипически схожих с луком многоярусным, кариотип может претерпеть изменения.

В коллекции *in vitro* ВИР сохраняются образцы *A. × proliferum*, которые были получены из разных источников, однако, их родословная нам неизвестна. Целью нашей работы было изучение разнообразия геномного и хромосомного состава образцов лука многоярусного *A. × proliferum* (Moench) Schrad. из коллекции *in vitro* ВИР с использованием методов молекулярной цитогенетики.

Материалы и методы.

В работе были исследованы 13 образцов лука многоярусного *A. × proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd. 1809, 11 из которых были получены из полевой коллекции ВИР, введены и сохраняются в *in vitro* с 2003 г., 1 – собран на территории республики Марий Эл, около города Йошкар-Ола, где культивировался на садовом участке более 30 лет, в культуре *in vitro* с 2014 г.; 1 – из Германии, в культуре *in vitro* с 2018 г. Используемые в работе образцы лука из коллекции *in vitro* представлены в таблице 1.

Образцы *Allium cepa* К 5320 и *Allium fistulosum* Русский зимний (К 3244) использовали для получения меченых проб ДНК родительских геномов для GISH экспериментов. Растения лука-батун получены из семян и выращены в почвенной культуре.

Таблица 1. Образцы *Allium* из коллекции *in vitro* ВИР, использованные в исследовании

Table 1. Studied *Allium* accessions from the VIR *in vitro* collection.

№ п/п	Вид	№ по каталогу	Происхождение	Год введения в культуру <i>in vitro</i>
1	<i>A. × proliferum</i>	3202	Сибирский ботанический сад	2003
2	<i>A. × proliferum</i>	3203	Ленинградская область (ЛСХИ)	2003
3	<i>A. × proliferum.</i>	3204	Ленинградская область	2003
4	<i>A. × proliferum</i>	3205	Ленинградская область	2003
5	<i>A. × proliferum</i>	3206	Алтайский край.	2003
6	<i>A. × proliferum</i>	3207	Ленинградская область	2003
7	<i>A. × proliferum</i>	3208	Ленинградская область	2003
8	<i>A. × proliferum</i>	3209	Алтайский край	2003
9	<i>A. × proliferum</i>	3210	Краснодарский край	2003
10	<i>A. × proliferum</i>	3211	Ленинградская область, завезен из Омской области	2003
11	<i>A. × proliferum</i>	3212	Ленинградская область	2003
12	<i>A. × proliferum</i>	И: 0157901	Республика Марий Эл, Россия,	2014
13	<i>A. × proliferum</i>	И: 632061	Германия, Мекленбург - Передняя Померания	2018
14	<i>A. cepa ssp. ascalonicum</i>	5320	Алтайский край	2004

Растения образцов лука многоярусного высаживали из культуры *in vitro* в почву и выращивали в условиях естественных фотопериода и температуры в весенне-летний период. Для анализа использовали по 3 растения каждого образца.

Фиксация материала и подготовка препаратов митотических хромосом. Для цитогенетического анализа корешки укорененных в почве растений помещали в воду со льдом (0°C) на сутки, затем в фиксатор 3:1 (96% этиловый спирт: ледяная уксусная кислота), фиксации хранили в морозильнике (-20°C) до использования. Для цитогенетического анализа готовили давленные препараты из корневой меристемы, обработанной в течение 50 мин. раствором мацерирующих ферментов, содержащим целлюлазу (1,07 U/mg, Sigma, Cellulase c22178, Япония) в концентрации 40 мг/мл и пектолиазу (0,94 U/mg, Sigma, Pectolyase p3026, Япония) в концентрации 10 мг/мл.

Подготовка ДНК. ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* выделяли по протоколу Бернатского и Тенксли (Bernatzky, Tanksley, 1986).

Геномную ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* и плазмидную ДНК, несущую 18S/25S рДНК (зонд Ver17) (Yakura, Tanifuji, 1983) метили методом Nick – трансляции с использованием DIG-Nick Translation Mix и Bio-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics); меченую биотином 5S рДНК получали методом ПЦР с использованием праймеров согласно Gottlob-McHugh с соавторами (Gottlob-McHugh et al., 1990).

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH, GISH). Флюоресцентную *in situ* гибридизацию проводили,

взяв за основу стандартные методики (Leitch et al, 1994; Pendinen et al, 2008).

FISH с дифференциально мечеными 18S/25S (DIG) и 5S (BIO) рДНК провели для определения их числа и локализации на митотических хромосомах лука многоярусного. Затем для идентификации геномной принадлежности хромосом на тех же препаратах провели GISH с дифференциально мечеными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum*. В двухцветной GISH-FISH для детекции биотиновой пробы использовали streptavidin–Cy3 (CyTM-conjugated Streptavidin, Jacson Immuno Research Laboratories, Inc. Dianova) в концентрации 6 ng/μl, для детекции дигоксигениновой метки – Anti Digoxigenin-Fluorescein (Roche Diagnostics) в концентрации 6 ng/μl. Хромосомы контрастировали раствором DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1.0 ng/μl).

Анализ препаратов и создание изображений проводили с использованием эпифлюоресцентного микроскопа AxioImager M2 с камерой AxioCamMRm и программным обеспечением AxioVision Rel 4.8.(ZEISS, Германия)

Результаты

Анализ хромосомного состава образцов лука многоярусного из коллекции *in vitro* ВИР с использованием FISH и хромосомспецифичных маркеров (5S и 18/25S рДНК) и GISH с дифференциально мечеными ДНК предполагаемых родительских видов выявил их гибридную природу.

