

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Получение и изучение линии с замещением хромосомы 4В пшеницы *Triticum aestivum* L. на хромосому 4Н^{mar} дикого ячменя *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)

Л.А. Першина^{1,2}✉, Н.В. Трубачеева^{1,2}, В.К. Шумный¹, Е.Д. Бадаева³

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ pershina@bionet.nsc.ru

Аннотация. Интрогрессивная гибридизация является основным методом расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы. В качестве источника новых генов для мягкой пшеницы может служить дикий ячмень *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ($2n = 4x = 28$), который характеризуется высокой устойчивостью к стрессовым факторам. Настоящая работа посвящена изучению возможности использования неполного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)–*T. aestivum* (Пиротрикс 28) ($2n = 54$), носителя цитоплазмы дикого ячменя, в качестве источника хромосом *H. marinum* для их интрогрессии в геном мягкой пшеницы. С этой целью получены гибриды между линией сорта мягкой пшеницы Пиротрикс 28 (далее П28) и неполным амфиплоидом, а затем среди потомков гибридов проведен отбор цитогенетически стабильных 42-хромосомных растений с высоким уровнем фертильности. С использованием GISH-анализа обнаружено наличие пары хромосом *H. marinum* в геноме этих растений. По результатам С-окрашивания хромосом установлено, что у этой гибридной линии произошло замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на хромосому дикого ячменя 4Н^{mar}. С помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров *Xgwm368* и *Xgwm6* подтверждено отсутствие хромосомы 4В мягкой пшеницы, а с применением EST-маркеров *BAWU808* и *BAW112* – наличие хромосомы 4Н^{mar} в геноме выделенной дисомной пшенично-ячменной линии. Изучение этой линии показало, что замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на хромосому дикого ячменя 4Н^{mar} привело к изменению ряда признаков: сильно выраженной антоциановой окраске coleoptile, характерной для дикого ячменя *H. marinum*, а также отсутствию пурпурной окраски ушек у основания листьев, которая проявляется у линии сорта пшеницы П28. По высоте растений, числу стеблей и колосьев в растении, числу колосков и зерен в главном колосе, а также числу зерен в растении линия 4Н^{mar}(4В) превосходит родительскую линию П28, а по массе 1000 зерен ей уступает. Цитогенетическая стабильность и фертильность линии 4Н^{mar}(4В) указывают на высокую компенсационную способность хромосомы 4Н^{mar} ячменя по отношению к хромосоме 4В мягкой пшеницы и гомеологию между этими хромосомами.

Ключевые слова: *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum*; мягкая пшеница; пшенично-ячменная замещенная линия 4Н^{mar}(4В).

Для цитирования: Першина Л.А., Трубачеева Н.В., Шумный В.К., Бадаева Е.Д. Получение и изучение линии с замещением хромосомы 4В пшеницы *Triticum aestivum* L. на хромосому 4Н^{mar} дикого ячменя *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):545-552. DOI 10.18699/VJGB-23-66

Development and characterization of a line with substitution of chromosome 4B of wheat *Triticum aestivum* L. on chromosome 4Н^{mar} of wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)

Л.А. Pershina^{1,2}✉, N.V. Trubacheeva^{1,2}, V.K. Shumny¹, E.D. Badaeva³

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomics Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ pershina@bionet.nsc.ru

Abstract. Introgressive hybridization is the main method of broadening the genetic diversity of bread wheat. Wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ($2n = 4x = 28$) has useful agronomical traits, such as high resistance to stress factors, that could be a potential source of new genes for bread wheat improvement. This study aimed to evaluate the possibility of introgression of *H. marinum* chromosomes into the genome of bread wheat using an incomplete amphiploid *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)–*T. aestivum* (Pyrotrix 28) ($2n = 54$) carrying the cytoplasm of wild barley. For this purpose, we crossed the line of bread wheat variety Pyrotrix 28 with an incomplete amphiploid, and then selected cytogenetically stable 42-chromosome plants with a high level of fertility in hybrid progeny. Genomic *in situ*

