

СПАРИВАНИЕ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ В МЕТАФАЗЕ I МЕЙОЗА У ТРИПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (HvHbHb)

Пендинен Г. И.^{1*}, Шольц М.²

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; *✉ pendinen@mail.ru

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

Актуальность. В скрещиваниях *H. vulgare* L.(2x) × *H.bulbosum* L.(2x) и *H. vulgare*(4x) × *H. bulbosum*(4x), при соотношении геномов в гибридном зародыше 1Hv : 1Hb, во многих случаях наблюдается элиминация хромосом ячменя луковичного. Это ограничивает возможности для привлечения в скрещивание значительного разнообразия родительских форм. При гибридизации диплоидных сортов *H. vulgare* с тетраплоидными образцами *H. bulbosum* (4x) результатом являются стабильные по хромосомному составу триплоидные гибриды (HvHbHb). На их основе могут быть получены интрогрессивные линии культурного ячменя. Целью нашего исследования было установить, с использованием GISH и FISH с хромосомоспецифичными маркерами, осуществляется ли гомеологичное спаривание хромосом родительских видов в метафазе I (MI) мейоза у триплоидных гибридов (HvHbHb) и каково участие в нем отдельных плеч хромосом культурного ячменя. **Материал и методы.** В исследовании использовали семь триплоидных гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb), полученных в четырех комбинациях скрещиваний с участием трех диплоидных сортов культурного ячменя и двух тетраплоидных образцов ячменя луковичного. Особенности гомеологичного спаривания хромосом в MI изучали с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (GISH и FISH с хромосомоспецифичными маркерами). **Результаты.** Для всех изученных гибридных растений характерен стабильный хромосомный состав в материнских клетках пыльцы (МКП) на стадии MI мейоза. Были выявлены мейотические конфигурации, образованные гомеологичными хромосомами родительских видов в количестве от 0,87 до 1,40 в среднем на клетку. Среди них преобладали vbb триваленты. Анализ спаривания в MI мейоза у триплоидных гибридов выявил участие в образовании гомеологичных Hv-Hb ассоциаций всех хромосомных плеч *H. vulgare*, кроме короткого плеча хромосомы 1H. У всех изученных триплоидных гибридов наблюдается тенденция к более высокой вовлеченности в гомеологичные ассоциации длинных плеч хромосом, эта особенность наиболее четко проявляется для хромосомы 5H. **Выводы** В MI мейоза у триплоидных гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb) выявлены межгеномные ассоциации с участием всех плеч хромосом *H. vulgare*, кроме короткого плеча хромосомы 1H. Для хромосомы 5H, как и для других хромосом культурного ячменя, характерно более частое вовлечение в гомеологичные ассоциации Hv-Hb длинных плеч хромосом по сравнению с короткими.

Ключевые слова: ячмень, межвидовая гибридизация, взаимодействие гомеологов, чужеродная интрогрессия, GISH, FISH.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript
Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

HOMEEOLOGOUS CHROMOSOME PAIRING AT METAPHASE I OF MEIOSIS IN *Hordeum VULGARE* L. × *H. Bulbosum* L. TRIPLOID HYBRIDS (HvHbHb)

Pendinen G. I.^{1*}, Scholz M.²

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St.Petersburg 190000, Russia; *✉ 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

Background. One of the ways to use the genetic potential of bulbous barley, which is characterized by a number of valuable traits, is interspecific hybridization. In crosses of *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (2x) and *H. vulgare* (4x) × *H. bulbosum* (4x) with a genome ratio of 1Hv : 1Hb in a hybrid embryo, elimination of bulbous barley chromosomes is observed in many cases, and the intensity of the process and the result of the crossing depend on the genotypes of the parental forms. This limits the possibility of including a significant variety of parental forms in crosses. Crossing of diploid forms of *H. vulgare* with tetraploid accessions of *H. bulbosum* (4x) results in the formation of triploid hybrids (HvHbHb) with stable chromosomal composition in pollen mother cells (PMCs) at metaphase I (MI) of meiosis. These triploid hybrids can serve as a basis for obtaining series of introgressive lines of cultivated barley. One of the tasks of this type of work is to estimate the involvement of various chromosomes and their arms in homoeologous associations. The aim of this work was to study the possibility of homoeologous pairing of chromosomes of parental species at MI of meiosis in triploid hybrids using GISH and FISH with chromosome-specific markers, as well as to register the participation of individual arms of the cultivated barley chromosomes in homoeologous associations with the chromosomes of bulbous barley in triploid hybrids (HvHbHb). **Materials and methods.** Seven triploid hybrids of *H. vulgare* × *H.bulbosum* (HvHbHb) obtained in four combinations of crosses with the participation of three diploid cultivars of cultivated barley and two tetraploid accession of bulbous barley were used in this study. The features of homoeologous pairing of chromosomes at MI were studied using the method of fluorescent *in situ* hybridization (GISH and FISH) with chromosome-specific markers. **Results** All the studied hybrid plants are characterized by a stable chromosomal composition in PMCs at the MI stage of meiosis. Meiotic configurations formed by homoeologous chromosomes of the parental species, ranging from 0.87 to 1.40 on average per cell, were identified in all the studied plants. Among them, vbb trivalents prevailed. Analysis of chromosome pairing at MI in triploid hybrids revealed the participation of all chromosome arms of *H. vulgare* in homoeologous Hv-Hb associations, except for the short arm of chromosome 1H. In all the studied triploid hybrids, there is a tendency for a higher frequency of involvement of the long arms of chromosomes in the formation of homoeologous associations; this feature is most clearly manifested in case of chromosome 5H. **Conclusions** Intergenomic associations with the participation of all arms of *H. vulgare* chromosomes, except for the short arm of chromosome 1H, were revealed at MI in *H. vulgare* × *H. bulbosum* triploid hybrids (HvHbHb). Chromosome 5H, as well as any other cultivated barley chromosome, is characterized by a higher involvement of its long arm in homoeologous associations Hv-Hb, as compared to the short arm.

