

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b)

Пендинен Г. И.¹, Чернов В. Е.¹, Шольц М.²

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова, ул.Большая Морская, д.42, 44, 190000, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: pendinen@mail.ru

²Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZL), Rudolf-Schick-Platz 3a, Groß Lüsewitz, 18190, Sanitz, Germany

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INTROGRESSIVE BARLEY LINES OBTAINED ON THE BASIS OF THE INTERSPECIFIC HYBRID *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b)

Pendinen G. I.¹, Chernov V. E.¹, Scholz M.²

¹N.I.Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Bolshaya Morskaya St., St.Petersburg. 19000, Russia. E-mail: pendinen@mail.ru

²Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZL), Rudolf-Schick-Platz 3a, Groß Lüsewitz, 18190, Sanitz, Germany

Актуальность. Привлечение чужеродного генетического материала *Hordeum bulbosum* L. для расширения разнообразия ячменя культурного является важной задачей, поскольку этот вид 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*. Целью нашего исследования было изучение в полевых условиях интрогрессивных линий культурного ячменя, полученных на основе триплоидного гибрида *H. vulgare* L. cv 'Igri' (2x) × *H. bulbosum* (4x) в сравнении с исходным сортом Igri. **Материал и методы.** В полевых условиях изучали линии ячменя с терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в различных плечах хромосом: 1HL, 2HL, 3HL, 7HL, 2HS, 1HL + 5HL, и с субтерминальной интрогрессией в хромосоме 5HL. Для идентификации интрогрессий и анализа их сохранения при полевой репродукции использовали метод *in situ* гибридизации (FISH, GISH). При культивировании в поле у растений определяли зимостойкость, озерненность. Структурный анализ растений проводили на побегах главного колоса после созревания. Показатели качества зерна определяли неразрушающим методом – спектроскопией в ближней инфракрасной области, используя БИК анализатор Инфралюм ФТ-10. **Результаты.** Было установлено, что для растений изучаемых линий характерно, как и для родительского сорта, закрытое цветение, линии сохраняют интрогрессии в потомстве при культивировании в поле без изоляции. Анализ показал, что небольшие фрагменты хромосом *H. bulbosum* 1HL, 2HL, 3HL, 1HL + 5HL, 7HL, 5HL изучаемых линий не оказывают существенного влияния на характеристику сорта по признакам фертильности, продуктивности и качества зерна. Отличия от исходного сорта отмечено у линии 14.10 с интрогрессией генетического материала в хромосоме 2HS. Для нее характерна более низкая фертильность и продуктивность при более высоком, чем у исходного сорта, содержании белка. **Выводы.** Изученные линии представляют собой высокофертильные формы ячменя, для которых характерно закрытое цветение и самоопыление, что обеспечивает сохранение интрогрессированных чужеродных фрагментов хромосом в последующих поколениях. Интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в терминальный участок короткого плеча хромосомы 2H вызывает изменения некоторых характеристик сорта Igri. **Ключевые слова:** ячмень, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, межвидовая гибридизация, чужеродная интрогрессия, интрогрессивная линия

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М. Характеристика интрогрессивных линий ячменя, полученных на основе межвидового гибрида *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b). Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):16-24. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

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. (H^vH^bH^b). Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):16-24. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

Background. Involving alien genetic material *Hordeum bulbosum* in the genome for the expansion of the genetic diversity of barley is a cultural important task because this species is characterized by a number of valuable traits. One way of using the genetic potential of bulbous barley is interspecies hybridization and the production of fertile introgressive lines of *H. vulgare* on the base of interspecies hybrids. The purpose of our investigation was to study introgressive lines of cultural barley obtained on the basis of the triploid hybrid *H. vulgare* cv 'Igri' (2x) × *H. bulbosum* (4x) in compare to the original Igri variety in the field conditions. **Materials and methods.** In the field conditions the barley lines with intro-gressions of the genetic material of bulbous barley in the different arms of chromosomes *H. vulgare* (1HL, 2HL, 3HL, 5HL, 7HL, 2HS, 1HL + 5HL) were studied. **Methods.** *In situ* hybridization (FISH, GISH) was used to identify the introgressions and to analyze their saving in line kar-yotypes after field reproduction. For cultivated in field conditions plants the estimation of winter survival and graininess were estimated. Structural analysis of plants was carried out on tillers of the main spike after maturation. The quality of the grain was determined by the non-destructive method of monitoring - near infrared spectroscopy, using the Infralum FT-10 BIC analyzer. **Results.** Closed flowering and self pollination were observed for plants of the studied lines same as for parent variety. The introgressions were saved in the offspring when the plants cultivated in a field conditions without isolation of spike. The analysis showed that small fragments of chromosomes of *H. bulbosum* in chromosomes 1HL, 2HL, 3HL, 5HL, 7HL, 1HL + 5HL of the studied lines do not significantly affect on characteristics (of fertility, productivity and grain quality) of the variety. Differences from the initial variety were observed at line 14.10 with the introgression of genetic material in the chromosome 2HS. It is characterized by lower fertility and productivity, and protein content in the grain is higher than that of the original variety. **Conclusions** The studied lines are highfertility forms of barley. The introgression of the genetic material of *H. bulbosum* into the terminal region of the short arm of the chromosome 2H causes changes in some characteristics of the Igri variety.