В геноме родительских видов сайты 18S/25S рДНК локализованы терминально в коротких плечах двух пар хромосом (хромосомы 6 и 8) генома *A. cepa* (рисунк 1а, в, г), одна из которых со спутником (хромосома 6,

рис.1в), и в коротком плече одной пары спутничных хромосом *A. fistulosum* (рис. 1д, ж), сайты 5S рДНК, локализованы в коротких плечах 7-й хромосомы: *A. cepa* (2 сайта, рис. 1б) и *A. fistulosum* (1 сайт) (рис. 1д, е).

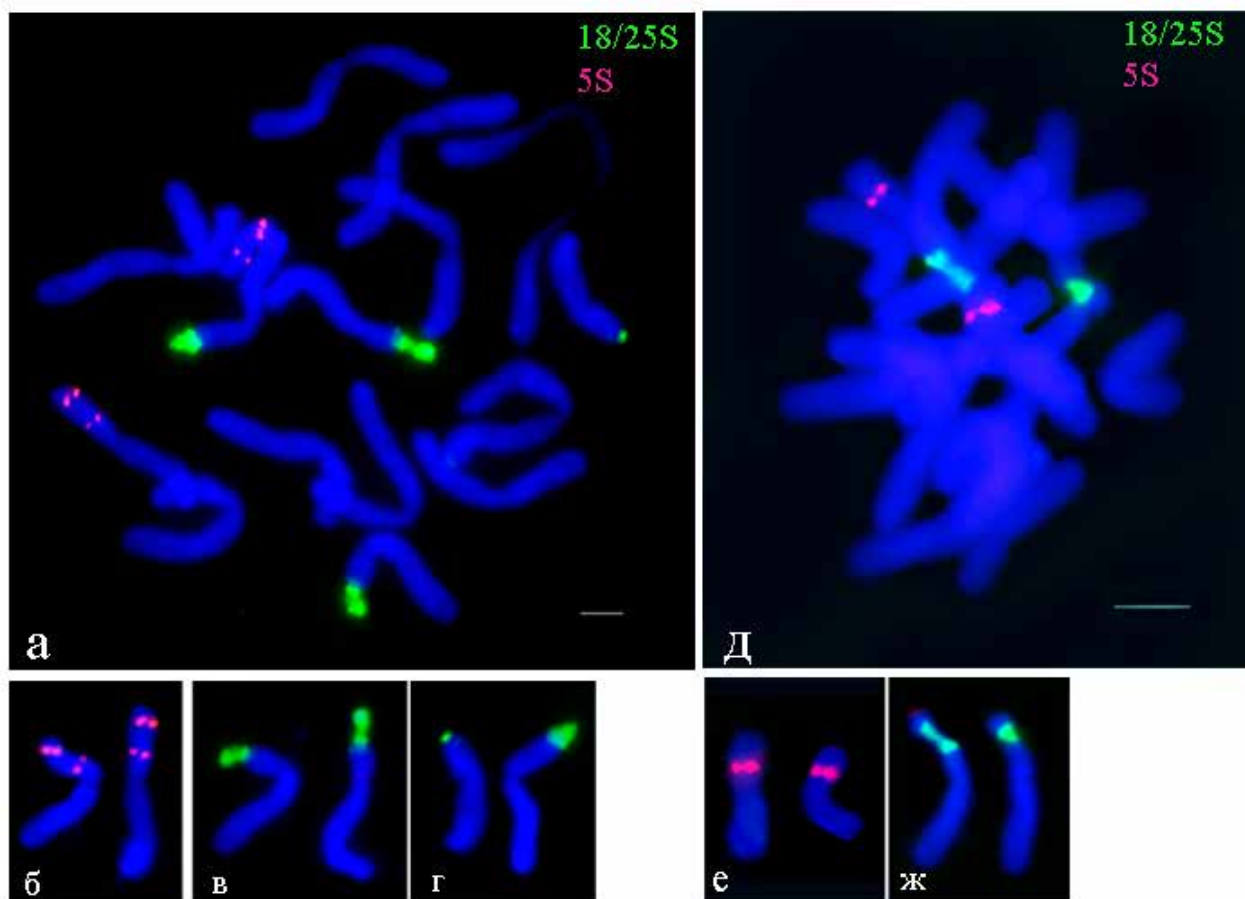


Рис. 1. Локализация маркеров 5S 18/25S рДНК на митотических хромосомах *A. cepa* (а – г) и *A. fistulosum* (д – е). а – FISH с хромосомами *A. cepa* (К 5320) – идентифицированы: б – пара хромосом 7 с двойным 5S маркером в коротком плече, в – пара хромосом 6 с сателлитом в коротком плече, г – пара хромосом 8 с 18/25S маркером в коротком плече; д – FISH с хромосомами *A. fistulosum* Русский зимний: е – пара хромосома 7 с одним 5S маркером в коротком плече, ж – пара хромосом с сателлитом в коротком плече.

