

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.1.7-19>

УДК 633.491:631.524:58.085

Технология протопластов и соматическая гибридизация картофеля – современное состояние и перспективы (обзор)

© 2023. О. Б. Поливанова✉, А. С. Егорова, А. Б. Сиволапова, С. В. Горюнова
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха»,
Московская область, г. Люберцы, д. п. Красково, Российская Федерация

Дикie виды растений рода *Solanum* часто использовались в качестве источников важных сельскохозяйственных признаков, включая устойчивость к разнообразным болезням, вредителям и воздействию абиотических факторов. Однако их широкое применение в селекции картофеля ограничено сложными барьерами половой несовместимости с *Solanum tuberosum* L. Слияние ферментативно изолированных протопластов соматических клеток является одним из подходов к преодолению половой несовместимости. Многообразные ядерные и цитоплазматические признаки, проявляемые соматическими гибридами картофеля, обеспечивают новый генетический материал для селекционных программ, о чем свидетельствует создание большого количества соматических гибридов культурного картофеля с дикими видами *Solanum*. Исследования в области получения соматических гибридов картофеля с помощью слияния протопластов продолжаются уже более 40 лет. В рамках данного обзора рассматриваются перспективы применения данной технологии в современной селекции картофеля. Геномные, транскриптомные и протеомные исследования позволяют лучше понять фундаментальные процессы, лежащие в основе образования соматических гибридов, такие как формирование клеточной стенки, хромосомные перестройки в продуктах слияния, регенерация, а также вносят существенный вклад в понимание процессов стабилизации генома. Усовершенствование методов молекулярного скрининга как генома, так и цитоплазмы также способствует расширению области применения соматических гибридов в селекции. Наконец показано, что соматическая гибридизация способствует интрогрессии важных сельскохозяйственных признаков, прежде всего устойчивости к патогенам.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., соматические гибриды, протопласты

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха» (тема № FGGM-2022-0002).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Поливанова О. Б., Егорова А. С., Сиволапова А. Б., Горюнова С. В. Технология протопластов и соматическая гибридизация картофеля – современное состояние и перспективы (обзор). Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2023;24(1):7-19. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.1.7-19>

Поступила: 07.10.2022

Принята к публикации: 28.12.2022

Опубликована онлайн: 27.02.2023

Current state and prospects of protoplast technology and potato somatic hybridization (review)

© 2023 Oksana B. Polivanova✉, Anna S. Egorova, Anastasia B. Sivolapova, Svetlana V. Goryunova

Russian Potato Research Centre, Moscow region, Lyubertsy, Kraskovo, Russian Federation

Wild *Solanum* species have often been used as sources of important agricultural traits, including resistance to various diseases, pests, and abiotic factors. However, their large-scale use in potato breeding is limited by complex barriers of sexual incompatibility with *Solanum tuberosum*. Fusion of protoplasts enzymatically isolated from somatic cells is one of the approaches to overcoming sexual incompatibility. The diverse nuclear and cytoplasmic traits exhibited by potato somatic hybrids provide new genetic material for breeding programs, which is confirmed by the creation of a large number of somatic hybrids of cultivated potatoes with wild *Solanum* species. The research in development of somatic potato hybrids by means of protoplast fusion has been carried out for more than 40 years already. In this review, the prospects for the use of this technology in modern potato breeding are considered. Genomic, transcriptomic, and proteomic studies provide further insight into the fundamental processes underlying the somatic hybrids formation, such as cell wall formation, chromosomal rearrangements in fusion products, regeneration, and also make a significant contribution to understanding the processes of genome stabilization. Improvement in the methods of molecular screening of both genome and cytoplasm also contributes to the expansion of the field of application of somatic hybrids in breeding. Finally, it has been shown that somatic hybridization promotes the introgression of important agricultural traits, primarily resistance to pathogens.

Keywords: *Solanum tuberosum* L, somatic hybrids, protoplasts

Acknowledgments: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the Russian Potato Research Centre (theme No. FGGM -2022-0002).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interest: the authors declare that there was no conflict of interest.

For citation: Polivanova O. B., Egorova A. S., Sivolapova A. B., Goryunova S. V. Current state and prospects of protoplast technology and potato somatic hybridization (review). *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2023;24(1):7-19. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.1.7-19>

Received: 07.10.2022

Accepted for publication: 28.12.2022

Published online: 27.02.2023

Протопласты – это растительные клетки, у которых удалена клеточная стенка обработкой ферментами, расщепляющими целлюлозу [1]. Системы изолированных протопластов растений используются в генетической трансформации, функциональном исследовании генов, реконструкции сигнальных и метаболических путей, при определении субклеточной локализации белков, изучении межбелковых взаимодействий *in vivo*, при анализе транзиторной экспрессии и для получения соматических гибридов путем слияния протопластов [2]. Протопласты растений были впервые выделены Е. С. Цоцкинг (Е. С. Cocking) в 1960 году из клеток корня томата [3]. Впоследствии были разработаны другие методики и протоколы для эффективного получения жизнеспособных протопластов из множества видов растений, клеток, тканей и типов органов, а также регенерации растений из протопластов. С момента открытия соматической гибридизации, эксперименты с регенерацией растений из протопластов проводились более чем на 320 видах высших растений, входящих в 146 родов и 49 семейств [4].

Соматическая гибридизация – это метод культуры клеток и тканей, который позволяет изменять клеточные геномы путем слияния протопластов и комбинировать не только ядерные гены, но и гены органелл, создавая новые формы растений. Основной вклад этого метода в селекцию растений – преодоление барьеров полового скрещивания и возможность переноса чужеродных генов между различными видами, родами и семействами растений. Процесс создания соматического гибрида включает несколько этапов: поиск подходящего экспланта, выделение протопластов, их слияние, регенерация растений, последующий отбор и идентификация соматических гибридных растений.

В настоящее время изолированные протопласты играют ключевую роль в разьяснении нашего понимания клеточной биологии, структуры, функции растительных клеток и тканей, а также в исследованиях переноса генов и манипуляций с ними, потому что для

соматической гибридизации, в отличие от трансформации, не нужно идентифицировать и изолировать интересующие исследователей гены, чтобы перенести их в геном другого растения. По той же причине соматическая гибридизация является отличным инструментом для модификации сложных полигенных признаков. И, самое главное, соматическая гибридизация позволяет осуществлять перенос не только ядерных генов, но и генетического материала митохондрий и пластид от обоих родительских форм.

