

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ У ПОДСОЛНЕЧНИКА***И.Н. АНИСИМОВА, В.А. ГАВРИЛОВА**

На примере подсолнечника показано развитие идей Н.И. Вавилова об отдаленной гибридизации как способе расширения разнообразия возделываемых культур. Обобщены результаты исследований по скрещиваемости культурного подсолнечника с дикими видами рода *Helianthus*, характеру наследования признаков в гибридных поколениях, особенностям структурно-функциональных преобразований геномов в потомствах у межвидовых гибридов. Проанализированы практические результаты скрещиваний *H. annuus* с многолетними видами *Helianthus*; обсуждаются различные аспекты применения такого подхода для решения задач селекции и вопросов частной генетики подсолнечника. С использованием метода отдаленной гибридизации разработана и предложена новая модель для исследования генетических механизмов взаимодействия ядра и цитоплазмы.

Ключевые слова: подсолнечник, виды, отдаленная гибридизация, генетическая модель ЦМС-*Rf*.

Keywords: sunflower, species, interspecific hybridization, CMS-*Rf* genetic model.

Отдаленная (межвидовая и межродовая) гибридизация — это способ создания новых геномов и генотипов, сочетающих ценные признаки родительских видов. Существенный вклад в теоретическое обоснование отдаленной гибридизации как метода селекции внес Николай Иванович Вавилов. В 1932 году, обобщая полученные с ее помощью достижения в области растениеводства, он писал: «Из общих задач генетики... мы выделяем, прежде всего, проблему отдаленной гибридизации, разработку вопроса о применимости отдаленных скрещиваний, гибридизации различных видов и родов. Самые увлекательные задачи, интересующие селекционера и агронома..., в значительной мере связаны с проблемой отдаленной гибридизации; сочетание наиболее интересных признаков в сорте... обуславливается во многих случаях именно применимостью отдаленной гибридизации» (1). Разработка способов отдаленной гибридизации стала одним из основных направлений научной деятельности организованного Н.И. Вавиловым в 1925 году во Всероссийском НИИ растениеводства (ВИР) отдела генетики (2). Его первым руководителем был назначен Георгий Дмитриевич Карпеченко, классические исследования которого по теории отдаленной гибридизации вошли в золотой фонд мировой науки (3). Выяснение генетических и цитогенетических механизмов совместимости/несовместимости видов до сих пор остается в числе основных задач этого отдела ВИР.

Достигнутые к настоящему времени успехи в области селекции подтверждают справедливость идей Н.И. Вавилова об исключительной роли отдаленной гибридизации в расширении генетического разнообразия культурных растений (4, 5). Николай Иванович рассматривал отдаленную гибридизацию прежде всего как способ передачи культурным видам устойчивости к болезням, вредителям и неблагоприятным факторам среды. Выявленные им общие закономерности в распределении иммунитета к инфекционным заболеваниям лежат в основе исследований по поиску устойчивых форм среди разнообразия культурных растений и их диких родичей. Н.И. Вавилов установил, что «наиболее контрастные различия по иммунитету выявляют растения, цитогенетически резко дифференцированные на различные виды» и что «виды, иммунные к одному заболева-

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-04-00329).

нию, нередко устойчивы и ко многим другим заболеваниям (примеры комплексного, или группового, иммунитета)» (6).

Открытые Н.И. Вавиловым закономерности в распределении признаков иммунитета нашли применение в селекции важнейшей масличной культуры — подсолнечника. В работах ученого приводятся примеры устойчивости многолетнего клубненосного вида *H. tuberosus* и однолетнего подсолнечника серебристолистного *H. argophyllus* к ржавчинному грибу *Puccinia helianthi* (7). К настоящему времени описано множество заболеваний культурного подсолнечника, которые вызывают паразитические грибы. Наибольший вред наносят фомопсис (возбудитель *Phomopsis helianthi*), белая гниль (*Sclerotinia sclerotiorum*), серая гниль (*Botrytis cinerea*), ложная мучнистая роса (*Plasmopara halstedii*), ржавчина. Серьезную опасность представляют альтернариоз (*Alternaria helianthi*), фомоз (*Phoma macdonaldii*), вертициллез (*Verticillium dahliae*), а также цветковое растение-паразит заразиха (*Orobanche cumana*).

В 1938 году Н.А. Шибря сформулировал практические цели межвидовой гибридизации у подсолнечника (8). Основной задачей он считал повышение иммунитета у культурного подсолнечника (однолетний вид *H. annuus*) за счет высокоустойчивого *H. tuberosus*. Еще одно направление ученый связывал с созданием на основе гибридов *H. annuus* × *H. tuberosus* многолетнего подсолнечника, дающего ботву, клубни и семена (9). Другие исследователи подчеркивали ограниченность генетической основы у культурного подсолнечника и значимость межвидовой гибридизации как способ расширения его генетического разнообразия (10-14). К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что дикие виды рода *Helianthus* служат источниками цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), восстановления фертильности пыльцы, устойчивости к вредным организмам и неблагоприятным условиям среды, оригинального жирнокислотного состава масла и других ценных признаков и свойств (10-18).

