

Научная статья

УДК 575.222.72:633.16

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-1-02



Возможности использования тетраплоидного межвидового гибрида *Hordeum bulbosum* L. × *Hordeum vulgare* L. в получении новых рекомбинантных линий ячменя

Г. И. Пендинен¹, В. Е. Чернов², М Шольц³¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия²Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия³Julius Kühn-Institut Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZI), Groß Lüsewitz, Germany**Автор, ответственный за переписку:** Галина Ивановна Пендинен, pendinen@mail.ru

Актуальность. *Hordeum bulbosum* L. – единственный дикорастущий вид рода *Hordeum*, генофонд которого успешно используется в интрогрессивной гибридизации для расширения генетического разнообразия *Hordeum vulgare* L. При создании интрогрессивных форм на основе гибридов *H. vulgare* с *H. bulbosum* необходимо учитывать плоидность образцов родительских видов, их генетические особенности, определяющие интенсивность процесса элиминации хромосом *H. bulbosum* в эмбриогенезе. Цель исследования – выявление особенностей, связанных с элиминацией хромосом ячменя луковичного в зародышах, полученных в различных комбинациях скрещиваний с участием тетраплоидного гибрида *H. bulbosum* с *H. vulgare* для его эффективного использования при создании интрогрессивных линий ячменя *H. vulgare*. **Материал и методы.** Для анализа использовали 9-15-ти дневные зародыши, полученные в скрещиваниях тетраплоидного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* Borwina (4x)) (HbHbHvHv) с сортами *H. vulgare* ‘Igri’ (2x) и ‘Borwina’ (2x), с *H. bulbosum* A17 (4x), а также при самоопылении гибрида. Анализ хромосомного состава проводили на давленных препаратах разновозрастных зародышей методом геномной *in situ* гибридизации (GISH). **Результаты.** При самоопылении гибрида среди 11-15-ти дневных зародышей из числа изученных примерно половина – миксоплоидные, у остальных преобладают клетки, содержащие только геномный материал *H. vulgare*. При скрещивании гибрида с сортами ячменя ‘Igri’ (2x) и ‘Borwina’ (2x) процесс элиминации интенсивен, к 10-11-му дням после опыления во всех зародышах преобладают клетки, содержащие только геномный материал *H. vulgare* независимо от направления скрещивания и используемого сорта. В скрещиваниях тетраплоидного гибрида с *H. bulbosum* A17 (4x) получаются гибридные зародыши со стабильным хромосомным составом. Во всех вариантах скрещиваний выявлены зародыши с рекомбинантными хромосомами *H. vulgare*, несущие чужеродный генетический материал ячменя луковичного. **Заключение.** Для массового получения интрогрессивных линий культурного ячменя различных сортов на основе частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) наиболее эффективным является скрещивание с сортами *H. vulgare* (2x). В потомстве от таких скрещиваний будут только растения культурного ячменя, среди которых можно выявить формы с интрогрессией *H. bulbosum* и уже в первом поколении от их самоопыления отобрать линии *H. vulgare*, несущие генетический материал ячменя луковичного в обоих гомологах.

Ключевые слова: межвидовая гибридизация, элиминация хромосом, чужеродная интрогрессия, интрогрессивные линии

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0009, а также в рамках двустороннего российско-германского сотрудничества (проект №145)

Для цитирования: Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М. Возможности использования тетраплоидного межвидового гибрида *Hordeum bulbosum* L. × *Hordeum vulgare* L. в получении новых рекомбинантных линий ячменя. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(1):6-20. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-1-02

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М., 2024

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-1-o2

Possibilities of using the tetraploid interspecific hybrid *Hordeum bulbosum* L. × *Hordeum vulgare* L. in obtaining new recombinant barley lines

Galina I. Pendinen¹, Vladimir E. Chernov², Margaret Scholz³¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia²Agrophysical Research Institute, St. Petersburg, Russia³Julius Kühn-Institut Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZI), Groß Lüsewitz, Germany**Corresponding author:** Galina I. Pendinen, pendinen@mail.ru

Background. *Hordeum bulbosum* L. is the only wild species of the genus *Hordeum*, the gene pool of which is successfully used in introgressive hybridization to increase the genetic diversity of *H. vulgare* L. When creating introgression forms based on hybrids of *H. vulgare* with *H. bulbosum*, it is necessary to take into consideration the ploidy of the parent species, and their genetic features that determine the intensity of the process of *H. bulbosum* chromosomes elimination in embryogenesis. The purpose of our investigation was to study the features associated with the elimination of bulbous barley chromosomes in embryos obtained in various combinations of crosses involving the tetraploid hybrid *H. bulbosum* with *H. vulgare* for its effective use in obtaining introgression lines of *H. vulgare*. **Material and methods.** The analysis was performed on 9-15 days old embryos obtained in crosses of the tetraploid hybrid F2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) with 'Igri' (2x) and 'Borwina' (2x) barley varieties, with *H. bulbosum* A17 (4x), as well as during its self-pollination. The chromosomal composition of embryos of different ages was analyzed on squashed embryo slides using genomic *in situ* hybridization (GISH). **Results.** Among the 11-15 days old embryos obtained from self-pollination of the hybrid, approximately half of the studied ones were mixoploids, while in other embryos the majority of cells contained only the genomic material of *H. vulgare*. The elimination process was very intensive in crosses of the hybrid with the barley varieties 'Igri' (2x) and 'Borwina' (2x), and by day 10-11 after pollination cells containing only the genomic material of *H. vulgare* predominated in all embryos, regardless of the direction of crossing and the variety used. Hybrid embryos with a stable chromosomal composition resulted from a cross of a tetraploid hybrid with *H. bulbosum* A17 (4x). Embryos with recombinant *H. vulgare* chromosomes carrying alien genetic material of bulbous barley were identified in all types of crosses. **Conclusion.** The most efficient way for the mass production of introgression lines of cultivated barley varieties based on the partially fertile hybrid F2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)), is the crossing with varieties of *H. vulgare* (2x). The progeny from such crosses will contain only cultivated barley plants, among which it is possible to identify forms with the introgression of *H. bulbosum* and use already the first generation from their self-pollination for selecting *H. vulgare* lines carrying the genetic material of bulbous barley in both homologs.

Keywords: interspecific hybridization, chromosomes elimination, alien introgression, introgression lines

Acknowledgments: the research was performed within the framework of the State Assignment according to the Thematic Plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0009 as well as within the framework of bilateral Russian-German cooperation (project No.145)

For citation: Pendinen G.I., Chernov V.E., Scholz M. Possibilities of using the tetraploid interspecific hybrid *Hordeum bulbosum* L. × *Hordeum vulgare* L. in obtaining new recombinant barley lines. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(1):6-20. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-1-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. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Pendinen G.I., Chernov V.E., Scholz M., 2024

Введение

Ячмень луковичный *Hordeum bulbosum* L. – многолетний вид, среди образцов которого встречаются диплоидные и тетраплоидные формы (Bothmer et al., 1991). Как и культурный ячмень, он относится к секции *Hordeum*. 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). Ячмень луковичный – единственный дикорастущий вид рода *Hordeum*, генофонд которого успешно используется в интрогрессивной гибридизации для расширения генетического разнообразия ячменя культурного *Hordeum vulgare* L.

Образцы *H. bulbosum* характеризуются рядом ценных признаков, таких как устойчивость к мучнистой росе, стеблевой и листовой ржавчине, вирусам BaMMV, BaYMV и BYDV (Jones, Pickering, 1978; Michel, 1996; Habekuß et al. 2004). Показана возможность их переноса от образцов *H. bulbosum* в геном *H. vulgare* при межвидовой гибридизации (Jones, Pickering, 1978; Michel, 1996; Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009; Hoseinzadeh et al., 2020; Pidon et al., 2021; 2023; Yu et al., 2018; 2022). На основе межвидовых гибридов между *H. vulgare* и *H. bulbosum* получены серии интрогрессивных линий (Johnston et al., 2009; Pickering, 1991; Pickering et al. 1994; Pickering et al., 2000; Zhang et al., 2001; Scholz et al., 2009; Pendinen et al., 2018).

