



НОВЫЕ ИНТРОГРЕССИВНЫЕ ФОРМЫ КУЛЬТУРНОГО ЯЧМЕНЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ

Hordeum vulgare L. × *Hordeum bulbosum* L.

Пендинен Г. И.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44;

* pendinen@mail.ru

Актуальность. Привлечение чужеродного генетического материала ячменя луковичного *Hordeum bulbosum* L. для расширения разнообразия ячменя культурного *Hordeum vulgare* L. является важной задачей, поскольку вид *H. bulbosum* характеризуется рядом ценных признаков. Одним из путей использования генетического потенциала ячменя луковичного служит межвидовая гибридизация и получение на основе гибридов фертильных интрогрессивных линий *H. vulgare*. Цель исследования – получение новых интрогрессивных форм ярового ячменя с использованием межвидовых триплоидного ($H^bH^bH^b$) и тетраплоидного ($H^bH^bH^bH^b$) гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным для расширения коллекции интрогрессивных линий *H. vulgare*. **Материал и методы.** Для создания новых интрогрессивных форм, диплоидный ячмень культурный *H. vulgare* (2x) сорта ‘Roland’ опыляли пыльцой межвидовых гибридов: 1) триплоидного, полученного при скрещивании диплоидного ячменя сорта ‘Roland’ (2x, H^bH^b) с тетраплоидным образцом ячменя луковичного *H. bulbosum* W851 (4x, $H^bH^bH^bH^b$): *H. vulgare* ‘Roland’ (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x) ($H^bH^bH^b$); 2) тетраплоидного, полученного при использовании в скрещивании тетраплоидного образца *H. bulbosum* A17 (4x, $H^bH^bH^bH^b$) в качестве материнской формы и тетраплоидного культурного ячменя сорта ‘Borwina’ (4x, $H^bH^bH^bH^b$) в качестве опылителя: *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* ‘Borwina’ (4x) ($H^bH^bH^bH^b$). В потомстве от этих скрещиваний отбирали формы культурного ячменя с интрогрессией генетического материала ячменя луковичного, далее отбор продолжали в двух поколениях от самоопыления растений первого поколения, полученных в результате возвратных скрещиваний, то есть растений BC1 с чужеродными интрогрессиями. Идентификацию и локализацию интрогрессий проводили с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (GISH и FISH с хромосомоспецифичными маркерами). **Результаты.** При скрещивании культурного ячменя с триплоидным и тетраплоидным межвидовыми гибридами *H. vulgare* × *H. bulbosum* получены новые формы ячменя культурного с рекомбинантными хромосомами, среди которых выделено два растения с тремя терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. У первого растения, полученного на основе триплоидного гибрида, выявлены интрогрессии в хромосомах 5HL, 1HL, 3HS. При сочетании в кариотипе двух гомологов с интрогрессией 5HL исходного размера у растений в потомстве наблюдается гибель проростков. У второго растения, полученного на основе тетраплоидного гибрида, выявлены интрогрессии в хромосомах 5HL, 2HL, 7HS. В потомстве от самоопыления этой формы наличие интрогрессии 2HL исходного размера в обоих гомологах приводит к стерильности растений. Выявлены формы с изменением размеров интрогрессий в 5HL и 3HS в потомстве первого растения и с изменением размеров интрогрессии в 2HL в потомстве второго растения, что свидетельствует о рекомбинации в мейозе в этих участках хромосом у растений BC1. **Заключение.** При скрещивании культурного ячменя с триплоидным межвидовым гибридом *H. vulgare* × *H. bulbosum* в потомстве выявлено растение культурного ячменя с интрогрессиями в хромосомах 1HL, 5HL, 3HS. При скрещивании с тетраплоидным межвидовым гибридом выявлено растение культурного ячменя с интрогрессиями в хромосомах 2HL, 5HL, 7HS. На основе ярового сорта ячменя ‘Roland’ созданы две серии новых интрогрессивных форм *H. vulgare* с различным сочетанием рекомбинантных хромосом.

Ключевые слова: ячмень, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, межвидовая гибридизация, *in situ* гибридизация, чужеродная интрогрессия

Для цитирования:

Пендинен Г.И. Новые интрогрессивные формы культурного ячменя, полученные на основе межвидовых гибридов *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(4):25-39. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-o2

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.** **Дополнительная информация.** Полные данные этой статьи доступны <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-4-o2> **Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы. Все авторы одобрили рукопись. Конфликт интересов отсутствует.**


Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития, оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

NEW INTROGRESSIVE FORMS OF CULTIVATED BARLEY OBTAINED ON THE BASIS OF INTERSPECIFIC HYBRIDS

Hordeum vulgare L. × *Hordeum bulbosum* L.

Pendinen G. I.

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;

*  pendinen@mail.ru

Background. The use of alien genetic material of bulbous barley *Hordeum bulbosum* L. to increase the diversity of cultivated barley *Hordeum vulgare* L. is an important task, since *H. bulbosum* is characterized by a number of valuable traits. One of the ways to use the genetic potential of bulbous barley is the interspecific hybridization and obtaining fertile introgressive lines of *H. vulgare* based on interspecific hybrids. The aim of the study was to obtain new introgressive forms of spring barley using interspecific triploid ($H^vH^bH^b$) and tetraploid ($H^bH^bH^vH^v$) hybrids of cultivated barley with bulbous barley to expand the collection of introgressive lines of *H. vulgare*. **Materials and methods.** To create new introgressive forms, diploid barley *H. vulgare* (2x) cv. 'Roland', was crossed with interspecific hybrids *H. vulgare* cv. 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x) ($H^vH^bH^b$), and *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) ($H^bH^bH^vH^v$). Cultivated barley forms with introgression of the bulbous barley genetic material were selected from the offspring from these crosses; then the selection was continued in two progenies from self-pollination of selected BC1 plants with three alien introgressions. Identification and localization of introgressions was carried out using the method of fluorescent *in situ* hybridization (GISH and FISH with chromosome-specific markers) **Results.** The crossing of cultivated barley with triploid and tetraploid interspecific hybrids *H. vulgare* × *H. bulbosum* yielded new forms of cultivated barley with recombinant chromosomes, among which two plants with three terminal introgressions of the genetic material of bulbous barley were identified. The first plant, derived from a triploid hybrid, showed introgressions in chromosomes 5HL, 1HL and 3HS. When two homologues with the 5HL introgression of the initial size are combined in the karyotype, the lethality of seedlings is observed in the offspring plants. In the second plant obtained on the basis of a tetraploid hybrid introgression was revealed in chromosomes 5HL, 2HL, and 7HS. In the offspring from self-pollination of this form, the presence of the 2HL introgression of the original size in both homologues led to plant sterility. Forms with a change in size of the introgression in 5HL and 3HS in the offspring of the first plant and with a change in size of the introgression in 2HL in the offspring of the second plant were detected, which indicated that meiotic recombination had occurred in those chromosome regions in BC1 plants. **Conclusions** A barley plant with the introgression of bulbous barley chromatin into chromosomes 1HL, 5HL, and 3HS of cultivated barley was identified in the offspring from a cross of cultivated barley with a triploid interspecific hybrid *H. vulgare* × *H. bulbosum*. In crosses with a tetraploid interspecific hybrid, a barley plant with the introgression into chromosomes 2HL, 5HL, and 7HS was found. On the basis of 'Roland' spring barley cultivar, two series of new introgressive forms of *H. vulgare* with various combinations of recombinant chromosomes have been created.

Key words: barley, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, interspecific hybridization, *in situ* hybridization, alien introgression

For citation:

Pendinen G.I. New introgressive forms of cultivated barley obtained on the basis of interspecific hybrids *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(4):25-39. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-o2

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. Additional information.

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-4-o2> **The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. All authors approved the manuscript. No conflict of interest.**

ORCID ID:

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

УДК 575.222.72

Поступила в редакцию: 20.12.2021

Принята к публикации: 28.12.2021

Acknowledgments: The research was performed within the framework of the State Assignment according to the Thematic Plan of VIR, Project No. 0662-2019-0006 "Search for, Viability Maintenance and Disclosure of the Potential of Hereditary Variation in the VIR Global Collection of Cereal and Groat Crops for the Development of an Optimized Genebank and its Sustainable Utilization in Plant Breeding and Crop Production".