Род *Helianthus* включает 51 вид, из которых 14 — однолетние диплоидные ($2n = 34$), в том числе культурный подсолнечник *H. annuus* (секция *Helianthus*), и 37 — многолетние с различной ploidy (секции *Atrorubentes* и *Ciliares*) (19). Установлено, что однолетние дикорастущие виды ($2n = 34$) легко вступают в гибридизацию с культурным подсолнечником и дают фертильное потомство при любом направлении скрещиваний. На основе гибридов культурного подсолнечника с однолетними дикими видами получены источники ЦМС (20-22), созданы селекционные линии, в том числе обладающие генами устойчивости к болезням (15, 23). Особую ценность для селекции представляют многолетние виды, которые служат источниками признаков, отсутствующих у однолетних видов, в частности группового (по Н.И. Вавилову) иммунитета к болезням и вредителям. В обычных условиях многолетние и однолетние виды рода *Helianthus* скрещиваются с большим трудом (при этом образуются стерильные гибриды) или несовместимы (10, 24, 25). По определению Г.Д. Карпеченко (3), такой тип скрещиваний можно отнести к инконгруэнтным. Результаты анализа скрещиваемости видов, дополненные данными цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, позволили оценить характер межвидовых взаимосвязей и определить геномный состав видов рода. Установлено, что несовместимость однолетних и многолетних видов подсолнечника при скрещиваниях обусловлена различиями в их геномном составе (24, 27). В соответствии с недавней гипотезой французских исследователей, все виды рода *Helianthus* имеют общий геном С; геном Н — общий для однолетних видов, геном Р — для многолетних видов; геном А

специфичен для секции *Atrorubentes* (28).

Несовместимость при скрещиваниях препятствует эффективному использованию генетического потенциала многолетних диких видов в селекции подсолнечника. Для преодоления барьеров нескрещиваемости предлагались различные приемы: подбор пар, воздействие термошоком, предварительное вегетативное сближение, многократное опыление (27). В последние десятилетия для получения гибридов успешно использовались методы биотехнологии (культуры зародышей, слияния протопластов) (29-34). В литературе описаны и различные приемы восстановления фертильности у гибридов от скрещиваний между культурным подсолнечником и многолетними видами *Helianthus*. Один из них заключается в получении потомств от возвратных скрещиваний посредством опыления стерильных растений F₁ смесью пыльцы культурного подсолнечника с целью получения фертильных растений BC₁. Этот подход, использованный при гибридизации *H. annuus* и многолетнего диплоидного *H. mollis*, весьма трудоемок и малоэффективен (35). Тем не менее, на его основе удалось успешно интрогрессировать в геном однолетнего подсолнечника гены, влияющие на архитектуру растений (укороченные междоузлия, свойственные *H. mollis*). Интро-грессированные фрагменты генома локализованы на молекулярно-гене-тической карте в двух группах сцепления (36).

Другая стратегия, основанная на классических работах Г.Д. Карпенченко (37), заключается в удвоении набора хромосом у растений F₁. Впервые искусственные амфидиплоиды у подсолнечника получили R.C. Jackson и B.G. Murrey (38), впоследствии этот метод использовался неоднократно (39). В частности, амфидиплоиды от скрещиваний культурного подсолнечника с многолетними видами получали с целью передачи устойчивости к заразице (40). Однако указанный метод не нашел широкого распространения, поскольку обладает существенным недостатком — происходит реверсия гибридных растений к диплоидному состоянию (минуя стадию анеуплоидии) и, как следствие, полная утрата генетического материала дикого вида.

Существенный вклад в селекцию подсолнечника на групповой иммунитет методом отдаленной гибридизации внесли работы, выполненные Г.В. Пустовойт во Всероссийском НИИ масличных культур (ВНИИМК, г. Краснодар). Ей впервые удалось получить реципрокные межвидовые гибриды культурного подсолнечника с *H. tuberosus*, *H. tomentosus*, *H. subcaulescens*, *H. scaberimus*, *H. mollis* (10, 11). Они были однолетними, высокофертильными, имели промежуточный фенотип и такое же число хромосом, как у культурного подсолнечника ($2n = 34$), независимо от пloidности второго родителя. Кроме того, гибриды обладали устойчивостью к патогенам, полученной от дикого вида. На основе их 22-го поколения селекционерами ВНИИМК были созданы сорта Лидер, Березанский и др., характеризующиеся высокой масличностью и устойчивостью к болезням. К настоящему времени в разных странах на основе гибридизации культурного подсолнечника с многолетними дикими видами получен исходный селекционный материал, включающий линии с интрогрессированной устойчивостью к склеротинии (41) и альтернарии (42), засухоустойчивостью (43) и другими признаками.

В ВИР были созданы серии производных от межвидовых скрещиваний, в которых материнской формой служила одна и та же линия культурного подсолнечника с ЦМС, а отцовскими — многолетние виды различной пloidности (*H. mollis*, *H. maximiliani*, *H. laetiflorus*, *H. trachelifolius*, *H. angustifolius*, *H. occidentalis*, *H. strumosus*, *H. rigidus*, *H. giganteus*, *H. groseserratus*, *H. divaricatus*, *H. hirsutus*, *H. decapetalus* и *H. tomentosus*) (44-46). В потомстве от этих скрещиваний присутствовали фертильные и образую-

щие семена многолетние растения, не похожие ни на отцовскую, ни на материнскую форму; однолетние растения, близкие по фенотипу к однолетнему дикорастущему подсолнечнику; гибриды, потомства F_1 и F_2 которых расщеплялись на растения культурного и дикорастущего типа по признакам фертильности пыльцы, типу ветвления, наличию опушения и антоциановой окраски; гибриды, не дающие расщепления в F_2 - F_8 , морфологически сходные с линиями культурного подсолнечника, но обладающие своеобразным ветвлением, характерным только для этих форм.