Дикie виды рода *Solanum* хорошо адаптируются к широкому спектру климатических и почвенных условий, устойчивы ко многим патогенам и вредителям. Все это делает их крайне привлекательными для селекционеров, однако такие факторы, как автотетраплоидность, высокий уровень гетерозиготности, тетрасомное наследование, сложности в преодолении барьеров скрещивания и стерильность многих форм – сильно осложняют селекционную работу. Одним из методов, способных решить эти проблемы, является соматическая гибридизация. Именно поэтому культивируемый картофель (*Solanum tuberosum* L.) стал одной из первых сельскохозяйственных культур, использованных для получения соматических гибридов. В настоящее время с использованием технологии слияния протопластов были получены сотни внутри- и межвидовых соматических гибридов *Solanum tuberosum* L. Они были охарактеризованы по множеству признаков и широко используются в селекции картофеля, в генетических и геномных исследованиях.

Цель обзора – обобщить доступную информацию об исследованиях в области соматической гибридизации картофеля и оценить перспективы развития данной технологии для селекции. В рамках обзора также описаны технические и экспериментальные подходы к получению протопластов картофеля и методы их слияния.

Материал и методы. Поиск литературы по соответствующей теме осуществлялся в

базах данных PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar, на сайтах издательств периодической научной литературы Springer, Elsevier, Taylor & Francis и другие. Поиск в базах данных осуществляли по ключевым словам: *Breeding, Genetics, Genomics, Potato, Solanum species, Somatic hybrid, Protoplasts, Somatic hybridization, Protoplast fusion and culture*. Поиск литературы на русском языке проводили в базе данных РИНЦ. В качестве ключевых слов использовались: *соматическая гибридизация, картофель, Solanum tuberosum, соматические гибриды, протопласты*. Ограничения по дате публикаций во время поиска не вводились. Это связано с тем, что опыт получения и применения протопластов на культуре картофеля насчитывает более чем 40-летнюю историю. Некоторые подходы к получению протопластов, их слиянию с последующей регенерацией являются хорошо запротоколированными, и эти протоколы остаются актуальными в настоящее время. Первичный отбор публикаций осуществляли по заголовкам и аннотациям. В дальнейшем рассматривали соответствующие разделы полного текста отобранных статей – материалы и методы, результаты и обсуждения. В общей сложности при работе над обзором литературы было проанализировано более 150 источников, из которых для вторичного анализа и работы над обзором было отобрано 75 статей.

Основная часть. Перспективы соматической гибридизации картофеля. Проанализировав обзорные и оригинальные статьи, посвященные соматической гибридизации картофеля, были даны следующие обоснования преимуществ этой технологии по сравнению с традиционными методами селекции:

- 1) возможность получения фертильных соматических гибридов с целевыми признаками диких видов;
- 2) возможность переноса моногенных и полигенных признаков за один этап;
- 3) возможность рекомбинации ядерных и цитоплазматических геномов;
- 4) отсутствие угрозы биобезопасности, в отличие от использования трансгенных технологий.

Кроме уже упомянутых барьеров половой несовместимости при скрещивании с дикими родственными видами, еще одной особенностью генетики картофеля является то, что большинство культивируемых форм *S. tuberosum* являются тетраплоидами. Как следствие, некоторые селекционные программы предпо-

лагают применение дигаплоидов ($2n = 24$), которые используются для воссоздания тетраплоидов ($2n = 48$). Поэтому на сегодняшний день используются два основных подхода к гибридизации видов рода *Solanum* – получение межвидовых асимметричных гибридов *S. tuberosum* с дикими видами или создание симметричных гибридов от двух диплоидных линий одного вида.

Первый подход дает возможность интрогрессии ценных хозяйственных признаков от дикого картофеля к культурному. Например, таким образом были получены гибриды – потенциальные источники ценных признаков картофеля, таких как сниженное содержание гликоалкалоидов и устойчивость к засолению [5, 6, 7]. Кроме того, соматическая гибридизация является альтернативным способом переноса R-генов картофеля [8].

Второй подход приводит к образованию тетраплоидов, которые сочетают в себе ценные черты используемых диплоидных составляющих и, в то же время, сохраняют высокий уровень гетерозиготности [6].

Получение аллоплазматических форм картофеля методом соматической гибридизации также является перспективным. Это позволяет получить новые формы с различными комбинациями ядерных, митохондриальных и пластидных геномов, например формы с рекомбинантными органеллами или цитоплазматические гетерозиготы [9]. Практическое значение имеют работы по созданию форм с цитоплазматической мужской стерильностью. В работе А. Перл с соавт. (A. Perl et al.) [10] была показана возможность переноса данного признака от дикого вида *S. stoloniferum*.

Помимо существенных преимуществ метода соматической гибридизации, у него есть и ряд недостатков, ограничивающих его широкое применение в селекции. Во-первых, это большая длительность эксперимента по сравнению с генетической трансформацией, обусловленная необходимостью устранения нежелательных признаков от соматических гибридов посредством серии обратных скрещиваний. Во-вторых, это генетическая нестабильность, отсутствие или плохая урожайность, невысокая жизнеспособность или летальность, очень низкая скрещиваемость полученных асимметричных соматических гибридов с культивируемым генофондом и потеря гибридами целевых признаков, что связано с негативными эффектами генетических факторов, вовлеченных в контроль пре- и постзиготической несовместимо-

сти, которые могут оказывать эффект в последующих поколениях [9, 11]. Несмотря на это, есть много примеров успешной интрогрессии некоторых агрономически важных признаков соматических гибридов.

Первые протоколы по соматической гибридизации *S. tuberosum* с дикими видами были разработаны в 1990-х годах [12, 13, 14] и используются до сих пор. К настоящему времени путем слияния протопластов были получены сотни меж- и внутривидовых соматических гибридов с использованием 23 видов *Solanum* [15]. Например, известны соматические гибриды, устойчивые к *Phytophthora*

infestans, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanaceae*, PLRV, PVX, PVY и нематоды, а также соматические гибриды с морозостойкостью и более высокой способностью адаптации к холоду (табл.). Помимо этого, получены гибриды с более высоким содержанием крахмала и пониженной или повышенной концентрацией гликоалкалоидов [6]. Также соматические внутривидовые и межвидовые гибриды *Solanum* получают с целью создания новой ядерно-цитоплазматической зародышевой плазмы и индукции изменчивости пластидной и митохондриальной ДНК [16, 17, 18, 19].