Введение

Дикорастущие виды рода *Hordeum* L. могут служить одним из важных источников расширения генетического разнообразия ячменя культурного *Hordeum vulgare* L. В зависимости от возможности использования в селекции культурного ячменя, виды *Hordeum* относят к первичному, вторичному и третичному генным пулам (Bothmer et al., 1992). Ячмень луковичный *Hordeum bulbosum* L. относят к вторичному генетическому пулу. Среди образцов этого вида встречаются диплоидные и тетраплоидные формы (Bothmer et al., 1991). Ячмень луковичный – единственный дикорастущий вид рода *Hordeum*, генофонд которого успешно используется в интрогрессивной гибридизации с культурным ячменем *H. vulgare*. Для геномов этих двух видов характерна значительная степень сходства, обеспечивающая гомеологичную рекомбинацию в мейозе (Bothmer et al., 1991), а также высокая степень коллинеарности всех групп сцепления (Wendler et al., 2017). Образцы ячменя луковичного характеризуются рядом ценных признаков, которые могут быть перенесены в геном культурного ячменя при межвидовой гибридизации (Jones, Pickering, 1978; Michel, 1996; Szigat, Szigat, 1991; Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009; Pidon et al., 2021). Особенно важное значение имеют такие признаки *H. bulbosum*, как устойчивость к мучнистой росе, стеблевой и листовой ржавчине, вирусам BaMMV, BaYMV, BYDV. Поэтому, несмотря на то, что традиционно особенности взаимодействия геномов *H. bulbosum* и *H. vulgare* используют для получения гаплоидов культурного ячменя (Ho, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003), необходимо использовать генофонд этого дикорастущего вида как источник для расширения генетического разнообразия ячменя культурного при межвидовой гибридизации. На основе межвидовых гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* получены интрогрессивные линии (Pickering, 1988; Pickering, 1992; Pickering et al., 1994; Pickering et al., 2000; Johnston, Pickering, 2002; Scholz et al., 2009; Pendinen, Scholz, 2018). Среди них выявлены формы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, переданной от ячменя луковичного: к листовой ржавчине (интрогрессия в хромосому 2HL или 4HL), к стеблевой ржавчине (интрогрессия в 6HS), к ринхоспориозу (интрогрессия в 4HS); к мучнистой росе (интрогрессия в короткое плечо хромосомы 2HS) (Pickering et al., 2000; Pickering et al., 2006; Shtaya et al., 2007; Ruge et al., 2020). Отобраны интрогрессивные линии, устойчивые к вирусам и идентифицированы новые гены устойчивости к BaMMV (ген *Rym14Hb* – интрогрессия в 6HS; ген *Rym16Hb* – интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в хромосому 2HL), к BaYMV (*Rym16Hb* – интрогрессия в 2HL), к BYDV (ген *Ryd4Hb* – интрогрессия в 3HL) (Ruge, et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009; Pidon et al., 2021).

Гомеологичная рекомбинация в мейозе гибридов лежит в основе интрогрессии генетического материала *H. bulbosum* в геном ячменя культурного (Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004; Pickering et al., 2006; Scholz, Pendinen, 2017, Pendinen, Scholz, 2020). Разные хромосомы и их плечи с разной частотой участвуют в образовании межгеномных ассоциаций хромосом в мейозе (Pickering et al., 2004; Pickering et al., 2006; Scholz, Pendinen, 2017, Pendinen, Scholz, 2020). Показано, что рекомбинация между хромосомами геномов этих видов происходит в терминальных участках хромосом. В связи с этим, необходимо привлечение наибольшего разнообразия генотипов ячменя луковичного и *H. vulgare* в скрещиваниях для создания разнообразия интрогрессивных линий культурного ячменя.

В скрещиваниях *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (2x) и *H. vulgare* (4x) × *H. bulbosum* (4x) при соотношении геномов $1H^v : 1H^b$, в гибридном зародыше во многих комбинациях наблюдается элиминация хромосом ячменя луковичного, и результат скрещивания в значительной степени зависит от генотипов используемых родительских форм (Ho, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003). Чаще всего в таких вариантах скрещиваний результатом являются гаплоиды *H. vulgare*, или гибридные формы с нестабильным числом хромосом (Lange, 1971a,b). Эта особенность в значительной степени ограничивает привлечение разнообразия сортов культурного ячменя в интрогрессивную гибридизацию с ячменем луковичным. При скрещивании диплоидных форм *H. vulgare* с тетраплоидными образцами *H. bulbosum* (4x) результатом являются стабильные по хромосомному составу триплоидные гибриды ($H^vH^bH^b$) (Lange, 1971a). На их основе могут быть получены серии интрогрессивных линий культурного ячменя. С использованием триплоидного гибрида *H. vulgare* 'Igrí' (2x) × *H. bulbosum* (4x), уже создана серия озимых линий, имеющих фенотип культурного ячменя и характеризующихся высокой фертильностью (Scholz et al., 2009; Pendinen et al., 2018). Одним из путей расширения разнообразия сортов культурного ячменя, привлекаемых для создания интрогрессивных линий, может быть их скрещивание с многолетними стабильными триплоидными ($H^vH^bH^b$) и тетраплоидными ($H^vH^vH^bH^b$) формами.

Целью нашего исследования было создание новых форм культурного ячменя, несущих генетический материал ячменя луковичного, на основе триплоидного и тетраплоидного межвидовых гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum*.

Материал

Для получения новых интрогрессивных форм, ячмень *H. vulgare* (2x) сорта 'Roland' (к-26897) скрещивали с триплоидным межвидовым гибридом *H. vulgare* 'Roland'(2x) × *H. bulbosum* W851 кл1 (4x) ($H^vH^bH^b$), характеризующимся частичной фер-

тельностью пыльцы. Кроме того, в скрещиваниях в качестве опылителя использовали частично фертильный многолетний гибрид *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) (H^bH^bH^vH^v) (Scholz et al., 2017). Отбор новых интрогрессивных форм проводили среди растений BC1, полученных в следующих комбинациях скрещиваний: *H. vulgare* 'Roland' ×

(*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (9 растений); *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 кл1 (4x)) (47 растений). Далее, в потомстве от самоопыления растений BC1 с тремя интрогрессиями (табл. 1) проводили отбор форм с различным сочетанием рекомбинантных хромосом.

Таблица 1. Растения *Hordeum vulgare* L. с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного, используемые для дальнейшего отбора.

Table 1. *Hordeum vulgare* L. plants with the introgression of the genetic material of bulbous barley, used for further selection.

№/ No.	BC1	Геномный состав / число и локализация интрогрессий в хромосомах растений BC1 Genomic composition / number and localization of introgressions into chromosomes of BC1 plants	Изучено растений в потомстве от самоопыления BC1/ Number of plants studied in the progeny from self-pollination of BC1
1	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851 (4x))	H ^v H ^v / 3 – 5HL; 1HL; 3HS терминальные различных размеров	52
2	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. bulbosum</i> A17 (4x) × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x))	H ^v H ^v / 3 – 5HL, 2HL, 7HS терминальные различных размеров	7

В восьми семьях F2, полученных на основе растения *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x)) и в пяти семьях F2, полу-

ченных на основе растения *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)), проводили следующий цикл отбора интрогрессивных форм (табл. 2).