В F_2 и последующих поколениях наблюдалось появление одних и тех же морфологических типов независимо от того, какой многолетний вид использовался в скрещивании в качестве отцовской формы. Создана коллекция интрогрессивных линий однолетнего подсолнечника, выведенных посредством предварительного отбора из потомства межвидовых гибридов F_1 , а также из их потомств от анализирующих скрещиваний со стерильной материнской формой. Они характеризуются фенотипической однородностью и комплексом ценных биологических признаков, предположительно полученных от многолетнего родителя, — устойчивостью к патогенам, способностью форм с ЦМС восстанавливать фертильность пыльцы и своеобразным морфотипом. Уже в F_1 у межвидовых гибридов отмечена стабилизация числа хромосом на диплоидном уровне, независимо от плоидности отцовского вида (16, 47, 48). Масса 1000 семян интрогрессивных линий варьировала от 31 до 80 г. Доля лузги у гибридов изменялась от 23 до 43 %, причем у шести гибридов она составила менее 30 %. По крупности семян и лузжистости линии уступали стандартному сорту Передовик. При этом количество масла (основной показатель качества семян) изменялось от 48,0 до 56,3 %, что было выше стандарта в среднем на 1,9 %. За исключением двух комбинаций, масличность ядра у гибридов превышала 50 %, причем у пяти равнялась 55 %. Особую ценность представляет линия, выделенная из гибрида $114 \times H. giganteus$, которая в течение 3 лет (2009-2011 го-ды) в условиях Кубанской опытной станции ВИР (Краснодарский край) демонстрировала полную устойчивость к такому опасному заболеванию, как фомопсис.

Формы подсолнечника, созданные на основе метода отдаленной гибридизации, характеризуются раннеспелостью и обладают высокой комбинационной способностью по урожаю семян при скрещиваниях с линией ЦМС. Многие из них проявляют рецессивный характер ветвления и предназначены для использования в качестве восстановителей фертильности пыльцы у линий с ЦМС при получении промышленных гетерозисных гибридов. Имеются гибридные комбинации, для потомства которых типично отсутствие ветвления, полное восстановление фертильности пыльцы и более высокая, чем у стандартного сорта Передовик, урожайность семян. При возвратных скрещиваниях с линией ЦМС были получены однокорзиночные высокорослые (180-190 см) хорошо выровненные по высоте гибридные растения с крупными корзинками диаметром около 25 см. Этот успех во многом объясняется использованием для гибридизации линий ЦМС, несущих гены автофертильности, а не самонесовместимых сортов. У тех автофертильных форм, которые способны преодолеть несовместимость, этот процесс происходит легче и при отдаленном скрещивании (16, 46).

Хронологически можно выделить два этапа, посвященных исследованиям гибридов от скрещиваний культурного подсолнечника с многолетними видами рода *Helianthus*. Первый из них (до середины 1980-х годов) связан с выяснением причин несовместимости геномов при гибридизации культурного подсолнечника с многолетними видами и поиском способов

преодоления нескрещиваемости. В этот период были выполнены исследования мейоза гибридов, в частности работы специалистов болгарской школы под руководством профессора Й. Георгиевой-Тодоровой (25). Вторым этапом исследований межвидовых гибридов подсолнечника совпадает с началом широкого использования современных молекулярно-генетических технологий. С развитием методов молекулярного маркирования появилась возможность для определения природы гибридов, многие из которых ранее считались ложными. Однако до сих пор механизмы интрогрессии и особенности преобразования геномов при межвидовой гибридизации у подсолнечника изучены недостаточно. В настоящее время для характеристики гибридов и доказательства интрогрессии генов, контролируемых ценными признаками, из генома дикого вида успешно используются методы анализа полиморфизма ДНК. В частности, для доказательства интрогрессии фрагментов генома отцовского многолетнего вида в генотип гибридов *H. annuus* × *H. mollis* использованы RAPD-, RFLP- и AFLP-маркеры (randomly amplified polymorphic DNA, restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism) (30, 31, 36). Другие исследователи также применяли методы RAPD (49), SSR (simple sequence repeat) (50, 51), AFLP (41) и, кроме того, блоттинг-гибридизацию по Саузерну (52).

Для выяснения особенностей структурно-функциональных преобразований генома при межвидовой гибридизации у подсолнечника использовался полиморфизм электрофоретических спектров 11S глобулина семян (гелиантинина) (53). Многолетние и однолетние виды *Helianthus* различаются по компонентному составу электрофоретического спектра запасного белка семян гелиантинина, синтез которого находится под контролем не менее трех локусов — *HelA*, *HelB* и *HelC*. В семенах F₁ от скрещиваний *H. annuus* с однолетними дикорастущими видами и формами независимо от направления скрещиваний наблюдалась кодоминантная экспрессия вариантов полипептидов обоих родителей, а в F₂ отмечался менделевский характер расщепления.

Иной тип наследования компонентов гелиантинина обнаружен при анализе гибридов от скрещиваний культурного подсолнечника с многолетними видами. Электрофоретические спектры гелиантинина, выделенного из семян F₁ межвидовых гибридов, оказались идентичны спектру материнской линии либо содержали новые, не свойственные родительским формам варианты. Такой характер изменчивости наблюдался и в следующих поколениях. В группе из 83 интрогрессивных линий выявлено 6 различных типов спектра (фенотипов) гелиантинина. Спектр гелиантинина, свойственный однолетней материнской форме, имели 35 % линий. В 60 % потомств межвидовых гибридов отмечались изменения в спектре компонентов, контролируемых локусом *HelC*. Все типы спектра запасных белков семян, наблюдавшиеся у анализируемых форм, ранее описаны у культурного подсолнечника.