Таблица – Соматические гибриды *S. tuberosum* с дикими видами *Solanum* /
Table – *S. tuberosum* somatic hybrids with wild *Solanum* species

Вид / Species	Целевой признак / Target trait	Способ слияния / Method of fusion	Подтверждение гибридности / Characterization	Ссылка / References
1	2	3	4	5
<i>S. acaule</i>	Устойчивость к <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp., гликоалкалоиды / Resistance to <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp., glycoalkaloids content	Нет информации / No data	Проточная цитометрия, содержание гликоалкалоидов / Flow cytometry, glycoalkaloid content	[20]
<i>S. berthaultii</i>	Устойчивость к засолению, к <i>Fusarium solani</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> и PVY / Salt-stress resistance, to <i>Fusarium solani</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> and PVY	Электрослияние / Electrofusion	I-SSR-PCR, проточная цитометрия / I-SSR-PCR, flow cytometry	[21, 22]
<i>S. berthaultii</i>	Устойчивость к <i>Streptomyces</i> spp. / Resistance to <i>Streptomyces</i> spp.	Нет информации / No data	Подсчет хромосом, фенотипический анализ / Chromosome counting, phenotype analysis	[23]
<i>S. brevidens</i>	Содержание гликоалкалоидов / Glycoalkaloids content	Нет информации / No data	Анализ гликоалкалоидов, геномная гибридизация <i>in situ</i> / Glycoalkaloid analysis, GISH	[24]
<i>S. bulbocastanum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	ПЭГ-индуцированное слияние / PEG induced fusion	RAPD, RFLP	[25]
	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	Электрослияние / Electrofusion	Проточная цитометрия, SSR, AFLP, окрашивание DAPI / Flow cytometry, SSR, AFLP, DAPI staining	[26]
	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>		RAPD	[27, 28]
	Устойчивость к <i>P. infestans</i> и <i>Meloidogyne chitwoodi</i> / Resistance to <i>P. infestans</i> and <i>Meloidogyne chitwoodi</i>		RAPD, проточная цитометрия / RAPD, flow cytometry	[17]
	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>		Геномная гибридизация <i>in situ</i> , ISSR / GISH, ISSR	[16, 29]
	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>		Ядерные и цитоплазматические SSR-маркеры / Nuclear and cytoplasmic SSR-markers	[30]
<i>S. cardiophyllum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	Электрослияние / Electrofusion	RAPD, морфологическая оценка, подсчет хромосом / RAPD, morphological estimation, chromosome counting	[31]
	Устойчивость к колорадскому жуку и PVY / Resistance to Colorado potato beetle and PVY		SSR, AFLP, MFLP, морфологический анализ / SSR, AFLP, MFLP, morphological estimation	[32]

1	2	3	4	5
<i>S. cardiophyllum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	Электрослияние / Electrofusion	RAPD, ISSR, SSR, AFLP, тип цитоплазмы, проточная цитометрия, морфологическая оценка / RAPD, ISSR, SSR, AFLP, type of cytoplasm, flow cytometry, morphological estimation	[33]
<i>S. chcoense</i>	Устойчивость к <i>R. solanacearum</i> / Resistance to <i>R. solanacearum</i>	Нет информации / No data	SSR, проточная цитометрия / SSR, flow cytometry	[34, 35]
<i>S. circaefolium</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	Электрослияние / Electrofusion	Проточная цитометрия, RFLP / Flow cytometry, RFLP	[36]
<i>S. commersonii</i>	Устойчивость к бактериальному увяданию / Bacterial wilt resistance	Нет информации / No data	Подсчёт числа хромосом / Chromosome counting	[37]
<i>S. etuberosum</i>	Устойчивость к PVY / Resistance to к PVY	Электрослияние / Electrofusion	Проточная цитометрия, SSR, тип цитоплазмы, оценка фенотипа / Flow cytometry, SSR, type of cytoplasm, phenotypes estimation	[18, 38]
		Нет информации / No data	Геномная гибридизация <i>in situ</i> , ISSR, проточная цитометрия / GISH, ISSR, flow cytometry	[39]
<i>S. melongena</i>	Устойчивость к бактериальному увяданию / Bacterial wilt resistance	Электрослияние / Electrofusion	Геномная гибридизация <i>in situ</i> , проточная цитометрия, SSR / GISH, flow cytometry, SSR	[40]
<i>S. × michoacanum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>		CAPS, RAPD, морфологическая, цитологическая и физиологическая характеристика / CAPS, RAPD, morphological estimation, cytological and physiological characteristics	[41]
<i>S. nigrum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	ПЭГ-индуцированное слияние / PEG induced fusion	RAPD, проточная цитометрия / RAPD, flow cytometry	[28]
<i>S. phureja</i>	Устойчивость к бактериальному увяданию / Bacterial wilt resistance	Электрослияние / Electrofusion	Изоферментный анализ, RAPD, SSR, анализ хлоропластного генома / Isoenzyme analysis, RAPD, SSR, chloroplast genome analysis	[42]
<i>S. pinna-tisectum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> и <i>Erwinia carotovora</i> / Resistance to <i>P. infestans</i> and <i>Erwinia carotovora</i>		RAPD, проточная цитометрия / RAPD, flow cytometry	[17]
<i>S. sanctae-rosae</i>	Устойчивость к цистообразующей нематоды / Nematode (Meloidogyne spp.) resistance	Нет информации / No data	RFLP, SSR, анализ генома митохондрий и хлоропластов / RFLP, SSR, analysis of mitochondria and chloroplasts genome	[43]
<i>S. stenotomum</i>	Устойчивость к бактериальному увяданию / Bacterial wilt resistance	Электрослияние / Electrofusion	SSR, биохимический анализ, оценка плоидности / SSR, biochemical analysis, ploidy estimation	[44]
<i>S. tarnii</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> , колорадскому жуку и PVY / Resistance to <i>P. infestans</i> , colorado potato beetle and PVY		Проточная цитометрия, SSR, AFLP / Flow cytometry, SSR, AFLP	[8]
<i>S. vernei</i>	Устойчивость к засолению / Salt-stress resistance	ПЭГ-индуцированное слияние / PEG induced fusion	Проточная цитометрия, ISSR, RAPD, изоферментный анализ / Flow cytometry, ISSR, RAPD, isoenzyme analysis	[45]
<i>S. verrucosum</i>	Устойчивость к вирусу скручивания листьев (PLRV) / Resistance to PLRV	Электрослияние / Electrofusion	Оценка фенотипа, RFLP / Phenotypes estimation, RFLP	[46]
<i>S. villosum</i>	Устойчивость к <i>P. infestans</i> / Resistance to <i>P. infestans</i>	ПЭГ-индуцированное слияние / PEG induced fusion	Геномная гибридизация <i>in situ</i> , RAPD / GISH, RAPD	[47]

В последние 20 лет количество исследований с использованием метода соматической межвидовой гибридизации неуклонно растет. Активно изучаются генетические основы интрогрессированных от диких видов признаков, ядерный и цитоплазматический геном и другие характеристики полученных ранее соматических гибридов. Кроме того, постоянно расширяется количество методов, применяемых для подтверждения гибридности: от цитологических до биохимических и молекулярно-генетических. Сводные данные об основных работах в этом направлении представлены в таблице.

Данные исследования направлены на устранения препятствий в применении соматических гибридов в селекции. Важной задачей является установление моделей наследования соматических гибридов с большой генетической сложностью, так как в ходе соматической гибридизации картофеля образуются продукты с различной плоидностью.