Fig. 1. Localization of 5S and 18/25S rDNA markers on mitotic chromosomes of *A. cepa* (а – г) and *A. fistulosum* (д – е). а – FISH with *A. cepa* (k-5320) chromosomes; identified: б – chromosome 7 pairs with a double 5S marker on the short arm, в – chromosome 6 pair with a satellite on the short arm, г – chromosome 8 pair with 18/25S marker on the short arm; д – FISH with *A. fistulosum* (cv. Russkii zimnii) chromosomes: е – chromosome 7 pair with one 5S marker on the short arm, ж – pair of chromosomes with a satellite on the short arm.

GISH анализ показал, что все изученные образцы *A. × proliferum* представляют собой межвидовые гибриды *A. cepa* с *A. fistulosum* (таблица 2, рисунки 2 – 4), однако, было выявлено некоторое разнообразие кариотипов и уровня пloidности.

Большая часть образцов *A. × proliferum* – 10 из 13 пред-

ставляют собой гибриды ($2n=2x=16$), в кариотипе которых выявлены по восемь хромосом родительских видов (табл. 2, рис. 2, б, и). У семи из них (К 3204; К 3208; К 3210; К 3211; К 3212; К 3209; И:632061) число и распределение на хромосомах маркеров рДНК соответствует этой характеристике родительских видов (рис. 2., а – ж).

Таблица 2. Характеристика хромосомного состава образцов *A. × proliferum* из коллекции *in vitro* ВИР
Table 2. Details of chromosome composition of *A. × proliferum* accessions from the VIR *in vitro* collection

Образцы	Число хромосом				Хромосом с маркером			
	всего	<i>cepa</i> *	<i>fist</i> **	<i>cepa/fist</i>	18S/25S		5S	
					<i>cepa</i>	<i>fist</i>	<i>cepa</i>	<i>fist</i>
К 3204; К 3208; К 3210; К 3211; К 3212; К 3209; И:632061	16	8	8	0	2	1	1	1
К 3202; К 3207; И:о157901	16	8	8	0	3	1	1	1
К 3206	16	8	7	1	2	1	1	1
К 3205	29	16	13	0	4	2	2	1
К 3203	23	7	15	1***	3+1***	4	1	2
<i>A. cepa</i> ssp. <i>ascalonicum</i> К 5320	16	16	-	-	4	-	2	-
<i>A. fistulosum</i> К 3244	16	-	16	-	-	2	-	2

* - *A. cepa*; ** - *A. fistulosum*, *** - хромосома *A. fistulosum* с небольшой терминальной интрогрессией *A. cepa*, несущей 18S/25S маркер.

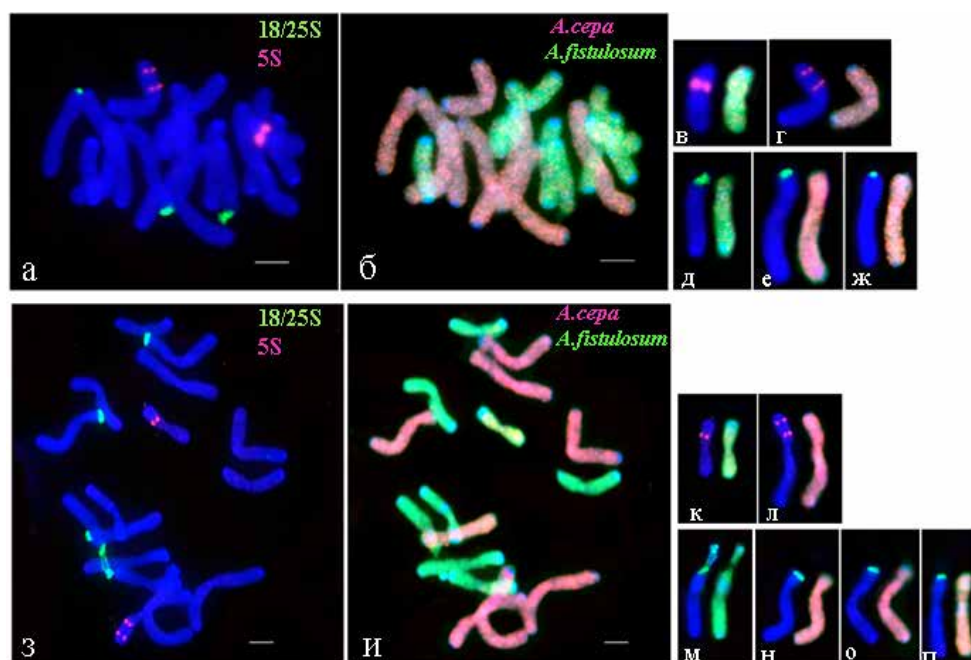


Рис. 2. FISH с маркерами 5S и 18/25S рДНК и GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* митотических хромосом диплоидных образцов *A. × proliferum* (а – ж) – К 3212: а – результат FISH с 5S и 18/25S маркерами, б – та же клетка после GISH; в, г – хромосомы 7 с 5S маркером геномов *A. fistulosum* и *A. cepa* соответственно; д – е – хромосомы с маркером 18/25S – спутничная хромосома *A. fistulosum* (д) и 2 хромосомы *A. cepa* (е, ж), одна из которых хромосома 6 – спутничная (е). (з – п) – И:о157901: з – результат FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, и та же клетка после GISH; к, л – хромосомы 7 с 5S маркером хромосом *A. fistulosum* и *A. cepa* соответственно; м – п хромосомы с маркером 18/25S – спутничная хромосома *A. fistulosum* (м) и три хромосомы *A. cepa* (н – п), одна из которых хромосома 6 – спутничная (н).