Таблица 2. Семьи *Hordeum vulgare* L., полученные на основе самоопыления растений BC1 и использованные в GISH-анализе

Table 2. Families of *Hordeum vulgare*, obtained from self-pollination of BC1 plants and used in GISH analysis

№/ No.	№ семьи / Family No.	Геномный состав / число и локализация интрогрессий у растений F ₁ Genomic composition / number and localization of introgression in F ₁ plants	Число изученных растений в F ₂ / Number of studied F ₂ plants
<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851 (4x)),			
1	41/7	H ^v H ^v / 3 : 2-1HL терм; 1- 5HL крупная терм.	12
2	41/12	H ^v H ^v / 5: 2-1HL терм; 1- 5HL крупная терм.; 2-3HS терм очень мал	12
3	42/17	H ^v H ^v / 3: 1-1HL терм; 2- 3HS терм. разл.размера	6
4	43/19	H ^v H ^v / 5: 2-1HL терм; 2- 5HL разл разм. терм.; 1- 3HS очень мал. терм	8
5	44/27	H ^v H ^v / 4: 1-1HL терм; 2- 5HL разл разм. терм.; 1- 3HS терм	14
6	45/31	H ^v H ^v / 1: 5HL, крупная терминальная	11
7	46/37	H ^v H ^v / 4: 2-1HL терм; 1- 5HL; 1- 3HS терм	6
8	46/38	H ^v H ^v / 1: 5HL, крупная терминальная	6
<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. bulbosum</i> A17(4x) и-632321* × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x))			
1	73/11	H ^v H ^v / 4: 2- 2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм, 1-7HS крупная терм	1
2	73/5	H ^v H ^v / 2: 1-2HL крупная терм.	6
3	74/12	H ^v H ^v / 3: 2 -2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм	8
4	74/7	H ^v H ^v / 2: 1 -2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм	6
5	74/8	H ^v H ^v / 3: 1- 2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм, 1-7HS больш.терм	6

Примечание:

* - образец тетраплоидного ячменя луковичного *H. bulbosum* (4x) с номером интродукции из коллекции ВИР

Материал и методы

Культивирование растений. Растения ячменя, использованные в скрещиваниях в качестве материнской формы, выращивали в условиях опытного поля. Многолетние гибридные растения *H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x) и *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x), используемые в качестве опылителей, культивировали в сосудах с почвой: с октября по май – в теплице с неконтролируемой температурой и освещенностью, с мая по октябрь – на открытой вегетационной площадке. Зерна, полученные в результате опыления цветков материнских растений пылью гибридов, проращивали в чашках Петри. Перед посадкой в почву 1-2 корня каждого проростка отбирали для цитогенетического анализа. Проростки высаживали в сосуды с почвой объемом 1 литр и культивировали в теплице. Используя GISH-анализ, отбирали растения с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. У растений собирали зерна от самоопыления. Часть зерновок высаживали для дальнейшего отбора. Растения F₁ и F₂ также выращивали в индивидуальных сосудах с почвой с предварительной фиксацией корешков проростков для проведения *in situ* гибридизации.

Фиксация материала и подготовка препаратов. Отобранные для цитогенетического анализа корешки помещали на сутки в воду со льдом, затем фиксировали в смеси 96% этиловый спирт : ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1. Фиксатор через сутки меняли на свежий. Фиксации хранили в морозильной камере (-20°C) до их использования. Перед подготовкой препаратов корневые меристемы инкубировали в течение 70 минут в растворе мацерирующих ферментов, содержащих целулазу R10 (1,14 ед/мг) в концентрации 40 мг/мл, и пектолиазу (0,94 ед/мг) в концентрации 10 мг/мл. Затем готовили давленные препараты.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH, GISH). Для идентификации генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах *H. vulgare* использовали *in situ* гибридизацию.

Подготовку митотических препаратов и *in situ* гибридизации (GISH, FISH) проводили по адаптированной к изучению межвидовых гибридов ячменя культурного с ячменем луковичным методике, обеспечивающей надежную идентификацию генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах *H. vulgare* (Scholz et al, 2009; Scholz et al. 2017).

Для идентификации хромосом использовали два маркера: 5S рДНК и 18/25S рДНК (Brown et al, 1999, Pickering et al, 2004, Scholz, Pendinen, 2017).

Для идентификации хромосом *H. vulgare* использовали меченые 1) 5S рДНК, позволяющую идентифицировать хромосомы 2Н, 3Н, 7Н, 4Н; 2) 18/25S рДНК – для идентификации хромосом 1Н, 5Н, 6Н.

Для GISH общую ДНК *H. bulbosum* метили методом Nick-трансляции с использованием DIG-Nick Translation

Mix (Roche, Diagnostics GmbH, Germany). Нуклеотидную последовательность 18/25S рДНК в плазмиде VER17 (Yakura, Tanifuji, 1983) метили методом Nick-трансляции с использованием BIO- или DIG-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Меченую 5S рДНК получали методом ПЦР с использованием праймеров согласно ранее опубликованному протоколу (Gottlob-McHugh et al., 1990), в смесь для реакции включали биотин-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany). В пробе для гибридизации использовали дифференциально меченые геномную ДНК *H. bulbosum* для GISH и хромосомспецифичный маркер ДНК для FISH (5S рДНК или 18/25S рДНК), а также в качестве блоклирующей – общую ДНК *H. vulgare*, разрушенную кипячением до длины фрагментов 100-200 пн. В двухцветной GISH-FISH для детекции биотиновой пробы использовали streptavidin-Cy3 (Dianova GmbH, Germany), для детекции дигоксигениновой метки – anti-digoxigenin-FITC (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Хромосомы контрастировали DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, дигидрохлорид), используя раствор в концентрации 1,0 мкг/мкл.

Анализ препаратов. Для анализа препаратов, создания изображений и оптимизации их качества использовали эпифлуоресцентный микроскоп AxioImager M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) с камерой AxioCamMRm и программным обеспечением AxioVision Rel 4.8. Для оптимизации яркости и контраста компьютерных изображений использовали программу Adobe Photoshop 6.0.

Результаты

Одной из задач работы по увеличению коллекции интрогрессивных линий ячменя является расширение разнообразия привлекаемых в скрещивания образцов родительских видов *H. vulgare* и *H. bulbosum*. Скрещивание сортов ячменя с межвидовыми гибридами – один из быстрых путей для отбора интрогрессивных форм культурного ячменя, поскольку хромосомы *H. bulbosum* в этом случае элиминируются в эмбриогенезе из-за возрастания дозы генома культурного ячменя. Среди полученных растений отбирают формы с рекомбинантными хромосомами Н^{vb}, несущими фрагменты генетического материала *H. bulbosum*.

Для использования в скрещиваниях были выбраны два гибрида, образующие хорошо сформированную пыльцу (Приложение / Supplement¹). Пыльники тетраплоидного гибрида *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) хорошо растрескиваются, гибрид характеризуется частичной фертильностью при самоопылении. У триплоидного гибрида *H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x) большинство колосьев имели нерастрескивающиеся пыльники со стерильной пылью. Однако в отдельных колосьях этого растения наблюдали растрескивание пыльников

и высыпание из них пылевых зерен. Такую пыльцу собирали и использовали в скрещиваниях.

При опылении культурного ячменя пыльцой тетраплоидного гибрида *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) наблюдали высокую завязываемость (76,2%) и формирование выполненных зерновок, из которых проросли лишь 9 (56,25 % от общего числа) (табл. 3). В реципрокном скрещивании завязываемость была ниже (15,38%), формировались щуплые зерновки со слаборазвитым эндоспермом, из шести зерновок

проросли три (50% от общего числа зерновок). Зерновки, полученные при опылении культурного ячменя пыльцой триплоидного гибрида *H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x), имели хорошо развитые зародыш и эндосperm. Большая часть из них (75,86 %) проросли. Все полученные растения имели фенотип культурного ячменя. При анализе хромосомного состава проростков методом GISH было показано, что все они представляют только 14-хромосомные формы *H. vulgare*.

Таблица 3. Завязываемость, прорастание зерновок и частота интрогрессивных форм в потомстве BC1 при скрещиваниях культурного ячменя с межвидовыми гибридами *H. vulgare* × *H. bulbosum*

Table 3. Seed setting, germination of caryopses and the frequency of introgressive forms in the progeny of BC1 in crosses of cultivated barley with interspecific hybrids *H. vulgare* × *H. bulbosum*

№/ No.	Комбинация скрещивания / Cross combination	Опылено цветков / Number of pollinated flowers	Завязалось зерновок / Seed setting		Проросло зерновок / Number of sprouted kernels		Проростков с Н ^{vb} * хромосомами/ Seedlings with Н ^{vb} chromosomes	
			число	%	число	%	число	%
1	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851 (4x))	299	58	19,39	44	75,86	1	2,27
2	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. bulbosum</i> A17 (4x) × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x))	21	16	76,19	9	56,25	3	33,33
3	(<i>H. bulbosum</i> A17 (4x) × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x)) × <i>H. vulgare</i> 'Roland'	39	6	15,38	3	50,00	2	66,67

* Н^{vb} – хромосома *H. vulgare* с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum*

Н^{vb} – chromosome of *H. vulgare* with the introgression of *H. bulbosum* genetic material

Среди растений, полученных в комбинации *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x)), выявлено только одно с терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в хромосомах 5HL, 1HL, 3HS (табл. 4, рис. 1б), терминальная интрогрессия в хромосоме 5HL этого растения была длиннее других. Эта интрогрессивная форма представляет наибольший интерес, поскольку в ее создании использованы новые, ранее не использованные образцы: яровой сорт культурного ячменя 'Roland' и клон *H. bulbosum* W851. Для этого клона характерен короткий период яровизации и высокая зимостойкость в условиях опытного поля НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (г. Пушкин, Санкт-Петербург).