При скрещивании *H. vulgare* с *H. bulbosum* в потомстве могут наблюдаться межвидовые гибриды, или гаплоиды культурного ячменя как результат элиминации хромосом ячменя луковичного в процессе эмбриогенеза (Lange, 1971a; b; Kasha, Kao, 1970). В скрещиваниях *H. vulgare* (2x) с *H. bulbosum* (2x) и *H. vulgare* (4x) и *H. bulbosum* (4x) при соотношении геномов 1Hv : 1Hb в гибридном зародыше часто 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 или диплоидные формы *H. vulgare*, а также гибридные формы с нестабильным числом хромосом (Lange, 1971a; b). Эта особенность в значительной степени ограничивает вовлечение разнообразных сортов культурного ячменя в интрогрессивную гибридизацию с ячменем луковичным. В ряде комбинаций скрещиваний при соотношении плоидности родительских видов 1Hv : 1Hb с использованием сортов ячменя ‘Emir’ (2x) (Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004; 2006a) и ‘Borwina’ (4x) получены цитогенетически стабильные гибриды (Szigat, Pohler, 1982, Scholz, Pendinen, 2017). При соотношении геномов родительских видов 1Hv : 2Hb в скрещиваниях тетраплоидного *H. bulbosum* с диплоидным *H. vulgare* элиминации хромосом ячменя луковичного не происходит и в потомстве

наблюдаются цитогенетически стабильные триплоидные гибриды (HvHbHb) независимо от используемых для создания гибридов образцов родительских видов (Lange, 1971a; Yu, 2018; Pendinen, Scholz, 2020).

Кроме того, в литературе описаны случаи получения триплоидных гибридов с геномным составом HvHvHb с нетипичным для гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным соотношением дозы родительских геномов – 2Hv : 1Hb (Szigat, Pohler, 1982; Pickering, 1991; Gilpin et al., 1997). В этих случаях в получении гибридов использовали сорта ‘Emir’ и ‘Borwina’, полученных на основе *H. vulgare*.

При составлении схемы скрещиваний для получения интрогрессивных форм на основе гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным необходимо учитывать ряд факторов, основными из которых являются плоидность образцов родительских видов, их генетические особенности, определяющие интенсивность процесса элиминации хромосом ячменя луковичного в эмбриогенезе. По результатам нашего предварительного исследования, интенсивность элиминации хромосом *H. bulbosum* в эмбриогенезе гибридных зародышей, полученных при скрещивании ячменя луковичного (4x) с сортами ячменя культурного ‘Igrі’ (4x) и ‘Borwina’ (4x) различается в зависимости от сорта ячменя (Pendinen et al., 2013).

Ранее в наших исследованиях был синтезирован тетраплоидный гибрид *Hordeum bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x) (HbHbHvHv), в потомстве от его самоопыления получен частично фертильный тетраплоидный гибрид F₂ (HbHbHvHv), у которого детально изучены особенности гомеологичного спаривания хромосом в мейозе и реализация рекомбинационного потенциала в потомстве от самоопыления (Scholz, Pendinen, 2017). Родительский клон ячменя луковичного, использованный при его получении, характеризуется рядом ценных признаков, в частности, устойчивостью к *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) Davis (Pickering et al., 2006b), к вирусам желтой карликовости ячменя BYDV, карликовости ячменя WDV, слабой мозаики ячменя BaMMV, желтой мозаики ячменя BaYM (Michel, 1996; Habekuß et al., 2004; Schliephake et al., 2013). При межвидовой гибридизации идентифицированный у *H. bulbosum* A17 ген *Ryd4Hb* устойчивости к BYDV был перенесен в субтерминальный участок хромосомы 3HL *H. vulgare* сорта ‘Igrі’ (Scholz et al., 2009), ген *Rph22* устойчивости к листовой ржавчине ячменя *Puccinia hordei* G.H.Otth – в длинное плечо хромосомы 2HL сорта ‘Golden Promise’ (Johnston et al., 2013), ген количественной устойчивости *Rph26*, эффективный против листовой ржавчины ячменя *Puccinia hordei*, был интрогрессирован из этого же клона A17 *H. bulbosum* в субтерминальный участок хромосомы 1HL *H. vulgare* сорта ‘Emir’ (Yu et al., 2018). В связи с этим, актуальной задачей является получение серии интрогрессивных линий ячменя от гибридов, полученных от скрещивания различных сортов *H. vulgare* с клоном A17 *H. bulbosum* L.

Целью исследования являлось изучение особенностей, связанных с элиминацией хромосом ячменя луковичного в гибридных зародышах, полученных в различных комбинациях скрещиваний с участием частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) для эффективного использования этого гибрида при создании на его основе интрогрессивных линий ячменя с участием различных сортов *H. vulgare*.

Материал и Методы

В работе использованы следующие образцы: клон ячменя луковичного *H. bulbosum* A17 (4x), тетраплоидные и диплоидные образцы *H. vulgare* сортов 'Igrі' (2x, 4x) и 'Borwina' (2x, 4x), многолетний тетраплоидный гибрид F_2 с геномным составом HbHbHvHv, полученный при самоопылении гибрида *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x) (Pendinen et al., 2013; Scholz, Pendinen, 2017). Для этого гибрида характерна частичная фертильность, в его потомстве от самоопыления встречаются как гибридные формы, так и диплоиды, соответствующие культурному ячменю (2x). И в первом, и во втором случае выявляются формы с рекомбинантными хромосомами культурного ячменя. Принимая во внимание особенности взаимодействия геномов родительских видов и перспективы дальнейшего использования этого гибрида в интрогрессивной гибридизации, изучали особенности поведения хромосом культурного ячменя и ячменя луковичного в эмбриогенезе у потомков от различных комбинаций скрещиваний: с сортами культурного ячменя 'Igrі' (2x) и 'Borwina' (2x), с ячменем луковичным *H. bulbosum* A17 (4x), а также от самоопыления.

Для подтверждения наших предварительных данных о различном влиянии генотипов сортов 'Igrі' и 'Borwina' на интенсивность элиминации хромосом изучали хромосомный состав зародышей из зафиксированных 10-ти, 12-ти и 14-ти дневных зерновок, полученных от скрещивания *H. bulbosum* A17 (4x) с сортом 'Igrі' (4x) и 12-ти дневных зерновок, полученных от скрещивания с сортом 'Borwina' (4x). В делящихся клетках зародышей определяли число хромосом родительских видов. В каждом варианте изучали по три зародыша.

Подготовка материала для исследования. Растения выращивали в теплице с 16-ти часовым фотопериодом и температурой 22°C днем и 16°C ночью. Для скрещиваний цветки в колосьях материнских форм кастрировали за 2-3 дня до созревания пыльников. Опыление проводили через 2-3 дня после кастрации. Через 9-14 дней после опыления завязавшиеся зерновки помещали в фиксатор 3:1 (этиловый спирт 96% : ледяная уксусная кислота), фиксированный материал до использования хранили в морозильной камере при -20°C.

Зародыши из зафиксированных зерновок вычленили непосредственно перед подготовкой препарата и помещали их на предметное стекло в каплю раствора маце-

рирующих ферментов, содержащих 4% целлюлазы R10 (1,14 U/mg) и 1% пектолиазы (0,94 U/mg) на 20-25 мин. Затем фермент убирали, зародыши промывали дистиллированной водой, затем 45% уксусной кислотой и использовали для приготовления давленных препаратов.

Флюоресцентная ДНК-ДНК гибридизация *in situ*.

Для идентификации генетического материала ячменя луковичного использовали геномную *in situ* гибридизацию (GISH) с меченой геномной ДНК *H. bulbosum*, в качестве блокирующей использовали ДНК *H. vulgare* 'Igrі' (2x), кроме того, в некоторых случаях в пробу для гибридизации добавляли меченую 18/25S рДНК, маркирующую 1HS, 5HS, 6HS плечи хромосом культурного ячменя и плечо 6HS ячменя луковичного. Подготовку препаратов, мечение ДНК, флюоресцентную *in situ* гибридизацию проводили по ранее описанной методике (Scholz et al., 2009; Scholz, Pendinen, 2017). Геномную ДНК *H. bulbosum* и плазмидную ДНК, несущую 18S/25S рДНК (зонд Ver17) (Yakura, Tanifuji, 1983) метили методом Nick-трансляции с использованием DIG- или BIO-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics).

Для анализа препаратов, создания и обработки изображений использовали эпифлюоресцентные микроскопы Nikon 90i (Nikon Corporation, Япония) с камерой DS-Qi1 и AxioImager M2 (Carl Zeiss microscopy GmbH, Germany) с камерой AxioCamMRm и программным обеспечением AxioVision Rel 4.8.

Результаты

Элиминация хромосом ячменя луковичного в гибридных зародышах от скрещивания *H. bulbosum* A17 (4x) с *H. vulgare* 'Igrі' (4x) и 'Borwina' (4x)

Анализ 11-12-ти дневных зародышей, полученных в комбинации *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Igrі' (4x) показал, что процесс элиминации хромосом ячменя луковичного очень интенсивный, наблюдаются микроядра, образованные хромосомами ячменя луковичного. Ни в одной из делящихся клеток не выявлено эуплоидного гибридного набора хромосом (14 *Hb* + 14 *Hv*). Выявленные анеуплоидные гибридные клетки имели от одной до 11-ти хромосом ячменя луковичного и 14 хромосом ячменя культурного. Значительная часть клеток представляли собой гаплоидные клетки тетраплоидного *H. vulgare* ($n=2x=14$) (рис. 1a, b). К 14-му дню в делящихся клетках не выявлено хромосом ячменя луковичного (рис. 1c). Хромосомный материал ячменя луковичного в зародышах этого возраста встречается только в виде редких микроядер.