Key words: barley, interspecific hybridization, homoeologous interactions, alien introgression, GISH, FISH.

Для цитирования: 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-o2

For citation: 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 Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-o2

ORCID:

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

УДК 575.222.72

Поступила в редакцию: 01.12.2020

Принята к публикации: 14.12.2020

Введение

Ячмень луковичный *Hordeum bulbosum* L. – единственный вид дикорастущего ячменя, генофонд которого успешно используется в интрогрессивной гибридизации с культурным ячменем *H. vulgare* L. Несмотря на то, что традиционно *H. bulbosum* используют для получения гаплоидов (Ho, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003), этот вид вовлекают в скрещивания для получения гибридов с культурным ячменем, поскольку он характеризуется рядом ценных признаков, таких как устойчивость к мучнистой росе, стеблевой и листовой ржавчине, которые могут быть интродуцированы в культурный ячмень при гибридизации этих видов (Jones, Pickering, 1978; Pickering, 1988; Pickering et al., 1994). В ряде исследований на основе гибридов *H. vulgare* и *H. bulbosum* созданы интрогрессивные линии культурного ячменя, в том числе, характеризующиеся устойчивостью к болезням (Pickering, 1988; Pickering et al., 2000; Jonson, Pickering, 2002; Scholz et al., 2009). Было установлено, что устойчивость к листовой ржавчине обусловлена интрогрессией генетического материала луковичного ячменя в длинное плечо хромосомы 2Н или 4Н ячменя *H. vulgare*, устойчивость к стеблевой ржавчине – в короткое плечо хромосомы 6Н; устойчивость к ринхоспориозу передалась с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* в короткое плечо хромосомы 4Н, а к мучнистой росе – с интрогрессией в короткое плечо хромосомы 2Н (Hoseinzadeh et al, 2020; Pickering et al., 2000; Pickering et al., 2006b; Shtaya et al., 2007). Среди интрогрессивных форм выявлены генотипы, устойчивые к вирусам VaMMV, VaYMV, BYDV, идентифицированы новые гены устойчивости (Michel, 1996; Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009). Таким образом, показана реальная возможность использования межвидовой гибридизации для интрогрессии ценных признаков *H. bulbosum* в геном культурного ячменя.

В основе интрогрессии генетического материала ячменя луковичного в геном культурного ячменя лежит процесс мейотической рекомбинации. Для идентификации генетического материала родительских видов у гибридов и определения плеч хромосом, участвующих в образовании межгеномных хромосомных ассоциаций у гибридов *H. vulgare* с *H. bulbosum*, был использован метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (GISH и FISH с хромосомоспецифичными маркерами). Таким образом, была изучена частота гомеологичных ассоциаций различных хромосом и их плеч в метафазе I (MI) мейоза у двух диплоидных (HvHb) и тетраплоидных растений (HbHbHvHv), а также выявлены участки *H. bulbosum* в составе хромосом *H. vulgare* в потомстве стабильного тетраплоидного гибрида, что указывало

на возможность межгеномной мейотической рекомбинации (Pickering et al. 2004; Pickering et al, 2005, 2006a; Scholz, Pendinen, 2017). Показано, что рекомбинация между хромосомами этих видов происходит в терминальных участках, при этом обмен генетической информацией ограничен. В связи с этим, необходимо привлечение наибольшего разнообразия генотипов ячменя луковичного и ячменя культурного в скрещивания для создания разнообразия интрогрессивных линий культурного ячменя. Известно, что в скрещиваниях *H. vulgare*(2x) × *H. bulbosum*(2x) и *H. vulgare*(4x) × *H. bulbosum*(4x) при соотношении геномов 1Hv : 1Hb, в гибридном зародыше во многих случаях наблюдается элиминация хромосом ячменя луковичного, и результат скрещивания в значительной степени зависит от генотипов используемых родительских форм (Ho, Kasha, 1975; Fukuyama, Hosoya, 1983; Devaux, 2003). Чаще всего в таких вариантах скрещиваний результатом являются гаплоиды *H. vulgare*, или гибридные формы с нестабильным числом хромосом (Lange, 1971a,b). Эта особенность в значительной степени ограничивает привлечение разнообразия сортов культурного ячменя в интрогрессивную гибридизацию с ячменем луковичным. При скрещивании диплоидных форм *H. vulgare* с тетраплоидными образцами *H. bulbosum*(4x) результатом являются стабильные по хромосомному составу триплоидные гибриды (HvHbHb) (Lange, 1971a). На их основе могут быть получены серии интрогрессивных линий культурного ячменя. С использованием триплоидного гибрида *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x), уже создана серия таких линий, имеющих фенотип культурного ячменя и характеризующихся высокой фертильностью (Scholz et al., 2009; Pendinen et al, 2018). Одной из задач в подобных исследованиях является оценка участия в гомеологичных ассоциациях различных хромосом и их плеч.

Целью нашего исследования было охарактеризовать уровень гомеологичного спаривания хромосом родительских видов в MI мейоза у триплоидных гибридов (HvHbHb) и выяснить, каково участие отдельных плеч хромосом культурного ячменя в гомеологичных ассоциациях с хромосомами ячменя луковичного с помощью методов GISH и FISH с хромосомоспецифичными маркерами.

Материалы и методы.

Материал. В исследовании использовали семь триплоидных гибридов *Hordeum vulgare* L. (2x) × *Hordeum bulbosum* L.(2x) (HvHbHb), полученных в четырех комбинациях скрещиваний с участием трех диплоидных сортов культурного ячменя и двух тетраплоидных образцов ячменя луковичного (табл. 1).

Таблица 1. Триплоидные гибриды *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x) (HvHbHb), использованные в исследовании

Table 1. Triploid hybrids *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x) (HvHbHb) used in the study.