Fig. 2. FISH with 5S and 18/25S rDNA markers and GISH with genomic DNA *A. cepa* and *A. fistulosum* mitotic chromosomes of labeled accessions *A. × proliferum* (а – ж) – k-3212: а – the result of FISH with 5S and 18/25S markers, б – the same cell after GISH; в, г – chromosomes 7 with 5S marker of *A. fistulosum* and *A. cepa* genomes, respectively; д – е – chromosomes with 18/25S marker – satellite chromosome of *A. fistulosum* (д) and two *A. cepa* chromosomes (е, ж), one of which i.e., chromosome 6, is a satellite chromosome (е). (з – п) – I:о157901: з – the result of FISH with 5S and 18/25S chromosome markers, and the same cell after GISH; к, л – chromosomes 7 with 5S marker of *A. fistulosum* and *A. cepa*, respectively; м – п – chromosomes with 18/25S marker – satellite chromosome of *A. fistulosum* (м) and 3 chromosomes of *A. cepa* (н – п), one of which, i.e., chromosome 6, is a satellite chromosome (н).

У перечисленных семи образцов сайты 18S/25S рДНК локализованы терминально в коротких плечах двух хромосом *A. cepa* (рис. 2, а, е, ж) и в одной хромосоме *A. fistulosum* (рис. 2, а, г), сайты 5S рДНК выявлены у *A. cepa* в одной хромосоме (2 сайта, рис. 2, г) и в одной хромосоме *A. fistulosum* (1 сайт, рис. 2, в). У трех образцов (К 3202, К 3207, И:о157901), наряду с 18S/25S маркером в двух хромосомах, дополнительно выявлена еще одна хромосома с этим маркером, локализованным терминально в коротком плече одной из субметацентрических хромосом *A. cepa* (рис. 2, н – п). Число и локализация марке-

ра 5S рДНК у этих форм также сходны с родительскими видами (табл. 2, рис. 2, к, л), причем у образца И:о157901 были изучены как растения из культуры *in vitro*, так и растения исходного клона, все время культивируемые *in vivo*. Кариотипические характеристики обеих форм совпали.

У всех трех изученных растений одного из диплоидных образцов лука многоярусного ($2n = 2x = 16$) (К 3206) выявлено восемь хромосом *A. fistulosum*, семь хромосом *A. cepa* и одна рекомбинантная хромосома *A. fistulosum/A. cepa*, в которой генетический материал *A. cepa*, охватывает большую часть одного из плеч (рис. 3, а, в).

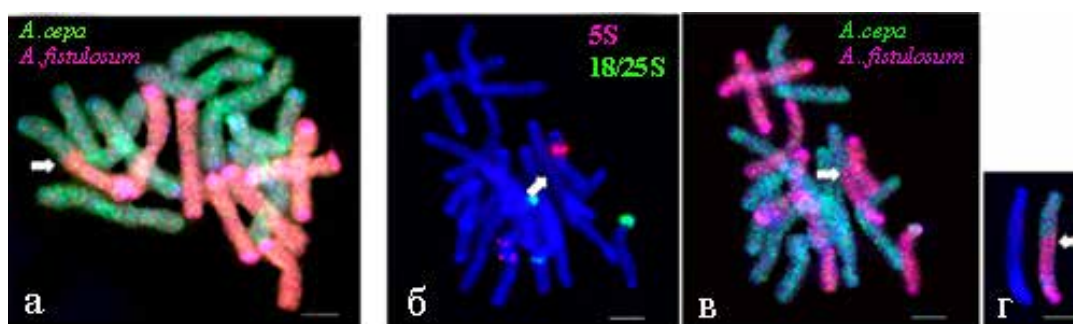


Рис. 3. GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* различных растений и FISH с маркерами 5S и 18/25S рДНК диплоидного образца *A. × proliferum* К 3206. а – GISH хромосом растения 1 с дифференциально мечеными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum*; б, в – FISH хромосом растения 2 и та же клетка после GISH соответственно; г – перестроенная хромосома генома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала *A. cepa*.

Fig. 3. GISH with genomic DNA of *A. cepa* and *A. fistulosum* of different plants and FISH with 5S and 18/25S diploid rDNA probes on *A. × proliferum* accession К 3206. а – GISH of plant 1 chromosomes with differentially labeled *A. cepa* and *A. fistulosum* DNA; б, в – FISH of plant 2 chromosomes and the same cell after GISH, respectively; г – rearranged chromosome of the *A. fistulosum* genome with introgression of *A. cepa* genetic material.

Число и распределение на хромосомах сайтов гибридизации с зондами 18S/25S, 5S рДНК соответствуют этим характеристикам родительских видов. Перестроенная хромосома не несет этих сайтов (рис. 3, б – г).

Два образца, в кариотипе которых также выявлены хромосомы *A. cepa* и *A. fistulosum*, отличаются по числу родительских хромосом от типичных представителей лука многоярусного (рисунок 4).