В гибридных зародышах, полученных от скрещивания с сортом *H. vulgare* 'Borwina' (4x), процесс элиминации не столь интенсивен; к 12-му дню после опыления большинство клеток (92,6%) в проанализированных зародышах содержали полный набор хромосом *H. bulbosum*.

В ряде клеток (7,4%) отмечена элиминация от одной до четырех хромосом ячменя луковичного и выявлены

микроядра, образованные хромосомами *H. bulbosum*.

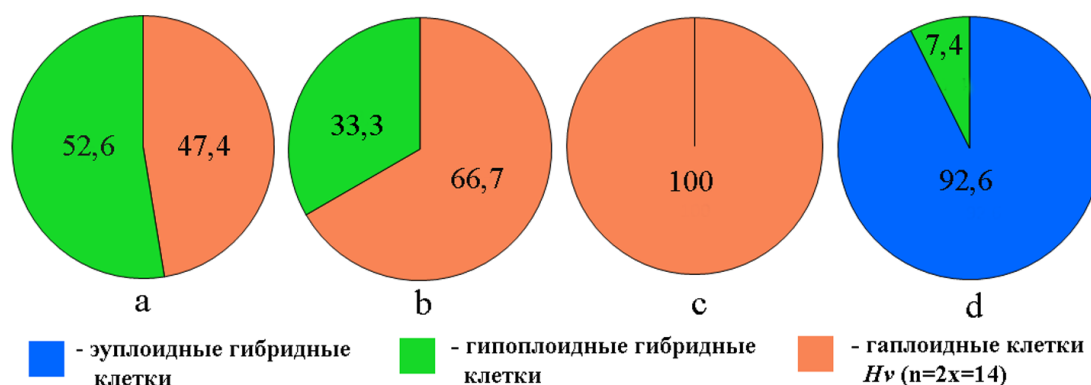


Рис. 1. Доли гаплоидных и гибридных (эуплоидных и гипоплоидных) клеток в зародышах, полученных от скрещивания *H. bulbosum* A17 (4x) с тетраплоидными образцами *H. vulgare* (4x) 'Igri' (a-c) и 'Borwina' (4x) (d)

a – 11-ти суточные зародыши; b – 12-ти суточные зародыши; c – 14-ти суточный зародыш; d – 12-ти суточные зародыши. Доля различных групп клеток на диаграмме указана в %

Fig. 1. Proportions of haploid and hybrid (euploid and hypoploid) cells in embryos obtained from crossing *H. bulbosum* A17 (4x) with tetraploid *H. vulgare* (4x) 'Igri' (a-c) and Borwina (4x) (d)

a – 11-day-old embryos; b – 12-day-old embryos; c – 14-day-old embryo; d – 12-day-old embryos. The occurrence of different groups of cells in the diagram is indicated in %

Хромосомный состав зародышей, полученных в различных комбинациях скрещиваний с участием тетраплоидного гибрида F₂ (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x))

Тетраплоидный гибрид *H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x), (HbHbHvHv) обладает частичной фертильностью; в его потомстве от самоопыления встречаются как гибридные формы, так и культурный ячмень (2x). И в первом, и во втором случае выявляются формы с рекомбинантными хромосомами культурного ячменя (Scholz, Pendinen, 2017). Принимая во внимание особенности взаимодействия геномов родительских видов, изучали особенности поведения хромосом культурного ячменя и ячменя луковичного в эмбриогенезе в различных комбинациях скрещиваний.

Самоопыление гибрида. Показано, что во всех изученных 9-ти-15-ти суточных зародышах, полученных при самоопылении гибрида, преобладает тенденция к элиминации хромосом ячменя луковичного (табл. 1). В тканях пяти изученных 9-ти и 11-ти суточных зародышей встречаются как клетки с полной элиминацией хромо-

сом ячменя луковичного, содержащие только хромосомы *H. vulgare*, так и клетки, в которых помимо хроматина культурного ячменя наблюдается остаточное количество генетического материала ячменя луковичного: от 1 до 5 хромосом (рис. 2a). Наблюдаются микроядра, образованные генетическим материалом ячменя луковичного, а также гибридные клетки (рис. 2b). В пяти из 11 проанализированных 13-ти – 15-ти суточных зародышей наблюдали практически полную элиминацию хромосом *H. bulbosum*, лишь в некоторых участках было отмечено наличие клеток, включающих наряду с хромосомами культурного ячменя остаточные количества хроматина ячменя луковичного, а также микроядра, образованные хроматином *H. bulbosum*. В шести зародышах наблюдалась миксоплоидия, клетки с 14 хромосомами культурного ячменя единичны; в основном, эти зародыши состоят из гибридных клеток с различным количеством генетического материала ячменя луковичного. Выявлены 11-ти, 13-ти и 15-ти дневные миксоплоидные гибридные зародыши. Цитогенетически стабильных гибридных зародышей, состоящих из клеток с геномным составом HvHvHbHb, выявлено не было.

Таблица 1. Характеристики геномного состава зародышей, полученных в результате самоопыления гибрида F₂ (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv)

Table 1. Characteristics of the genomic composition of embryos obtained from self-pollination of the F₂ hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) hybrid

Возраст зародыша, сутки/ age of the embryo, days	Число зародышей/ Number of embryos	Характеристика геномного состава зародыша/ Characteristics of the genomic composition of the embryo	Наличие хромосом с интрогрессией/ Presence of chromosomes with introgression
9	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> * (HvHv, 2n=14), некоторые содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> **. Микроядра <i>Hb</i>	1 – <i>Hv</i> ^{Hb***}
11	1	Миксоплоидный гибридный зародыш. Большинство клеток содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> , единичные - только 14 хромосом <i>Hv</i> .	0
	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> . (HvHv, 2n=14), некоторые клетки содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	1 – <i>Hv</i> ^{Hb*} 1 – 1HL
	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), в некоторых клетках - единичные хромосомы <i>Hb</i> (не более 1 на клетку). Микроядра <i>Hb</i> .	1 – 1HL
13	2	Миксоплоидные гибридные зародыши: 14 хромосом <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14) и различное число (<14) хромосом <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	0
	2	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), некоторые содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	0
14 -15	2	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>H. vulgare</i> (HvHv, 2n=14), некоторые клетки содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	0
	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), некоторые клетки содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	2 – <i>Hv</i> ^{Hb*}
	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), некоторые клетки содержат генетический материал <i>Hv</i> и <i>Hb</i> . Микроядра <i>Hb</i> .	1 – 1HL 1 – 5HL/ 6HL 1 – <i>Hv</i> ^{Hb*}
	4	Миксоплоидные гибридные зародыши: 14 хромосом <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14) и различное количество <i>Hb</i> . Часть зародыша – клетки, содержащие только хромосомы <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Микроядра <i>Hb</i> .	0

* – *H. vulgare*, ** – *H. bulbosum*, *** – *Hv*^{Hb} – неидентифицированная хромосома *H. vulgare* с интрогрессией *H. bulbosum* (не 1Н, не 5Н, не 6Н)

В клетках у пяти из 16 изученных зародышей выявлены рекомбинантные хромосомы *H. vulgare*, несущие терминальные интрогрессии генетического материала *H. bulbosum*: у двух – по одной рекомбинантной хромосоме: 1-1HL (рис. 2с), 1 – не идентифицирована, но установлено, что она не является ни 1Н, ни 5Н, ни 6Н; у одного – 2 интрогрессии (не идентифицированы: не являются ни 1Н, ни 5Н, ни 6Н); у одного – 3 интрогрессии (одна – 1HL, вторая – 5HL или 6HL, третья – не идентифицирована). В остальных зародышах рекомбинантных хромосом культурного ячменя выявлено не было (рис. 2д).

Скрещивания гибрида с *H. vulgare* ‘Borwina’ (2x). При скрещивании гибрида с ячменем сорта ‘Borwina’ (2x), как при использовании его в качестве материнской формы, так и как опылителя, к 10-12 сут-

кам после опыления во всех зародышах отмечено наличие клеток, содержащих только геномный материал *H. vulgare*, а также идентифицирован остаточный хромосомный материал ячменя луковичного в виде микроядер или единичных хромосом (табл. 2, рис. 3). В большинстве зародышей этого возраста преобладали клетки, содержащие только хромосомы культурного ячменя (см. табл. 2). Лишь у одного 10-дневного зародыша, полученного при использовании гибрида в качестве материнской формы, наблюдали миксоплоидную структуру: в его составе, наряду с клетками *H. vulgare*, значительное количество миксоплоидных гибридных клеток, содержащих наряду с хромосомами культурного ячменя 1-5 хромосом ячменя луковичного и большое число микроядер *H. bulbosum* (см. рис. 3 d, e, f).