У растений, полученных в Гиссенском университете (г. Гиссен, Германия) посредством гибридизации линии НА89 с многолетними ди-, тетра- и гексаплоидными видами в полевых условиях с последующим культивированием зародышей на искусственной среде (30), выявлены сходные изменения спектра компонентов, кодируемых локусом *HelC*. Аналогичная ситуация отмечена и для наследования морфологических признаков. В потомствах от межвидовых скрещиваний идентифицированы 5 различных морфологических типов растений, которые у культурного подсолнечника рассматриваются как мутантные (16). Возникновение сходных морфологических признаков и электрофоретических компонентов белков семян в

потомствах от различных комбинаций скрещиваний культурного подсолнечника с многолетними видами можно рассматривать как проявление параллелизма, иллюстрирующее открытый Н.И. Вавиловым закон гомологических рядов в наследственной изменчивости (цит. по 54).

С помощью произвольных олигонуклеотидных праймеров, дифференцирующих генетический материал многолетних и однолетних видов *Helianthus* (28), обнаружены отдельные фрагменты, предположительно интрогрессированные из генома многолетнего вида, а также фрагменты, отсутствовавшие у родительских форм, что может быть результатом перестроек в геноме у гибридов. Методом RAPD-анализа выявлена нестабильность генома интрогрессивных линий даже после многолетнего инбридинга (в поколениях F_8 - F_{12}). Гибридологический анализ показал, что локус, определяющий признак нижнего ветвления, у одной из интрогрессивных линий находится в нестабильном состоянии (55). Интрогрессию гена *Rf1*, контролирующего признак восстановления фертильности, из генома многолетних видов в геном межвидовых гибридов удалось подтвердить с помощью SCAR-маркера (sequence characterized amplified region) (56).

Для оценки характера реорганизаций геномов у межвидовых гибридов использовали ПЦР-анализ геномных последовательностей, кодирующих ряд функционально важных белков. Размеры амплифицированных фрагментов у культурного подсолнечника и многолетних видов *Helianthus* четко различались. Однако у всех гибридов продукты амплификации большинства локусов совпадали по длине с продуктами амплификации у материнской линии культурного подсолнечника. Для решения вопроса о том, был ли интересующий исследователя ген интрогрессирован в генотип гибрида из генома дикого вида, необходим анализ первичных нуклеотидных последовательностей. Так, выявлены существенные различия между *H. annuus* и многолетними видами в последовательностях нуклеотидов кодирующих (ген запасного альбумина SFA8) и некодирующих (SCAR-маркер локуса *Rf1*) фрагментов генома. Вместе с тем, нуклеотидные последовательности гомологичных фрагментов у гибрида и однолетнего вида либо были идентичными, либо характеризовались многочисленными заменами единичных нуклеотидов (57, 58).

Молекулярно-генетические исследования межвидовых гибридов подсолнечника, созданных с помощью методов биотехнологии (культуры зародышей, слияния протопластов), показали, что производные межвидовых скрещиваний, независимо от их происхождения, представляют собой частичные, или «асимметричные», гибриды, в геноме которых преобладает генетический материал культурного подсолнечника. Для соматических гибридов, полученных посредством электрослияния протопластов *H. annuus* и *H. maximiliani*, были характерны варианты изоферментов культурного подсолнечника. Интрогрессированный фрагмент генома дикого вида выявлен лишь с помощью одного из 10 произвольных праймеров (59). В связи с тем, что возможность неполного происхождения этих форм за счет апомиксиса исключалась, асимметричность их генома объясняется преобразованиями геномов и элиминацией хромосом дикого вида на ранних стадиях развития каллуса. В мейозе у гибридов F_1 от скрещивания однолетнего подсолнечника и многолетних видов рода *Helianthus* обнаруживались уни-, три- и тетраваленты, но чаще всего встречались биваленты и наблюдалось правильное расхождение хромосом в анафазе (25). Представленные результаты указывают на то, что процессы реорганизации геномов (или гаплоидизация) при половой гибридизации культурного подсолнечника с многолетними видами рода *Helianthus* происходят на ранних премейотиче-

ских и, возможно, на постзиготических стадиях.

Данные сравнительного анализа полиморфизма гелиантинина и амплифицированных фрагментов ДНК позволяют предполагать, что изменчивость, наблюдаемая в потомствах у межвидовых гибридов подсолнечника, носит неслучайный характер и может быть обусловлена реорганизацией генома под влиянием «геномного шока», индуцированного межвидовой гибридизацией (60). К факторам, определяющим подобную реорганизацию, по-видимому, относятся перемещения мобильных генетических элементов, активность которых может быть вызвана отдаленной гибридизацией (55, 61).

Среди наиболее значимых достижений отдаленной гибридизации у подсолнечника следует отметить получение новых источников ЦМС. В литературе сообщается о 72 источниках, подавляющее большинство которых получены на основе отдаленной гибридизации (20-22, 46, 62). Использование новых источников ЦМС позволяет избежать опасности эпифитотий, связанных с унификацией типа цитоплазмы. Тем не менее, в настоящее время при создании промышленных гибридов подсолнечника используется преимущественно один источник — ЦМС РЕТ1, полученный из межвидового гибрида *H. petiolaris* × *H. annuus* (63). Ограниченное применение в селекции новых генетических систем ЦМС-*Rf* объясняется отсутствием надежных генов *Rf* для каждого типа цитоплазмы, что обусловлено слабой изученностью генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы.