У *A. × proliferum* К 3203 выявлено семь хромосом *A. cepa* и 16 хромосом *A. fistulosum*, одна из которых несет терминальную интрогрессию генетического материала *A. cepa* в длинном плече (рис. 4, б). В четырех хромосомах *A. cepa* выявлены сайты 18S/25S рДНК: в хромосоме 6 – спутничной – хорошо идентифицируемый в терминальной части короткого плеча – в районе спутника, и терминально расположенные минорные сайты в коротких плечах трех хромосом (рис. 4, а, д, е). В коротком плече хромосомы 7 *A. cepa*, как и у родительского вида, выявлены два сайта 5S рДНК (рис. 4, а, в). Среди хромосом *A. fistulosum* выявлена пара спутничных хромосом (хромосома 8), несущих сайты 18S/25S рДНК (рис. 4, а, ж). Кроме того, в коротком плече еще одной из хромосом *A. fistulosum* выявлен терминально лока-

лизированный минорный сайт 18S/25S рДНК (рис. 4, з). В одной паре хромосом локализован сайт 5S рДНК (рис. 4, г). Расположение 5S маркера на обеих хромосомах 7 *A. fistulosum* соответствует этой характеристике родительского кариотипа, но гомологичные хромосомы различаются размерами сайтов гибридизации с зондом 5S рДНК (рис. 4, г). В длинном плече одной из субметацентрических хромосом выявлена терминально расположенная интрогрессия генетического материала *A. cepa* с терминальным минорным маркером 18/25S в интрогрессированном фрагменте (рис. 4, и).

Образец К 3205 представляет собой близкую к тетраплоидной форму с 16 хромосомами *A. cepa* и 13 хромосомами *A. fistulosum* (рис. 4, л). Среди хромосом *A. cepa* этого образца, как и у родительского вида, идентифицированы две пары хромосом (шестой – спутничной и восьмой) с терминально локализованными в коротких плечах сайтами 18S/25S рДНК (рис. 4, к, о) и пара хромосом 7 с двумя сайтами 5S рДНК в коротком плече (рис. 4, м). Среди хромосом *A. fistulosum* выявлена пара спутничных хромосом, несущих сайт 18S/25S рДНК (рис. 4, к, р) и лишь одна хромосома 7 с сайтом 5S рДНК в коротком плече (рис. 4, к, н).