hybridization (GISH) revealed a pair of *H. marinum* chromosomes in the genome of these plants. C-banding analysis confirmed that bread wheat chromosome 4B was replaced by wild barley chromosome 4H^{mar}. SSR markers *Xgwm368* and *Xgwm6* confirmed the absence of chromosome 4B, and EST markers *BAWU808* and *BAW112* identified chromosome 4H^{mar} in the genome of the isolated disomic wheat-barley substitution line. The study of this line showed that the substitution of chromosome 4B with chromosome 4H^{mar} resulted in a change of some morphological traits. It included intense anthocyanin coleoptile coloration, specific for *H. marinum*, as well as a lack of purple coloration of the ears in the leaf sheath, specific for Pyrotrix 28. Line 4H^{mar}(4B) showed increased performance for several traits, including plant height, number of spikes and tillers per plant, spikelet and grain number in the main spike, grain number per plant, but it had decreased values of 1000-grain weight compared to wheat. Cytogenetic stability and fertility of line 4H^{mar}(4B) indicated a high compensation ability of barley 4H^{mar} for wheat chromosome 4B and confirmed their homeology.

Key words: *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum*; bread wheat; wheat-barley substitution line 4H^{mar}(4B).

For citation: Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Shumny V.K., Badaeva E.D. Development and characterization of a line with substitution of chromosome 4B of wheat *Triticum aestivum* L. on chromosome 4H^{mar} of wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6): 545–552. DOI 10.18699/VJGB-23-66

Введение

Интрогрессивная гибридизация – основной метод увеличения генетического разнообразия мягкой пшеницы, а выявление источников новых генов, определяющих хозяйственно ценные признаки, такие как устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, улучшенные хлебопекарные качества, повышенное содержание микроэлементов в зерне и др., представляет собой актуальную задачу (Molnár-Láng, Linc, 2015; Hao et al., 2020). Виды рода *Hordeum* L., к которым относятся однолетние и многолетние ячменные травы, а также виды зернового типа рассматриваются в качестве одного из таких источников (Garthwaite et al., 2005; Rubiales, Moral, 2011).

Проведение гибридизации между видами ячменя и пшеницы стало возможным с развитием методов преодоления прогамной и эмбриональной несовместимости, сильно выраженной при скрещиваниях видов этих родов (Kruse, 1973). К настоящему времени получены пшенично-ячменные замещенные, дополненные и транслокационные линии с участием хромосом *Hordeum vulgare* (Molnár-Láng et al., 2014), *H. spontaneum* (Taketa, Takeda, 2001), *H. chilense* (Rey et al., 2015), *H. californicum* (Fang et al., 2014), а также аллоплазматические линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, которые используются в селекции для создания перспективных форм и сортов пшеницы (Першина и др., 2018). Кроме того, на основе гибридов *H. chilense* с мягкой и твердой пшеницей создана новая зерновая культура тритордеум (Martín et al., 1999; Martín, 2017).

Способность к скрещиванию с пшеницей проявляют и два подвида из комплекса ячменя морского *H. marinum*: травянистые однолетники *H. marinum* Hudson ssp. *marinum* (2x) и *H. marinum* Hudson ssp. *gussoneanum* (Parl.) Thell. (2x, 4x) (Першина и др., 2004; Islam et al., 2007). Благодаря высокой устойчивости к засолению и заболачиванию эти виды способны произрастать на засоленных лугах и болотах вдоль морских побережий (Garthwaite et al., 2005; Islam et al., 2007). При этом устойчивость к засолению у *H. marinum* оценивается выше, чем у других представителей Triticeae (Garthwaite et al., 2005). Кроме того, у *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (= *H. geniculatum* All.) (2n = 28) отмечена устойчивость к засухе и резким перепадам температуры (Кобылянский, 1967), а также выделены образцы с высоким содержанием белка в семенах (Першина и др., 2009).

На основе ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x) × *T. aestivum* (Першина и др., 2004) и *H. marinum* (2x) × *T. aestivum* (Islam et al., 2007) получены амфилоиды, несущие цитоплазму дикого ячменя. По сравнению с родительскими генотипами у амфилоидов промежуточные показатели солеустойчивости и устойчивости к заболачиванию (Islam et al., 2007; Malik et al., 2009), а по сравнению с пшеницей у них понижена продуктивность. Такое проявление признаков у амфилоидов может быть обусловлено негативным влиянием цитоплазмы *H. marinum*. Чтобы устранить это влияние, необходимо получение эуплазматических гибридных генотипов, у которых пшеница – материнская форма. Однако использование *H. marinum* ssp. *gussoneanum* в качестве опылителя при скрещивании с пшеницей крайне затруднено из-за образования ограниченного количества пыльцы в мелких цветках *H. marinum*.