Key words: barley, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, interspecific hybridization, alien introgression, introgressive line

УДК 575.222.72

Поступила в редакцию 17.10.2018
Принята к публикации 08.11.2018

Межвидовая гибридизация является одним из важных методов расширения генетического разнообразия видов культурных растений. Дикорастущие виды рода *Hordeum* L. обладают рядом ценных признаков, однако их использование в скрещиваниях с *H. vulgare* ограничено. В зависимости от возможности использования в селекции культурного ячменя, виды *Hordeum* относят к первичному, вторичному и третичному генным пулам (Bothmer et al., 1992). Первичный генный пул включает все многообразие *H. vulgare* (селекционные сорта, ландрасы, дикорастущие подвиды, такие как *H. vulgare* subsp. *spontaneum*, которые свободно скрещиваются с культурным ячменем, дают плодовитое потомство). К вторичному генетическому пулу относят ячмень луковичный *H. bulbosum*. Третичный генный пул составляют все остальные виды, в настоящее время генофонд этих видов не использован для расширения генетического разнообразия *H. vulgare* из-за репродуктивных барьеров и межвидовой несовместимости на разных стадиях развития гибридов. Ячмень луковичный нашел применение в селекции для получения удвоенных гаплоидов культурного ячменя (Ho, Jones, 1980; Furusho, 1995). Кроме того, образцы этого вида характеризуются рядом ценных признаков, таких как устойчивость к мучнистой росе, стеблевой и листовой ржавчине, которые могут быть перенесены в геном культурного ячменя при межвидовой гибридизации (Jones, Pickering, 1978). На основе гибридов *H. vulgare* с *H. bulbosum* получены фертильные интрогрессивные линии (Pickering, 1988; Pickering, 1992; Pickering et al. 1994; Pickering et al., 2000; Jonson, Pickering, 2002; Scholz et al., 2009). Среди них выделены формы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, переданной от луковичного ячменя. У линий, устойчивых к листовой ржавчине, генетический материал луковичного ячменя интрогрессирован в длинное плечо 2Н или 4Н хромосомы *H. vulgare*, а у форм, устойчивых к стеблевой ржавчине – в короткое плечо хромосомы 6Н, устойчивость к ринхоспориозу передается с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* в короткое плечо хромосомы 4Н, устойчивость к мучнистой росе – с интрогрессией в короткое плечо хромосомы 2Н (Pickering et al., 2000; Pickering et al., 2006; Shtaya et al., 2007). Среди межвидовых гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным, а также полученных на их основе интрогрессивных линий выявлены формы, устойчивые к VaMMV, VaYMV, BYDV вирусам, идентифицированы новые гены устойчивости (Michel, 1996; Szigat, Szigat, 1991; Ruge, et al, 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009). Интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в геном ячменя культурного происходит в результате мейотической рекомбинации гомеологичных хромосом в терминальных участках хромосомных плеч (Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004; Pickering et al., 2006; Scholz et al., 2017).

В наших совместных исследованиях (начиная с 2005 года) на базе института Сельскохозяйственных растений (Гросс Люзевиц) на основе триплоидных гибридов культурного ячменя сорта Igri с *H. bulbosum* (4х) получена серия форм ячменного типа с интрогрессиями *H. bulbosum* в хромосомах 1HL, 2HL, 3HL, 5HL, 7HL, 2HS. При получении линий все работы проводились в условиях теплицы, в

дальнейшем линии размножали, выращивая их после яровизации в лабораторных условиях в сосудах на вегетационной площадке, семена получали от самоопыления при изолировании колосьев.

Целью нашего исследования была характеристика фертильности, продуктивности, качества зерна изучаемых интрогрессивных линий и их сравнении по этим признакам с исходным сортом ячменя Igri при культивировании в условиях экспериментального поля ВИР.

Материал

Интрогрессивные линии ячменя *Hordeum vulgare* L. получены на основе триплоидного межвидового гибрида *H. vulgare* Igri ($2n=2x=14$) × *H. bulbosum* A17 ($2n=4x=28$). Родительский сорт ячменя опыляли частично фертильной пылью этого гибрида. С использованием метода *in situ* гибридизации в BC₁ отбирали растения, несущие хромосомы с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. В последующих поколениях от самоопыления двух растений BC₁ отбирали формы с соответствующими интрогрессиями в обоих гомологах. На рисунке 1 представлена схема получения интрогрессивных линий.

Полученные таким образом линии озимого ячменя с терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в различных плечах хромосом: 12.46 – 1HL, 12.47 – 2HL, 12.52 – 3HL, 11.103.013 – 7HL, 14.10 – 2HS, 15.1. b3 – 1HL + 5HL, и с субтерминальной интрогрессией: 12.42 – 5HL (Рис. 2, б-з) служили объектом исследования в работе.

Методы

Анализ сохранения интрогрессий при репродукции линий без изоляции. В первой репродукции семян линий, полученных в полевых условиях, изучали сохранение интрогрессий генетического материала *H. bulbosum* с использованием метода *in situ* гибридизации. Для этого отбирали по 20 зерен из полевой репродукции 2015 года линий 12.46, 12.47, 12.42, 12.52, 11.103.013 и по 10 зерен из полевой репродукции 2017 линий 15.1. b3 и 14.10

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH, GISH). Для цитогенетического анализа корешки проростков помещали в воду со льдом (0°C) на сутки, затем в фиксатор 3:1 (96%-й этанол: ледяная уксусная кислоты), фиксации хранили в морозильнике (–20°C) до их использования. Подготовку препаратов, мечение ДНК, флюоресцентную *in situ* гибридизацию проводили по стандартной методике (Leitch et al., 1994) с ранее описанными модификациями (Scholz et al., 2009; Scholz et al., 2017). Геномную ДНК *H. bulbosum* и плазмидную ДНК, несущую 18S/25S рДНК (зонд Ver17) (Yakura, Tanifuji, 1983) метили Nick –трансферазой, 5S рДНК метили методом ПЦР ДНК *H. vulgare* сорта Igri с использованием праймеров согласно Gottlob-McHugh с соавторами (Gottlob-McHugh et al., 1990). Для идентификации интрогрессий использовали флюоресцентную *in situ* гибридизацию с дифференциально мечеными геномной ДНК *H. bulbosum* (DIG) и ДНК хромосомспецифичных маркеров культурного ячменя: 5S rDNA

(BIO) – локализован в 2HL, 3HL, 4HS, 7SH; 18S/25S rDNA (BIO, DIG) – локализован в 1HS, 5HS, 6HS (рис. 2а). Для анализа препаратов, создания и обработки изображений использовали эпифлюоресцентные микроскопы Nikon 90i

с камерой DS-Qi1i и AxioImager M2 с камерой AxioCamMRm и программное обеспечение AxioVision Rel 4.8, и Adobe Photoshop 6.0.