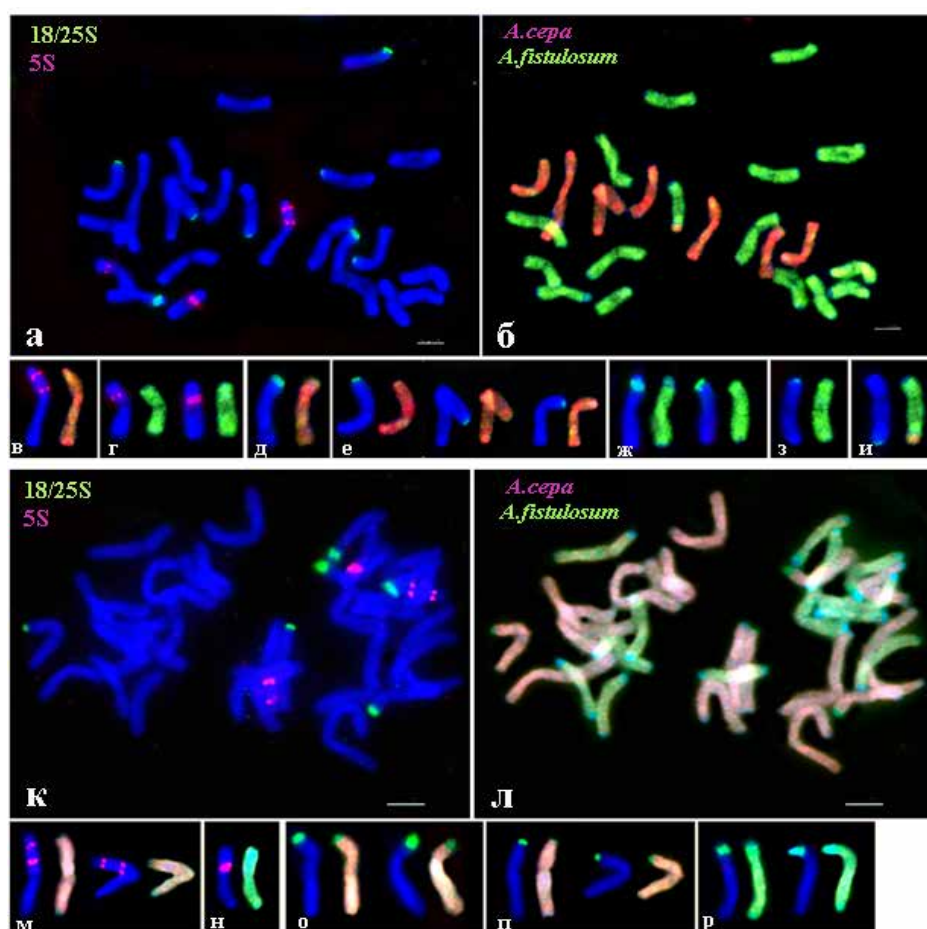


Рис. 4. FISH с использованием зондов 5S и 18/25S рДНК и GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* применительно к образцам *A. × proliferum* с отличным от диплоидного числом хромосом. (а – и) – К 3203 ($2n=23$): а – FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, б – та же клетка после GISH – 7 хромосом *A. cepa* и 16 *A. fistulosum*, в, г – одна хромосома 7 *A. cepa* и две хромосомы *A. fistulosum* соответственно; д – е – хромосомы с маркером 18/25S у *A. cepa* – одна спутничная хромосома 6 (д) и три хромосомы с минорными терминально локализованными маркерами (е) *A. fistulosum* – пара спутничных хромосом (ж), хромосома с минорным теломерно локализованным маркером (з, и), и – хромосома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала и минорным 18/25S маркером в интрогрессированном фрагменте; (к – п) – К 3205 ($2n=29$): к – FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, л – та же клетка после GISH – 16 хромосом *A. cepa* и 13 *A. fistulosum*; м, н – две хромосомы 7 *A. cepa* и одна *A. fistulosum* соответственно; о – п – три пары хромосом с маркером 18/25S: две *A. cepa* (о, п), одна из них спутничная (о), одна пара спутничных хромосом *A. fistulosum* (п).

Fig. 4. FISH with 5S and 18/25S rDNA as probes and GISH with genomic DNA from *A. cepa* and *A. fistulosum* as applied to *A. × proliferum* accessions with polyploid chromosome numbers. (a – и) – K 3203 ($2n=23$): а – FISH with 5S and 18/25S chromosome markers, б – the same cell after GISH – seven *A. cepa* and 16 *A. fistulosum* chromosomes, в, г – one chromosome 7 of *A. cepa* and two *A. fistulosum* chromosomes, respectively; д – е – of *A. cepa* chromosomes with 18/25S marker – one satellite chromosome 6 (д) and three chromosomes with minor telomeric markers (е); *A. fistulosum* chromosomes – a pair of satellite chromosomes (ж), a chromosome with a minor telomeric marker (з, и), и – *A. fistulosum* chromosome with introgression of genetic material and a minor 18/25S marker in the introgressed fragment; (к – п) – k-3205 ($2n=29$): к – FISH with 5S and 18/25S markers, л – the same cell after GISH – 16 *A. cepa* and 13 *A. fistulosum* chromosomes; м, н – two chromosomes 7 of *A. cepa* and one *A. fistulosum* chromosome, respectively; о – п – three pairs of chromosomes with 18/25S marker: two *A. cepa* chromosomes (о, п), one of them satellite (о), and one pair of satellite chromosomes of *A. fistulosum* (п).

Обсуждение

Результаты анализа локализации сайтов рДНК образцов видов – носителей родительских геномов лука многоярусного *A. × proliferum* согласуются с литературными данными (Sato, 1981; Ricroch et al., 1992; Do et al., 2001; Gernand et al., 2007). Среди исследованных нами образцов лука многоярусного выявлены формы (К 3202, К 3207, И:о157901) с локализацией 18/25S рДНК в трех хромосомах *A. cepa*, одна из которых спутничная и две с терминальными минорными сайтами. Однако, как свидетельствуют результаты ряда авторов, у этого вида сайты 18S/25S рДНК локализованы в коротких плечах только двух пар хромосом (хромосомы 6- и 8) у *A. cepa*, одна из которых спутничная (Sato, 1981; Ricroch et al., 1992; Do et al., 2001; Gernand et al., 2007). Выявление дополнительного минорного сайта 18/25S рДНК у этих образцов не является следствием изменений кариотипа при культивировании в условиях *in vitro*, поскольку для растений клона И:о157901, культивируемого *in vivo*, и того же образца после культивирования *in vitro* эти характеристики совпадают. Возможно, у лука репчатого существует полиморфизм количества минорных сайтов гибридизации с зондами 18/25S рДНК, и различное их количество у образцов лука многоярусного обусловлено полиморфизмом по этому признаку у родительских форм *A. cepa*.

У одного из диплоидных 16-ти хромосомных образцов – К 3206 – выявлена одна рекомбинантная хромосома *A. cepa*. Происхождение такой перестроенной хромосомы у этой формы не вполне понятно. Следует предположить, что эта форма еще до введения в культуру *in vitro* несла перестроенную хромосому, поскольку, при поддержании и размножении *in vitro* микроклонирование осуществляется, как и в естественных условиях, путем образования адвентивных почек. Образования каллуса, в процессе которого могут возникать изменения кариотипа, при этом не происходит. Можно предположить, что исходный гибрид не являлся луком многоярусным, лишенным способности к образованию цветков. Зародыш мог образоваться из неоплодотворенной яйцеклетки с диплоидным набором хромосом, явившейся следствием отсутствия редукции числа хромосом в первом делении мейоза. В таком случае рекомбинантных хромосом, составленных из генетического материала обоих родительских видов, было бы две – одна от *A. cepa*, а другая от *A. fistulosum*. Однако у образца К 3206 нами выявлена только одна такая хромосома. Исходя из данных литературы, может быть предложена следующая гипотеза возникновения диплоидного гибрида с одной рекомбинантной хромосомой. Для гибридов *A. cepa* с *A. fistulosum* описана спонтанная полиплоидизация (Levan, 1941; Budylin et al., 2014). Тетраплоидные формы могут быть фертильными и давать семена. Возврат к диплоидному состоянию у таких растений мог быть результатом гаплоидного апомиксиса, например, развития зародыша из не-

оплодотворенной яйцеклетки. Такой зародыш мог иметь одну хромосому, составленную из генетического материала обоих родительских видов. Эта форма, из-за изменения ее геномного состава, могла приобрести свойства лука многоярусного. В литературе есть информация о выявлении растения с признаками лука многоярусного среди растений поколения F_3 гибрида лука репчатого и батуна (Ershov, Yureva, 1985).