В ходе работ по межвидовой соматической гибридизации картофеля изначально

получают гибриды с участием диких видов и первые поколения от скрещивания соматических гибридов. Затем осуществляется отбор гибридных форм с целевыми признаками. Пути интрогрессии генетического материала диких видов в виде единичных чужеродных хромосом или их сегментов в геном *S. tuberosum* выявляются с помощью цитогенетических методов и хромосом-специфичных ДНК-маркеров. На следующем этапе осуществляется картирование генов и локусов количественных признаков, определяющих целевой признак и разработка сцепленных с ними молекулярных маркеров. На последнем этапе происходит вовлечение в селекционный процесс генов и локусов количественных признаков диких видов, осуществляются работы по созданию пребридингового материала и получению новых сортов [9].

Технические и экспериментальные подходы к получению соматических гибридов S. tuberosum. Этапы эксперимента по получению соматических гибридов картофеля отображены на рисунке 1.

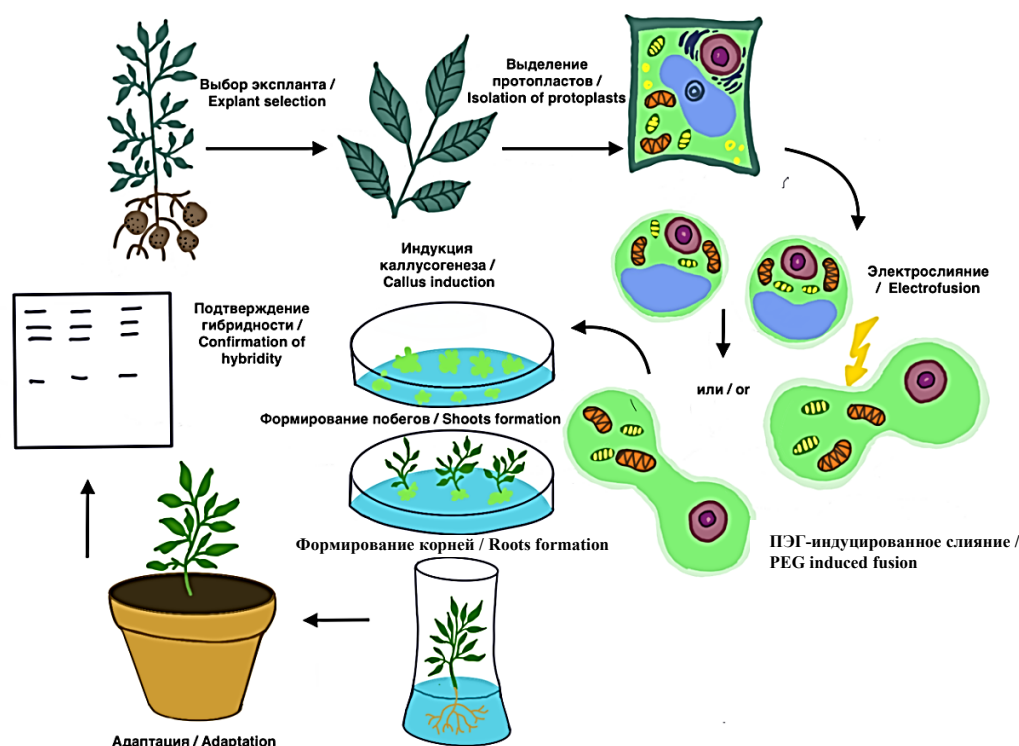


Рис. Этапы соматической гибридизации *S. tuberosum* /
Fig. Stages of somatic hybridization experiment of *S. tuberosum*

Первый этап: поиск экспланта, выделение протопластов, регенерация тканей. На первом этапе необходимы предварительные исследования культуры клеток и тканей, прежде всего,

для определения условий регенерации побегов. В качестве источника клеток, как правило, используют ткани листа. Это объясняется тем, что листья растений доступны в большом

количестве и легко разрушаются при обработке ферментами, что ведет к высвобождению большого количества протопластов. Одним из основных факторов роста и выживаемости культуры протопластов являются условия окружающей среды, в которых выращиваются растения-доноры. Температура воздуха, параметры света и фотопериод, относительная влажность в значительной степени влияют на физиологию клеток эксплантов, на простоту ферментативного выделения протопластов, их последующую жизнеспособность, а также рост клеток в культуре. Изначально исследователи использовали в качестве исходного материала только молодые растения, выращенные в естественных условиях. Однако, со временем, в качестве доноров все чаще стали выбирать побеги, культивируемые *in vitro*, которые обладают рядом преимуществ перед целыми растениями. Во-первых, физиологическое состояние культур побегов легче контролировать, поскольку точно определены и физические условия культивирования, и состав питательной среды, в том числе точно известно содержание регуляторов роста. Во-вторых, исключается время, затрачиваемое на поверхностную стерилизацию эксплантов.

В качестве основы для разработки сред для инициирования культуры протопластов, поддержания делений клеток (образования каллуса) и индукции органогенеза используются следующие стандартизированные среды с различными модификациями: MS [48], B5 ([49], KM [50], VKM [51], V-47 [52], K4 [53], SKM [54].

Частота регенерации для картофеля рассчитывается как отношение числа регенерантов к общему количеству эксплантов и варьируется от 4-10 до 30-60 % в зависимости от используемого протокола регенерации [6]. Для выделения протопластов картофеля используют следующие ферменты: целлюлаза (0,5-1,0 %), пектиназа, мацерозим (0,2 %), неорганические солевые растворы, содержащие маннит, сорбит или другие углеводные соединения для создания необходимых осмотических условий.

Второй этап: слияние протопластов. Слияние протопластов растений может осуществляться двумя основными способами. Первый – основан на применении химических фузогенов – нитрата натрия, ионов кальция при высоком pH, сульфата декстрана, моноолеата глицерина, водорастворимых полимеров (полиэтиленгликоль или поливини-

ловый спирт); второй – на использовании электрического тока.

Индукцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние неспецифично и эффективно для протопластов, принадлежащих к разным видам, родам или даже семействам. В рамках этого метода к смеси протопластов добавляют 22-30 % ПЭГ в соотношении 1:1. ПЭГ вызывает немедленную адгезию протопластов и образование кластеров клеток.

М. Сенда с соавторами (M. Senda et al.) [55] были первыми, кто продемонстрировал, что короткий электрический импульс может быть применен для индукции слияния протопластов. Они установили, что электрослияние протопластов протекает при комнатной температуре и в условиях физиологического pH без использования химических фузогенов. Сегодня именно этот метод чаще применяют для слияния протопластов картофеля (табл.).

Многочисленные работы показали, что нет никаких данных, указывающих на то, что сам метод слияния протопластов влияет на качество полученных гибридов (табл.). Слияние протопластов относительно неэффективно и неспецифично, поэтому индуцированная для слияния смесь содержит как исходные компоненты слияния и гетерокарионы, так и продукты гомофузии, то есть гомокариотические продукты слияния, и неспецифичные гетерокарионы. Поэтому крайне важным этапом в процессе получения соматических гибридов является отбор гетерокарионов [56].