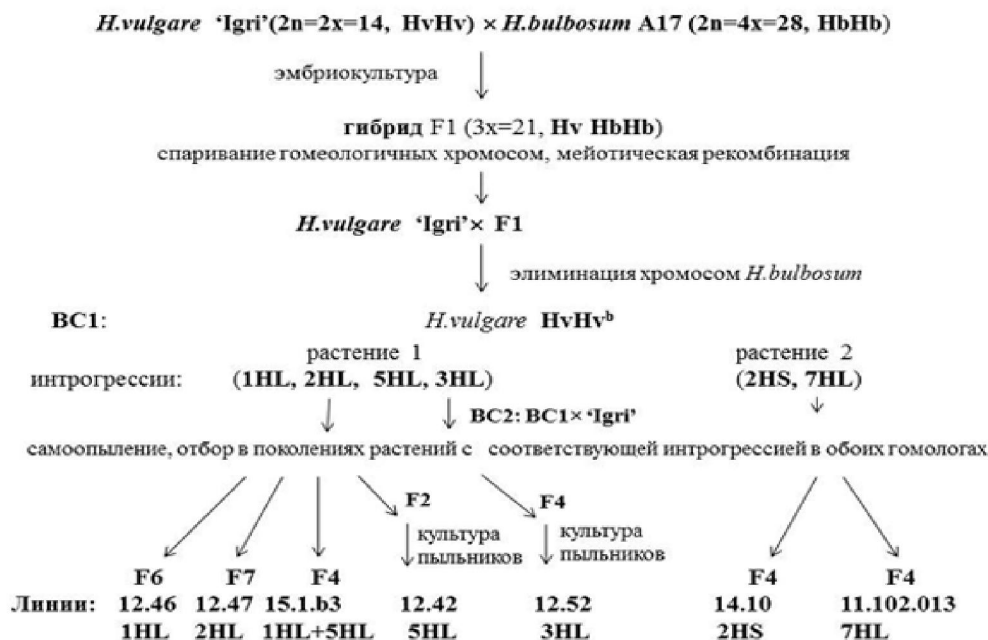


Рис. 1. Схема создания интрогрессивных линий *H. vulgare* на основе межвидового гибрида *H. vulgare* cv Igri (2x) × *H. bulbosum* (4x)

Fig. 1. The scheme of *H. vulgare* introgressive lines synthesis on the base of the interspecific hybrid *H. vulgare* cv Igri (2x) × *H. bulbosum* (4x)

Анализ зимостойкости. Зимостойкость линий определяли в полевом эксперименте в течение 3-х лет (2014, 2015, 2016). Семена ячменя сорта Igri и полученных на его основе интрогрессивных линий высевали под зиму в середине сентября на экспериментальном поле ВИР в г. Пушкин. Посев линий 12.46, 12.47, 12.42, 12.52, 11.103.013 и исходного сорта Igri 2015 и 2016 проводили в 1 повторности (по 20 и по 40 зерен каждой линии в 2015 и 2017 г. соответственно), в 2017 – в двух повторностях (по 60 зерен в каждой повторности). Кроме того, в 2017 году были посеяны линии 15.1.b3 (по 60 зерен в двух повторностях) 14.10. (по 60 зерен в 1 повторности). Учет количества растений перед уходом под зиму проводили в конце октября. Учет количества перезимовавших растений проводили в начале мая. Перезимовавшими считали растения, у которых наблюдали формирование новых листьев. Зимостойкость линий определяли, вычисляя процент растений, выживших после перезимовки, от числа растений, ушедших под зиму.

Определение озерненности колоса. После созревания в посеве отбирали стебли растений с главным колосом (не менее чем у 10 растений на образец). Учитывали число цветков и число завязавшихся зерновок в главном колосе растений в эксперименте 2017 г. Озерненность линий определяли, как процент завязавшихся зерновок в колосе

от общего числа цветков в колосе. Рассчитывали процент озерненности в среднем на колос и ошибку среднего.

Определение массы зерна с главного колоса и массы 1000 зерен. В образцах зерна линий урожая 2015 и 2017 годов у каждого отобранного побега учитывали массу зерна с главного колоса. Среднюю массу 1000 зерен определяли по результатам взвешивания 5 отобранных проб по 200 зерен из образца. Результат каждого взвешивания умножали на 5, затем находили среднее значение и рассчитывали ошибку среднего. Для определения массы использовали весы L610D Sartorius.

Определение высоты растения. Высоту растения определяли, измеряя длину стебля с главным колосом (с учетом длины главного колоса без остей) не менее чем у 10 растений. Линейные измерения проводили, используя линейку ГОСТ 427-75.

Анализ качества зерна. В связи с тем, что для экспериментов имелось небольшое количество зерен, которое необходимо было сохранить для следующего посева, показатели качества зерна определяли неразрушающим методом контроля – спектроскопией в ближней инфракрасной области, используя БИК анализатор Инфралюм ФТ-10. Спектры снимали, помещая в кювету анализатора пробу целого неразрушенного зерна объемом 45 – 50 мл, что составляло 400 – 450 зерен на образец. Полученный

спектр автоматически, в программе InfralumPro сравнивался с калибровочной базой данных, созданной на основе спектров стандартных референтных образцов с определением показателей по ГОСТ. Были определены следующие показатели качества зерна: содержание белка, содержание крахмала, пленчатость в % от общей массы зерна.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 12. Для изучаемых показателей определяли среднюю арифметическую и ошибку средней. Для сравнения средних использовали критерий *t* Стьюдента.

Результаты

Сохранение интрогрессий при воспроизведении линий в полевых условиях. Изучаемые линии имеют интрогрессии генетического материала в обоих гомологах различных хромосом (рис. 2, б–з.). Одной из задач работы было изучение сохранения интрогрессий генетического материала *H. bulbosum* при выращивании в полевых условиях без изоляции колоса.