У двух растений, полученных в комбинации *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) выявлено по одной хромосоме с небольшой, едва различимой на цитологических препаратах после GISH, терминальной интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* в 1HL у одного и в 6HS – у другого растения. У одного растения этой комбинации выявлено три рекомбинантные хромосомы с терминальными интрогрессиями в 2HL, 5HL (небольшая), 7HS (см. табл. 4, рис. 2а). У двух растений, полученных в реципрокной комбинации, выявлены маленькие терминальные интрогрессии в хромосоме 3HL.

¹ Приложение доступно в онлайн версии статьи / Supplement is available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-4-o2>

Таблица 4. Интрогрессивные формы *H. vulgare*, выявленные в потомстве от скрещивания культурного ячменя с межвидовыми гибридами

Table 4. Introgressive forms of *H. vulgare* identified in the offspring from crosses of cultivated barley with interspecific hybrids

№/No.	Комбинация скрещиваний / Cross combination	№ растения / Plant No.	Число – локализация интрогрессий / Number – introgression site
1	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. bulbosum</i> A17 (4x) × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x))	1	1 – 1HL – терминальная
		2	1 – 6HS – терминальная
		3	3 – 5HL, 2HL, 7HS – терминальные
2	(<i>H. bulbosum</i> A17 (4x) × <i>H. vulgare</i> 'Borwina' (4x)) × <i>H. vulgare</i> 'Roland'	1	1 – 3HL – терминальная
		2	1 – 3HL – терминальная
3	<i>H. vulgare</i> 'Roland' × (<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851 (4x))	1	3 – 5HL; 1HL; 3HS – терминальные

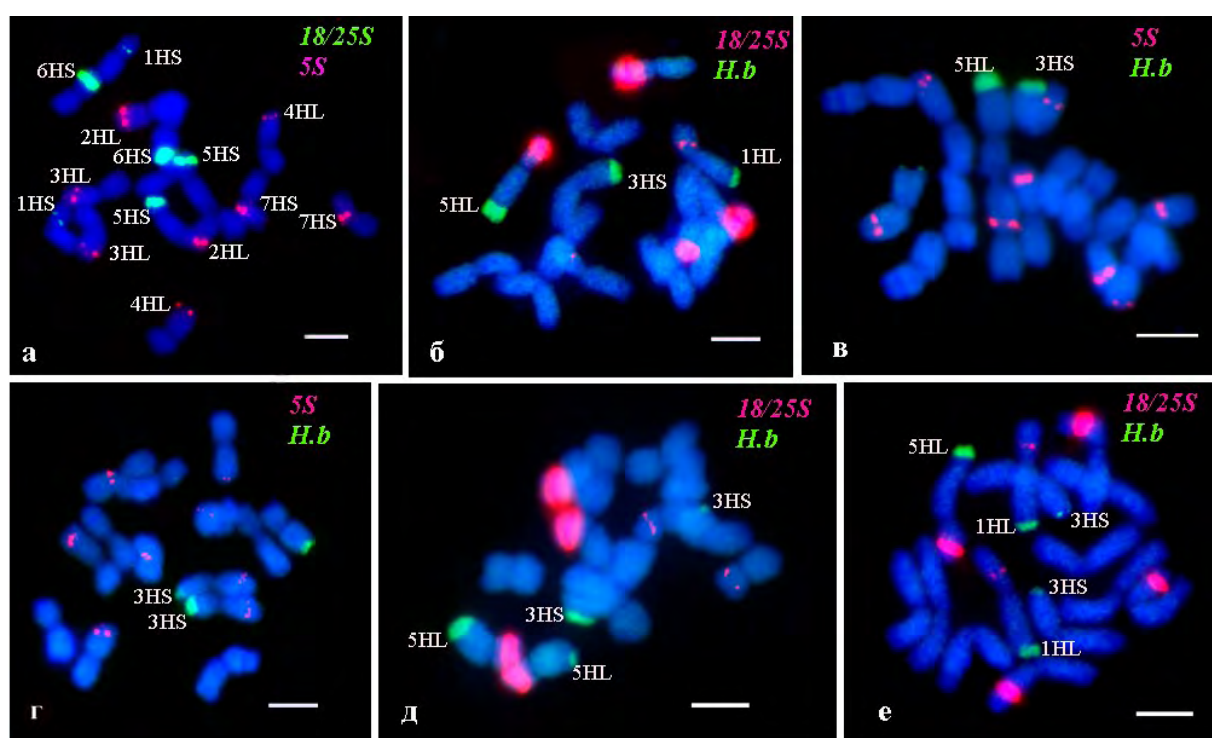


Рис 1. Локализация генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах интрогрессивных форм *H. vulgare* у растений в потомстве от скрещивания *H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x))

а – локализация маркеров 5S и 18S/25S на хромосомах ячменя сорта 'Roland'; б-е – кариотипы форм с интрогрессиями генетического материала *H. bulbosum*: б – растения BC1 с интрогрессиями в хромосомах 1HL, 5HL, 3HS; в-е в растениях от самоопыления BC1 с двумя интрогрессиями в хромосомах 5HL и 3HL (в); с тремя интрогрессиями, две из них – различных размеров – в двух гомологах хромосомы 3HS (г); с четырьмя интрогрессиями – две из них различных размеров – в двух гомологах хромосомы 5HL, две – в двух гомологах 3HS (д); с пятью интрогрессиями: двумя – в хромосоме 1HL, двумя – в хромосоме 3HS, одной – в 5HL (е).

Fig. 1. Localization of *H. bulbosum* genetic material in the chromosomes of introgressive forms of *H. vulgare* in the offspring plants from crossing *H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x))

а – localization of markers 5S and 18S/25S on the chromosomes of 'Roland' barley; б-е – karyotypes of forms with the introgression of the genetic material of *H. bulbosum*: б – BC1 plants with introgression in chromosomes 1HL, 5HL, 3HS; в-е – plants from BC1 self-pollination with two introgressions in chromosomes 5HL and 3HL (в); with three introgressions, two of them – of different size – in two homologues of chromosome 3HS (г); with four introgressions – two of them of different size – in two homologues of chromosome 5HL, two – in two homologues of 3HS (д); with five introgressions: two – in 1HL, two – in 3HS, one – in 5HL chromosome (е).

Для дальнейшего отбора интрогрессивных форм использовали семена от самоопыления двух растений с тремя интрогрессиями: *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x)) и *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)).

В потомстве растения BC1 *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x)) с тремя интрогрессиями было выявлено 17 групп растений с различным сочетанием хромосом, несущих интрогрессии генетического материала ячменя луковичного, от 1-ой до 5-ти на растение (табл. 5, рис. 1в – е).

В случае сочетания в кариотипе растения обоих гомологов с интрогрессией 5HL исходного размера (рис. 2а,б), наблюдали летальность на стадии развития первого листа (см. табл. 5). Зерновки у таких растений прорастали нормально, начинал развиваться зеленый первый лист, затем лист начинал терять зеленую окраску, растения погибали на стадии первого – начала развития второго листа. Летальность наблюдалась у всех растений с парой таких

рекомбинантных хромосом, независимо от наличия или отсутствия других интрогрессий.