№ / No.	Гибридная комбинация / Hybrid combination	Код растения / Plant code	Хромосомный состав / Chromosome composition	Происхождение / Origin
1	<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851, клон 1 (4x)	F1_RW,2	7Hv+14Hb	Отдел биотехнологии ВИР
2	<i>H. vulgare</i> 'Roland' (2x) × <i>H. bulbosum</i> W851, клон1 (4x)	F1_RW,4	7Hv+14Hb	Отдел биотехнологии ВИР
3	<i>H. vulgare</i> Roland (2x) × <i>H. bulbosum</i> A17, клон1 (4x)	F1_RA, 6	7Hv+14Hb	Отдел биотехнологии ВИР
4	<i>H. vulgare</i> Roland (2x) × <i>H. bulbosum</i> A17 (4x)	F1_RA,1	7Hv+14Hb	Отдел биотехнологии ВИР
5	<i>H. vulgare</i> Borwina (2x) × <i>H. bulbosum</i> A17 (4x)	F1_RA,7	7Hv+14Hb	Отдел биотехнологии ВИР
6	<i>H. vulgare</i> Borwina (2x) × <i>H. bulbosum</i> A1 (4x)	F1_1	7Hv+14Hb	Институт Юлиуса Кюна, Гросс-Люзевиц, Германия
7	<i>H. vulgare</i> Igrі (2x) × <i>H. bulbosum</i> A17 (4x)	F1_2	8Hv*+14Hb	Институт Юлиуса Кюна, Гросс-Люзевиц, Германия

* – две хромосомы 6H

Фиксация материала и подготовка мейотических препаратов. Для фиксации пыльников гибриды F1_1 и F1_2 выращивали в теплице Института Юлиуса Кюна (Гросс-Люзевиц), гибриды F1_RW,2, F1_RW,4, F1_RA,6, F1_RA,7 и F1_RA,7 выращивали в условиях физиологической площадки НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР». Колосья фиксировали в 3 : 1 (96 %-й этиловый спирт : ледяная уксусная кислота), который через сутки меняли на свежий. Фиксации хранили в морозильной камере (-20°C) до их использования. Отбирали пыльники с материнскими клетками пыльца (МКП, Pollen Mother Cells (PMCs)) на стадии диакинеза – МІ, инкубировали их в течение 40 мин. в растворе мацерирующих ферментов, содержащих целлюлазу R10 (1,14 U/mg) в концентрации 40 мг/мл и пектолиазу (0,94 U/mg) в концентрации 10 мг/мл. Затем готовили давленные препараты.

Гибридизация ДНК-ДНК *in situ*. Для идентификации геномов родительских видов и отдельных хромосом использовали метод флюоресцентной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* (FISH). Подготовку препаратов, мечение ДНК, *in situ* гибридизацию проводили по стандартной методике (Leitch et al., 1994) с ранее описанными модификациями (Scholz et al., 2009; Scholz, Pendinen, 2017).

Для идентификации хромосом использовали два маркера: 5S рДНК и 18/25S рДНК (Brown et al, 1999, Pickering et al, 2004, Scholz, Pendinen, 2017). Сайты 5S рДНК локализованы в хромосомах 5Hb *H. bulbosum*, 2HL, 3HL, 7HS,

4HL *H. vulgare*, причем у сортов Igrі и Roland эти хромосомы легко идентифицируются по размеру маркера и его расположению на хромосоме (рис. 1, а). У сорта Borwina хромосомы 2H и 3H не различимы между собой из-за сходства интенсивности сигнала и его расположения на длинном плече этих хромосом (рис. 1, б). Сайты 18/25S рДНК локализованы в коротких плечах хромосом 1HS, 5HS, 6HS *H. vulgare* и в хромосоме 6Hb *H. bulbosum*.

Для геномной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* (GISH) геномную ДНК *H. bulbosum* метили методом Nick-трансляции с использованием реактива DIG-Nick Translation Mix (Roche). Плазмидную последовательность 18/25S рДНК в пробе VER17 (Yakura, Tanifuji, 1983) метили методом Nick-трансляции с использованием BIO- или DIG-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics). Меченую 5S рДНК получали методом ПЦР с использованием праймеров согласно Gottlob-McHugh с соавторами (Gottlob-McHugh et al., 1990), в смесь для реакции включали биотин-16-dUTP (Roche Diagnostics). Для реакции использовали ДНК *H. vulgare* Igrі.

В пробе для гибридизации использовали дифференциально меченые геномную ДНК *H. bulbosum* для GISH и хромосомоспецифичный маркер ДНК для FISH (5S рДНК и/или 18/25S рДНК), а в качестве блока геномную ДНК *H. vulgare* (разрушенную автоклавированием до фрагментов длиной 100-200 bp). В двухцветной GISH-FISH для детекции биотиновой пробы использовали streptavidin-Cy3 (Dianova), для детекции дигоксигени-

новой метки – anti-digoxigenin-FITC (Roche Diagnostics). Хромосомы контрастировали раствором DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в концентрации 1.0 нг/мкл.

Анализ препаратов. На препаратах отбирали клетки на стадии диакинеза и МI, в которых учитывали типы и частоту ассоциаций хромосом, идентифицируя плечи хромосом *H. vulgare*, вовлеченные в межгеномные ассоциации. Для анализа препаратов, создания и обработки изображений использовали эпифлюоресцентный микроскоп AxioImager M2 с камерой AxioCamMRm и программным обеспечением AxioVision Rel 4.8. Кроме того, для обработки изображений использовали программу Adobe Photoshop 6.0.

Статистический анализ результатов. Для каждого гибридного растения рассчитывали число хромосомных конфигураций различного типа, образованных гомеологичными хромосомами (Hv-Hb), в среднем на клетку. Долю плеч хромосом *H. vulgare*, вовлеченных в гомеологичные ассоциации Hv-Hb определяли в процентах от общего числа плеч хромосом этого вида в изученных клетках.