Было установлено, что для растений изучаемых линий характерно, как и для родительского сорта, закрытое цветение. Созревание пыльцы и растрескивание пыльника в главном колосе происходит, как и у родительского вида, в закрытом цветке, когда колос только начинает выходить из трубки. Анализ кариотипов растений из случайно выбранных зерен полевой репродукции 2015 года для линий 12.46 (1HL), 12.47 (2HL), 12.42 (3HL), 11.103.013 (7HL), 12.52 (5HL) не выявил форм, отличных от исходного материала: все изученные растения имели соответствующие интрогрессии генетического материала *H. bulbosum* в обоих гомологах. Линии 14.10 (2HS), и 15.1.b3 (1HL + 5HL) были созданы и включены в эксперимент позднее, поэтому высеяны в поле только 2017. Анализ кариотипов случайно отобранных семян (по 10 на линию) также не выявил форм, отличных от исходного материала. Таким образом, при полевой репродукции изучаемые интрогрессивные линии *H. vulgare* сохраняют чужеродные фрагменты хромосом *H. bulbosum*.

Зимостойкость. Анализ результатов перезимовки изучаемых интрогрессивных линий в полевых условиях, показал, что процент перезимовавших растений у линий в эксперименте 2014–2015 и 2016–2017 года не ниже исходного сорта Igrі (табл. 1). В условиях зимы 2015–2016 годов все растения сорта Igrі и изучаемых линий погибли, за исключением одного растения линии 42.12 (5HL).

Показатели урожайности. Одной из характеристик, связанных с урожайностью, является озерненность колоса. По числу цветков в колосе линии 12.47(2HL), 12.52(3HL), 12.42(5HL), 15.1.b3(1HL + 5HL), 14.10(2HS) соответствуют ячменю сорта Igrі. Линия 11.102.013 (7HL) достоверно превышает по этой характеристике исходный сорт ($t=5,51$, при $df=64$ $p=0,00001$), а у линии 12.46 (1HL) этот показатель достоверно ниже, чем у исходного сорта ($t=4,56$ при $df=69$ $p<0,00001$) (табл. 2.). По озерненности колоса 6 из 7 изученных линий соответствуют исходному сорту ячменя. Для них характерна озерненность более 90%. У линии 14.10 с интрогрессией в коротком плече

хромосомы 2Н этот показатель ниже, чем у ячменя сорта Igrі. Число зерен в колосе у этой линии достоверно ниже, чем у исходного сорта ($t=2,770$, при $df=51$ $p=0,00779$), при этом число цветков в колосе не отличается достоверно от сорта Igrі ($t=1,124$ при $df=51$ $p=0,266$).

Важными характеристиками, отражающими продуктивность растений, являются показатели масса зерна с колоса и масса 1000 зерен. В таблице 3 приведены средние значения этих показателей, учитывая данные 2015 и 2017 годов для 5 из 7 изученных линий и исходного сорта ячменя. Линии 15.1.b3 и 14.10 высевались только в 2017 году, потому для них приведены данные за 2017. Масса зерна с колоса у линий 12.47 (2HL), 12.52 (3HL), 12.42 (5HL), 15.1.b3 (1HL + 5HL) с числом зерен в колосе, соответствующим исходному сорту, в среднем, несколько ниже, чем у сорта Igrі (табл. 3). По массе зерна с колоса линия 11.102.013 (7HL) превышает исходный сорт, что, вероятно, определяется большим числом зерен, формируемых в колосе, по массе же 1000 зерен эта линия близка к исходному сорту. В среднем, значение массы 1000 зерен (усредненные данные 2015 и двух повторностей 2017 года) для всех линий несколько ниже, чем у сорта Igrі (табл. 3). Наименьшие значения изучаемых показателей продуктивности отмечено для линии 14.10 (2HS). Масса 1000 зерен этой линии достоверно ниже, чем у сорта Igrі в соответствующей повторности опыта ($t=11,616$, при $df=8$ $p=0,00003$), масса зерна с колоса также достоверно ниже, чем у исходного сорта ячменя в соответствующей повторности ($t=5,246$, при $df=10$ $p=0,00037$). Таким образом, у линии 14.10 показатели, определяющие продуктивность: число зерен в колосе, массе зерна с колоса и масса 1000 зерен ниже, чем у исходного сорта ячменя.

Высота растений. Высоту растений определяли по длине стебля с главным колосом (с учетом длины главного колоса без остей). Результаты анализа растений эксперимента 2015 года и двух повторностей 2017 года приведены на рисунке 3.

Как видно на диаграмме, для исходного сорта ячменя Igrі характерно невысокое варьирование высоты растения в зависимости от года выращивания: от 79,1 до 72,2 см. Для линии 11.102.013 (7HL) отмечены сходные пределы варьирования этого показателя: от 81,60 до 72,80 см. Для линий 12.47, 12.52, 12.42 отмечено большее варьирование этого признака, что, возможно, связано с чувствительностью этих линий к условиям произрастания. Линии 11.102.013, 15.1.b3 и 14.10 по длине стебля с главным колосом соответствуют сорту Igrі.

Показатели качества зерна. Результаты анализа приведены в таблице 4. Как показали результаты, наименее вариabельным является содержание крахмала в зерне: от 63,5 % у сорта Igrі до 64,5 % - у линии 11.102.013. По показателю содержания белка линии 12.46, 12.47, 12.52, 12.42, 15.1.b3 близки к исходного сорта ячменя Igrі (16,1 %). Для линии 11.102.013 отмечено более низкое, чем у сорта Igrі, содержание белка: 12,8. У линии 2HS выявлено самое высокое содержание белка в зерне: 18,7%.