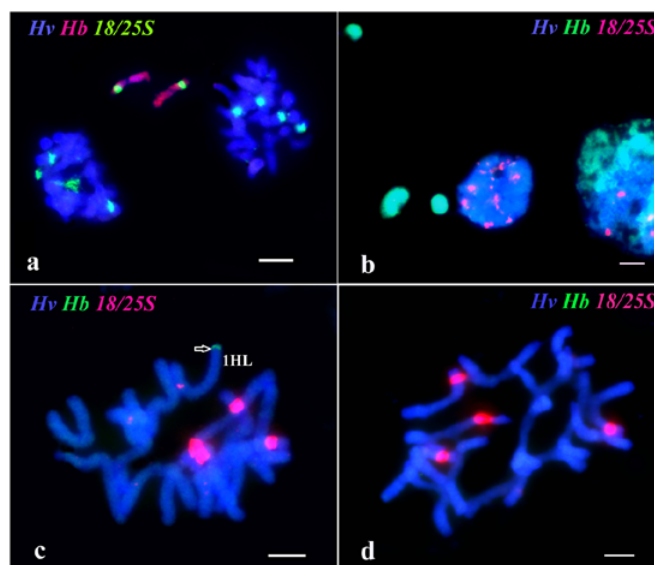


Рис. 2. Геномный состав клеток зародышей, полученных в результате самоопыления тетраплоидного гибрида F_2 (*H. bulbosum* L. A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv)

a – конец анафазы митоза в клетке 9-ти дневного зародыша: 2 хромосомы 6Hb будут утрачены в процессе деления; b – ядра гибридной клетки и клетки, содержащей только хромосомы *Hv* и микроядра *Hb* 11-ти дневного зародыша; c, d – метафазные хромосомы диплоидных клеток *Hv* 11-ти дневного зародыша с рекомбинантной хромосомой *Hv*, несущей терминальную интрогрессию (указана стрелкой) хромосомы IHL (c) и без рекомбинантных хромосом *Hv* (d)

Fig. 2. Genome composition of embryo cells obtained from self-pollination of the tetraploid F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv):

a – the end of anaphase of mitosis in a cell of a 9-day-old embryo: 2 chromosomes 6Hb of *H. bulbosum* will be lost during the division process; b – nuclei of a hybrid cell and a cell containing only *Hv* chromosomes and *Hb* micronuclei of an 11-day-old embryo; c, d – diploid cell of *Hv* of an 11-day-old embryo with a recombinant chromosome carrying terminal introgression (indicated by arrow) in IHL chromosome (c) and without recombinant chromosomes of *Hv* (d).

Таблица 2. Характеристики геномного состава зародышей, полученных в результате скрещиваний гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) с *H. vulgare* 'Borwina' (2x) (HvHv)

Table 2. Characteristics of the genomic composition of embryos obtained in crosses of the F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) with *H. vulgare* 'Borwina' (2x) (HvHv)

Комбинация скрещивания / Cross combination	Возраст зародыша, сутки / age of the embryo, days	Число зародышей / Number of embryos	Характеристика геномного состава зародыша / Characteristics of the genomic composition of the embryo	Наличие хромосом с интрогрессией / chromosomes with introgression
HvHv $\times$ HbHbHvHv	11-13	6	Преобладают клетки с хромосомами <i>Hv</i> * (HvHv, 2n=14), единичные микроядра <i>Hb</i> **.	0
HbHbHvHv $\times$ HvHv	10	1	Миксоплоидный зародыш: клетки с 14 хромосомами <i>Hv</i> , 0-5 <i>Hb</i> , преобладают клетки только с хромосомами <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), микроядра <i>Hb</i>	0
		1	Преобладают клетки с хромосомами <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), микроядра <i>Hb</i>	1 - Hv ^{Hb} ***
	12-13	8	Преобладают клетки с хромосомами <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14), единичные микроядра <i>Hb</i>	0

* – *H. vulgare*, ** – *H. bulbosum*, *** – Hv^{Hb} – неидентифицированная хромосома *H. vulgare* с интрогрессией *H. bulbosum* (не является ни 1H, ни 5H ни 6H)

К 13 дню после опыления процесс элиминации хромосом ячменя луковичного в зародышах, полученных в результате реципрокных скрещиваний, практически завершен, наблюдаются лишь единичные микроядра,

образованные хромосомами *H. bulbosum*.

В хромосомном наборе одного из 16 изученных зародышей выявлена рекомбинантная хромосома *H. vulgare* с терминальной интрогрессией *H. bulbosum* (рис. 3 с).

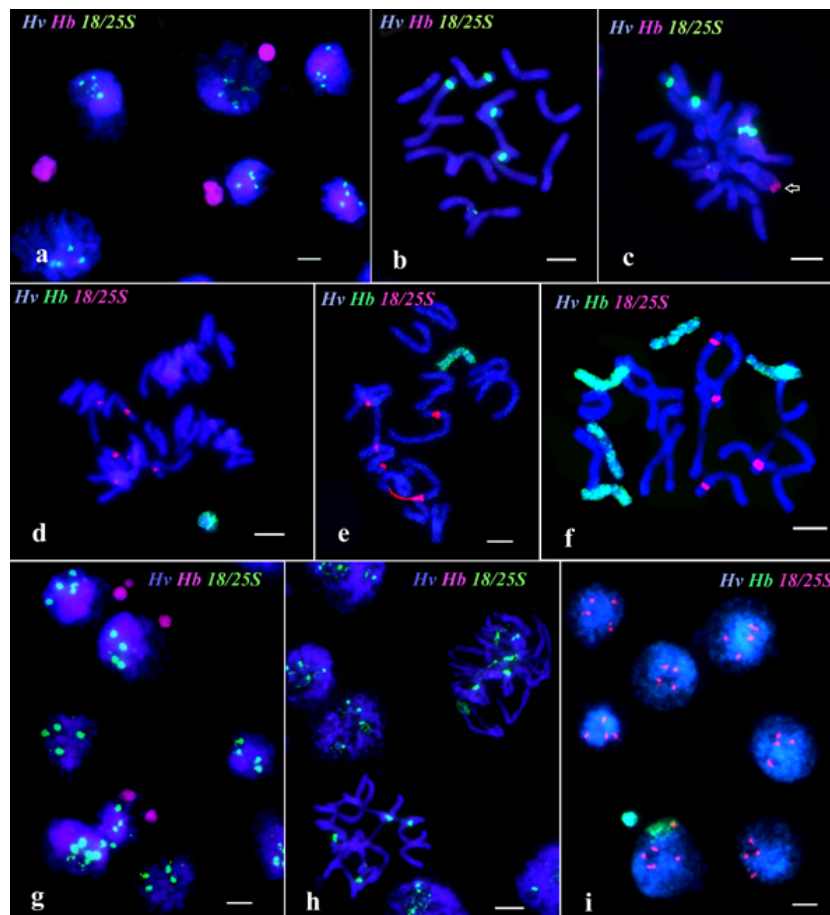


Рис. 3. Геномный состав клеток зародышей, полученных от скрещивания тетраплоидного гибрида F_2 (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) с *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (2x)

a, b, c, d, e, f, i – гибрид использован в качестве материнской формы; g, h – гибрид использован как опылитель: a – микроядра *Hb* и ядра клеток, содержащие только хромосомы *Hv* 10-ти дневного зародыша; b – метафазные хромосомы диплоидной клетки *Hv* ($2n=2x=14$) 10-ти дневного зародыша с практически полной элиминацией хромосом *Hb*; c – метафазные хромосомы диплоидной клетки *Hv* 10-ти дневного зародыша с рекомбинантной хромосомой, несущей терминальную интрогрессию (указана стрелкой); d, e, f – метафазные хромосомы клеток миксоплоидного 10-ти дневного зародыша: с диплоидным набором хромосом и полной элиминацией хромосом *Hb* (d); с одной хромосомой *Hb* (e) и с 5 хромосомами *Hb* (f); g – микроядра *Hb* и ядра клеток, содержащие только хромосомы *Hv* у 12-ти дневного зародыша; h – ядра клеток и метафазные хромосомы у 12-ти дневного зародыша с полной элиминацией генетического материала *Hb* и диплоидным набором хромосом *Hv* ($2n=2x=14$); i – микроядро *Hb* и ядро с неполной элиминацией хромосом *Hb* в клетках 12-ти дневного зародыша

Fig 3. Genome composition of embryo cells obtained in crosses of the tetraploid F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) with *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (2x)

a, b, c, d, e, f, i – the hybrid was used as the maternal form; g, h – hybrid was used as a pollinator: a – *Hb* micronuclei and cell nuclei containing only *Hv* chromosomes, nuclei of a 10-day-old embryo; b – metaphase chromosomes of a diploid *Hv* cell ($2n=2x=14$) in a 10-day-old embryo with almost complete elimination of *Hb* chromosomes; c – metaphase chromosomes of a diploid *Hv* cell in a 10-day-old embryo with a recombinant chromosome carrying terminal introgression (indicated by an arrow); d, e, f – metaphase chromosomes of a cells in a mixoploid 10-day embryo: with a diploid set of chromosomes and complete elimination of *Hb* chromosomes (d); with one *Hb* chromosome (e) and with five *Hb* chromosomes (f); g – *Hb* micronuclei and cell nuclei containing only *Hv* chromosomes in a 12-day-old embryo; h – cell nuclei and metaphase chromosomes of a 12-day-old embryo with complete elimination of *Hb* genetic material and a diploid set of *Hv* ($2n=2x=14$) chromosomes; i – *Hb* micronucleus and cell nucleus with incomplete elimination of *Hb* chromosomes in cells of a 12-day-old embryo

Скрещивания гибрида с *H. vulgare* 'Igrі' (2x). В этой гибридной комбинации при использовании *H. vulgare* 'Igrі' (2x) как в качестве материнской формы, так и в качестве опылителя, уже к 9-10 дню после опыления преобладают клетки, содержащие только геномный матери-

ал *H. vulgare*, но во всех зародышах этого возраста выявлены участки с остаточным хромосомным материалом ячменя луковичного в виде микроядер или единичных хромосом в клетках (табл. 3, рис. 4 а,b,c).