Третий этап: отбор гибридов. Желаемые гибридные клетки обычно составляют менее 10 % от всего количества клеток, участвующих в слиянии. Именно поэтому разработка и оптимизация методов отбора гибридных клеток была одним из ключевых вопросов, которые необходимо было решить.

Один из методов отбора – выделение устойчивых к антибиотикам и гербицидам клеток [57]. Так, для селекции гетерокарионов картофеля применяют устойчивость к антибиотикам канамицину [58] и стрептомицину [59], а также к аналогу метаболита 6-азаурацилу [60]. Другой метод отбора – использование при гибридизации трансгенных линий, несущих ген зелёного флуоресцентного белка в качестве репортерного [61].

Четвертый этап: проверка гибридности и гибридный анализ. Для оценки гибридности используются разнообразные методы и подходы: цитологические (проточная цитометрия, подсчет хромосом, подсчет

замыкающих клеток, FISH-флуоресцентная гибридизация *in situ* и GISH-геномная гибридизация *in situ*; молекулярное маркирование (RAPD, RFLP, SSR, IISR, CAPS); биохимические методы, такие как изоферментный анализ; оценка фенотипа (морфология стеблей, листьев, клубней, соцветий, фертильность пыльцы) (табл.). В последнее время для получения более точной информации о структуре геномов соматических гибридов используется diversity array technology (DArT). Процесс разработки маркера DArT состоит из нескольких этапов: создание геномного представления; создание библиотеки; микрочипирование фрагментов ДНК на предметных стеклах; гибридизация меченых зондов; сканирование и анализ данных. Важным этапом технологии DArT является снижение сложности генома. Редуцированную фракцию генома получают путем расщепления геномной ДНК рестрикционными ферментами с последующим лигированием рестрикционных фрагментов с адаптерами. Карты DArT были получены для *Solanum × michoacanum* (mch) [62], *Solanum ruizceballosii* [63].

Соматические гибриды отличают по типам цитоплазмы (W/α, T/β, W/γ, W/δ и S/ε), определяемым с помощью молекулярных маркеров, специфичных для геномов хлоропластов и митохондрий [64]. К. Хосака и Р. Санетомо (К. Hosaka и R. Sanetomo) [65] разработали комбинацию из 5 маркеров и сгруппировали цитоплазму картофеля по шести типам: T (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*); D (*Solanum demissum*); P (*S. phureja*); A (*S. tuberosum* ssp. *andigena*); M (Mother type); W (Wild species).

Оценка наличия целевых признаков у соматических гибридов осуществляется в контролируемых условиях в лабораториях или полевых исследованиях.

Проверка гибридности также может исследоваться наряду с изучением генетической основы признаков, передаваемых в ходе соматической гибридизации.

Проблемы и перспективы соматической гибридизации S. tuberosum. В настоящее время в научных публикациях удалось обнаружить лишь одно упоминание сорта картофеля (Jeseo), полученного на основе соматических гибридов *S. tuberosum* и *S. brevidens* [66]. Работы по генетической и фенотипической оценках соматических гибридов картофеля и получение перспективного потомства F2, BC1, BC2 и

BC3 связаны с расширением использования соматических гибридов в селекционных программах. Например, многолетние полевые исследования соматических гибридов *S. tuberosum* и их потомков показали стабильную передачу и экспрессию устойчивости к PLRV и PVY в трех (BC1, BC2 и BC3) и двух (BC1 и BC2) поколениях соответственно [67]. Полевые испытания потомства BC1, полученного от соматических гибридов *S. tarnii*, также показали высокую урожайность, хорошее качество клубней и устойчивость к PVY [8].

Геномные исследования соматических гибридов и их родителей не проводились в широких масштабах. С развитием технологий секвенирования следующего поколения открываются возможности для применения этих инструментов на соматических гибридах для изучения биологии и усовершенствования картофеля.

Полные геномные последовательности хлоропластов *S. commersonii* – дикого вида и донора протопластов для интрогрессии устойчивости к бактериальному увяданию – позволили идентифицировать 2 Indel-маркера, которые могут быть использованы в генотипировании хлоропластов. Также результаты, полученные в этом исследовании, подтвердили случайное распределение генома хлоропластов при слиянии протопластов и его наследование по материнской линии, что может быть использовано для выбора подходящих пластидных генотипов в программах селекции картофеля [68]. Высокопроизводительное генотипирование соматических гибридов *S. × michoacanum* + *S. tuberosum* с использованием 5358 маркеров DArT показало наличие обеих родительских хромосом и потерю некоторых маркеров у гибридов [69]. А с помощью анализа микрочипов были идентифицированы гены устойчивости к фитофторозу у соматического гибрида *S. tuberosum* + *S. pinnatisectum* [70]. В другом исследовании с использованием микрочипов были идентифицированы гены, контролирующие процесс клубнеобразования у соматических гибридов *S. tuberosum* + *S. etuberosum*. Экспрессируемые в листьях гены были вовлечены в такие функции, как транспорт, метаболизм углеводов, фитогормонов, транскрипция, трансляция и связаны с клубнеобразованием [38].

Также был произведен анализ последовательностей митохондриального и пластидного генома соматических гибридов *S. com-*

mersonii и *S. tuberosum*, в ходе которого были идентифицированы сложные компоненты и структура генома, такие как гибридная форма 45S рДНК в соматическом гибриде, уникальный пластом в *S. commersonii* и рекомбинантный митогеном. Структура митогенома демонстрирует динамическую рекомбинацию, опосредованную тандемными повторами. Предполагается, что рекомбинантный митогеном может быть получен в результате гомологичной рекомбинации между обоими видами во время развития соматического гибрида [71].

Одной из проблем технологии соматической гибридизации и культуры клеток и тканей в целом является геномная нестабильность вследствие соматической вариабельности. Соматическая вариабельность может выражаться в проявлении различных морфологических признаков растений, времени появления всходов, количестве собранных клубней, содержании гликоалколоидов. Различия также идентифицируются на уровне ядерных микросателлитных маркеров (ncSSR) и связаны с вариациями фенотипа [72]. В 2019 году исследователи из США провели оценку нестабильности генома *S. tuberosum*, регенерированного из протопластов. Все регенеранты были затронуты анеуплоидией или структурными хромосомными изменениями. Некоторые хромосомы демонстрировали сегментарные делеции и дупликации. При повторной выборке разных листьев одного и того же растения обнаружены различия у трех регенерантов, что указывает на частое сохранение нестабильности. Эти результаты показали, что культивирование растений *in vitro*, в зависимости от используемого протокола, может вызывать нестабильность генома, приводя к крупномасштабным изменениям и поставить под угрозу конечный фенотип растения [73]. Геномная нестабильность также связана со сложными взаимодействиями генетических компонентов сливаемых клеток. Обнаружение этих генетических изменений требует привлечения молекулярно-генетических методов. В изучении генетической нестабильности растений, в частности картофеля, широко используются SSR-маркеры, выявляющие многочисленные полиморфизмы микросателлитов. Их использование в

изучении нестабильности генома основывается на том, что их перестройки связаны с нарушениями в системах исправления ошибок спаривания ДНК [74]. Соматические вариации могут быть объяснены не только структурными изменениями в ДНК – следует также принимать во внимание влияние эпигенетического фона. Так, длительно культивируемые регенеранты картофеля демонстрировали не только генетический, но и эпигенетический (метилирование) полиморфизм [75]. Не исключено, что подобного рода изменения могут возникать и при регенерации протопластов в ходе культивирования *in vitro*.