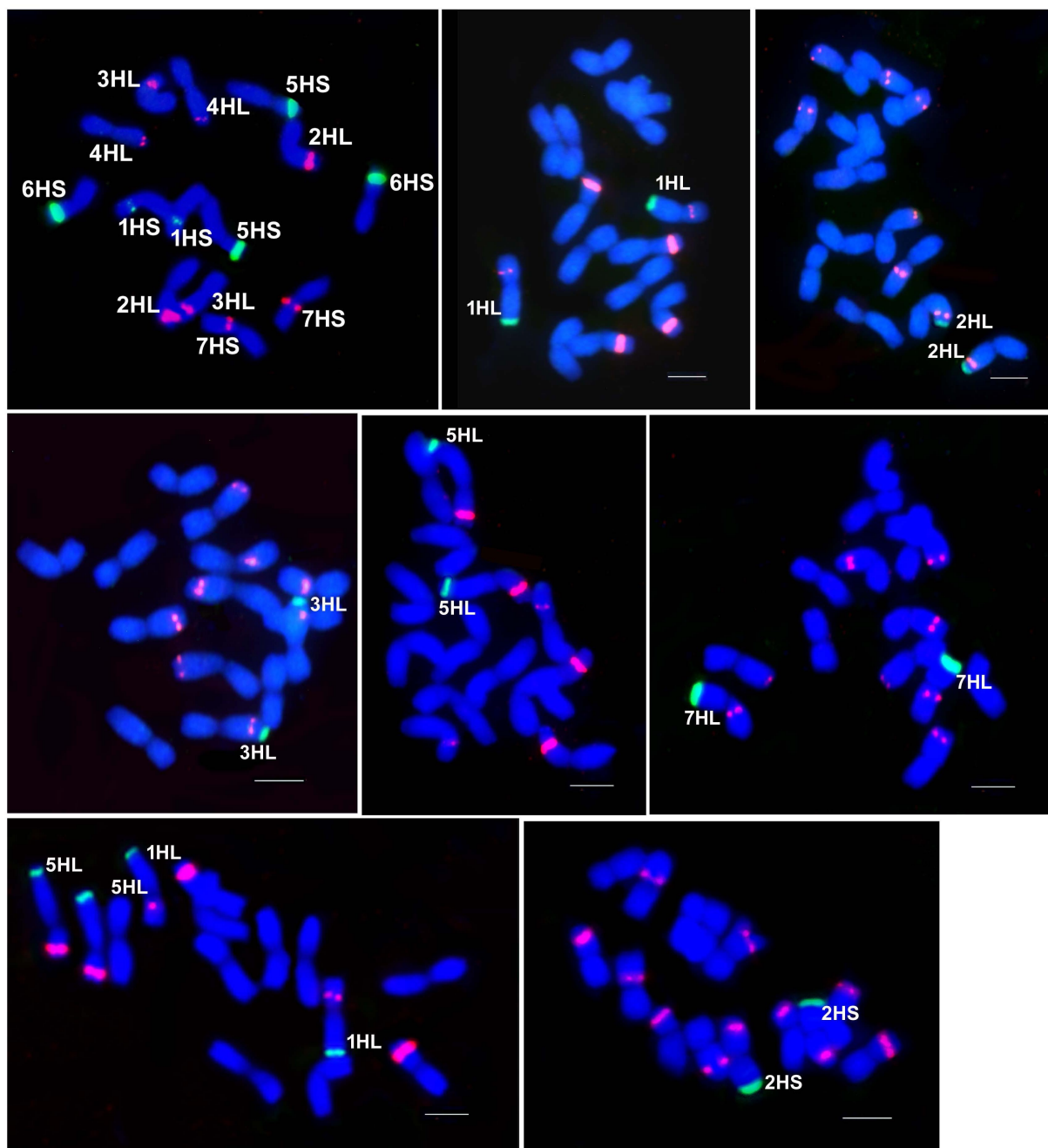


Рис. 2. Локализация генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах интрогрессивных линий *H. vulgare*

а - локализация хромосомных маркеров 5S (BIO – красная метка) и 18S/25S (DIG – зеленая метка) на хромосомах ячменя сорта Igri; б - з – кариотипы линий с интрогрессиями генетического материала *H. bulbosum* (DIG – зеленая метка): б – 12.46 (1HL), в – 12.47 (2HL); г – 12.42 (3HL); д – 12.52 (5HL), е – 11.103.013 (7HL); ж – 15.1.b3 (1HL+5HL), з – 14.10 (2HS); для идентификации рекомбинантной хромосомы использованы хромосомные маркеры 18S/25S (б, д, ж) (BIO – красная метка) и хромосомный маркер 5S (в, г, е, з) (BIO – красная метка)

Fig. 2. Localization of *H. bulbosum* the genetic material in the chromosomes of the introgressive lines of *H. vulgare*

a-localization of chromosome markers 5S (BIO-red) and 18S / 25S (DIG-green) on chromosomes of barley Igri; b - h-karyotypes of lines with introgressions of genetic material *H. bulbosum* (DIG - green): b – 12.46 (1HL), c – 12.47 (2HL); d – 12.42 (3HL); e – 12.52 (5HL), f – 11.103.013 (7HL); g – 15.1.b3 (1HL + 5HL), h – 14.10 (2HS); for identification of recombinant chromosomes the next markers were used: 18S/ 5S(b, e, g) and c, d, f, h 5S (c, d, f, h) (BIO - red)

Таблица 1. Результаты перезимовки интрогрессивных линий в полевых условиях, Пушкин.
Table 1. Winter survival of introgressive lines in field conditions, Pushkin.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Год	Высеяно зерен	Количество растений			
				Проросло		Перезимовало	
				Число	%	Число	%
Igri	-	2014-2015	60	57	95,0	16	28,1 ± 6,0*
- « -	-	2015-2016	40	36	90,0	0	0
- « -	-	2016-2017	120	101	84,2	39	38,6 ± 4,8
12.46	1HL	2014-2015	20	18	90,0	11	61,1 ± 11,5
- « -	1HL	2015-2016	40	35	87,5	0	0
- « -	1HL	2016-2017	120	107	89,2	47	43,9 ± 4,8
12.47	2HL	2014-2015	20	17	85,0	11	64,7 ± 18,1
- « -	2HL	2015-2016	40	32	80,0	0	0
- « -	2HL	2016-2017	120	67	55,5	40	59,7 ± 8,7
12.52	3HL	2014-2015	20	20	100	5	25,0 ± 9,7
- « -	3HL	2015-2016	40	35	87,5	0	0
- « -	3HL	2016-2017	120	99	82,5	46	46,5 ± 5,0
12.42	5HL	2014-2015	20	19	95,0	8	42,1 ± 11,3
- « -	5HL	2015-2016	40	37	92,5	1	2,7 ± 2,7
- « -	5HL	2016-2017	120	115	95,8	37	32,1 ± 4,4
11.102.013	7HL	2014-2015	20	20	100,0	13	65,0 ± 10,7
- « -	7HL	2015-2016	40	38	95,0	0	0
- « -	7HL	2016-2017	120	112	93,33	48	42,9 ± 4,8
14.10	2HS	2016-2017	40	36	90,0	12	33,3 ± 7,9
15.1.b3	1HL+5HL	2016-2017	141	134	95,0	33	24,6 ± 3,7