Следует отметить, что у ряда растений размер интрогрессии 5HL отличался от исходного растения, что свидетельствует о гомеологичной мейотической рекомбинации в этом участке хромосомы. Выявлены жизнеспособные формы с двумя интрогрессиями 5HL различных размеров (см. рис. 1д), поэтому существует возможность отбора жизнеспособных стабильных форм, несущих чужеродный генетический материал в обоих гомологах этого плеча хромосомы. Растения с другим составом интрогрессий имели нормальную жизнеспособность, по фенотипу были близки к родительскому сорту ячменя. Среди них выявлены формы с интрогрессией в обоих гомологах хромосом 1HL и 3HS. У растений с двумя интрогрессиями 3HS отмечено различие размеров фрагментов генетического материала ячменя луковичного в гомологичных хромосомах. Изменение размеров интрогрессий в 5HL и 3HS свидетельствует о рекомбинации в мейозе в этих участках хромосом у растения BC1.

Таблица 5. Идентифицированные интрогрессии генетического материала ячменя луковичного у растений в поколении от самоопыления BC1 (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x)))

Table 5. Identified introgressions of the genetic material of bulbous barley in the offspring plants from BC1 self-pollination (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x)))

№/No.	Число растений/ Number of plants	С интрогрессиями / With introgressions				Примечание/ Comment
		число */ Number	1HL	5HL	3HS	
1	6	1	0	1 крупная	0	-
2	2	1	0	0	1	-
3	4	2	1	1 крупная	0	-
4	6	2	1	0	1	-
5	5	2	0	1-крупная	1	-
6	2	2	0	2 крупная	0	Летальность*
7	1	3	1	2 разл разм	0	-
8	2	3	0	2 разл разм	1	-
9	2	3	0	2 крупная	1	Летальность*
10	4	3	1	1 менее исх	1	-
11	2	3	1	1 крупная	1	-
12	1	3	1	0	2 разл	-
13	1	3	0	1 крупная	2 разл разм	-
14	2	4	1	2 крупная	1	Летальность*
15	4	4	2	1 крупная	1	
16	2	4	2	1 менее исх	1	
17	1	4	1	2 разл разм	1	
18	1	5	2	2 разл разм	1	

* – нежизнеспособные растения с первым зеленым листом, постепенной потерей хлорофилла и гибелью на стадии развития первого листа.

* – nonviable plants with the first green leaf, gradual loss of chlorophyll and death at the first leaf stage.

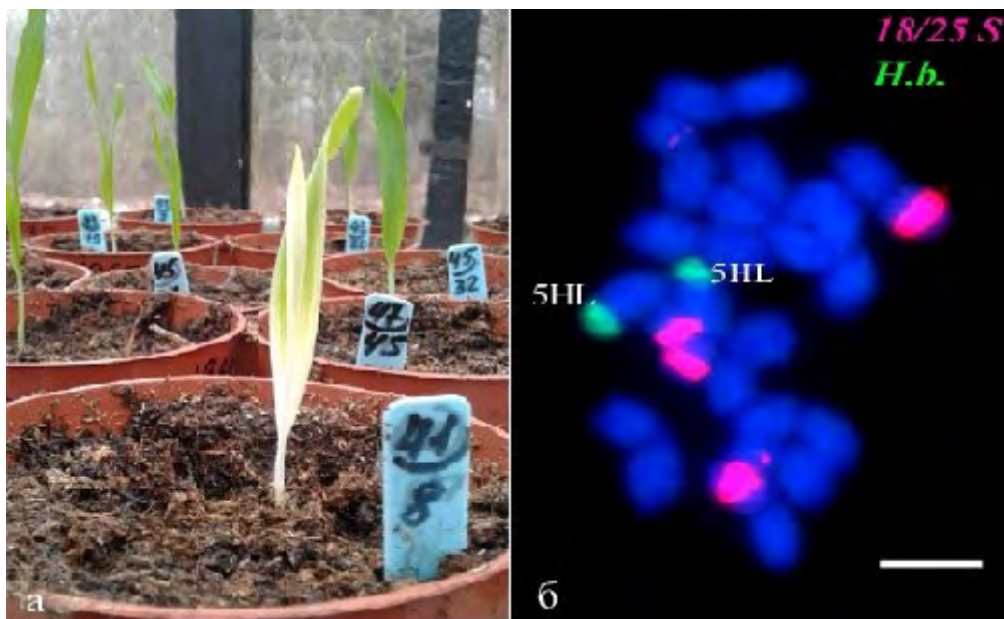


Рис. 2. Летальность на стадии второго листа у растения в потомстве от самоопыления BC1 (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851(4x)).

а – нежизнеспособное растение, **б** – кариотип этого растения с интрогрессиями генетического материала *H. bulbosum* исходного размера в обоих гомологах 5HL

Fig. 2. Mortality at the second leaf stage in the offspring plant from BC1 self-pollination (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x)).

a – nonviable plant, **b** – karyotype of this plant with the introgression of *H. bulbosum* genetic material of the initial size in both 5HL homologues

Растения с различным числом и сочетанием интрогрессий были использованы для дальнейшего отбора рекомбинантных форм. Во втором поколении от самоопыления изучали потомство восьми семей с различной комбинацией рекомбинантных хромосом. Как и в предыдущем поколении, в случае сочетания в кариотипе обоих гомологов с интрогрессией 5HL исходного размера наблюдали летальность на стадии развития второго листа. Но, наряду с летальными растениями с интрогрессией исходного размера в 5HL, были выявлены растения также несущие генетический материал *H. bulbosum* в обоих гомологах 5HL, но интрогрессии в этих случаях либо различались по размеру, либо были примерно равного размера, но меньше исходной интрогрессии. Среди растений второго поколения от самоопыления исходного растения с интрогрессиями отобраны линии с различным сочетанием рекомбинантных хромосом (табл. 6). Выявлены формы с интрогрессией генетического материала в обоих гомологах хромосом 1HL и 3HS.

В потомстве от самоопыления второго растения BC1 от скрещивания (*H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)), имевшего три интрогрессии в хромосомах 5HL, 2HL, 7HS,

было охарактеризовано семь растений по количеству рекомбинантных хромосом с локализованным в них генетическим материалом ячменя луковичного. Выявлены различные варианты сочетания интрогрессий чужеродных хромосом в кариотипах изучаемых растений (табл. 7, рис. 3б-е). Наибольший интерес для дальнейшего отбора линий представляют растения с рекомбинантными хромосомами 2HL и/или 7HS в одном из гомологов, поскольку интрогрессии генетического материала ячменя луковичного в этих хромосомах имеют значительные размеры. Это дает возможность предполагать гомеологичную мейотическую рекомбинацию в соответствующем участке и проводить дальнейший отбор в последующих поколениях линий с интрогрессиями различного размера и локализации на хромосоме. Для растения №74/11 с интрогрессиями в обоих гомологах хромосомы 2HL характерна практически полная стерильность – завязалась одна зерновка (см. рис. 3б). Пыльники этого растения не растрескивались (см. Приложение / Supplement¹). У другого растения с интрогрессией в хромосоме 2HL фрагменты генетического материала *H. bulbosum* в двух гомологах различались по размерам, что свидетельствует о рекомбинации в этом участке хромосомы (см. рис. 3г).

Таблица 6. Идентифицированные интрогрессии генетического материала ячменя луковичного у растений во втором поколении от самоопыления растения BC1 (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x))

Table 6. Identified introgressions of the genetic material of bulbous barley in plants in the second generation from self-pollination of BC1 plants (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × (*H. vulgare* 'Roland' × *H. bulbosum* W851 (4x))