Быстрое развитие молекулярно-генетических методов в сочетании с другими методами позволяет проводить более глубокие исследования стабильности генома и улучшить качество исследований соматической гибридизации.

Заключение. Создание соматических гибридов с использованием диких видов *Solanum* с желаемыми признаками способно расширить узкую генетическую базу культурного картофеля. Для успешного применения в селекции картофеля необходим анализ селекционного потенциала соматических гибридов, получение потомства путем гибридизации с обычными сортами и идентификация молекулярных маркеров, сцепленных с целевыми признаками. Новые инструменты геномики способствуют значительному прогрессу в исследованиях соматической гибридизации картофеля. Они позволяют эффективно осуществлять геномную селекцию и исследовать сложные биологические процессы, лежащие в основе целевых признаков, а также стабильность генома и взаимодействия ядерного и цитоплазматического генома. В совокупности данные исследования будут способствовать развитию технологии соматической гибридизации и расширению области ее применения. Наиболее важными признаками, обосновывающими применение соматической гибридизации в селекции картофеля, является устойчивость к PLRV, PVY и *P. infestans*. Необходимо дальнейшее проведение полевых испытаний перспективного потомства с целью расширения селекционных программ с использованием соматических гибридов.

References

1. Nagata T., Takebe I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta*. 1970;92:301-308. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00385097>
2. Jia N., Zhu Y., Xie F. An efficient protocol for model legume root protoplast isolation and transformation. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:670. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00670>

3. Cocking E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*. 1960;187:962-963.
DOI: <https://doi.org/10.1038/187962a0>
4. Roest S., Gilissen L. J. W. Regeneration from protoplast a supplementary literature review. *Acta Botanica Neerlandica*. 1993;42(1):1-23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00674.x>
5. Laurila J., Laakso I., Larkka J., Gavrilenko T., Rokka V.-M., Pehu E. The proportions of glycoalkaloid aglycones are dependent on the genome constitutions of interspecific hybrids between two *Solanum* species (*S. brevidens* and *S. tuberosum*). *Plant Science*. 2001;161(4):677-683. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(01\)00453-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(01)00453-8)
6. Orczyk W., Przetakiewicz J., Nadolska-Orczyk A. Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* – application to genetics and breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;74:1-13. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023396405655>
7. Trabelsi S., Gargouri-Bouzd R., Vedel F., Nato A., Lakhoua L., Drira N. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005;83:1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-3667-3>
8. Thieme R., Rakosy-Tican E., Gavrilenko T., Antonova O., Schubert J., Nachtigall M., Heimbach U., Thieme T. Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;116:691-700.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0702-2>
9. Гавриленко Т. А., Ермишин А. П. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):16-29. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJ17.220>
EDN: XYEBBV
- Gavrilenko T. A., Yermishin A. P. Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):16-29. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.18699/VJ17.220>
10. Perl A., Aviv D., Galun E. Protoplast-fusion-derived *Solanum* hybrids: application and phylogenetic limitations. *Theoretical and Applied Genetics*. 1990;79(5):632-640. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00226876>
11. Laferriere L., Helgeson J., Allen C. Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;98:1272-1278.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051193>
12. Rokka V.-M., Xu Y.-S., Kankila J., Kuusela A., Pulli S., Pehu E. Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica*. 1994;80:207-217. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00039652>
13. Waara S., Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*. 1995;85:217-233.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00023951>
14. Rokka V.-M., Tauriainen A., Pietilä L., Pehu E. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*. 1998;18:82-88.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050536>
15. Tiwari J. K., Devi S., Ali N., Luthra S. K., Kumar V., Bhardwaj V., Singh R. K., Rawat S., Chakrabarti S. K. Progress in somatic hybridization research in potato during the past 40 years. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2018;132:225-238. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1327-z>
16. Iovene M., Savarese M., Cardi T., Frusciante L., Scott N., Simon P. W., Carputo D. Nuclear and cytoplasmic genome composition of *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *Genome*. 2007;50(5):443-450.
DOI: <https://doi.org/10.1139/g07-024>
17. Greplová M., Polzerová H., Vlastníková H. Electrofusion of pro- topoplasts from *Solanum tuberosum*, *S. bulbocastanum* and *S. pin- natisectum*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2008;30:787. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0183-1>
18. Tiwari J. K., Poonam, Sarkar D., Pandey S. K., Gopal J., Kumar S. R. Molecular and morphological characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. etuberosum* Lindl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2010;103:175-187. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9765-x>
19. Sarkar D., Tiwari J. K., Sharma S. H., Poonam., Sharma S. A., Gopal J., Singh B. P., Luthra S. K., Pandey S. K., Pattanayak D. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. pinnatisectum* Dun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2011;107:427-440. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9993-8>
20. Rokka V.-M., Laurila J., Tauriainen A., Laakso I., Larkka J., Metzler M., Pietiä L. Glycoalkaloid aglycone accumulations associated with infection by *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato species *Solanum acaule* and *Solanum tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. *Plant Cell Reports*. 2005;23:683-691.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0868-x>
21. Bidani A., Nouri-Ellouz O., Lakhoua L., Sihachakr D., Cheniclet C., Mahjoub A., Drira N., Gargouri-Bouzd R. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum berthaultii* and *Solanum tuberosum* L. showed recombinant plastome and improved tolerance to salinity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2007;91:179-189.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9284-6>
22. Nouri-Ellouz O., Triki M. A., Jbir-Koubaa R., Louhichi A., Charfeddine S., Drira N., Gargouri-Bouzd R. Somatic hybrids between potato and *S. berthaultii* show partial resistance to soil-borne fungi and potato virus Y. *Journal of Phytopathology*. 2016;164(7-8):485-496. DOI: <https://doi.org/10.1111/JPH.12474>
23. Ahn Y. K., Park T.-H. Resistance to common scab developed by somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 2013;63(7):595-603.
DOI: <https://doi.org/10.1080/09064710.2013.829867>