* - приведены значения процента перезимовки и ошибка процента

Таблица 2. Характеристика озерненности колоса интрогрессивных линий, Пушкин, 2017 г.
Table 2. Characteristic of the spike graininess of introgressive lines, Pushkin, 2017.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Число растений	Число цветков в колосе	Число зерен в колосе	Озерненность колоса, %
Igri	-	47	22,7 ± 0,3*	21,3 ± 0,3*	93,8 ± 3,5*
12.46	1HL	24	18,9 ± 0,7	18,0 ± 0,8	95,3 ± 4,3
12.47	2HL	30	23,2 ± 0,4	21,3 ± 0,5	91,8 ± 5,0
12.52	3HL	21	22,3 ± 0,4	21,5 ± 0,6	96,4 ± 4,1
12.42	5HL	25	23,5 ± 0,5	22,5 ± 0,6	95,7 ± 4,1
11.102.013	7HL	19	27,3 ± 1,0	25,5 ± 1,1	93,4 ± 5,7
15.1.b3	1HL + 5HL	44	23,8 ± 0,3	22,9 ± 0,4	96,2 ± 2,9
14.10	2HS	15	23,8 ± 1,4	18,2 ± 1,8	76,5 ± 10,9

* - приведены значения процента озерненности в среднем на колос и ошибка среднего

Показатель пленчатости зерна близок по значению у всех изучаемых форм и варьирует от 7,12% у линии 15.1.b3 с двумя рекомбинантными хромосомами до 7,99% у сорта Igri. Таким образом, наличие интрогрессий у изу-

чаемых линий не влияет на важную характеристику качества ячменя – пленчатость зерна. По показателю пленчатости линий и исходного сорта Igri их зерно можно охарактеризовать как среднепленчатое, ближе к тонкопленчатому (Sumina et al., 2013).

Таблица 3. Характеристика интрогрессивных линий по массе зерна с колоса и массе 1000 зерен, Пушкин, 2015, 2017 г.
Table 3. Characteristic of introgressive lines to the features of the mass of grain from the spike and the mass of 1000 grains, Pushkin, 2015, 2017.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Масса зерна с колоса, г.	Масса 1000 зерен, г.
Igri(2x)	-	$1,39 \pm 0,08$ (1,23 - 1,54)*	$64,7 \pm 4,0$ (54,8 - 67,4)*
12.46	1HL	$1,07 \pm 0,18$ (0,89 - 1,25)	$58,2 \pm 2,2$ (56,9 - 60,7)
12.47	2HL	$1,17 \pm 0,11$ (1,05 - 1,21)	$53,2 \pm 6,0$ (46,8 - 58,6)
12.52	3HL	$1,13 \pm 0,044$ (1,08 - 1,22)	$57,8 \pm 1,606$ (55,3 - 60,8)
12.42	5HL	$1,26 \pm 0,04$ (1,19 - 1,33)	$54,6 \pm 2,3$ (50,3 - 58,1)
11.102.013	7HL	$1,52 \pm 0,100$ (1,39 - 1,72)	$61,4 \pm 2,8$ (55,7 - 64,3)
15.1.b3	1HL + 5HL	$1,29 \pm 0,03$ (1,27; 1,32)	$59,1 \pm 0,6$ (59,6; 58,4)
14.10	2HS	$0,95 \pm 0,09$	$48,3 \pm 0,5$

* -- приведены средние значения и ошибка среднего, включая данные 2015 и 2017 годов

* - варьирование средних значений в разные годы, включая данные 2015 и двух повторностей 2017г.

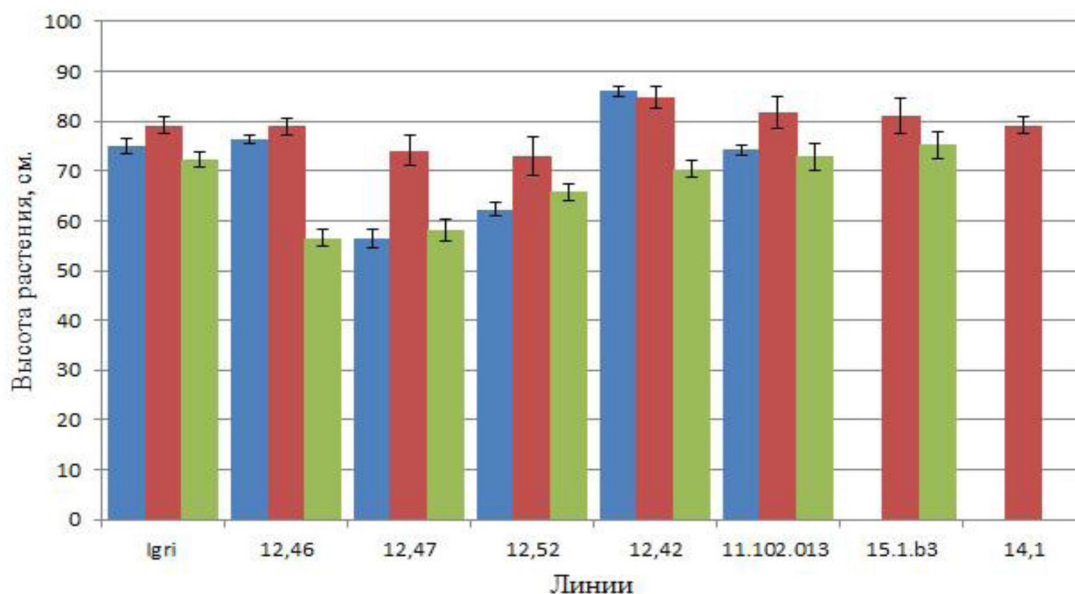


Рис. 3. Высота растений интрогрессивных линий: голубой – результаты 2015 года; красный и зеленый – результаты двух повторностей 2017.

Планка погрешностей отражает ошибку среднего значения.

Fig. 3. The plant height of introgression lines: blue – the results of 2015, red and green – the results of two replications 2017.
 Error bars indicates a standart error.