№ растения F ₁ (число и локализация интрогрессий) / F ₁ plant number (number and introgression site)	Число растений / Number of F ₂ plants	С интрогрессиями в хромосомах / With introgressions in chromosomes			
		Всего / Total	1HL	5HL	3HS
41/7 (2-1HL терм; 1- 5HL крупная терм.)	5	2	2	0	0
	5	3	2	1 терм. крупная	
	2*	4	2	2 терм. крупные	0
41/12 (2-1HL терм; 1- 5HL крупная терм.; 2-3HS терм очень мал)	2	2	2 терм равн	0	
	2	2	2 терм разл разм	0	0
	2	3	2 терм равн	1 крупная	0
	5	3	2 терм разл разм	1 крупная	
	1	3	2 терм	1 средн терм	0
42/17 (1-1HL терм; 2- 3HS терм. разл.размера)	1	2	0	0	2
	2	3	1	0	2
	1	3	1 мал	0	2
	1	4	2 разл разм	0	2
43/19 (2-1HL терм; 2- 5HL разл разм. терм.; 1- 3HS очень мал. Терм)	1	3	2	1	0
	1	4	1	1	2 оч мал
	1	4	2	2 разл разм	0
	2	5	2	1 крупная	2 оч мал
	1	5	2	2 разл разм	1 оч мал
	2	6	2	2 мал	2 оч мал
44/27 (1-1HL терм; 2- 5HL разл разм. терм.; 1- 3HS терм)	2	2	2	0	
	2	3	2	0	1
	4	3	2	1	0
	1	3	1	0	2
	1	4	2	1 мал субтерм	1
	1	4	2	1	1 мал
	1	4	2	0	2
	1	5	2	1 средн	2
	1	6	2	2 средн разм	2
45/31 (5HL крупная терминальная)	1	1	0	1 мал	0
	1	1	0	1 средн	0
	7	1	0	1 терм крупная	0
	2	0	0	0	0
46/37 (2-1HL терм; 1-5HL; 1-3HS терм)	2	2	2	0	0
	1	3	2	0	1
	1	3	2	1 крупная	0
	2	4	2	1 крупная	1
46/38 (1-5HL , крупная терминальная)	3	0	0	0	0
	2	1	0	1 крупная	0
	1*	2	0	2 крупная	0

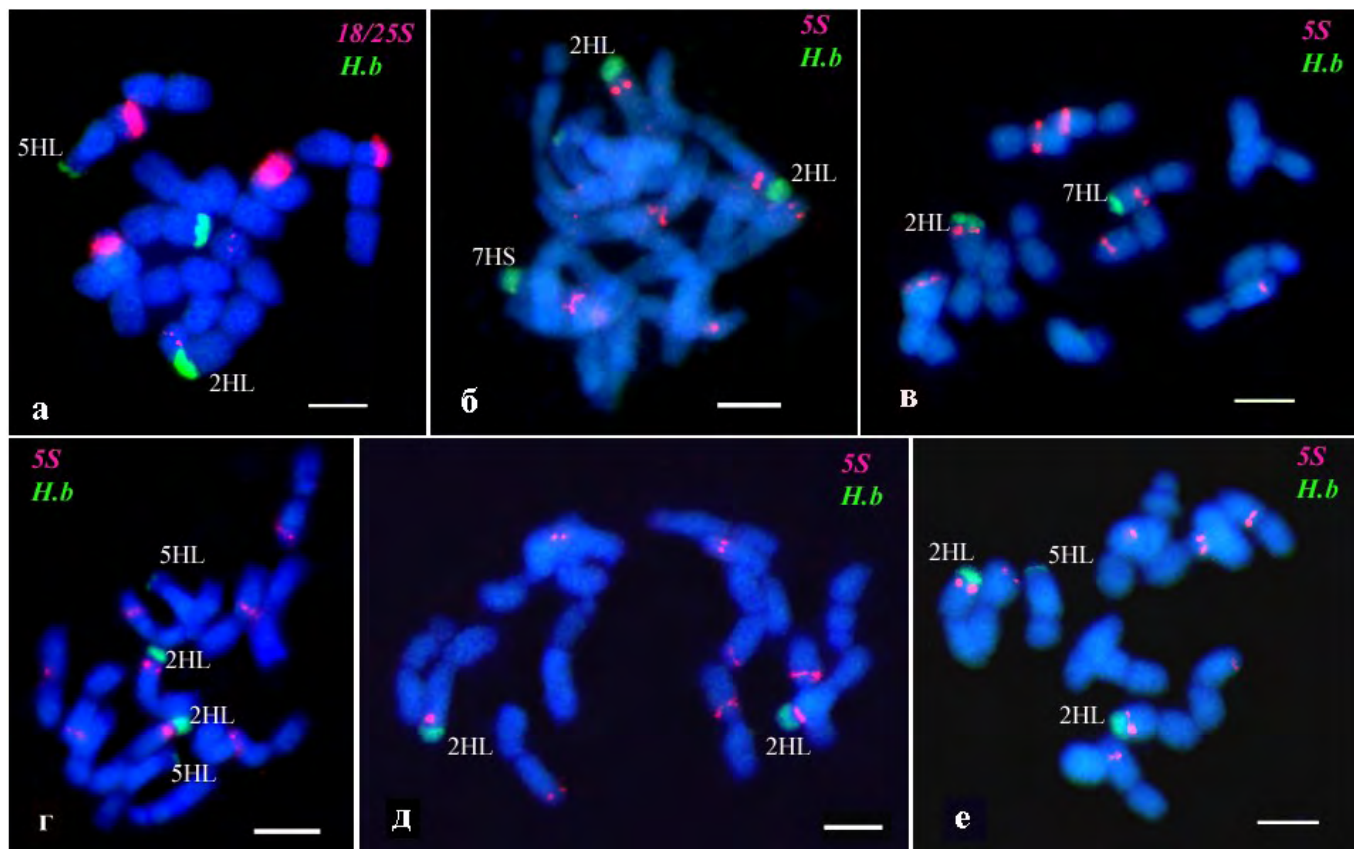


Рис. 3. Локализация генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах интрогессивных форм *Hordeum vulgare* L. у растений в потомстве от скрещивания (*H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x))

a – у исходного растения *H. vulgare* (BC1) с тремя интрогрессиями, локализованными в хромосомах 2HL, 5HL, 7HS; **б-е** – у растений от самоопыления BC1 с интрогрессиями в обоих гомологах 2HL и в одном из гомологов 7HS – стерильное растение (**б**); в одной хромосоме 2HL и в одной – 7HS (**в**); с интрогрессиями различных размеров в двух гомологах 2HL и маленькие терминальными интрогрессиями – в двух гомологах 5HL (фертильное растение) (**г**); с интрогрессиями 2HL равного размера (стерильное растение) в двух гомологах (**д**); с интрогрессиями различных размеров в двух гомологах 2HL и маленькой терминальной интрогрессией в одном из гомологов 5HL (фертильное растение) (**е**)

Fig. 3. Localization of *H. bulbosum* genetic material in the chromosomes of introgressive forms of *H. vulgare* in the offspring plants from crossing (*H. vulgare* Roland × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x))

a – in the original plant *H. vulgare* (BC1) with three introgressions localized in chromosomes 2HL, 5HL, 7HS; **b-e** – in plants from self-pollination of BC1 with the introgression in both homologues 2HL and in one of the homologues 7HS – a sterile plant (**b**); in one chromosome 2HL and one 7HS (**c**); with introgressions of various size in two homologues of 2HL and small terminal introgressions in two homologues of 5HL (fertile plant) (**d**); with 2HL introgressions of equal size (sterile plant) in two homologues (**d**); with introgressions of different size in two homologues of 2HL and a small terminal introgression in one of the homologues of 5HL (fertile plant) (**e**)

Таблица 7. Идентифицированные интрогрессии генетического материала ячменя луковичного у форм в поколении от самоопыления растения BC1 (*H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)).

Table 7. Identified introgressions of the genetic material of bulbous barley in offspring plants from self-pollination of BC1 plant (*H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x))

Число растений (№) / Number of plants (No.)	С интрогрессиями / With introgressions			
	Всего / Total	2HL	5HL	7HS
1 (74/5)	2	1	0	1 терм
2 (74/7;74/10)	2	1	1	0
1 (74/8)	3	1	1	1 терм
1 (74/9)	3	0	2	1 терм
1 (74/11)	4	2	1	1 терм
1 (74/12)	4	2 разл. разм.	2	0

Таблица 8. Идентифицированные интрогрессии генетического материала ячменя луковичного во втором поколении от самоопыления растения BC1 *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x))

Table 8. Identified introgressions of the genetic material of bulbous barley in F2 from self-pollination of BC1 plant *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x))

№ растения F ₁ / No. of F ₁ plants	Число растений F ₂ / Number of F ₂ plants	С интрогрессиями / With introgressions			
		Всего/ Total	2HL	5HL	7HS
74/11 (2- крупная терм., 1-5HL мал. терм., 1-7HS крупная терм)	1	4	2 терм	1 терм	1 терм.
73/5 (1-2HL крупная терм.)	1	1	0	1 терм	0
	3	1	1 терм	0	0
	2	0	0	0	0
74/12 (2 -2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм.)	7	2	2 терм	0	0
74/7 (1 -2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм)	1	3	2 терм	1 терм	0
	2	2	1 терм	1 терм	0
	1	2	2 терм	0	0
	1	1	1 терм	0	0
74/8 (1- 2HL крупная терм., 1-5HL мал.терм, 1-7HS крупная терм)	1	4	2 терм	1 терм	1 терм.
	1	3	1 терм	1 терм	1 терм.
	1	2	1 терм	1 терм	0
	1	2	1 терм	0	1 терм.
	2	1	1 терм	0	0

Во втором поколении от самоопыления пяти растений с различным сочетанием рекомбинантных хромосом было охарактеризовано 26 растений из пяти семей и выявлено 15 вариантов сочетания рекомбинантных хромосом с чужеродными интрогрессиями генетического

материала ячменя луковичного (табл. 8).