Таблица 3. Характеристики геномного состава зародышей, полученных в результате скрещивания гибрида F₂ (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) с *H. vulgare* 'Igrі' (2x) (HvHv)
Table 3. Characteristics of the genomic composition of embryos obtained in crosses of the F₂ hybrid (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) with *H. vulgare* 'Igrі' (2x) (HvHv)

Комбинация скрещивания/ Cross combination	Возраст зародыша, сутки/ Age of the embryo, days	Число зародышей/ Number of embryos	Характеристика геномного состава зародыша/ Characteristics of the genomic composition of the embryo	Наличие хромосом с интрогрессией/ chromosomes with introgression
HvHv × HbHbHvHv	9	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> * (HvHv, 2n=14). Единичные микроядра, образованные хромосомами <i>Hb</i> **.	0
	12	1	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Единичные микроядра, образованные хромосомами <i>Hb</i> .	0
		3	Только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Микроядер <i>Hb</i> на выявлено	0
		1	Только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Микроядер <i>Hb</i> на выявлено	1 – 1 HL
		1	Гиперплоид <i>Hv</i> (HvHv, 2n=15): 1 дополнительная спутничная хромосома (5H или 6H). Микроядер <i>Hb</i> на выявлено	1 – 5HS или 6HS
	13	6	Только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Генетического материала <i>Hb</i> не выявлено.	
	14	1	Только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Микроядер и хромосом <i>Hb</i> не выявлено.	1 – Hv ^{Hb} ***
HbHbHvHv × HvHv	10, 12	5	Преобладают клетки, содержащие только геномный материал <i>Hv</i> (HvHv, 2n=14). Единичные микроядра <i>Hb</i> и гибридные клетки с различным количеством генетического материала <i>Hb</i>	0

* – *H. vulgare*, ** – *H. bulbosum*, *** – Hv^{Hb} – неидентифицированная хромосома *H. vulgare* (не является ни 1H, ни 5H, ни 6H) с интрогрессией *H. bulbosum*

У 12-дневных зародышей преобладают клетки, содержащие только хромосомы культурного ячменя. Единичные микроядра и хромосомы *H. bulbosum* выявлены у одного зародыша, полученного при использовании культурного ячменя в качестве материнской формы, и у двух изученных зародышей в реципрокной комбинации (см. табл. 3, рис. 4d,e,g,h). В 13-ти и 14-ти дневных зародышах хромосом и микроядер ячменя луковичного не выявлено (см. табл. 3).

В трех из 14-ти изученных зародышей этой комбинации с полной элиминацией хромосом ячменя луковичного выявлено по одной рекомбинантной хромосоме с терминальной интрогрессией генетического материала *H. bulbosum*, две из которых идентифицированы: в одном

зародыше – интрогрессия в хромосоме 1HL, в другом – в 5HS или 6HS (рис. 4f). Во втором случае зародыш имеет дополнительную сателлитную (5H или 6H) хромосому (см. рис. 4f).

Скрещивания гибрида с *H. bulbosum* A17 (4x). GISH-анализ шестнадцати 11-ти – 16-ти дневных зародышей, полученных в результате опыления тетраплоидного гибрида пыльцой родительского клона ячменя луковичного показал, что 15 из них имеют эуплоидный гибридный набор хромосом (геномный состав HbHbHbHv, 2n=4x=21 Hb + 7 Hv) (табл. 4, рис. 5b), один зародыш – с анеуплоидным гибридным набором хромосом: 17 Hb и 8 Hv (см. табл. 4, рис. 5c).

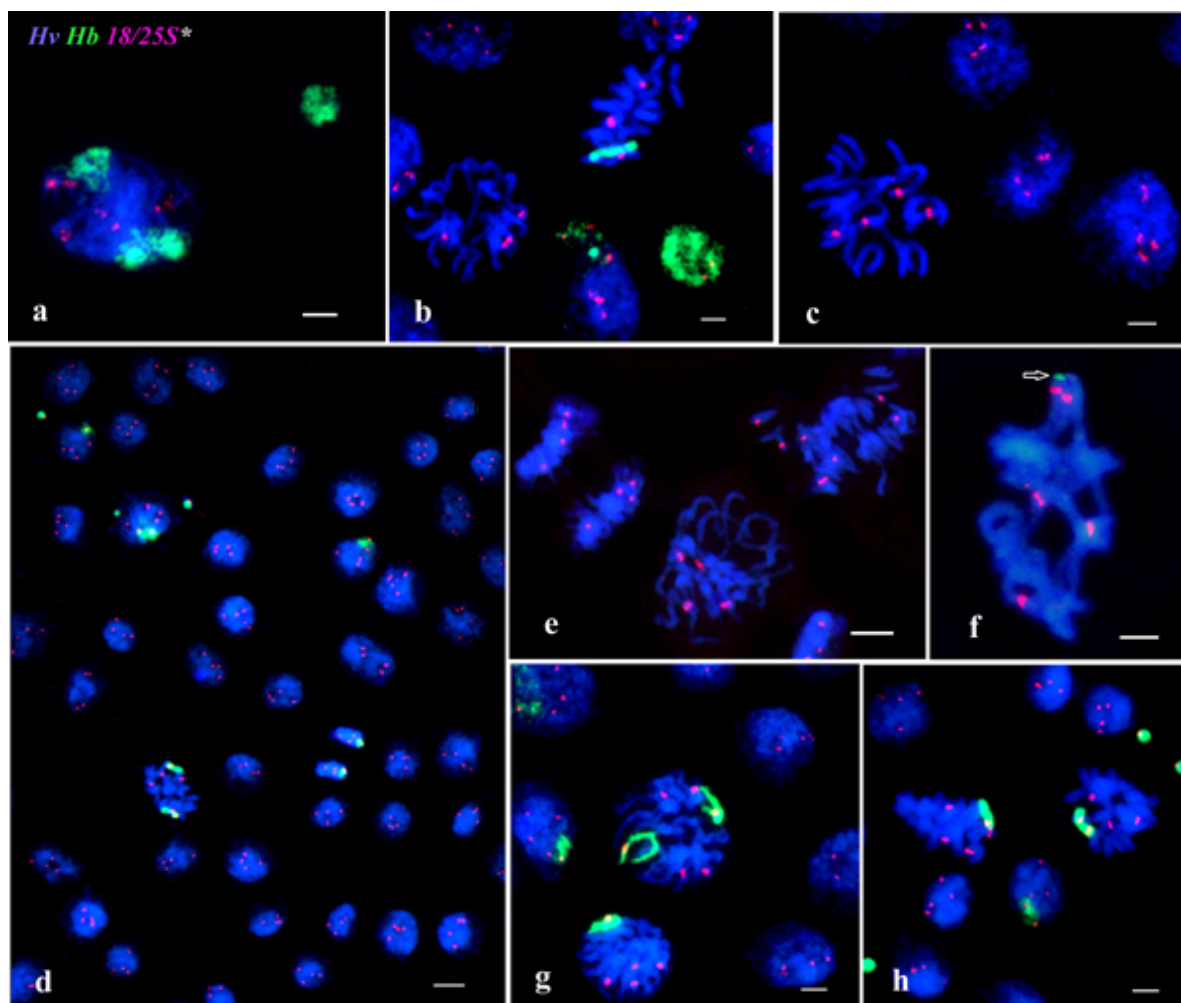


Рис. 4. Геномный состав клеток зародышей, полученных от скрещиваний тетраплоидного гибрида F_2 (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) с *H. vulgare* L. ‘Igri’ (2x)

b, c, e, g, h – гибрид использован в качестве материнской формы; a, d, f – гибрид использован в качестве опылителя:

a – микроядро *Hb* и ядро с неполной элиминацией в клетке 9-ти дневного зародыша; b, c – микроядро *Hb* и метафазные хромосомы в клетке с неполной элиминацией хромосом *Hb*, ядра с полной элиминацией хромосом *Hb* (b) и ядра и метафазные хромосомы в клетках с полной элиминацией хромосом *Hb* (c) 10-дневного зародыша; d, e – микроядро *Hb* и метафазные хромосомы в клетке с неполной элиминацией хромосом *Hb*, ядра с полной элиминацией хромосом *Hb* (d) и делящиеся клетки, содержащие только хромосомы *Hv* (e) 12-ти дневного зародыша; f – клетка зародыша с гиперплоидным набором хромосом *Hv*: дополнительная хромосома – 5H или 6H, одна из которых с терминальной интрогрессией *Hb* в коротком плече (указана стрелкой); g, h – ядра и хромосомы делящихся клеток 12-ти-дневного зародыша с незавершившейся элиминацией хромосом *Hb* в некоторых клетках: встречаются ядра и делящиеся клетки с одной или двумя хромосомами 6Hb, а также микроядра, образованные хромосомой 6Hb. (* – цвет соответствующих хромосом и проб (зондов) на всех рисунках)