Обсуждение

В нашем исследовании были изучены 7 интрогрессивных линий, полученных на основе гибрида *H. vulgare* Igri

(2x) × *H. bulbosum* A17(4x), для которого характерна высокая частота гомеологичного спаривания хромосом: число тривалентов, включающих хромосомы обоих родительских геномов, варьировало от 0 до 4, составляя 0,74 в

среднем на клетку. Мейотическая гомеологичная рекомбинация обеспечивает интрогрессию генетического материала *H. bulbosum* в хромосомы культурного ячменя. Быстрое получение рекомбинантных форм *H. vulgare* с интрогрессиями ячменя луковичного на основе триплоидных гибридов с геномным составом $H^vH^bH^b$ связано с особенностями взаимодействия геномов этих видов в гибридах, приводящее к элиминации хромосом *H. bulbosum*, которая зависит от ряда факторов, в том числе – от генотипа родительских форм (Pickering, 1984). Ранее нами показано, что при соотношении геномов 1 : 1 при скрещивании тетраплоидной формы ячменя сорта Igri(4x) с *H. bulbosum* A17(4x) в гибридном геноме на ранних этапах эмбриогенеза (до 10 суток после опыления) происходит элиминация хромосом луковичного ячменя (Pendinen et al., 2013). Триплоидные гибриды, имеющие стабильную геномную

структуру $H^vH^bH^b$ стерильны, получение потомства этих форм проблематично, необходимо использование специальных приемов, стимулирующих образование нередуцированных гамет, обладающих сбалансированным числом хромосом. В результате опыления культурного ячменя пылью триплоидного гибрида, обработанного колхицином, были получены растения BC_1 , представляющие собой диплоидный *H. vulgare* ($2n=2x=14$) с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. Таким образом, мейотическая рекомбинация и последующая элиминация хромосом *H. bulbosum* при получении растений BC_1 обуславливают быстрое получение фертильных форм ячменя с рекомбинантными хромосомами. При дальнейшем отборе растений *H. vulgare* с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в обоих гомологах созданы фертильные интрогрессивные линии.

Таблица 4. Показатели качества зерна интрогрессивных линий, выращенных в полевых условиях, Пушкин, 2017.
Table 4. Grain quality of introgressive lines cultivated in field conditions, Pushkin, 2017.

№	Линия	Рекомбинантная хромосома	Содержание белка, %	Содержание крахмала, %	Пленчатость зерна, %
1	Igri	-	16,1 ± 1,01*	63,5 ± 0,09*	7,99 ± 0,044*
2	12.46	1HL	16,4 ± 0,14	63,6 ± 0,12	7,65 ± 0,156
3	12.47	2HL	15,7 ± 0,61	64,1 ± 0,12	7,54 ± 0,257
4	12.52	3HL	14,6 ± 0,44	63,7 ± 0,35	7,59 ± 0,396
5	12.42	5HL	15,9 ± 0,08	63,7 ± 0,21	7,61 ± 0,108
6	11.102.013	7HL	12,8 ± 0,97	64,5 ± 0,22	7,44 ± 0,148
7	15.1.b3	1HL + 5HL	15,5 ± 0,44	64,2 ± 0,26	7,12 ± 0,099
8	14.10	2HS	18,7 ± 0,39	63,9 ± 0,21	7,26 ± 0,016

* - среднее значение оцениваемого показателя и ошибка среднего

Изучение в полевых условиях линий ячменя с терминальными интрогрессиями в различных хромосомах: 12.46 (1HL), 12.47 (2HL), 12.52 (3HL), 11.103.013 (7HL), 14.10 (2HS), 15.1.b3 (1HL + 5HL), и с субтерминальной интрогрессией: 12.42 (5HL) показало, что эти формы близки по изучаемым показателям к исходному сорту ячменя Igri. Важной характеристикой линий является закрытое цветение и самоопыление, что дает возможность поддерживать и размножать линии в полевых условиях, сохраняя интрогрессии, без изоляции колоса. Показатели зимостойкости линий не ниже, чем у исходного сорта. Однако, выживание растений при перезимовке зависит от погодных условий конкретного года. Так, в 2015–2016 году все изучаемые формы и сходный сорт Igri, погибли при перезимовке. Поэтому на основе озимых линий начато создание яровых интрогрессивных форм путем вовлечения в скрещивания сортов ярового ячменя. Для отбора яровых растений с интрогрессией в обоих гомологах используется метод *in situ* гибридизации для строгих рекомбинантных хромосом. По характеристикам, определяющим урожайность, таким как озерненность колоса, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен 6 из 7 изученных линий, в общем, близки к исходному сорту Igri. Для линии 14.10 харак-

терно значительное снижение этих показателей в сравнении с исходным сортом и другими линиями, что, вероятно, связано с наличием интрогрессии в коротком плече хромосомы 2Н. Следует отметить, что эта линия также выделяется более высоким содержанием белка в зерне, чем у остальных линий и исходного сорта.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что интрогрессия генетического материала ячменя луковичного в 2HS хромосоме вызывает изменения некоторых характеристик ячменя сорта Igri у линии 14.10. Для линии 11.102.013 с интрогрессией в хромосоме 7HL, отмечено снижение содержания белка в зерне в сравнении с исходным сортом.

В настоящее время продолжается изучение полученных линий. Так, начато изучение устойчивости к воздействию солевого (NaCl) стресса. По предварительным данным, полученным в лабораторных условиях на проростках, линии 14.10, 11.102.013, 15.1.b3 выделяются по солеустойчивости на ранних стадиях развития. Таким образом, изучаемые интрогрессивные линии могут представлять интерес как источники хозяйственно значимых признаков. Фертильность линий и сохранение интрогрессий в полевых условиях при самоопылении дает возможность их размножения и дальнейшего изучения.