Среди изучаемых растений были выявлены формы с интрогрессиями в обоих гомологах 2HL (см. табл. 8). Характерной особенностью растений с этой интрогрессией является различная фертильности растений (табл. 9).

Таблица 9. Фертильность рекомбинантных форм *H. vulgare* с интрогрессией в обоих гомологах хромосомы 2HL

Table 9. Fertility of *H. vulgare* recombinant forms with introgressions in both homologues of 2HL chromosome

№ растения / Plant No.	Число интрогрессий / Number of introgressions			Число цветков / Number of flowers	Завязалось зерновок / Seed setting	
	2HL	5HL	7HS		Число / Number	%
73/11	2	1	1	121	1	0,83
s* 73/11 , p 1	2	1	1	218	0	0
74/12	2	2	0	154	17	11,04
s 74/12 p 1	2	0	0	175	55	73,33
s 74/12 p 5	2	1	0	104	0	0
s 74/12 p7	2	0	0	163	7	4,29
s 74/12 p 9	2	0	0	118	66	55,93
s 74/12 p.10	2	0	0	91	7	7,69
s 74/12 p.12	2	0	0	84	1	1,19
73/7	1	1	0	51	44	86,27
s 73/7 p.5	2	0	0	217	0	0
73/8	1	1	1	75	45	61,33
s 73/8 p 6	1	0	1	110	103	93,63
s 73/8 p 1	1	1	0	123	114	92,68
s 73/8 p 5	1	1	1	61	13	21,31
s 73/8 p 6	1	0	7	84	67	79,76
s 73/8 p4	2	1	1	82	72	87,80

s* – самоопыление / selfing

Растения с интрогрессией в одной из хромосом имели нормальную фертильность. Для растения 73/11 с интрогрессиями исходной формы в обоих гомологах характерна стерильность, единственное растение, полученное в потомстве этого растения, было полностью стерильным. В потомстве растения 74/12 (см. рис. 3г) с различным размером интрогрессированных фрагментов наблюдали растения с различной фертильностью (от 0 до 73,33%), что может быть связано с размерами интрогрессий в 2HL у этих растений. Различие в размерах интрогрессий у гомологов, вероятно, является результатом гомеологичной мейотической рекомбинации в пределах части плеча хромосомы у растений с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* в одном из гомологов.

Обсуждение

Целью работы было создание новых интрогрессивных форм ячменя на основе ярового сорта 'Roland'. При опылении культурного ячменя пыльцой гибридов были выявлены интрогрессивные формы, что свидетельствует о формировании гибридами полноценных пыльцевых зерен, способных к прорастанию и оплодотворению. Тераплоидный гибрид *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) детально изучен в наших пре-

дыдущих исследованиях (Scholz, Pendinen, 2017). Это – частично фертильное растение, завязывающее зерновки при самоопылении. Поэтому было ожидаемо завязывание семян при опылении культурного ячменя пыльцой этого растения. Пыльца триплоидных гибридов (Н^хН^бН^б) обычно стерильна (см. рис. 1d Приложения / Supplement, Fig. 1d), но у использованного в скрещиваниях гибридного растения *H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x) в единичных колосьях, цветущих обычно первыми после перезимовки, наблюдали растрескивающиеся пыльники и высыпавшуюся из них пыльцу, часть из которой хорошо выполнена, и, возможно, функциональна (см. рис. 1c Приложения / Supplement, Fig. 1c). Причины формирования такой пыльцы у этого гибрида пока не ясны. Возможно, появление выполненных пыльцевых зерен связано со спонтанной полиплоидизацией на каком-либо этапе развития спорогенной ткани. Кроме того, можно предположить, что при определенных условиях в процессе мейоза не происходит редукция числа хромосом, но при анализе этого растения характерных особенностей мейотического деления, приводящих к нередукции, не выявлено (Pendinen, Scholz, 2020).

Все полученные в результате скрещиваний растения представляли собой культурный ячмень (2n=2x=14).

Быстрое получение рекомбинантных форм культурного ячменя *H. vulgare* с интрогрессиями ячменя луковичного на основе триплоидных и тетраплоидных гибридов ($H^vH^bH^b$ и $H^bH^bH^vH^v$) связано с особенностями взаимодействия геномов этих видов в гибридах, приводящее к элиминации хромосом *H. bulbosum*. (Lange, 1971,6; Но, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003). При соотношении геномов $1H^v : 1H^b$, в гибридном зародыше во многих комбинациях наблюдается элиминация хромосом ячменя луковичного (Lange, 1971,6; Но, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003). При беккроссировании ячменем культурным соотношение числа геномов смещается в сторону увеличения дозы генома ячменя культурного, поэтому в поколении BC1 выявляются только растения *H. vulgare*.

В результате скрещиваний были получены новые интрогрессивные формы на основе ярового ячменя сорта 'Roland'. Обобщая данные о вариантах рекомбинантных хромосом и локализации интрогрессий, трудно сделать заключение о различной частоте встречаемости той или иной рекомбинантной хромосомы или ее плеча, поскольку было выявлено только 10 интрогрессий. Тем не менее, можно отметить тенденцию более частой межгеномной рекомбинации в длинных плечах хромосом – 7 из 10 выявленных интрогрессий локализованы в длинном плече. Причем, каждая из интрогрессий, обнаруженных нами в длинных плечах хромосом 1HL, 5HL, 3HL, встречалась у двух растений. Эта тенденция соответствует данным анализа гомеологичного спаривания хромосом в мейозе у этих гибридов (Pickering et al., 2004, 2006; Scholz, Pendinen, 2017; Pendinen, Scholz, 2020).

Выявление в потомстве от самоопыления растений с интрогрессий в одном из соответствующих гомологов хромосом 5HL, 2HL, 3HS форм с измененным (уменьшенным) чужеродным фрагментом, в сравнении с исходным его размером, свидетельствует о гомеологичном спаривании хромосом и о мейотической рекомбинации в этих участках соответствующих хромосом. Возможно, рекомбинационный процесс связан с наличием в этих участках хромосом *H. vulgare* регионов с высокой рекомбинационной активностью – так называемых hotspots или горячих точек рекомбинации (Künzel et al., 2000). Плечо 5HL *H. vulgare* характеризуется наибольшим количеством таких горячих точек рекомбинации. Поэтому в потомстве растения со значительного размера интрогрессией в одной из 5HL, наличие которой в двух гомологах приводит к летальности, можно ожидать появление растений с измененными размерами и рекомбинантных по разным участкам в пределах интрогрессированного фрагмента, что, в свою очередь, делает возможным получение на основе таких растений жизнеспособных интрогрессивных линий. Изменение размеров интрогрессий в 2HL при мейотической рекомбинации и получение растений с различной локализацией сайтов рекомбинации в пределах чужеродной вставки позволит создать фертильные линии с рекомбинантными хромосомами 2HL.

Заключение

Новые интрогрессивные формы ярового ячменя *H. vulgare* с фрагментами генетического материала ячменя луковичного *H. bulbosum* были получены при скрещивании культурного ячменя с двумя межвидовыми гибридами *H. vulgare* 'Roland' × (*H. vulgare* 'Roland' (2x) × *H. bulbosum* W851 (4x)) ($H^vH^bH^b$), *H. vulgare* 'Roland' × (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) ($H^bH^bH^vH^v$). Выявлены растения с интрогрессиями в трех хромосомах 1HL, 5HL, 3HS – при использовании в скрещивании триплоидного гибрида, а при использовании в скрещивании тетраплоидного гибрида – в хромосомах 2HL, 5HL, 7HS. В потомстве первого растения, в случае сочетания в кариотипе обоих гомологов с интрогрессией 5HL исходного размера, наблюдали летальность на стадии развития второго листа. У ряда растений отмечено уменьшение исходного размера интрогрессий в 5HL, среди них выявлены жизнеспособные формы с двумя интрогрессиями различных размеров в этом плече хромосомы, которые могут быть использованы в отборе интрогрессивных линий с рекомбинантной хромосомой 5HL.