Fig 4. Genome composition of embryo cells obtained in crosses of the tetraploid F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) with *H. vulgare* L. ‘Igri’ (2x)

b, c, e, g, h – the hybrid was used as the maternal form; a, d, f – the hybrid was used as a pollinator: a – *Hb* micronucleus and a nucleus with incomplete elimination in the cell of a 9-day-old embryo; b, c – *Hb* micronucleus and metaphase chromosomes of a cell with incomplete elimination of *Hb* chromosomes, nuclei with complete elimination of *Hb* chromosomes (b) and nuclei and metaphase chromosomes of cells with complete elimination of *Hb* chromosomes (c) of a 10-day-old embryo; d, e – *Hb* micronucleus and metaphase chromosomes of a cell with incomplete elimination of *Hb* chromosomes, nuclei with complete elimination of *Hb* chromosomes (d) and dividing cells containing only *Hv* chromosomes (e) of a 12-day-old embryo; f – embryo cell with a hyperploid set of chromosomes *Hv*: additional chromosome – 5H or 6H, one of them with terminal introgression of *Hb* in the short arm (indicated by arrow); g, h – nuclei and chromosomes of dividing cells in a 12-day-old embryo with incomplete elimination of *Hb* chromosomes in some cells: there are nuclei and dividing cells with 1 or 2 6Hb chromosomes, as well as micronuclei formed from the 6Hb chromosome. (* - color of corresponding chromosomes and samples (probes) in all figures)

Таблица 4. Характеристика геномного состава зародышей, полученных в результате реципрокных скрещиваний гибрида F_2 (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) с тетраплоидным *H. bulbosum* A17 (4x) (HbHbHbHb)

Table 4. Characteristics of genomic composition of embryos obtained in reciprocal crosses of the F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) × *H. vulgare* L. ‘Borwina’ (4x)) (HbHbHvHv) with tetraploid *H. bulbosum* L. A17 (4x) (HbHbHbHb)

Комбинация скрещивания/ Cross combination	Возраст зародыша, сутки/ age of the embryo, days	Число зародышей/ Number of embryos	Характеристика геномного состава зародыша/ Characteristics of the genomic composition of the embryo	Хромосом с интрогрессией/ Chromosomes with introgression
HbHbHvHv × HbHbHbHb	11	1	Гибридные зародыши – $2n = 4x : 21 Hb + 7 Hv^*$. Элиминации хромосом <i>Hb</i> ** не отмечено	1-1HL
		1	Гибридные зародыши – $2n = 4x : 21 Hb + 7 Hv$. Элиминации хромосом <i>Hb</i> не отмечено	1- Hb^{Hv***}
		1	Гибрид с 17 хромосомами <i>Hb</i> и 8 хромосомами <i>Hv</i> . Дополнительная хромосома – 1HL	0
	11-16	13	Гибридные зародыши – $2n = 4x : 21 Hb + 7 Hv$. Элиминации хромосом <i>Hb</i> не отмечено	0
HbHbHbHb × HbHbHvHv	13	2	Гибридные зародыши – $2n = 4x : 21 Hb + 7 Hv$. Элиминации хромосом <i>Hb</i> не отмечено	0

* – *H. vulgare*, ** – *H. bulbosum*

*** – Hb^{Hv} – хромосома *H. bulbosum* с интрогрессией *H. vulgare*

Для всех изученных зародышей, как эуплоидных, так и анеуплоидных, характерна стабильность числа хромосом, микроядер не выявлено (рис. 5a). Среди 15 эуплоидных зародышей выявлено два с рекомбинантными хромосомами: у одного выявлена одна хромосома *H. bulbosum* с терминальной интрогрессией *H. vulgare* (рис. 5d), у другого – хромосома 1H *H. vulgare* с терминальной интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* (рис. 5e).

При использовании *H. bulbosum* в качестве материнской формы были получены только два зародыша. Они имели эуплоидный гибридный набор хромосом (геномный состав HbHbHbHv, $2n=4x=21 Hb + 7 Hv$). Зародыши, отобранные на 13 день после опыления, были цитологически стабильны, элиминации хромосом какого-либо из родителей не выявлено, микроядер не обнаружено (см. табл. 4).

Обсуждение

Родительский клон ячменя луковичного *H. bulbosum* A3 (4x), который был использован для получения межвидового гибрида, изученного в работе, характеризуется рядом ценных признаков, в частности, устойчивостью к *Rhynchosporium secalis* (Pickering et al., 2006b), к вирусам BYDV, WDV, BaMMV, BaYMV (Michel, 1996; Nabekov et al., 2004; Schliephake et al., 2013), показана возможность передачи ряда генов устойчивости от этого клона культурному ячменю при межвидовой гибридизации (Shtaya et al., 2007; Scholz et al., 2009, Johnston et al.,

2013; Yu et al, 2018). Частично фертильный тетраплоидный гибрид, полученный с участием клона *Hordeum bulbosum* A17, может быть использован для создания серии линий ячменя с интрогрессиями генетического материала *H. bulbosum* в разные хромосомы и с участием различных сортов *H. vulgare*.

Главной задачей нашего исследования являлось изучение особенностей, связанных с элиминацией хромосом ячменя луковичного в эмбриогенезе в различных комбинациях скрещиваний с участием частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* ‘Borwina’ (4x)) для создания оптимальной для данного гибрида схемы получения интрогрессивных линий культурного ячменя.

Ранее показано, что для мейоза изучаемого нами тетраплоидного гибрида характерно наличие гомеологичных ассоциаций хромосом родительских видов, в которых с разной частотой участвуют все плечи хромосом, кроме короткого плеча хромосомы 1H. В потомстве от самоопыления этого гибрида выявлены растения с рекомбинантными хромосомами *H. vulgare*, несущими интрогрессии генетического материала *H. bulbosum* в терминальных участках различных плеч хромосом, кроме 1HS (Scholz, Pendinen, 2017). Таким образом, существует потенциальная возможность обменов между участками гомеологичных хромосом, которая может быть обусловлена наличием гомологичных участков в гомеологичных хромосомах, либо ослаблением генетического контроля, блокирующего рекомбинацию между гомеологами.

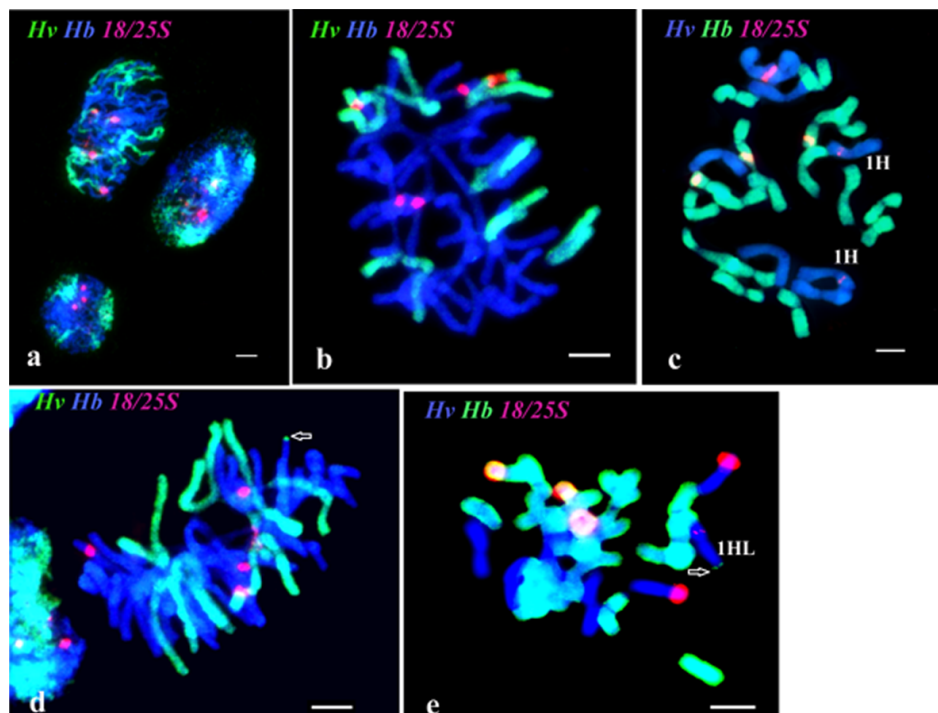


Рис. 5. Геномный состав клеток зародышей, полученных в результате скрещивания тетраплоидного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) с *H. bulbosum* (4x)