Кроме того, для оценки участия каждого плеча в гомеологичном спаривании, рассчитывали число гомеологичных ассоциаций Hv-Hb с участием каждого плеча хромосом *H. vulgare* в среднем на клетку. Для срав-

нительной оценки участия различных плеч хромосом в гомеологичном спаривании определяли долю гомеологичных ассоциаций хромосом с участием каждого плеча (в %) от общего числа плеч, участвующих в образовании ассоциаций между хромосомами двух видов *H. vulgare* и *H. bulbosum* (Hv и Hb, соответственно).

Результаты

Для всех изученных гибридных растений характерен стабильный хромосомный состав в материнских клетках пыльцы (МКП) на стадии МI мейоза. Анализ спаривания хромосом у гибридов *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x) (HvHbHb) показал, что большая часть хромосом культурного ячменя представлена унивалентами (от 5,09 до 6,15 в среднем на клетку у различных растений), хромосомы ячменя луковичного в большинстве своем образуют биваленты (от 5,58 до 6,11 в среднем на клетку). Подробная характеристика спаривания хромосом в МI мейоза изучаемых гибридов представлена в таблице 1 приложения (Supplementary Table 1¹).

Тем не менее, у всех изученных растений были выявлены мейотические конфигурации: биваленты (II), триваленты (III), тетраваленты (IV), образованные гомеологичными хромосомами (табл. 2).

Таблица 2. Среднее число гомеологичных ассоциаций хромосом в МI мейоза МКП гибридов *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x) (HvHbHb)

Table 2. Mean number of homoeologous Hv-Hb pairing configurations* in M I in PMCs of *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (4x) (HvHbHb) hybrids

Код гибридного растения / Hybrid plant code	Изучено МКП / PMCs studied	Число конфигураций Hv-Hb* в среднем на МКП / Hv-Hb* configurations, average per PMC				Частота спаривания Hv-Hb (%)** / Hv-Hb pairing frequency (%)**
		II		III	IV	
		Открытых/ rod	Закрытых/ ring			
F1_RW,2	93	0,22 (0-2)***	0,04 (0; 1)***	1,14 (0-3)***	0	9,98
F1_RW,4	43	0,19 (0-2)	0,02 (0; 1)	0,79 (0-3)	0	7,14
F1_RA, 6	84	0,25 (0-3)	0,04 (0; 1)	0,95 (0-4)	0	8,59
F1_RA,1	27	0,15 (0; 1)	0	0,70 (0-3)	0	6,61
F1_RA,7	30	0,17 (0; 1)	0	0,70 (0-3)	0	6,67
F1_1	23	0,09 (0; 1)	0	1,00 (0-2)	0	7,14
F1_2	43	0,21 (0-4)	0,05 (0-2)	0,88 (0-3)	0,14 (0; 1)	8,72

*- II- бивалент, III- тривалент, IV-тетравалент

** - % плеч хромосом *H. vulgare*, вовлеченных в гомеологичные ассоциации Hv-Hb от общего числа плеч хромосом этого вида в изученных клетках

*** - ряд от минимального до максимального значения на МКП.

¹ Supplementary Table 1 is available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-o2>

Число различных конфигураций в среднем на клетку несколько различается у разных растений, что, возможно, связано с внешними условиями в момент фиксации, а также с индивидуальными генетическими и физиологическими особенностями отдельных гибридов. Число гомеологичных конфигураций составляет от 0,87 в среднем на клетку у гибрида F1_RA,7 до 1,40 у гибрида F1_RW,2. Среди них преобладают триваленты

(от 0,70 до 1,14 в среднем на клетку; от 0 до 4 в отдельных клетках) (рис.1 в-к). У ряда растений наряду с открытыми бивалентами с одной хиазмой выявлены закрытые биваленты с хиазмами в обоих плечах. У гибрида *H. vulgare* Igr1 (2x) × *H. bulbosum* A17 (4x) (F1_2), имеющего две 6H хромосомы, отмечены тетраваленты, образованные с участием этой хромосомы (см. табл. 2).

Таблица 3. Участие отдельных плеч хромосом *H. vulgare* в гомеологичном спаривании Hb-Hv в MI мейоза в МКП триплоидных гибридов (HvHbHb).

Table 3. Participation of individual arms of *H. vulgare* chromosomes in homoeologous Hb-Hv pairing at MI of meiosis in PMCs of triploid hybrids (HvHbHb)

Код гибридного растения/ Hybrid plant code	Маркер/ Marker	Число МКП/ PMCs number	Хромосома/ Chromosome	Число гомеологичных ассоциаций Hb-Hb с участием плеча в среднем на клетку / Mean number of homoeologous Hb-Hb arm associations per cell		Процент от общего числа ассоциаций Hb-Hb / Percentage of the total number of Hb-Hb associations	
				L-L	S-S	L	S
F1_RW,2	18/25S	46	1H	0,13	0	9,23	0
			5H	0,15	0,04	10,77	3,08
			6H	0,07	0,07	4,62	4,62
			(2+3+4+7)H	0,96*		67,69**	
	5S	47	2H	0,23	0,11	16,22	7,69
			3H	0,17	0,11	12,31	7,69
			4H	0,09	0,06	6,15	4,62
			5H	0,15	0,04	10,80	3,08
			7H	0,15	0,06	10,80	4,62
			(1+6) H	0,21		15,38	
F1_RW, 4	18/25S	47	1H	0,07	0	6,98	0
			5H	0,19	0,02	18,60	2,33
			6H	0,07	0,02	6,98	2,33
			(2+3+4+7)H	0,63		62,79	
F1_RA, 6	18/25S	51	1H	0,10	0	8,33	0
			5H	0,24	0,04	20,00	3,33
			6H	0,08	0,06	6,67	5,00
			(2+3+4+7)H	0,67		56,67	
	18/25S +5S	33	1H	0,15	0	12,20	0
			2H	0,18	0,09	14,63	7,32
			3H	0,06	0,09	4,88	7,32
			4H	0,06	0,03	4,88	2,44
			5H	0,21	0,06	17,07	4,88
			6H	0,03	0,06	2,44	4,88
F1_RA,1	18/25S	14	1H	0,14	0	12,50	0
			5H	0,21	0	18,75	0
			6H	0,14	0	12,50	0
			(2+3+4+7)H	1,64		56,25	