В настоящей работе приведены результаты использования неполного амфилоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (2n = 54), носителя цитоплазмы дикого ячменя, в качестве источника хромосом *H. marinum* для интрогрессии их в геном мягкой пшеницы, а также охарактеризована выделенная среди потомков этих гибридов эуплазматическая пшенично-ячменная дисомная линия 4H^{mar}(4B).

Материалы и методы

Растительный материал и условия его изучения. Выполнена гибридизация между линией, сформированной от одного растения сорта яровой мягкой пшеницы Пиротрикс 28 (материнский генотип, П28), и отдельными растениями неполного амфилоида Л-503 *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (Пиротрикс 28) (2n = 54). Неполный амфилоид, выделенный среди потомков цитогенетически нестабильного амфилоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (2n = 68–70), содержит 42 хромосомы пшеницы и 12 хромосом *H. marinum*, за исключением пары хромосом 5H^{mar} (Trubacheeva et al., 2019).

Из семян, завязавшихся в двух гибридных комбинациях (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10), были выращены растения, а их потомки изучены в поколениях F₂–F₆. Каждое поколение формировали из семян наиболее продуктивного растения предыдущего поколения. Растения характеризо-

вали по завязываемости семян в главном колосе, разделяя их по уровню фертильности на группы: ПС – полностью стерильные (нет зерен); ЧС – частично стерильные (1–9 зерен); ЧФ – частично фертильные (10–19); Ф – фертильные (20–30); ПФ – полностью фертильные (более 30 зерен). Начиная с поколения F₂, у растений подсчитывали число хромосом. У эуплоидных (2n = 42) растений F₅ гибрида (П28 × 503р10) определяли хромосомный состав в метафазе I (МI). Цитогенетически стабильные эуплоидные растения включали в исследования по идентификации хромосом *H. marinum* ssp. *gussoneanum*. Гибридизацию и изучение потомков гибридов проводили в гидропонной теплице.

Выделенная пшенично-ячменная замещенная линия 4Н^{mar}(4В) была изучена на полевом участке. Растения выращивали на делянках шириной 1 м по 20 растений в ряду, с расстоянием между рядами 25 см. Контролем служила родительская линия сорта яровой мягкой пшеницы Пиротрикс 28. Каждый генотип выращивали по три ряда, расположенных в рандомизированном порядке. Выполнена оценка линий по морфологическим признакам. Во время уборки определяли высоту растений, число побегов, число продуктивных колосьев, длину главного колоса, число колосков в главном колосе, число зерен в главном колосе и растении. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2007. Использован однофакторный дисперсионный анализ с последующим вычислением наименьшей существенной разности (НСР) (Доспехов, 1985).

Цитологический анализ, геномная *in situ* гибридизация и С-окрашивание хромосом. Анализ числа хромосом выполняли по стандартной методике приготовления препаратов по Фельгену с использованием кончиков корешков растений, выращиваемых в гидропонной теплице. Характер конъюгации в МI мейоза материнских клеток пыльцы (МКП) изучали на временных давленных препаратах при окрашивании 2 % ацетокармином. Геномную *in situ* гибридизацию (GISH) осуществляли в соответствии с ранее опубликованной методикой (Trubacheeva et al., 2019). В качестве зонда для гибридизации использовали меченную биотином геномную ДНК *H. marinum* ssp. *gussoneanum*. Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioImagerM1 (Zeiss, Германия). Работа выполнена при использовании оборудования ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН. С-окрашивание хромосом проводили по ранее опубликованному протоколу (Badaeva et al., 1994).

Молекулярные методы исследований. EST-маркеры *BAWU808* и *BAW112*, эффективность которых для выявления хромосомы 4Н^{mar} показана ранее в работе (Trubacheeva et al., 2019), использовали для подтверждения ее наличия в геноме растений выделенной линии. Отсутствие хромосомы 4В мягкой пшеницы у пшенично-ячменной замещенной линии 4Н^{mar}(4В) подтверждали с помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров *Xgwm368* и *Xgwm6*, разработанных для мягкой пшеницы (Röder et al., 1998). Структура праймеров и условия ПЦР описаны ранее (Trubacheeva et al., 2019). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Bio-Rad T-100 Thermal Cycler, разделение продуктов ПЦР – в 1.5–2.5 %

агарозном геле, содержащем бромистый этидий, визуализацию – с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Результаты

Выявление эуплоидных растений среди потомков гибридов (П28 × Л-503)

В результате скрещивания линии пшеницы П28 с неполным амфилоидом Л-503 в четырех гибридных комбинациях с частотой от 3.1 до 6.6 % завязались щуплые зерна, из которых были выращены растения F₁ (табл. 1).