а – гибридные клетки 11-ти дневного зародыша, микроядер не отмечено; б – клетка гибридного 11-ти дневного зародыша (HbHbHvHv): 7 хромосом *Hv* и 21 хромосома *Hb*; с – клетка анеуплоидного 13-ти дневного гибридного зародыша: 8 хромосом *Hv* (экстрахромосома 1H) и 17 хромосом *Hb*; д – клетка 11-ти дневного гибридного зародыша (HbHbHvHv) с рекомбинантной хромосомой *Hb*, несущей терминальную интрогрессию *Hv* (указана стрелкой); е – клетка 13-ти дневного гибридного зародыша (HbHbHvHv) с рекомбинантной хромосомой *Hv*, несущей терминальную интрогрессию *Hb* в длинном плече хромосомы 1H (указана стрелкой)

Fig. 5. Genome composition of embryonic cells obtained in crosses of the tetraploid F_2 hybrid (*H. bulbosum* L. A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) with *H. bulbosum* (4x)

а – hybrid cells of the 11-day-old embryo, micronuclei not observed; б – a hybrid cell of the 11-day-old embryo (HbHbHvHv): 7 chromosomes *Hv* and 21 chromosomes *Hb*; с – a cell of the aneuploid 13-day-old hybrid embryo: 8 chromosomes *Hv* (extrachromosome 1H) and 17 chromosomes *Hb*; д – a cell of the 11-day-old hybrid embryo (HbHbHvHv) with a recombinant *Hb* chromosome carrying terminal introgression *Hv* (indicated by arrow); е – a cell of the 13-day-old hybrid embryo (HbHbHvHv) with the recombinant *Hv* chromosome carrying terminal introgression of *Hb* in the long arm of chromosome 1H (indicated by arrow)

В нашем исследовании анализ хромосомного состава зародышей различного возраста, полученных в результате самоопыления, используемого в исследовании частично фертильного межвидового тетраплоидного гибрида, выявил тенденцию к элиминации хромосом в зародышах разного возраста. Среди 9-ти – 14-ти дневных зародышей более половины характеризуются практически полной элиминацией хромосом *H. bulbosum*, остальные – миксоплоиды с тенденцией к элиминации хромосом *H. bulbosum*. Гибридных зародышей со стабильным хромосомным составом не выявлено. В ранее проведенном исследовании среди растений в потомстве от самоопыления частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) были выявлены гибридные формы (80%) и растения ячменного типа (HvHv, 20 %) (Scholz, Pendinen, 2017). Среди гибридных

растений, наряду с эуплоидными формами (HvHvHbHb, $2n = 4x=28$, 31,4%), выявлены анеуплоидные растения (8,6%), в большинстве своем – гипоплоиды с числом хромосом от 21 до 27, а также миксоплоидные гибриды с тенденцией к элиминации хромосом ячменя луковичного (40%). Миксоплоидные растения, как правило, нежизнеспособны и гибнут на стадии проростка или в начале кущения. Эти данные расходятся с результатами анализа хромосомного состава зародышей. Известно, что на элиминацию хромосом *H. bulbosum* в эмбриогенезе в значительной мере влияет температура: при развитии гибридных зародышей при температуре выше 20°C, интенсивность элиминации хромосом ячменя луковичного значительно выше, чем при 15°C и 17,5°C (Pickering, 1985). Таким образом, при самоопылении гибрида в условиях теплицы при температуре выше 20°C

в потомстве следует ожидать нежизнеспособные миксоплоидные проростки или растения *H. vulgare* (2x). Полученные таким образом растения ячменного типа по хромосомному составу должны соответствовать озимому сорту 'Borwina' (2x), но будут иметь цитоплазму ячменя луковичного. Отобранные в потомстве от самоопыления частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) растения ячменного типа с рекомбинантными хромосомами далее могут быть использованы для скрещивания с растениями ячменя других сортов. В потомстве от таких скрещиваний возможен отбор форм, несущих интрогрессии. Самоопыление таких форм и дальнейший отбор отдельных растений в их потомстве даст возможность получить линии с интрогрессиями в обоих гомологичных хромосомах.

В возвратных скрещиваниях гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) с *H. vulgare* использовали два сорта: 'Igrі' (2x) и 'Borwina' (2x). Эти сорта были выбраны на основании результатов, свидетельствующих о различных темпах элиминации в гибридных зародышах с соотношением родительских геномов 1Hv:1Hb, полученных с участием этих сортов. При использовании этих ячменей в реципрокных комбинациях скрещиваний с межвидовым гибридом было показано, что во всех комбинациях уже на 10-11-й день после опыления элиминация хромосом ячменя луковичного в зародышах завершается, лишь в отдельных клетках выявляются единичные хромосомы ячменя луковичного, а также встречаются микроядра, образованные хромосомным материалом ячменя луковичного. Остаточный генетический материал ячменя луковичного, идентифицированный практически во всех зародышах, свидетельствует о том, что в оплодотворении участвовали гаметы гибрида, несущие генетический материал обоих родительских видов, предположительно, с геномным составом (HbHv). В потомстве от таких скрещиваний будут только растения культурного ячменя, в зависимости от направления скрещивания они будут иметь цитоплазму *H. vulgare* или *H. bulbosum*. Среди них можно выявить формы с рекомбинантными хромосомами культурного ячменя с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum*. Уже в первом поколении от самоопыления этих форм можно отобрать линии с интрогрессиями в обоих гомологичных хромосомах. В такой схеме для получения интрогрессивных линий в скрещивании с гибридом могут быть использованы различные диплоидные сорта культурного ячменя, включая те, которые, подобно 'Borwina' и 'Emir', в результате скрещивания с ячменем луковичным при соотношении геномов 1Hv:1Hb, дают гибридное потомство (Szigat, Pohler, 1982.; Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004, 2006a; Scholz, Pendinen, 2017).

В реципрокных скрещиваниях гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) с тетраплоидным *H. bulbosum* A17 (4x) получают гибридные зародыши со стабильным хромосомным составом (21 Hb + 7 Hv) у большинства зароды-

шей; элиминации хромосом не выявлено. Хромосомный состав зародышей (21 Hb + 7 Hv) свидетельствует о том, что в оплодотворении участвовали эуплоидные гаметы гибрида с геномным составом HbHv. Анеуплоидный гибридный набор хромосом у одного из зародышей, вероятно, является следствием участия в оплодотворении анеуплоидной гаметы с потерей (4x) хромосом *H. bulbosum* и экстрахромосомой 1HL: возможно, при расхождении поливалентной гомеологичной ассоциации (тривалента HbHvHv или тетравалента HbHbHvHv) хромосом в первом делении мейоза могла появиться гамета с дополнительной хромосомой 1HL *H. vulgare*. Хромосомный состав зародышей (21 Hb + 7 Hv) свидетельствует о том, что в оплодотворении участвовали эуплоидные гаметы гибрида с геномным составом HbHv. Процесс получения интрогрессивных форм культурного ячменя на основе гибридов с геномным составом HbHbHbHv, вероятно, будет длительным и трудоемким, поскольку несбалансированный геномный состав пыльцы растений, полученных в такой комбинации, приведет к полной мужской стерильности, а яйцеклетки окажутся нежизнеспособными. Кроме того, при соотношении геномов 3Hb:1Hv со значительным преимуществом числа хромосом генома ячменя луковичного, должно потребоваться больше, чем один цикл возвратных скрещиваний на культурный ячмень для полной элиминации хромосом *H. bulbosum* и получения форм культурного ячменя с интрогрессиями. Хотя следует отметить, что теоретически у тетраплоидов с геномным составом HbHbHbHv частота Hb-Hv гомеологичного спаривания, а возможно, и частота гомеологичной рекомбинации должна быть выше, чем у тетраплоидного гибрида со сбалансированным геномным составом HbHbHvHv, но из-за возможной стерильности пыльцы этот рекомбинационный потенциал может не реализоваться. Возможность использования гибридных форм с геномным составом HbHbHbHv требует дополнительных исследований.