Для растений с сочетанием в кариотипе интрогрессии 2HL в обоих гомологах характерна практически полная стерильность. Для форм с уменьшенным размером терминального интрогрессированного фрагмента этой хромосомы хотя бы в одном из гомологов, стерильность колоса не характерна. Таким образом, в процессе дальнейшего отбора возможно получить интрогрессивные линии с рекомбинантной хромосомой 2HL, характеризующиеся нормальной фертильностью.

Выявленные в потомстве от самоопыления исходных интрогрессивных форм растения ячменя с меньшим, в сравнении с исходным размером, чужеродным фрагментом в хромосомах 5HL, 2HL, 3HS свидетельствуют о гомеологичной рекомбинации в мейозе в этом участке хромосомы. Путем отбора в первом и втором поколениях от самоопыления этих растений создана серия фертильных форм культурного ячменя с различным сочетанием рекомбинантных хромосом в кариотипе.

References / Литература

- Bothmer R., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R.B., Linde-Laursen I. An ecogeographical study of genus *Hordeum*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute; 1991.
- Bothmer R., Seberg O., Jacobsen N. Genetic resources in the *Triticeae*. *Hereditas*. 1992;(116):141-150. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00814.x
- Brown S.E., Stephens J.L., Lapitan N.L.V., Knudson D.L. FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L.). *Genome*. 1999;42(2):274-281. DOI: 10.1139/g98-127
- Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: Maluszynski M. et al. (eds.). Doubled Haploid Production in Crop. Dordrecht; Boston: IAEA; 2003. p.15-19. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4_3
- Fukuyama T., Hosoya H. Genetic control and mechanism of chromosome elimination in the hybrids between *Hordeum bulbosum* (4x) and *H. vulgare* (4x). *The Japanese Journal of*

- Genetics*. 1983;58(3):241-250. DOI: 10.1266/jig.58.241
- Gottlob-McHugh S., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., Yarosh O., Johnson D. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome*. 1990;33(4):486-494. DOI: 10.1139/g90-072
- Hoseinzadeh P., Ruge-Wehling B., Schweizer P., Stein N., Pidón H. High resolution mapping of a *Hordeum bulbosum*-derived powdery mildew resistance locus in barley using distinct homologous introgression lines. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:225. DOI: 10.3389/fpls.2020.00225
- Ho K.M., Kasha K.J. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. *Genetics*. 1975;81(2):263-275.
- Jones I.T., Pickering R.A. The mildew resistance of *Hordeum bulbosum* and its transference into *H. vulgare* genotypes. *Annals of Applied Biology*. 1978;88(2):295-298. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1978.tb00709.x
- Johnston P.A., Pickering R.A. PCR detection of *Hordeum bulbosum* introgression in a *H. vulgare* background using a retrotransposon-like sequence. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104(4):720-726. DOI: 10.1007/s00122-001-0791-2
- Lange W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica* 1971a;20:14-29. DOI: 10.1007/BF00146769
- Lange W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica*. 1971b;20:181-194. DOI: 10.1007/BF00056078
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society: Microscopy Handbooks, no. 27. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1994.
- Michel M. Untersuchungen zur Übertragung von Resistenzgenen aus der Wildart *Hordeum bulbosum* L. in die Kulturgerste *Hordeum vulgare* L. PhD Thesis, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung. München, Germany: Technische Universität; 1996. [in Deutsch]
- Pendinen G.I., Chernov V.E., Scholz M. Biological characterization of introgressive barley lines obtained on the basis of the interspecific hybrid *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H¹H²H³). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):16-24. [in Russian] (Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М. Характеристика интрогрессивных линий ячменя, полученных на основе межвидового гибрида *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H¹H²H³). *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):16-24). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24
- Pendinen G.I., Scholz M. Homoeologous chromosome pairing at metaphase I of meiosis in *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. triploid hybrids (H¹H²H³). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2):6-15. [in Russian] (Пендинен Г.И., Шольц М. Спаривание гомеологических хромосом в метафазе I у триплоидных гибридов *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H¹H²H³). *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):6-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-02
- Pickering R., Ruge-Wehling B., Johnston P.A., Schweizer G., Ackermann P., Wehling P. The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS. *Plant Breeding*. 2006;125:576-579. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01253.x
- Pickering R.A. The production of fertile triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. (2n=2x=14) and *H. bulbosum* L. (2n=4x=28). *Barley Genetics Newsletter*. 1988;18:25-29.
- Pickering R.A., Hudakova S., Houben A., Johnston P., Butler R.C. Reduced metaphase I associations between the short arms of homoeologous chromosomes in a *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. diploid hybrid influences the frequency of recombinant progeny. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(5):911-916. DOI: 10.1007/s00122-004-1725-6
- Pickering R.A., Klatte S., Butler R.C. Reduced chromosome association between the short arms of 5H homologues in *Hordeum vulgare* L. at metaphase I. *Plant Breeding*. 2005;124(4):416-418. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2005.01122.x
- Pickering R.A., Klatte S., Butler R.C. Identification of all chromosome arms and their involvement in meiotic homoeologous associations at metaphase I in 2 *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. hybrids. *Genome*. 2006;49(1):73-78. DOI: 10.1139/G05-071
- Pickering R.A., Malyshev S., Kunzel G., Johnston P.A., Korzun V., Menke M., Schubert I. Locating introgressions of *Hordeum bulbosum* chromatin within the *H. vulgare* genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000;100(1):27-31. DOI: 10.1007/PL00002904
- Pickering R.A., Timmerman G.M., Cromei M.G., Melz G. Characterisation of progeny from backcrosses of triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L.(2x) and *H. bulbosum* L.(4x) to *H. vulgare*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88(3-4):460-464. DOI: 10.1007/BF00223661
- Pidón H., Wendler N., Habekuß A., Maasberg A., Ruge-Wehling B., Perovic D., Ordon F., Stein N. High-resolution mapping of *Rym14Hb*, a wild relative resistance gene to barley yellow mosaic disease. *Theoretical and Applied Genetics*. 2021;134:823-833. DOI: 10.1007/s00122-020-03733-7
- Ruge B., Linz A., Pickering R., Proeseler G., Greif P., Wehling P. Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;107(6):965-971. DOI: 10.1007/s00122-003-1339-4
- Ruge-Wehling B., Linz A., Habekuß A., Wehling P. Mapping of *Rym16Hb*, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;113(5):867-873. DOI: 10.1007/s00122-006-0345-8
- Scholz M., Pendinen G. The Effect of Homoeologous Meiotic Pairing in Tetraploid *Hordeum bulbosum* L. × *H. vulgare* L. Hybrids on Alien Introgressions in Offspring. *Cytogenetic and Genome Research*. 2017;150(2):139-149. DOI: 10.1159/000455141
- Scholz M., Ruge-Wehling B., Habekuß A., Schrader O., Pendinen G., Fischer K., Wehling P. *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;119(5):837-849. DOI: 10.1007/s00122-009-1093-3
- Shtaya M.J.Y., Sillero J.C., Flath K., Pickering R., Rubeales D. The resistance to leaf rust and powdery mildew of recombinant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) derived from *H. vulgare* × *H. bulbosum* crosses. *Plant Breeding*. 2007;126(3):259-267. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01328.x
- Wendler N., Mascher M., Himmelbach A., Bini F., Kümlehn J., Stein N. A high-density, sequence-enriched genetic map of *Hordeum bulbosum* and its collinearity to *H. vulgare*. *The Plant Genome*. 2017;10(3):1-11 DOI: 10.3835/plantgenome2017.06.0049
- Yakura K., Tanifuji S. Molecular cloning and restriction analysis of *Eco* RI-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiology* 1983;24(7):1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650