24. Laurila J., Laasko I., Larkka J., Gavrilenko T., Rokka V.-M., Pehu E. The proportions of glycoalkaloid aglycones are dependent on the genome constitutions of interspecific hybrids between two *Solanum species* (*S. brevidens* and *S. tuberosum*). Plant Science. 2001;161(4):677-683. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00453-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00453-8)
25. Naess S. K., Bradeen J. M., Wielgus S. M., Haberlach G. T., McGrath J. M., Helgeson J. P. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. Theoretical and Applied Genetics. 2000;101:697-704. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051533>
26. Rakosy-Tican E., Thieme R., Nachtigall M., Molnar I., Denes T.-E. The recipient potato cultivar influences the genetic makeup of the somatic hybrids between five potato cultivars and one cloned accession of sexually incompatible species *Solanum bulbocastanum* Dun. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2015;122:395-407. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0777-4>
27. Bołtowiec B., Szczerbakowa A., Wielgat B. RAPD analysis of the interspecific somatic hybrids *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum*. Cellular & Molecular Biology Letters. 2005;10:51-162.
28. Szczerbakowa A., Tarwacka J., Oskiera M., Jakuczun H., Wielgat B. Somatic hybridization between the diploids of *S. × michoacanum* and *S. tuberosum*. Acta Physiologiae Plantarum. 2010;32:867-873. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0472-3>
29. Iovene M., Aversano R., Savarese S., Caruso I., Dimatteo A., Cardi T., Frusciante L., Carputo D. Interspecific somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* and their haploidization for potato breeding. Biologia Plantarum. 2012;56:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0008-3>
30. Sedlák P., Sedláková V., Vašek J., Zeka D., Čilová D., Melounová M., Orsák M., Domkářová J., Doležal P., Vejřl P. Phenotypic, molecular and biochemical evaluation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. bulbocastanum*. Scientific Reports. 2022;12(1):4484. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08424-5>
31. Shi Y. Z., Chen Q., Li H. Y., Beasley D., Lynch D. R. Somatic hybridization between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*. Canadian Journal of Plant Science. 2006;86:539-545. DOI: <https://doi.org/10.4141/P05-076>
32. Thieme R., Rakosy-Tican E., Nachtigall M., Schubert J., Hammann T., Antonova O., Gavrilenko T., Heimbach U., Thieme T. Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. Plant Cell Reports. 2010;29:1187-1201. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0905-x>
33. Chandel P., Tiwari J. K., Ali N., Devi S., Sharma S. H., Sharma S. A., Luthra S. K., Singh B. P. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*, potential sources of late blight resistance breeding. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2015;123:579-589. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0862-8>
34. Guo X., Xie C., Cai X., Song B., He L., Liu J. Meiotic behavior of pollen mother cells in relation to ploidy level of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. chacoense*. Plant Cell Reports. 2010;29:1277-1285. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0914-9>
35. Chen L., Guo X., Xie C., He L., Cai X., Tian L., Song B., Liu J. Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. Theoretical and Applied Genetics. 2013;126:1861-1872. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2098-5>
36. Oberwalder B., Schilde-Rentschler L., Löffelhardt-Ruob B., Ninnemann H. Differences between hybrids of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum circaefolium* Bitt. obtained from symmetric and asymmetric fusion experiments. Potato Research. 2000;43:71-82. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02358515>
37. Kim-Lee H., Moon J. S., Hong Y. J., Kim M. S., Cho H. M. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. American Journal of Potato Research. 2005;82:129-137. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02853650>
38. Tiwari J. K., Devi S., Sundaresha S., Chandel P., Ali N., Singh B., Bhardwaj V., Singh B. P. Microarray analysis of gene expression patterns in the leaf during potato tuberization in the potato somatic hybrid *Solanum tuberosum* and *Solanum etuberosum*. Genome. 2015;58(6):305-313. DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0191>
39. Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme T. Fertile somatic hybrids of *Solanum etuberosum* + dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationships of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y. Euphytica. 2003;131:323-332. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024041104170>
40. Yu Y., Ye W., He L., Cai X., Liu T., Liu J. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids. Plant Cell Reports. 2013;32:1687-1701. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1480-8>
41. Smyda P., Jakuczun H., Debski K., Śliwka J., Thieme R., Nachtigall M., Wasilewicz-Flis I., Zimnoch-Guzowska E. Development of somatic hybrids *Solanum × michoacanum* Bitter. (Rydb.) (+) *S. tuberosum* L. and autofused 4x *S. × michoacanum* plants as potential sources of late blight resistance for potato breeding. Plant Cell Reports. 2013;32:1231-1241. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1422-5>
42. Fock I., Collonier C., Purwito A., Luisetti J., Sonvannavong V., Vedel F., Servaes A., Ambroise A., Kodja H., Ducreux G., Sihachakr D. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. phureja*. Plant Science. 2000;160(1):165-176. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00375-7)
43. Harding K., Millam S. Analysis of chromatin, nuclear DNA and organelle composition in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum sanctaerosae*. Theoretical and Applied Genetics. 2000;101:939-947. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051565>
44. Fock I., Collonier C., Purwito A., Luisetti J., Sonvannavong V., Vedel F., Servaes A., Ambroise A., Kodja H., Ducreux G., Sihachakr D. Use of *S. stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. Plant Physiology and Biochemistry. 2001;39(10):899-908. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01307-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01307-9)