Заключение

Во всех изученных комбинациях скрещиваний гибрида F_2 (*H. bulbosum* L. A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* L. выявлены зародыши с рекомбинантными хромосомами *H. vulgare*, несущими чужеродный генетический материал ячменя луковичного, что свидетельствует о возможности получения интрогрессивных линий ячменя во всех изучаемых вариантах скрещиваний. Но, исходя из полученных результатов, для массового получения интрогрессивных линий культурного ячменя различных сортов на основе частично фертильного гибрида F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) $\times$ *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv), наиболее эффективным является скрещивание с сортами культурного ячменя *H. vulgare* (2x) как при использовании гибрида в качестве опылителя, так и в качестве материнской формы, поскольку независимо от сорта ячменя и направления скрещивания в эмбриогенезе происходит интенсивная элиминация хромосом *H. bulbosum*. В потомстве от

таких скрещиваний будут только растения культурного ячменя, среди которых можно выявить растения с интрогрессией *H. bulbosum*, и уже в первом поколении от их самоопыления отобрать интрогрессивные линии. При такой схеме скрещивания с частично фертильным гибридом F_2 (*H. bulbosum* A17 (4x) × *H. vulgare* 'Borwina' (4x)) (HbHbHvHv) для получения интрогрессивных форм *H. vulgare* могут быть использованы различные диплоидные сорта ячменя, включая те, которые при скрещивании с диплоидным *H. bulbosum* дают гибридное потомство.

References/Литература

- Bothmer R. von, Jacobsen N., Baden C., Jørgensen R.B., Linde-Laursen I. An ecogeographical study of genus *Hordeum*. Rome: IPGR; 1991.
- Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds.). *Doubled haploid production in crop plants*. Dordrecht: Springer; 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). *Japanese Journal of Genetics*. 1983;58:241-250. DOI: 10.1266/jjg.58.241
- Gilpin M.J., Pickering R.A., Fautrier A.G., McNeil D.L., Szigat G., Hill A.M., Kynast R.G. Morphological and molecular analysis of androgenetic, selfed and backcrossed plants produced from a *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* hybrid. *Plant Breeding*. 1997;116(6):505-510. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb02181.x
- Habekuß A., Schliephake E., Ehrig F. *Hordeum bulbosum* – a source for BYDV resistance. In: J. Spunar, J. Janicova (eds.) *Proceedings of the 9th international barley genetics symposium; 2004 June 20-26; Brno, Czech Republic*. Brno: Agricultural Research Institute Kromeriz; 2004. p.787-791.
- Ho K.M., Kasha K.J. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. *Genetics*. 1975;51(2):263-275.
- 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
- Johnston P.A., Niks R.E., Meiyalaghan V., Blanchet E., Pickering R. *Rph22*: mapping of a novel leaf rust resistance gene introgressed from the non-host *Hordeum bulbosum* L. into cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theoretical and Applied Genetics*. 2013;126:1613-1625. DOI: 10.1007/s00122-013-2078-9
- Johnston P.A., Timmerman-Vaughan G.M., Farnden K.J.F., Pickering R. Marker development and characterisation of *Hordeum bulbosum* introgression lines: a resource for barley improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;118:1429-1437. DOI: 10.1007/s00122-009-0992-7
- Jones I.T., Pickering R.A. The mildew resistance of *Hordeum bulbosum* and its transference into *H. vulgare* genotypes. *Annals of Applied Biology*. 1978;88:295-298. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1978.tb00709.x
- Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970;225(5235):874-876. DOI: 10.1038/225874a0
- Lange W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. 1. Production, Morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica*. 1971a;20(1):14-29. DOI: 10.1007/BF00146769
- Lange W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. 2. Elimination of Chromosomes in Hybrid Tissues. *Euphytica*. 1971b;20(2):181-194. DOI: 10.1007/BF00056078
- 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, [dissertation]. München: Technische Universität München; 1996. [in German]
- 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. (HvHbHb). *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. *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 (HvHbHb). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2):6-15. [in Russian] (Пендинен Г.И., Шольц М. Спаривание гомеологичных хромосом в метафазе I мейоза у триплоидных гибридов *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (HvHbHb). *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):6-15). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-02
- Pendinen G.I., Scholz M., Schrader O., Habekuß A. Using of bulbous barley *Hordeum bulbosum* L. for widening of genetic diversity of *Hordeum vulgare* L. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2013;171:123-126. [in Russian] (Пендинен Г.И., Шольц М., Шрадер О., Хабекус А. Использование ячменя луковичного *Hordeum bulbosum* L. для расширения генетического разнообразия *Hordeum vulgare* L. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2013;171:123-126).
- Pickering R.A., Timmerman G.M., Cromeey 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
- Pickering R.A. The production of fertile triploid hybrids from crosses between *Hordeum vulgare* L. (2n=4x=28) and *H. bulbosum* L. (2n=2x=14). *Hereditas*. 1991;114(3):227-236. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1991.tb00329.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*. 2006a;49(1):73-78. DOI: 10.1139/g05-071
- Pickering R.A., Hudakova S., Houben A., Johnson 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., Malyshev S., Künzel 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., 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*. 2006b;125(6):576-579. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01253.x
- Pidón H., Ruge-Wehling B., Will T., Habekuß A., Wendler N., Oldach K., Maasberg-Prelle A., Korzun V., Stein N. High-resolution mapping of *Ryd4th*, a major resistance gene to barley yellow dwarf virus from *Hordeum bulbosum*. *bioRxiv preprint*. 2023. DOI: 10.1101/2023.09.19.558385
- Pidón H., Wendler N., Habekuß A., Maasberg A., Ruge-Wehling B., Perovic D., Ordon F., Stein N. High-resolution mapping of *Rym14th*, a wild relative resistance gene to barley yellow mosaic disease. *Theoretical and Applied Genetics*. 2021;134(3):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
- Schliephake E., Habekuss A., Scholz M., Ordon F. Barley yellow dwarf

- virus transmission and feeding behaviour of *Rhopalosiphum padi* on *Hordeum bulbosum* clones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2013;146(3):347-356. DOI: 10.1111/eea.12033
- 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. *Ryd4th*: 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., Rubiales 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
- Szigat G., Pohler W. *Hordeum bulbosum* × *H. vulgare* hybrids and their backcrosses with cultivated barley. *Cereal Research Communications*. 1982;10(1/2):73-78.
- Wendler N., Mascher M., Himmelbach A., Bini F., Kumlehn 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 and Cell Physiology*. 1983;24(7):1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650
- Yu X., Kong H.Y., Meiyalaghan V., Casonato S., Chng S., Jones E.E., Butler R.C., Pickering R., Johnston P.A. Genetic mapping of a barley leaf rust resistance gene *Rph26* introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131:2567-2580. DOI: 10.1007/s00122-018-3173-8
- Yu X., Casonato S., Jones E., Butler R.C., Johnston P.A., Chng S. Phenotypic characterization of the *Hordeum bulbosum* derived leaf rust resistance genes *Rph22* and *Rph26* in barley. *Journal of Applied Microbiology*. 2022;133:2083-2094. DOI: 10.1111/jam.15710
- Zhang L., Pickering R., Murray B.G. Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*, using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*. 1999;83(3):304-309. DOI: 10.1038/sj.hdy.6885710
- Zhang L., Pickering R., Murray B.G. *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* tetraploid hybrid provides useful agronomic introgression lines for breeders. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*. 2001;29(4):239-246. DOI: 10.1080/01140671.2001.9514185

Информация об авторах

Галина Ивановна Пендинен, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Отдел биотехнологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, pendinen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2814-7074>

Владимир Евгеньевич Чернов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Отдел светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем, Агрофизический научно-исследовательский институт, 195220 Россия, Санкт-Петербург, Гражданский пр., 14, vechernov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2440-3782>

Маргрет Шольц, PhD, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Julius Kühn-Institut Rudolf-Schick-Platz, 3a, Groß Lüsewitz, Sanitz, 18190 Germany, margret.scholz@t-online.de

Information about the authors

Galina I. Pendinen, Cand. Sci (Biology), Senior Researcher, Department of Biotechnology, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, pendinen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2814-7074>

Vladimir E. Chernov, Cand. Sci (Biology), Senior Researcher, Department of Plant Light Physiology and Agroecosystem Bioproductivity, Agrophysical Research Institute, 14, Grazhdanskiy Avenue, St. Petersburg, 195220 Russia, vechernov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2440-3782>

Margaret Scholz, PhD, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZI), Julius Kühn-Institut Federal Research Centre for Cultivated Plants, 3a, Rudolf-Schick-Platz, Groß Lüsewitz, Sanitz, 18190 Germany, margret.scholz@t-online.de

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 15.01.2024; одобрена после рецензирования 21.02.2024; принята к публикации 20.03.2024.

The article was submitted on 15.01.2024; approved after reviewing on 21.02.2024; accepted for publication on 20.03.2024.