Код гибридного растения/ Hybrid plant code	Маркер/ Marker	Число МКП/ PMCs number	Хромосома/ Chromosome	Число гомеологичных ассоциаций Нv-Нb с участием плеча в среднем на клетку / Mean number of homoeologous Hv-Hb arm associations per cell		Процент от общего числа ассоциаций Нv-Нb / Percentage of the total number of Hv-Hb associations	
				L-L	S-S	L	S
F1_RA,7	18/25S	30	1H	0,10	0	10,71	0
			5H	0,20	0,033 ± 0,0333	21,43	3,57
			6H	0,03	0,033 ± 0,0333	3,57	3,57
			(2+3+4+7)H	0,53		57,14	
F1_1	18/25S +5S	23	1H	0,13	0	10,71	0
			(2+3)H	0,30	0,13	25,00	10,71
			4H	0	0,04	0	3,57
			5H	0,13	0	10,71	0
			6H	0,13	0,04	10,71	3,57
			7H	0,13	0,17	10,71	14,29
F1_2	18/25S +5S	43	1H	0,12	0	8,33	0
			2H	0,12	0,07	8,33	5,00
			3H	0,28	0,07	20,00	5,00
			4H	0,12	0,09	8,33	6,67
			5H	0,12	0	8,33	0
			6H	0,09	0,09	6,67	6,67
			7H	0,14	0,09	10,00	6,67

* L-L+S-S, ** L-L+S-S

В общем, доля плеч хромосом *H. vulgare*, вовлеченных в гомеологичные ассоциации Нv-Нb у различных растений, составляет от 6,61 до 9,98 от общего числа плеч хромосом этого вида во всех изученных клетках (см. табл. 2). Следует отметить, что среднее число мейотических конфигураций (II, III, IV), образованных гомеологичными хромосомами, не превышает одну на клетку в большинстве случаев. Однако, в ряде МКП отмечено до четырёх плеч хромосом *H. vulgare*, вовлеченных в межгеномные ассоциации Нv-Нb (рис. 1 г, и, к).

Одной из задач данного исследования было выяснить, участвует ли короткое плечо хромосомы 1H в гомеологичных ассоциациях, поскольку ранее, при изучении тетраплоидных гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным (НbНbНvНv), таких ассоциаций выявить не удалось. Поэтому для анализа всех гибридов был использован маркер 18/25S, позволяющий идентифицировать хромосому 1H. Анализ спаривания в МI мейоза у триплоидных гибридов позволил выявить участие в образовании гомеологичных Нv-Нb ассоциаций всех хромосомных плеч *H. vulgare* кроме короткого плеча хромосомы 1H (1HS) (табл. 3). Хромосомных ассоциаций с участием этого плеча ни у одного из исследованных гибридов не наблюдали.

У всех изучаемых гибридных растений в мейозе наблюдается тенденция к более высокой частоте вов-

лечения длинных плеч хромосом в образование гомеологичных ассоциаций (см. табл. 3). Так, частота участия длинного плеча хромосомы 5H в гомеологичном спаривании выше, чем короткого: от 10,71 % до 21,43 % от общего числа ассоциированных плеч у различных эуплоидных растений, и 8,33 % – у анеуплоидного растения, тогда как для короткого плеча эта величина составила от 0 до 4,88 (см. табл. 3). У трех гибридов F1_RA,1, F1_1 и F1_2 не выявлено клеток с участием плеча 5HS в гомеологичных межгеномных ассоциациях.

Среди ассоциаций с участием хромосомы 2H большее число – от 8,33 % до 16,22 % у различных растений – образованы с участием длинного плеча, и только от 0 до 7,69% – с участием ее короткого плеча. Для хромосомы 3H у растений F1_RW,2 и F1_2 наблюдается та же тенденция, хотя для растения F1_RA, 6 не выявлено более высокой частоты участия длинного плеча в гомеологичном спаривании, что, возможно, связано с небольшим объемом исследованной выборки МКП (см. табл. 3). У гибридного растения F1_1, полученного с участием ячменя сорта Vorwina, хромосомы 2H и 3H не различимы в случае использования в качестве маркера 5S рДНК: в обеих хромосомах маркер локализован ближе к терминальной части длинного плеча и имеет сходную интенсивность (рис.1, б).