Среди изученных нами образцов были выявлены две полиплоидные формы лука многоярусного: К 3203 ($2n = 23$) и К 3205 ($2n = 29$). Для 23-хромосомного гибрида К 3203 характерно наличие семи хромосом *A. cepa* и диплоидного набора хромосом *A. fistulosum*, причем FISH с 5S рДНК выявил различие в размерах сайтов гибридизации этого зонда у разных гомологов хромосомы 7 *A. fistulosum*. Это позволяет предположить, что 23-хромосомный триплоидный гибрид был получен либо с участием нередуцированной ($2n$) гаметы батуна, либо это растение получено при беккроссировании гибрида пыльцой *A. fistulosum*. У этого растения выявлена одна хромосома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала *A. cepa*. Среди хромосом *A. cepa* выявлено четыре хромосомы с сайтами гибридизации зонда 18/25S рДНК. Хромосомный состав этого образца требует более детального изучения с идентификацией индивидуальных хромосом. Исследованный нами образец К 3205 ($2n = 4x - 3 = 29$) представляет собой гипоплоидный тетраплоид с шестнадцатью хромосомами *A. cepa* и тринадцатью *A. fistulosum*.

Для объяснения возникновения полиплоидных форм нужно обратиться к результатам, изучения экспериментально полученных форм от скрещиваний *A. cepa* и *A. fistulosum* (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019). Триплоидные формы ($2n = 3x = 24$) были выявлены в F_2 экспериментально полученных гибридов в этой комбинации скрещивания, одно растение имело гаплоидный набор хромосом *A. cepa* и диплоидный *A. fistulosum*, у двух, наоборот, идентифицированы восемь хромосом *A. fistulosum* и шестнадцать *A. cepa* (Budylin et al., 2014). Кроме того, в различных поколениях в потомстве гибридов были выявлены 32-х хромосомные тетраплоиды с диплоидными наборами хромосом родительских видов, среди которых встречались формы с рекомбинантными хромосомами, а также 30-ти хромосомное растение с 16-ю хромосомами *A. cepa* и 14-ю хромосомами *A. fistulosum* ($2n = 4x - 2 = 30$) (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019). Все эти формы были получены спонтанно без искусственного удвоения числа хромосом. Механизм полиплоидизации неясен. Авторы предполагают, что полиплоидные формы могли произойти в результате отсутствия редукции числа хромосом в мейозе и участия в образовании зиготы нередуцированных гамет. Другой возможной причиной мог быть факультативный апомиксис. Это предположение связано с наличием такого типа размножения у ряда видов лука, например, у *A. tuberosum*, *A. ramosum* (Yamashita et al, 2012; Kojima,

Nagato, 1992). Также одним из возможных механизмов, как предполагают авторы, мог быть цитомиксис в материнских клетках пыльцы.

Заключение

С использованием методов молекулярной цитогенетики (GISH, FISH с зондами 5S и 18/25S рДНК) охарактеризован геномный состав образцов лука многоярусного *Allium × proliferum* из коллекции *in vitro* ВИР. Показано, что в коллекции представлены образцы лука многоярусного, имеющие кариотипические различия. Выявлены как типичные для *Allium × proliferum* аллодиплоидные формы ($2n = 2x = 16$), гибридный геном которых включает восемь хромосом *A. cepa* и восемь хромосом *A. fistulosum*, так и формы с хромосомными перестройками (К 3206, К 3203) и отличающиеся от *Allium × proliferum* уровнем плоидности (К 3205 и К 3203).

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0662-2019-0004.