Цитоплазматическая мужская стерильность, открытая у кукурузы М. Роудсом в 1931 году (64), представляет наилучшую модель для изучения материнского наследования у растений. Отметим, что в том же году, независимо от М. Роудса, это явление было открыто сотрудником отдела генетики ВИР М.И. Хаджиновым, не опубликовавшим свои результаты. К настоящему времени ЦМС известна более чем у 150 видов (65, 66) и характеризуется широким разнообразием фенотипов (67). С обнаружением ядерных генов восстановления фертильности пыльцы (*Rf*), способных супрессировать фенотип ЦМС, появилась возможность использовать системы ЦМС-*Rf* в качестве моделей для изучения механизмов взаимодействий ядерного и митохондриального геномов. К сожалению, из-за отсутствия соответствующих модельных объектов генетические аспекты и молекулярные механизмы этих взаимодействий остаются сравнительно малоизученными.

Большинство источников ЦМС получено с помощью межвидовой гибридизации (65, 68, 69). Объединение чужеродных цитоплазматических и ядерных геномов может приводить к мутациям либо образованию химерных митохондриальных генов, которые почти всегда включают части или копии известных генов (например, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы) и(или) неидентифицированных последовательностей (70). ЦМС как проявление геномных барьеров между ядром и цитоплазмой, а также гены восстановления фертильности, способствующие их преодолению, рассматриваются в числе важных факторов эволюции видов у цветковых растений (71-73).

Изучение молекулярного разнообразия у 29 источников цитоплазматической мужской стерильности подсолнечника позволило выделить несколько ее типов, обусловленных неодинаковой организацией митохондриальной ДНК (мтДНК) (74). Оказалось, что проявление многих типов ЦМС связано с экспрессией новой открытой рамки считывания митохондриального гена *orfH522*, котранскрибируемой с геном *atp1*. С использованием этих данных были разработаны диагностические ПЦР-маркеры для идентификации типа цитоплазмона (75). К настоящему времени установлена

хромосомная локализация пяти генов, восстанавливающих у подсолнечника мужскую фертильность на фоне различных типов цитоплазмона (76).

У высших растений согласованная работа геномов ядра и органелл регулируется обширным классом генов, кодирующих вовлеченные в анте-роградную/ретроградную регуляцию белки, которые характеризуются наличием тандемно повторяющихся последовательностей из 35 аминокислотных остатков (pentatricopeptide repeats, PPR). PPR-белки играют важную роль в процессинге и трансляции РНК органелл (77, 78). Большинство генетических факторов восстановления фертильности пыльцы гомологичны у разных видов растений, принадлежат к классу PPR-генов (79-82) и выделены в отдельное подсемейство (*PPR-RFL* — *PPR-Restorer-of-Fertility-Like*) генов (83). Отличительная черта *PPR-RFL*-генов высших растений — кластерная организация в геноме и уникальный характер дивергенции PPR-мотивов (84). Изменчивость нуклеотидных последовательностей у *PPR-RFL*-генов, по-видимому, служит источником разнообразия аллелей, продукты которых способны к специфическому взаимодействию с продуктами экспрессии генов митохондрий, ассоциированных с фенотипом ЦМС. Недавно у подсолнечника выявлен нуклеотидный полиморфизм фрагмента, ассоциированного с признаком восстановления фертильности пыльцы и содержащего PPR-мотивы (86).

Уникальные интрогрессивные линии, созданные в ВИР на основе межвидовых гибридов от скрещиваний стерильной линии *H. annuus* с многолетними видами рода *Helianthus* разной ploидности, могут быть использованы в качестве эффективной модели для выяснения фундаментальных механизмов преодоления ядерно-цитоплазматического конфликта, обусловленного несовместимостью геномов при отдаленной гибридизации. Предполагается, что линии этой группы имеют митохондриальный геном, идентичный геному исходной материнской линии, либо характеризуются его перестройками.

Начиная с F_1 , в потомствах линий отбирались генотипы с восстановленной мужской фертильностью, следовательно, они несут различные функциональные аллели генов *Rf*, которые были интрогрессированы из генома многолетнего вида либо стали результатом реорганизаций ядерного генома материнской линии вследствие отдаленной гибридизации. Кроме того, гибридизация могла привести к перестройкам митохондриального генома у исходных материнских линий. Это подтверждено ПЦР-анализом с использованием праймеров, специфичных для ассоциированного с ЦМС РЕТ1 митохондриального гена *orfH522*. У некоторых линий, а также у ряда гибридов в F_1 наблюдали отсутствие маркерного фрагмента либо изменение его длины. Можно ожидать, что такие интрогрессивные линии несут и новые аллели ядерных генов восстановления фертильности, которые компенсируют перестройки митохондриального генома, вновь возникшие при отдаленной гибридизации. Традиционно для выявления генов, восстанавливающих фертильность, и изучения особенностей их экспрессии проводят тест-скрещивания с ЦМС-линиями и анализируют растения в F_1 . Интрогрессивные линии подсолнечника как модельные объекты сочетают в одном генотипе аберрантные митохондриальные гены, вызывающие мужскую стерильность, и супрессирующие их ядерные факторы *Rf*. При реализации такого подхода для выявления и оценки характера экспрессии генов *Rf* исключается необходимость проведения скрещиваний. Кроме того, линии несут гены в гомозиготном состоянии, что предпочтительнее для подобного рода исследований ввиду возможного влияния межallelных взаимодействий на проявление признака у форм с гибридным геномом.