45. Trabelsi S., Gargouri-Bouazid R., Vedel F., Nato A., Lakhous L., Drira N. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005;83:1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-3667-3>
46. Carrasco A., De Galarreta J. I. R., Rico A., Ritter E. Transfer of PLRV resistance from *Solanum verrucosum* Schlecht to potato (*S. tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. *Potato Research*. 2000;43:31-42. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02358511>
47. Tarwacka J., Polkowska-Kowalczyk L., Kolano B., Śliwka J., Wielgat B. Interspecific somatic hybrids *Solanum villosum* (+) *S. tuberosum*, resistant to *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*. 2013;170(17):1541-1548. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.013>
48. Murashige T., Skoog F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
49. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1962;50(1):151-158. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
50. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 1975;126:105-110. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00380613>
51. Binding H., Nehls R. Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1977;85(3):279-280. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80255-9](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80255-9)
52. Binding H. Cell cluster formation by leaf protoplasts from axenic cultures of haploid *Petunia hybrida* L. *Plant Science Letters*. 1974;2(3):185-187. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(74\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0304-4211(74)90018-2)
53. Nagy J. I., Maliga P. Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana glauca*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1976;78(5):453-455. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(76\)80093-1](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(76)80093-1)
54. Hunt G. J., Helgeson J. P. A medium and simplified procedure for growing single cells from *Solanum* species. *Plant Science*. 1989;60(2):251-257. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90174-x](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90174-x)
55. Senda M., Takeda J., Abe S., Nakamura T. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant and Cell Physiology*. 1979;20(7):1441-1443. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075944>
56. Hammatt N., Lister A., Blackhall N. W., Gartland J., Ghose T. K., Gilmour D. M., Power J. B., Davey M. R., Cocking E. C. Selection of plant heterokaryons from diverse origins by flow cytometry. *Protoplasma*. 1990;154:34-44. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01349533>
57. Kulawiec M., Tagashira N., Plader W., Bartoszewski G., Kuć D., Sniezko R., Malepszy S. Chromosome number variation in somatic hybrids between transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) and *Solanum lycopersicoides*. *Journal of Applied Genetics*. 2003;44(4):431-437.
58. Guri A., Sink K. C. Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;76:490-496. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00260897>
59. Sidorov V. A., Zubko M. K., Kuchko A. A., Komarnitsky I. K., Gleba Y. Y. Somatic hybridization in potato: use of gamma-irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* struction. *Theoretical and Applied Genetics*. 1987;74:364-368. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00274719>
60. Gleddie S., Keller W. A., Setterfield G. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *Solanum sisymbriifolium* Lam. *Theoretical and Applied Genetics*. 1986;71:613-621. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00264265>
61. Rakosy-Tican E., Aurori A. Green fluorescent protein (GFP) supports the selection based on callus vigorous growth in the somatic hybrids *Solanum tuberosum* L. + *S. chacoense* Bitt. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37:201. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1946-0>
62. Śliwka J., Jakuczun H., Chmielarz M., Hara-Skrzypiec A., Tomczyńska I., Kilian A., Zimnoch-Guzowska E. A resistance gene against potato late blight originating from *Solanum × michoacanum* maps to potato chromosome VII. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;124:397-406. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1715-4>
63. Śliwka J., Jakuczun H., Chmielarz M., Hara-Skrzypiec A., Tomczyńska I., Kilian A., Zimnoch-Guzowska E. Late blight resistance gene from *Solanum ruiz-ceballosii* is located on potato chromosome X and linked to violet flower colour. *BMC Genetics*. 2012;13:11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-11>
64. Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*. 2000;116:221-230. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004039320227>
65. Hosaka K., Sanetomo R. Development of rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;125:1237-1251. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4>
66. Kim S. R., Ahn Y. K., Kim T. G., Kang H. S., Song S. W., Kim B. C., Kang S. G. Breeding of a new cultivar 'Jeseo' with resistance to common scab. *Korean Journal of Breeding Science*. 2013;45(4):468-473. DOI: <https://doi.org/10.9787/KJBS.2013.45.4.468>
67. Novy R. G., Gillen A. M., Whitworth J. L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum etuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007;114:1161-1172. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0508-2>
68. Cho K. S., Cheon K. S., Hong S. Y., Cho J. H., Im J. S., Mekapogu M., Yu Y. S., Park T. H. Complete chloroplast genome sequences of *Solanum commersonii* and its application to chloroplast genotype in somatic hybrids with *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports*. 2016;35(10):2113-2123. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2022-y>

69. Smyda-Dajmund P., Sliwka J., Wasilewicz-Flis I., Jakuczun H., Zimnoch-Guzowska E. Genetic composition of interspecific potato somatic hybrids and autofused 4x plants evaluated by DArT and cytoplasmic DNA markers. *Plant Cell Reports*. 2016;35:1345-1358. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1966-2>
70. Singh R., Tiwari J. K., Rawat S., Sharma V., Singh B. P. Monitoring gene expression pattern in somatic hybrid of *Solanum tuberosum* and *S. pinnatisectum* for late blight resistance using microarray analysis. *Plant Omics Journal*. 2016;9(1):99-105. URL: https://www.pomics.com/tiwari_9_1_2016_99_105.pdf
71. Cho K.-S., Lee H.-O., Lee S.-C., Park H.-J., Cho J.-H., Park Y.-E., Choi J.-G., Yang T.-J. Mitochondrial genome recombination in somatic hybrids of *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Scientific Reports*. 2022;12:8659. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12661-z>
72. Sedlák P., Sedláková V., Vašek J., Zeka D., Čílová D., Melounová M., Orsák M., Domkářová J., Doležal P., Vejřál P. Phenotypic, molecular and biochemical evaluation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. bulbocastanum*. *Scientific Reports*. 2022;12(1):4484. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08424-5>
73. Fossi M., Amundson K. R., Kuppu S., Britt A. B., Comai L. Regeneration of *Solanum tuberosum* plants from protoplasts induces widespread genome instability. *Plant Physiology*. 2019;180(1):78-86. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00906>
74. Jiang M., Wu X., Song Y., Shen H., Cui H. Effects of OsMSH6 mutations on microsatellite stability and homologous recombination in rice. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:220. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00220>
75. Dann A. L., Wilson C. R. Comparative assessment of genetic and epigenetic variation among regenerants of potato (*Solanum tuberosum*) derived from long-term nodal tissue culture and cell selection. *Plant Cell Reports*. 2011;30(4):631-639. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0983-9>

Сведения об авторах

✉ **Поливанова Оксана Борисовна**, научный сотрудник лаборатории клеточных и геномных технологий, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха», ул. Лорха, д. 23 литер В, д.п. Красково, г. Люберцы, Московская область, Российская Федерация, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3992-5452>, e-mail: polivanovaoks@gmail.com

Егорова Анна Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных и геномных технологий, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха», ул. Лорха, д. 23 литер В, д.п. Красково, г. Люберцы, Московская область, Российская Федерация, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8850-5481>

Сиволапова Анастасия Борисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных и геномных технологий, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха», ул. Лорха, д. 23 литер В, д. п. Красково, г. Люберцы, Московская область, Российская Федерация, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2058-5344>

Горюнова Светлана Валерьевна, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных и геномных технологий, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха», ул. Лорха, д. 23 литер В, д. п. Красково, г. Люберцы, Московская область, Российская Федерация, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1078-7348>

Information about the authors

✉ **Oksana B. Polivanova**, researcher, the Laboratory of Cell and Genomic Technologies, Russian Potato Research Centre, st. Lorkh, 23 B, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russian Federation, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3992-5452>, e-mail: polivanovaoks@gmail.com

Anna S. Egorova, junior researcher, the Laboratory of Cell and Genomic Technologies, Russian Potato Research Centre, st. Lorkh, 23 B, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russian Federation, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8850-5481>

Anastasia B. Sivolapova, junior researcher, the Laboratory of Cell and Genomic Technologies, Russian Potato Research Centre, st. Lorkh, 23 B, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russian Federation, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2058-5344>

Svetlana V. Goryunova, leading researcher, the Laboratory of Cell and Genomic Technologies, Russian Potato Research Centre, st. Lorkh, 23 B, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russian Federation, 140051, e-mail: coordinazia@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1078-7348>

✉ – Для контактов / Corresponding author