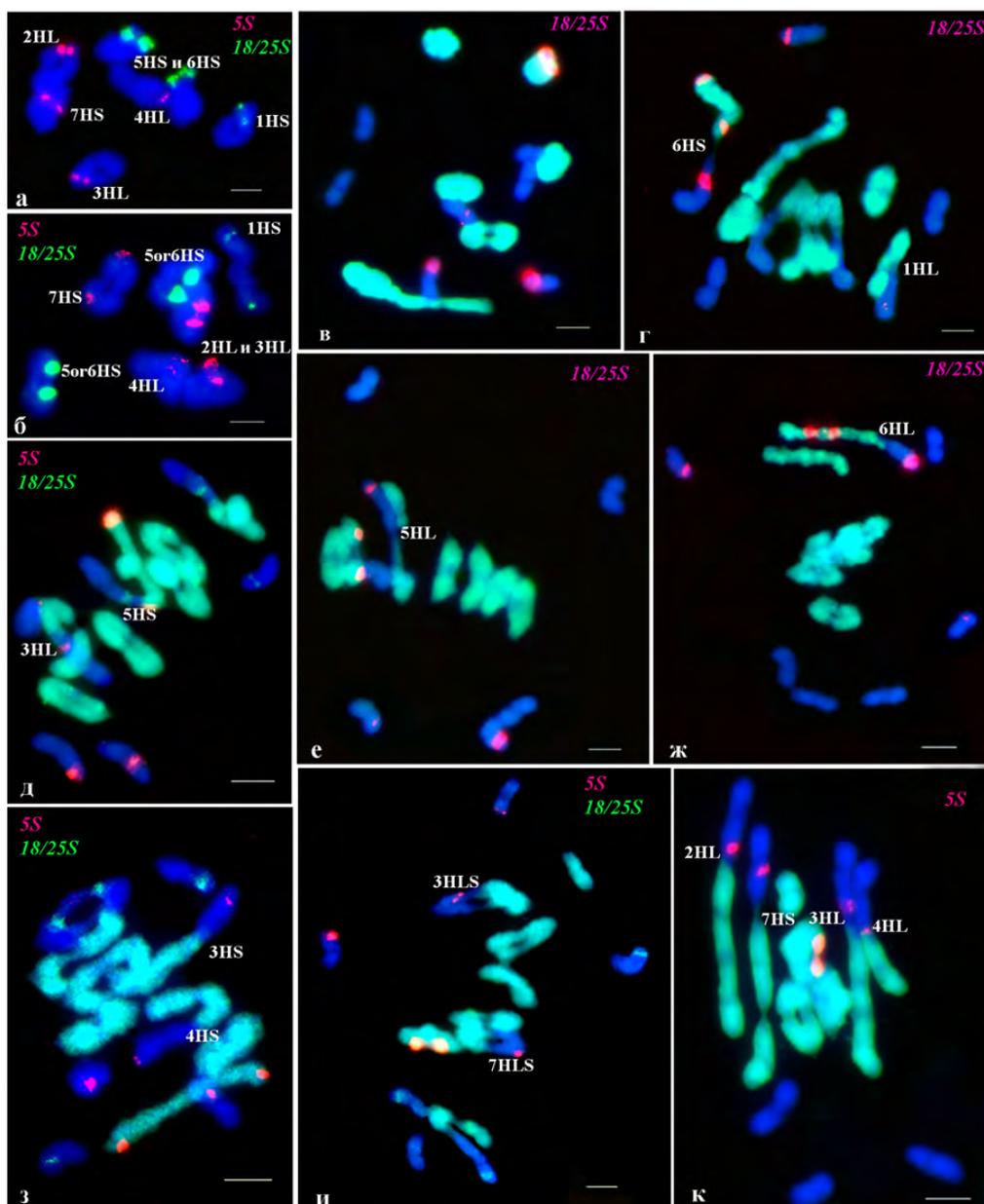


Рис. 1. Гомеологические ассоциации хромосом Hv-Hb в МI мейоза в материнских клетках пыльцы (МКП) триплоидных гибридов *H. Vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb). (GISH с меченой ДНК *H. bulbosum* (DIG – зеленая метка), FISH с хромосомоспецифичными маркерами)

a, б – локализация хромосомных маркеров 5S и 18S/25S на хромосомах ячменя сортов Roland (а) и Borwina (б); **в** – 7 II Hb и 7 I Hv в МКП гибрида F1_RW,4; **г** – 4 III (1HL, 6HS, 2 – не идентифицированы) в МКП гибрида F1_RA,6; **д** – 2 III (3HL, 5HS) в МКП гибрида F1_RA,6; **е** – 1 III (5HL) в МКП гибрида F1_RA,6; **ж** – 1 III (6HL) в МКП гибрида F1_RA, 6; **з** – 2 III (3HS, 4HS) в МКП гибрида F1_2; **и** – 2 II (3HLS, 7HLS) закрытого типа в МКП гибрида F1_2; **к** – 3 III (2HL, 3HL, 7HL) и 1 II открытого типа (4HL) в МКП гибрида F1_RW,2. В скобках приведены плечи хромосом *H. vulgare*, вовлеченные в ассоциации хромосом Hv-Hb. Масштабная линейка = 5µm

Fig. 1. Homoeologous pairing of individual chromosomes at MI of meiosis in pollen mother cells (PMC) of triploid *H. vulgare* × *H. bulbosum* hybrids (HvHbHb). (GISH with labeled *H. bulbosum* DNA (DIG – green labeling), FISH with chromosome-specific markers)

a, b – localization of chromosomal markers 5S and 18S/25S on the chromosomes of barley varieties Roland (a) and Borwina (b); **c** – 7 II Hb and 7 I Hv in MCP of the F1_RW,4 hybrid; **d** – 4 III (1HL, 6HS, 2 – not identified) in PCM of the F1_RA,6 hybrid; **e** – 2 III (3HL, 5HS) in MCP of the F1_RA,6 hybrid; **f** – 1 III (5HL) in PCM of the F1_RA,6 hybrid; **g** – 1 III (6HL) in MCP of the F1_RA,6 hybrid; **h** – 2 III (3HS, 4HS) in PCM of the F1_2 hybrid; **i** – 2 ring II (3HLS, 7HLS) in MCP of the F1_2 hybrid; **j** – 3 III (2HL, 3HL, 7HL) and 1 rod II (4HL) in PMC of the F1_RW,2 hybrid. The arms of *H. vulgare* chromosomes involved in Hv-Hb associations are shown in parentheses. Scale bar = 5µm

В сумме для этих хромосом частота гомеологических ассоциаций с участием длинного плеча выше, чем с участием короткого плеча: 25,00% и 10,71% соответственно. У этого растения частота гомеологических ассоциаций с участием длинного плеча хромосомы 7Н несколько ниже, чем с участием короткого плеча: 10,71 и 14,29, хотя для гибридов F1_RW,2, F1_RA,6, F1_2 отмечена тенденция более частого вовлечения в образование гомеологических ассоциаций длинных плеч хромосом, хотя эта разница не столь очевидна, как в случае хромосомы 5Н. Для хромосом 6Н и 4Н не выявляется четкой тенденции к более высокой частоте вовлечения в образование гомеологических ассоциаций длинного плеча хромосомы, чем короткого.