Таким образом, рассмотренные достижения отдаленной гибридизации подсолнечника подтверждают справедливость идей Н.И. Вавилова о значимости этого метода в расширении генетического разнообразия возделываемых растений. Результаты, полученные с помощью межвидовой гибридизации, в значительной мере способствовали развитию частной генетики подсолнечника. На их основе был установлен геномный состав рода *Helianthus*, определены особенности внутривидовых и межвидовых взаимосвязей. На современном этапе отдаленную гибридизацию необходимо использовать прежде всего для решения проблем селекции, связанных с созданием устойчивых к болезням и вредителям высокоурожайных сортов и гибридов. В числе основных задач — перенос генов устойчивости к вредным организмам и стрессовым факторам среды от диких видов рода *Helianthus* в генофонд культурного подсолнечника, создание новых генетических систем ЦМС-*Rf*. ЦМС, широко применяемая в селекции, может рассматриваться и в ином аспекте — как модель для выяснения фундаментальных механизмов взаимодействия ядра и цитоплазмы у цветковых растений. Успех работы в этих направлениях во многом зависит от результатов, полученных с использованием методов классической генетики, а также молекулярно-генетических технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н.И. Генетика на службе социалистического земледелия. Избранные труды. М.-Л., 1965, т. 5: 262-287.
2. Ригин Б.В. Н.И. Вавилов и основные направления и результаты исследований в отделе генетики ВНИИ растениеводства. Вестник ВОГиС, 2007, 11(3/4): 525-536.
3. Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации. Теоретические основы селекции растений. М.-Л., 1935: 293-354.
4. Цицин Н.В. Теория и практика отдаленной гибридизации. М., 1981.
5. Першина Л.А. О роли отдаленной гибридизации и полиплоидии в эволюции растений. Вестник ВОГиС, 2009, 13(2): 336-344.
6. Вавилов Н.И. Законы естественного иммунитета растений к инфекционным заболеваниям (Ключи к нахождению иммунных форм). Избранные труды. М.-Л., 1964, т. 4: 430-488.
7. Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям. М., 1986.
8. Шибря Н.А. Межвидовая гибридизация в роде *Helianthus* L. Изв. АН СССР, серия биол., 1938, 3: 733-769.
9. Шибря Н.А. Скрещивание топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) с подсолнечником (*Helianthus annuus* L.). Докл. АН СССР, 1936, 11(5): 189-192.
10. Пустовойт Г.В. Селекция подсолнечника на групповой иммунитет методом межвидовой гибридизации. Подсолнечник. М., 1975: 164-209.
11. Пустовойт Г.В. Межвидовая гибридизация как метод селекции на групповой иммунитет. Генетика, 1966, 2(1): 59-69.
12. Анащенко А.В. Селекция подсолнечника на устойчивость к болезням. Обзорная информация. М., 1978.
13. Анащенко А.В., Попова А.И. Коллекция дикорастущего подсолнечника и пути ее использования в селекции. С.-х. биол., 1985, 10: 9-11.
14. Seiler G. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. Field Crops Res., 1992, 30(3-4): 192-230.
15. Iouras M., Vranceanu A.V., Stanciu D., Soroga I. Sunflower inbred lines derived from interpecific hybrids. Helia, 2002, 25(36): 59-64.
16. Гаврилова В.А. Генетическая изменчивость видов рода *Helianthus* L. и возможности ее использования в селекции. Автореф. докт. дис. СПб, 2003.
17. Atlagic J. Roles of interspecific hybridization and cytogenetic studies in sunflower breeding. Helia, 2004, 27(4): 1-24.
18. Davey M.R., Jan M. Sunflower (*Helianthus annuus* L.): genetic improvement using conventional and in vitro technologies. J. Crop Improv., 2010, 24(4): 349-391.
19. Schilling E.E., Heiser C.B. Infrageneric classification of *Helianthus* (*Compositae*). Taxon, 1981, 30(2): 393-403.
20. Christov M. New sources of male sterility and opportunities for their utilization in sunflower hybrid breeding. Helia, 1992, 15(16): 41-48.
21. Чепурная А.Л., Шерстюк С.В., Тихомиров В.Т. CMS-*Rf* system for sunflower breeding. Helia, 2003, 26(38): 59-66.