Заключение

Небольшие фрагменты хромосом *H. bulbosum*, интрогрессированные в терминальные участки хромосом 1HL линии 12.46, 2HL линии 12.47, 3HL линии 12.52, 1HL + 5HL линии 15.1. b3, 7HL линии 11.103.013, и в субтерминальный участок плеча 5HL линии 12.42, в целом, не изменяют значительно характеристику исходного сорта Igr1 по признакам фертильности, продуктивности и качества зерна. Наибольшие отличия от исходного сорта отмечены у линии 14.10 с интрогрессией генетического материала в терминальном участке короткого плеча хромосомы 2H. Для этой линии характерна более низкая фертильность, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен, однако содержание белка в зерне выше, чем у исходного сорта. Таким образом, интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в терминальный участок короткого плеча хромосомы 2H вызывает изменения некоторых характеристик сорта Igr1 у линии 14.10.

Изученные линии представляют собой высокофертильные формы ячменя, для которых характерно закрытое цветение и самоопыление, что обеспечивает сохранение интрогрессированных чужеродных фрагментов хромосом в последующих поколениях.

Благодарности: работа выполнена по госзаданию № 0662-2018-0007 и в рамках двустороннего российско-германского сотрудничества (проект №145)

References/Literature

- Bothmer R, Seberg O, Jacobsen N (1992). Genetic resources in the *Triticeae*. *Hereditas* 116: 141-150.
- Furusko M (1995) Dreding of malting barley using the haploid method. *Japan Agric. Research Quarterly* 29: 9-15.
- Gottlob-McHugh S, Levesque M, MacKenzie K, Olson M, Yarosh O, Johnson D. (1990) Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome*. 33: 486-494.
- Ho KM, Jones E. (1980) Mingo Barley. *Can. J. Plant Science*. 60 (1): 279-280.
- Jones IT, Pickering RA (1978) The mildew resistance of *Hordeum bulbosum* and its transference into *H. vulgare* genotypes/ *Ann. Appl. Biology*. 88: 295-298.
- Jonson PA, Pickering RA (2002) PCR detection of *Hordeum bulbosum* introgression in a *H. vulgare* background using a retrotransposon-like sequence. *Theor. and Appl. Genetics* 104: -726.
- Leitch AR, Schwarzbacher T, Jackson D, Leitch IJ. (1994) *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society: Microscopy Handbooks. 27. BIOS Scientific Publishers, Oxford
- Michel M (1996) Untersuchungen zur Übertragung von Resistenzgenen aus der Wildart *Hordeum bulbosum* L. in die Kulturgerste *Hordeum vulgare* L. PhD Thesis, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Technische Universität München. 117 p.
- Pickering RA (1988) The production of fertile triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. (2n=2x=14) and *H. bulbosum* L. (2n=4x=28). *Barley Genetics Newsletter*. 18:25-29.
- Pendinen GI, Scholz M, Schrader O, A. Habekuß A (2013) Using of bulbous barley *Hordeum bulbosum* L. for widening of genetic diversity of *Hordeum vulgare* L. Proseeding on Applied Botany. *Genetics and Breeding*. 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. Т. 171. С. 123-126.
- Pickering RA (1992) Monosomic and double monosomic substitutions of *Hordeum bulbosum* L. chromosomes into *H. vulgare* L. *Theor. and Appl. Genetics*. 84: 466-472.
- Pickering R (1984) The influence of genotype and environment on chromosome elimination in crosses between *Hordeum vulgare* L., *Hordeum bulbosum* L. *Plant Sci Lett* 34: 153-164.
- Pickering RA, Klatte S, Butler RC (2006) 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*. 49: 73-78.
- Pickering RA, Hudakova S, Houben A, Johnson P., Butler RC (2004) Reduced metaphase associations between the short arms of homoeologous chromosomes in a *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. diploid hybrid influences the frequency of recombinant progeny/ *Theor. Appl. Genet.* 109: 911-916.
- Pickering RA, Timmerman GM, Cromey MG, Melz G (1994) Characterisation of progeny from backcrosses of triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L.(2x) and *H. bulbosum* L.(4x) to *H. vulgare*. *Theor. and Appl. Genet.* 88: 460-464.
- Pickering RA, Malyshev S, Kunzel G, Johnson PA, Korzun V, Menke M, Schubert I (2000) Locating introgressions of *Hordeum bulbosum* chromatin within the *H. vulgare* genome 100: 27-31.
- Pickering R, Ruge-Wehling B, Johnston PA, Schweizer G, Wehling P (2006) The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS // *Plant Breeding*. 125: 576-579.
- Ruge B, Linz A., Pickering R, Proeseler G, Greif P, Wehling P (2003) Mapping of Rym14Hb, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley *Theor. and Appl. Genet.* 107: 965-971.
- Ruge-Wehling B, Linz A, Habekuß A, Wehling P. (2006) Mapping of Rym16Hb, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* *Theor Appl Genet.* 113: 867-873
- Scholz M, Ruge-Wehling B, Habekuß A, Schrader O, Pendinen G, Fischer K, Wehling P (2009) Ryd4Hb: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus// *Theor. and Appl. Genet.* 119: 837-849
- Scholz M, Pendinen G. (2017) The Effect of Homoeologous Meiotic Pairing in Tetraploid *Hordeum bulbosum* L. × *H. vulgare* L. Hybrids on Alien Introgressions in Offspring // *Cytogenet Genome Research* 150 (2): 139-149 DOI: 10.1159/000455141
- Shtaya MJY, Sillero JC, Flath K, Pickering R, Rubeales D (2007) 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*. 126: 259-267.
- Sumina AV, Polonskiy VI (2013) The influence of cultivation conditions and genotype on scabiosis characteristic indicator of siberian selection barley grain. *Vestnik Kras GAU* 8: 80-84 [in Russian] Сумина А.В., Полонский В.И. Влияние условий выращивания и генотипа на показатель плесчатости зерна ячменя сибирской селекции // *Вестник Крас ГАУ*. 2013. № 8. С. 80-84.
- Szigat G, Szigat G (1991) Amphidiploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* – basis for the development of new initial material for winter barley breeding// *Vortr. Pflanzenzüchtg* 20: 34-39.
- Yakura K, Tanifuji S (1983) Molecular cloning and restriction analysis of Eco RI-fragments of *Vicia faba* rDNA// *Plant Cell Physiol*. 24: 1327-1330.
- Zhang L, Pickering R, Murray. (1999) Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*, using genomic in situ hybridization. *Heredity*. 1999. 83: 304-309