Обсуждение

H. vulgare и *H. bulbosum* – близкие виды, относящиеся к секции *Hordeum* рода *Hordeum* (Bothmer, Jacobsen, 1985; Bothmer et al., 1991). Геномы этих видов имеют высокую степень сходства, в связи с чем можно ожидать высокую степень ассоциации гомеологических хромосом. Случаи взаимодействия хромосом двух геномов подробно изучены у двух диплоидных гибридов *H. vulgare*(2x) × *H. bulbosum* в серии работ Пиккеринга с соавторами (Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004; Pickering et al., 2005; Pickering et al., 2006a). Показано, что для этих гибридов характерен высокий уровень взаимодействия гомеологов в МI мейоза: в среднем на клетку 6,72 парных ассоциаций у одного гибрида и 6,31 парных взаимодействий гомеологов у другого гибрида (Pickering et al., 2006a). Наши результаты, полученные при изучении триплоидных гибридов, выявили значительно более низкий уровень гомеологического спаривания – около одной конфигурации, образованной с участием гомеологов. Основное число бивалентов – это ассоциации между хромосомами ячменя луковичного. Тетраплоидный *H. bulbosum* (4x) имеет автополиплоидное происхождение (Bothmer et al., 1991). Хромосомы двух геномов этого тетраплоида имеют высокий уровень идентичности и, в случае отсутствия партнера для спаривания в пределах своего генома, хромосомы в мейозе образуют пару с партнером из другого генома Нb. Поэтому у триплоидных гибридов с геномным составом НvНbНb так же, как у тетраплоидов НvНvНbНb, вероятность гомеологического спаривания ниже, чем у диплоидных гибридов. У триплоидов, проанализированных в данном исследовании, частота гомеологического спаривания хромосом культурного ячменя и ячменя луковичного, оказалась сопоставима с этим показателем у ранее изученных нами тетраплоидов (Scholz, Pendinen, 2017).

Анализ частоты спаривания отдельных хромосом у триплоидных гибридов показал, что, несмотря на более низкую частоту межгеномных Нv-Нb ассоциаций, полученные характеристики в целом соответствуют данным, полученным Пиккерингом с соавторами (Pickering

et al., 2004, 2005, 2006a). Одной из причин разной частоты участия в гомеологических ассоциациях разных плеч хромосом, как предполагают авторы, может быть различие в их длине. Для плеча 5НL частота гомеологических ассоциаций была самой высокой из всех длинных плеч у диплоидных гибридов (Pickering, 2006a). Как показали наши исследования, у триплоидных гибридов это плечо хромосомы так же, как у большинства изученных растений, также чаще всего участвует в гомеологических ассоциациях. Как известно, 5НL – самое длинное плечо из всех у хромосом *H. vulgare* (Singh, Tsuchiya, 1982; Fukui, Kakeda, 1990; Brown et al., 1999). В геноме *H. bulbosum* это плечо также имеет наибольшую длину (Linde-Laursen et al. 1992; Bustos et al. 1996). Плечи хромосом 1НS и 5НS являются самыми короткими в геноме *H. vulgare*. В нашем исследовании ассоциации хромосом Нv-Нb с участием плеча 5НS встречаются реже, чем с участием длинного плеча этой хромосомы, а у трех гибридных растений такие ассоциации вообще не выявлены. Что касается плеча 1НS, то ни у одного из изученных триплоидных гибридов не было выявлено межгеномных ассоциаций с участием этого плеча. Ранее при анализе тетраплоидов НbНbНvНv мы также не выявили гомеологических ассоциаций Нv-Нb с участием этого плеча. Длинное и короткое плечи хромосом 4Н, 6Н, и 7Н близки по размеру, возможно, поэтому для этих хромосом не выявляется четкой тенденции, заключающейся в более частом вовлечении в гомеологические ассоциации длинного плеча хромосомы.

Другой фактор, определяющий частоту межгеномной гомеологической ассоциации хромосом, по мнению Пиккеринга (Pickering et al., 2004, 2006a) может быть связано с количеством районов хромосом с высокой рекомбинационной активностью – наличием так называемых «горячих точек» (hotspots) рекомбинации в хромосомах *H. vulgare* (Künzel et al., 2000). Малое количество таких точек выявлено в плече 5НS, в то время как в плече 1НS такие точки не были зарегистрированы, а плечо 5НL *H. vulgare* характеризуется наибольшим количеством горячих точек рекомбинации (Künzel et al., 2000). Возможно, из-за отсутствия горячих точек рекомбинации в коротком плече хромосомы 1Н нам и не удалось выявить гомеологических ассоциаций с участием этого плеча.

Несмотря на невысокую, по сравнению с диплоидными гибридами, частоту ассоциаций Нv-Нb у триплоидных гибридов, гомеологическое спаривание осуществляется и затрагивает плечи всех хромосом, кроме короткого плеча первой хромосомы. Таким образом, на основе таких гибридов возможно получение линий с рекомбинантными хромосомами, несущими генетический материал ячменя луковичного. С использованием триплоидного гибрида, полученного в результате скрещивания *H. vulgare* Igri (2x) × *H. bulbosum* A17 (4x), уже создана серия таких линий, имеющих фенотип культурного ячменя и характеризующихся высокой фертильностью (Scholz et al., 2009; Pendinen et al, 2018). Послед-

нее подтверждает возможность использования гибридов *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b) для интрогрессии генетического материала ячменя луковичного в геном культурного ячменя.

Заключение

В МI мейоза триплоидных гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* (H^vH^bH^b) выявлены межгеномные ассоциации с участием всех плеч хромосом *H. vulgare*, кроме короткого плеча хромосомы 1H. Для хромосомы 5H характерна более высокая частота вовлечения в гомеологичные ассоциации ее длинного плеча по сравнению с коротким плечом. Выявлена тенденция более частого участия длинных плеч других хромосом культурного ячменя в гомеологичных ассоциациях H^v-H^b. Выявление случаев гомеологичного спаривания хромосом в мейозе у триплоидных гибридов свидетельствует о возможности мейотической рекомбинации между хромосомами культурного ячменя и ячменя луковичного. Поскольку у триплоидных гибридов, имеющих соотношение геномов 1H^v : 2H^b, не происходит элиминации хромосом, то возможно привлечение в скрещивания различных образцов родительских видов и получение на их основе генетически разнообразных интрогрессивных линий.