22. Serieys H.A. Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources. FAO Progress Report (1996-1999). *Helia*, 1996, 22 (special issue): 71-84.
23. Miller J.F., Gulya T.J. Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Sci.*, 1991, 31(1): 40-43.
24. Анащенко А.В. Филогенетические связи в роде *Helianthus* L. Тр. по прикл. бот., ген. и сел., 1979, 64(2): 146-56.
25. Georgieva-Todorova I.D. Interspecific hybridization in the genus *Helianthus* L. *Z. Pflanzenzüchtung*, 1984, 93(4): 265-279.
26. Kostoff D. Autosynthesis and structure hybridity of the F₁-hybrid *H. tuberosus* L. × *H. annuus* L. and their sequences. *Genetica*, 1939, 11(5-6): 285-300.
27. Анисимова И.Н. Геномный анализ рода *Helianthus* L. *Генетика*, 1984, 21(12): 1925-1933.
28. Sossey-Alaoui K., Serieys H., Tersac M., Lambert P., Schilling E., Griveau Y., Kaan F., Berville A. Evidence for several genomes in *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97(3): 422-430.
29. Chandler J.M., Beard B.H. Sunflower interspecific hybridization using embryo culture: Proc. 8th Int. Sunflower Conf. Minneapolis, USA, 1978: 510-515.
30. Krauter R., Steinmetz A., Freidt W. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 1991, 82(4): 521-525.
31. Faure N., Serieys H., Berville A., Cazaux E., Kaan F. Occurrence of partial hybrids in wide crosses between sunflower (*Helianthus annuus*) and perennial species *H. mollis* and *H. orgyalis*. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 104(5): 652-660.
32. Sukno S., Ruso J., Jan C.C., Melero-Vara J.M., Fernández-Martínez J.M. Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica*, 1999, 106(1): 69-78.
33. Binsfeld P.C., Wingender R., Schnabl H. Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 101(8): 1250-1258.
34. Попов В.Н., Юшкина Л.Л., Шарыпина Я.Ю., Кириченко В.В. Генотипические особенности скрещиваемости культурного подсолнечника с дикими видами и использование эмбриокультуры при отдаленной гибридизации. *Цитология и генетика*, 2005, 39(1): 3-8.
35. Cazaux E., Serieys H., Lambert P., Sossey-Alaoui K., Tersac M., Berville A. Phenotypic and molecular analyses of «sunflower × *Helianthus mollis*» interspecific crosses. Proc. 14th Int. Sunflower Conf. Beijing, China, 1996, 2: 1093-1098.
36. Breton C., Gil A., Wagnier J., Serieys H., Berville A. Transfer of architectural traits from perennial *Helianthus mollis* Lam. to sunflower (*H. annuus* L.) and localization of introgression. *Euphytica*, 2012, 186(2): 557-572.
37. Карпеченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. (к проблеме экспериментального видообразования). Тр. по прикл. бот., ген. и сел., 1927, 17(3): 305-410.
38. Jackson R.C., Murrey B.G. Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.*, 1983, 64(2-3): 213-222.
39. Jan C.C., Chandler J.M. Sunflower interspecific hybrids and amphiploids of *Helianthus annuus* × *H. bolanderi*. *Crop Sci.*, 1989, 29(3): 643-646.
40. Jan C.C., Fernández-Martínez J.M., Ruso J., Mucoz-Ruz J. Registration of four sunflower germplasms with resistance to *Orobanche cumana* race F. *Crop Sci.*, 2002, 42(6): 2217-2218.
41. Ronicke S., Hahn V., Horn R., Grone I., Brahm L., Friedt W. Interspecific hybrids of sunflower as a source of *Sclerotinia* resistance. *Plant Breeding*, 2004, 123(2): 152-157.
42. Sujatha M., Prabakaran A.J. Ploidy manipulation and introgression of resistance to *Alternaria helianthi* from wild hexaploid *Helianthus* species to cultivated sunflower (*H. annuus* L.) aided by anther culture. *Euphytica*, 2006, 152(2): 201-215.
43. Seiler G.J., Gulya T.J., Marek F.L. Exploration for wild *Helianthus* species from the desert southwestern USA for potential drought tolerance. *Helia*, 2006, 29(45): 1-10.
44. Gavrilova V.A., Tolstaya T.T., Rozhkova V.T. Analysis of interspecific hybrids resulting from crosses between perennial wild *Helianthus* species and the cultivated sunflower. FAO Progress Report (1995-1996). Germany, 1997: 75-80.
45. Гаврилова В.А. Результаты межвидовой гибридизации культурного и многолетних дикорастущих видов подсолнечника. Тез. докл. Межд. конф. «Проблемы интродукции растений и отдаленной гибридизации». М., 1998: 292-294.
46. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. СПб, 2003.
47. Гаврилова В.А., Савченко Н.А., Толстая Т.Т., Рожкова В.Т., Пендинен Г.И., Антонова Т.С. Использование коллекции многолетних дикорастущих

- видов *Helianthus* L. для решения проблем гетерозисной селекции подсолнечника. В сб.: Генетические ресурсы культурных растений. Проблемы мобилизации, инвентаризации, сохранения и изучения важнейших сельскохозяйственных культур для решения приоритетных задач селекции. СПб, 2001: 242-243.
48. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н., Рожкова В.Т., Толстая Т.Т. Использование многолетних дикорастущих видов для создания интрогрессивных линий подсолнечника. В сб. докл. Межд. науч.-практ. конф. «Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника», посвященной 120-летию со дня рождения академика В.С. Пустовойта. Краснодар, 2006: 110-123.
 49. Hristova-Chebardzi M., Atanasova R., Batcharova R., Christov M., Ivanova I. Characterization of hybrids between *H. annuus* L. and the subspecies subromboides (Rydberg) Heiser of perennial hexaploid *H. pauciflorus*. *Helia*, 30(47): 37-50.
 50. Saftic-Pankovic D. Application of molecular markers in sunflower breeding. *Genetika*, 2007, 39(1): 1-11.
 51. Tarpomanova N., Hvarleva Tz., Hristova M., Atanasov I. Molecular marker characterization of breeding lines derived from *Helianthus annuus* × *Helianthus bolanderi* interspecific hybrids. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2009, 23(2): 565-567.
 52. Natali L., Giordani T., Polizzi E., Pugliesi C., Fambrini M., Cavallini A. Genomic alterations in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosus*. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97(8): 1240-1247.
 53. Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Лоскутов А.В., Рожкова В.Т., Толмачев В.В. Полиморфизм и наследование запасного белка семян у подсолнечника. *Генетика*, 2004, 40(9): 1215-1223.
 54. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Избранные труды, т. V. М.-Л., 1965: 179-222.
 55. Анисимова И.Н., Туманова Л.Г., Гаврилова В.А., Дягилева А.В., Паша Л.И., Митин В.А., Тимофеева Г.И. Нестабильность генома межвидовых гибридов подсолнечника. *Генетика*, 2009, 45(9): 1067-1077.
 56. Маркин Н.В., Тихонова М.А., Гаврилова В.А., Анисимова И.Н., Толстая Т.Т., Усатов А.В. Многолетние виды подсолнечника как потенциальные доноры гена *Rf1*. Тр. по прикл. ботан., ген. и сел., 2009, 166: 177-179.
 57. Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Гаврилова В.А. Генотипическая изменчивость уникального богатого метионином белка SFA8 подсолнечника. Мат. Межд. науч. конф. «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий», посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. Минск, 2010: 6.
 58. Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Алпатьева В.А., Тимофеева Г.И., Рожкова В.Т., Толстая Т.Т., Дука М.В. Идентификация гена *Rf1* в коллекции подсолнечника на основе молекулярного скрининга. Тр. по прикл. ботан., ген. и селекции, 2009, 166: 336-343.
 59. Tasci-Adjukovic K., Vasic D., Nagl N. Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(7): 698-704.
 60. Mc Clintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 1984, 226(4676): 792-801.
 61. Голубовский М.Д. Организация генотипа и формы наследственной изменчивости эукариот. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. Молекулярная генетика, эволюция и молекулярно-генетические основы селекции. М., 1985: 146-162.
 62. Christov M. Hybridization of cultivated sunflower and wild *Helianthus* species. Proc. Int. Conf. «Compositae: systematics, biology, utilization (Royal Botanic Gardens, Kew, 1994)», V. 2. *Compositae: biology and utilization* /P. Calogari, D. Hind (eds.). UK, Kew, 1996, 2: 603-615.
 63. Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.*, 1969, 19(2): 99-106.
 64. Rhoades M.M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. *Science*, 1931, 73(1891): 340-341.
 65. Schnable P.S., Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998, 3: 175-180.
 66. Иванов М.К., Дышниц Г.М. Цитоплазматическая мужская стерильность и восстановление фертильности пыльцы у высших растений. *Генетика*, 2007, 43(4): 451-468.
 67. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl.): S154-S169.
 68. Lonsdale D.M. Cytoplasmic male sterility: a molecular perspective. *Plant Physiol. Biochem.*, 1987, 25: 265-271.
 69. Stoeva-Popova P.K., Dimaculangan D., Radkova M., Vulkova Z. Towards cytoplasmic male sterility in cultivated tomato. *J. Agricult., Food and Environmental Sci.*, 2007, 1(1): <http://www.scientificjournals.org/journals2007/articles/1058.htm>.
 70. Hanson M.R. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu. Rev. Genet.*, 1991,