References/Литература

- Avrov N.N. Top onions and chives (Mnogoyarusnyy luk i shnitt-luk). Leningrad: Lenizdat; 1961. 44 p. [in Russian] (Авров Н.Н. Многорярусный лук и шнитт-лук. Ленинград: Лениздат. 1961. 44 с.)
- Bernatzky R., Tanksley S.D. Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 1986;72:314-324. DOI: 10.1007/BF00288567
- Bozzini A. On the karyotype of a viviparous onion, known as *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef. *Caryologia.* 1964;17(2):459-464. DOI:10.1080/00087114.1964.10796142
- Budylin M.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Khrustaleva L.I. GISH study generation of the interspecific hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. with relative resistance to downy mildew. *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(4):387-394. DOI:10.1134/s0022795414040036
- Curran L., Maude R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions. *Annals of Applied Biology.* 1984;105:277-283. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1984.tb03051.x
- Do S.D., Seo B.B., Yamamoto M., Suzuki G., Mukai Y. Identification and chromosome location of tandemly repeated DNA sequences in *Allium cepa*. *Genes Genet. Syst.* 2001;76:53-60. DOI: 10.1266/ggs.76.53
- Ershov I.I., Yureva N.A. Case of experimental production of top onion as a result of interspecific hybridization (Sluchay eksperimental'nogo polucheniya mnogoyarusnogo luka v rezultate mezhvidovoy gibrizatsii). In: *Sbornik nauchnykh trudov VNII selektsii i semenovodstva ovoshchnykh kul'tur.* 1985;20:117-119. [in Russian] (Ершов И.И., Юрєва Н.А. Случай экспериментального получения многоярусного лука в результате межвидовой гибридизации. В кн.: Сборник научных трудов ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. 1985;20:117-119.
- Fiskesjo G. Chromosomal relationships between three species of *Allium* as revealed by C-banding. *Hereditas.* 1975;81:23-32. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1975.tb01010.x
- Friesen N., Klaas M. Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 1998;45:511-523. DOI: 10.1023/A:1008647700251
- Fritsch R.M., Friesen N. I. Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch HD, Curran L (ed.) *Allium crop science: recent advances.* CABI Publishing; 2002. p.5-30.
- Galvan G.A., Wietsma W.A., Putrasamedja S., Permadi A.H., Kik C. Screening for resistance to anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives. *Euphytica.* 1997;95:173-178. DOI: 10.1023/A:1002914225154
- Gernand D., Golezyk H., Twan R., Ilnicki T., Houben A., Joachimiak A.J. Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*. *Genome.* 2007;50:435-442. DOI: 10.1139/G07-023
- Gottlob-McHugh S., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., Yaro-sh O., Johnson D. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome.* 1990;33:486-494. DOI: 10.1139/g90-072
- Helm J. Die zu Würz- und Speisezwecken kultivierten Arten der Gattung *Allium* L. *Kulturpflanze.* 1956;4:130-180 [In German]. DOI: 10.1007/BF02095412
- Hizume M. Allopolyploid nature of *Allium wakegi* Araki revealed by genomic *in situ* hybridization and localization of 5S and 18S rDNAs. *Japanese Journal Genet.* 1994;69:407-415. DOI: 10.1266/jgg.69.407
- Leitch A., Schwarzacher T., Jason D., Leitch I. *In situ Hybridization: a Practical Guide.* Oxford: BIOS; 1994.
- Kojima A., Nagato Y. Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction.* 1992;5(1):72-78. DOI: 10.1007/BF00714560
- Khrustaleva L.I., Kan L.Yu., Kirov I.V., Salmik A.A. Molecular cytogenetic analysis of natural and synthetic hybrids *A. fistulosum × A. cepa* (Molekulyarno-tsitogeneticheskiy analiz yestestvennykh i sinteticheskikh gbridov *A. fistulosum × A. cepa*). News TSHA (Izvestiya TSKHA). 2010;29:12-20. [in Russian] (Хрусталева Л.И., Кан Л.Ю., Киров И.В., Сальник А.А. Молекулярно-цитогенетический анализ естественных и синтетических гибридов *A. fistulosum × A. cepa*. Известия ТСХА. 2010;29:12-20.
- Kudryavtseva N., Havey M.J., Black L., Hanson P., Sokolov P., Odintsov L., Divashuk M., Khrustaleva L. Cytological evaluations of advanced generations of interspecific hybrids between *Allium cepa* and *Allium fistulosum* showing resistance to *Stemphylium vesicarium*. *Genes.* 2019;10:195. DOI: 10.3390/genes10030195
- Levan A. The cytology of the species hybrid *Allium cepa × Allium fistulosum* and its polyploidy derivatives. *Hereditas.* 1941;27:253-272. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1941.tb03260.x
- Maass H. Genetic diversity in the top onion, *Allium × proliferum* analysed by isozymes. *Pl. Syst. Evol.* 1997;208:35-44. DOI: 10.1007/BF00986081
- Netzer D., Rabinowitch H.D., Weintal C.H. Greenhouse technique to evaluate onion resistance to pink root. *Euphytica.* 1985;34:385-391. DOI: 10.1007/BF00022933
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome.* 2008;51:714-720. DOI: 10.1139/G08-052
- Puizina J. Shallots in Croatia – genetics, morphology and nomenclature. *Acta Bot. Croat.* 2013;72(2):387-398. DOI: 10.2478/botcro-2013-0016
- Puizina J., Papes D. Classical and molecular cytogenetic studies of top onion, *Allium × proliferum* (Moench) Schrader. *Acta Botanica Croatia.* 1999;58: 65-77.
- Ricroch A., Peffley E.B., Baker R.J. Chromosomal location of r DNA *Allium*: *in situ* hybridization using biotin- and fluorescein-labelled probe. *Theor. and Appl. Genet.* 1992;83:413-418. DOI: 10.1007/BF00226528
- Sato S. Cytological studies on the satellite chromosomes of *Allium cepa*. *Caryologia.* 1981;34: 431-440. DOI: 10.1080/00087114.1981.10796911
- Schubert I., Ohne H., Hanelt P. Phylogenetic conclusion from Giemsa banding and NOR staining in top onions (*Liliaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 1983;143:245-256. DOI: 10.1007/BF00986607
- Vosa C.G. Heterochromatic patterns in *Allium*. 1. The relationship between the species of the *Cepa* group and its allies. *Heredity.* 1976;36:383-392. DOI: 10.1038/hdy.1976.45
- Yakura K., Tanifuji S. Molecular cloning and restriction analysis of Eco RI-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiol.* 1983;24:1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650
- Yamashita K., Nakazawa Y., Namai K., Amagai M., Tsukazaki H., Wako T., Kojima A. Modes of inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids. *Breeding Science.* 2012;62:160-169. DOI: 10.1270/jsbbs.62.160