Благодарности/Acknowledgements

Работа выполнена в рамках госзадания № 0662-2019-0006 и двустороннего российско-германского сотрудничества (проект №145). / The present work has been performed within the framework of the State Assignment No. 0662-2019-0006 and of the bilateral Russian-German Cooperation (Project No. 145).

Литература/References/

Bothmer R., Jacobsen N. Origin, taxonomy and related species. In: D. Rasmussen (ed.). Barley. Wisconsin; 1985. p.19-56.

Bothmer R., Jacobsen N., Baden C., Jørgensen, Linde-Laursen I. An ecogeographical study of genus *Hordeum*. Rome: IPGR; 1991. p.127.

Brown S.E., Stephens J.L., Lapitan N.L.V., Knudson D.L. FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L.). *Genome*. 1999;42:274-281. DOI: 10.1139/g98-127

de Bustos, A., Cuadrado A., Soler, C., Jouve N. Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Research*. 1996;4:491-499. DOI: 10.1007/BF02261776

Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: M. Maluszynski et al. (eds.). Doubled haploid production in crop. 2003. p.15-19. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1293-4_3 [accessed Nov. 23, 2020].

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

Fukui K., Kakeda K. Quantitative karyotyping of barley chromosomes

by image analysis methods. *Genome*. 1990;33:450-458. DOI: 10.1139/g90-067

Gottlob-McHugh S., Lvesque M., MacKenzie K., Olson M., Yarosh O., Johnson D. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome*. 1990;33:486-494. DOI: 10.1139/g90-072

Hoseinzadeh P., Ruge-Wehling B., Schweizer P., Stein N., Pidon H. High Resolution Mapping of a *Hordeum bulbosum*-Derived Powdery Mildew Resistance Locus in Barley Using Distinct Homologous Introgression Lines. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:225. DOI: 10.3389/fpls.2020.00225

Ho K.M., Kasha K.J. Genetic Control of Chromosome Elimination during Haploid Formation in Barley. *Genetics*. 1975;81(2):263-275.

Jones I.T., Pickering R.A. The mildew resistance of *Hordeum bulbosum* and its transference into *H. vulgare* genotypes. *Annals of Applied Biology*. 1978;88:295-298. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1978.tb00709.x

Johnston P.A., Pickering R.A. PCR detection of *Hordeum bulbosum* introgression in an *H. vulgare* background using a retrotransposon-like sequence. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104:720-726. DOI: 10.1007/s00122-001-0791-2

Künzel G., Korzun L., Meister A.. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*. 2000;154:397-412. <http://www.genetics.org/cgi/content/full/154/1/397/DC1/>

Lange W.: Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica*. 1971a;20:14-29. DOI: 10.1007/BF00146769

Lange W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica*. 1971b;20:181-194. DOI: 10.1007/BF00056078

Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbooks. 27. BIOS Scientific Publishers: Oxford; 1994.

Linde-Laursen I., Bothmer R. von, Jacobsen N. Relationship in the genus *Hordeum*: Giemsa C-banded karyotypes. *Hereditas*. 1992;116:111-116. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00213.x

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, 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. (H^vH^bH^b). *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. (H^vH^bH^b). *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):16-24). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

Pickering R.A. The production of fertile triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. (2n=2x=14) and *H. bulbosum* L. (2n=4x=28). *Barley Genetics Newsletter*. 1988;18:25-29.

Pickering R.A., Hudakova S., Houben A., Johnston P.A., 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;109:911-916. DOI: 10.1007/s00122-004-1725-6

Pickering R.A., Klatt S., Butler R. Reduced chromosome association between the short arms of 5H homologues in *Hordeum vulgare* L. at metaphase I. *Plant Breeding*. 2005;124:416-418. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2005.01122.x

Pickering R.A., Klatt 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;49:73-78. DOI: 10.1139/G05-071

Pickering R.A., 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;125:576-579. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01253.x
- Pickering R.A., Timmerman G.M., Cromey 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
- 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;107:965-971. DOI: 10.1007/s00122-003-1339-4
- Ruge-Wehling B., Linz A., Habekuß A., Wehling P. Mapping of *Rym16Hb*, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;113(5):867-873. DOI: 10.1007/s00122-006-0345-8
- Scholz M., Pendinen G. The Effect of homoeologous meiotic pairing in tetraploid *Hordeum bulbosum* L. × *H. vulgare* L. hybrids on alien introgressions in offspring. *Cytogenetics and Genome Research*. 2017;150(2):139-149. DOI: 10.1159/000455141
- Scholz M., Ruge-Wehling B., Habekuß A., Schrader O., Pendinen G., Fischer K., Wehling P. *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;119:837-849. DOI: 10.1007/s00122-009-1093-3
- Shtaya M.J.Y., Sillero J.C., Flath K., Pickering R., Rubeales D. The resistance to leaf rust and powdery mildew of recombinant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) derived from *H. vulgare* × *H. bulbosum* crosses. *Plant Breeding*. 2007;126:259-267. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01328.x
- Singh R.J., Tsuchiya T. Identification and designation of telocentric chromosomes in barley by means of Giemsa N-banding technique. *Theoretical and Applied Genetics* 1982;64:13-24. DOI: 10.1007/BF00303644
- Yakura K., Tanifuji S. Molecular cloning and restriction analysis of *EcoRI*-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiology*. 1983;24:1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650
- Zhang L., Pickering R., Murray B. Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*. 1999;83:304-309. DOI: 10.1038/sj.hdy.6885710