- 25: 461-486.
71. Bomblies K. Doomed lovers: mechanisms of isolation and incompatibility in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2010, 61: 109-124.
 72. Rieseberg L.R., Blackman B.K. Speciation genes in plants. *Annals of Botany*, 2010, 106(3): 439-455.
 73. Castandet B., Araya A. The nucleocytoplasmic conflict, a driving force for the emergence of plant organellar RNA editing. *IUBMB Life*, 2012, 64(2): 120-125.
 74. Horn R. Molecular diversity of male-sterile inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 104(4): 562-570.
 75. Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding. *Plant Breeding*, 2008, 127(6): 587-591.
 76. Liu Z., Mulpuri S., Feng J., Vick B.A., Jan C.C. Molecular mapping of the *Rf3* fertility restoration gene to facilitate its utilization in breeding confection sunflower. *Mol. Breed.*, 2012, 29(2): 275-284.
 77. Lurin C., Andres C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyere C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffmann B., Lecharny A., Le Ret M., Martin-Magniette M.L., Mireau H., Peeters N., Renou J.P., Szurek B., Taconnat L., Small I. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2089-2103.
 78. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы митохондрий растений: ретроградная регуляция. *Физиология растений*, 2010, 57(1): 9-22.
 79. Bentolila S., Alfonso A.A., Hanson M.R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *PNAS USA*, 2002, 99(16): 10887-10892.
 80. Kazama T., Toriyama K. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Letters*, 2003, 544(1-3): 99-102.
 81. Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.*, 2005, 111(6): 994-1012.
 82. Jordan D.R., Klein R.R., Sakrewski K.G., Henzell R.G., Klein P.E., Mace E.S. Mapping and characterization of *Rf5*, a new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.*, 2011, 123(3): 383-396.
 83. Fujii S., Bond Ch.S., Small I.D. Selection patterns on restorer-like genes reveals a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *PNAS USA*, 2011, 108(4): 1723-1728.
 84. Horn R. Recombination: cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants. *Progress in Botany*, 2006, 67: 31-52.
 85. Yue B., Miller J.F., Hu J. Experimenting with marker assisted selection in confection sunflower germplasm enhancement. *Proc. 29th Sunflower Research Forum*. Fargo, USA, 2007: <http://www.sunflowernsa.com/research/research-workshop/>.
 86. Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Алпатьева Н.В., Рябова Д.Н., Рожкова В.Т. Полиморфизм гомологов *PPR-Rf1*-генов в геноме подсолнечника. *Тр. по прикл. ботан., ген. и сел.*, 2011, 186: 64-79.

ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства
им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии,
190000 г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44,
e-mail: irina_anisimova@inbox.ru

Поступила в редакцию
10 мая 2012 года

THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS OF INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION IN SUNFLOWER

I.N. Anisimova, V.A. Gavrilova

S u m m a r y

The development of N.I. Vavilov concepts on distant hybridization as a way for broadening cultivated plants diversity is demonstrated on the example of sunflower. The review of studies on the crossability of cultivated sunflower with wild *Helianthus* species, the inheritance of characters in hybrid generations, the peculiarities of the genome structural and functional reorganizations in interspecific hybrid progenies is given. The practical results of the crosses between *H. annuus* and perennial *Helianthus* species are analyzed; the diverse aspects for application of this approach in sunflower breeding and genetics are discussed. With the use of distant hybridization a new model for investigation of nuclear-cytoplasmic interaction genetic mechanisms is suggested.