Щуплые зерна, завязавшиеся у растений F₁, проявили всхожесть у гибрида (П28 × 503р5) с частотой 13.9 %, а у гибрида (П28 × 503р10) – с частотой 55.5 %. Со второго поколения у потомков этих гибридов изучен уровень фертильности, оцененный по числу зерен, завязавшихся в главном колосе, и проанализировано число хромосом (табл. 2).

Поклоение F₂ гибридной комбинации (П28 × 503р5) было представлено частично фертильными (33 %) растениями с числом хромосом 2n = 46, а также стерильными (45 %) и частично стерильными (22 %), среди которых были выявлены 46- и 48-хромосомные растения. Поклоение F₃, сформированное от частично фертильного растения (2n = 46), также состояло из стерильных (31 %), частично стерильных (44 %) и частично фертильных (25 %) растений. Лучшим по продуктивности в F₃ было 44-хромосомное растение, среди потомков которого в поколении F₄ наряду со стерильными (18 %), частично стерильными (41 %) и частично фертильными (27 %) отмечены и фертильные (14 %) растения. Среди потомства поколения F₄ найдены 42- и 44-хромосомные растения. В поколениях F₅ и F₆, сформированных от фертильных 42-хромосомных растений, помимо эуплоидов (2n = 42), обнаружены и анеуплоиды (2n = 41; 2n = 43). При этом по-прежнему наблюдалось расщепление на растения с разным уровнем фертильности, в том числе и стерильные (см. табл. 2). Растения с полной фертильностью появились только в поколении F₆ (6 %).

При отборе по продуктивности у гибридной комбинации (П28 × 503р10) происходило более ускоренное образование 42-хромосомных цитотипов с высоким уровнем фертильности. Уже в F₂ при наличии стерильных (13 %), частично стерильных (27 %) и частично фертильных (49 %) растений были выявлены и 46-хромосомные фертильные (20 %) растения. Остальные группы растений были представлены цитотипами с числами хромосом 2n = 46, 46 + t, 46 + 2t. Потомками 46-хромосомного растения в F₃ были стерильные (6 %), частично стерильные (38 %), частично фертильные (25 %), а также 42-хромосомные фертильные (31 %) растения. В F₃, кроме эуплоидов, обнаружены анеуплоиды, в том числе с телоцентрическими хромосомами (2n = 43, 43 + t, 44 + t, 44 + 2t).

Среди 26 растений поколения F₄, сформированного от 42-хромосомного растения поколения F₃, преобладали фертильные растения (62 %) при наличии растений с полной фертильностью (11 %). В общей сложности в F₄ комбинации (П28 × 503р10) полностью стерильные (8 %) растения и растения с низким уровнем фертильности (ча-

Таблица 1. Характеристика гибридных комбинаций (П28 × Л-503) по завязываемости зерен в колосе, числу зерен у растений F₁ и их всхожести

Гибридная комбинация	Число и частота* (%) гибридных зерен в опыленном колосе	Число		Всхожесть зерен, %
		изученных растений F ₁	зерен в растении F ₁	
П28 × 503p5	1 (3.3)	1	129	13.9
П28 × 503p9	1 (3.1)	1	2	0
П28 × 503p10	2 (6.6)	2	18	55.5
П28 × 503p22	1 (4.0)	1	0	–

* От числа опыленных цветков.

Таблица 2. Уровень фертильности и число хромосом у растений F₁–F₆ гибридной комбинации *T. aestivum* (П28) (2n = 42) × (*H. marinum* ssp. *gussoneanum* × П28) (2n = 54)

Поколение	Изучено растений	Число и частота (%) растений					Число хромосом
		ПС 0	ЧС (1–9) [#]	ЧФ (10–19) [#]	Ф (20–30) [#]	ПФ (более 30) [#]	
П28 × 503p5							
F ₂	18	8 (45 %)	4 (22 %)	6 (33 %)	0	0	46*, 48
F ₃	16	5 (31 %)	7 (44 %)	4 (25 %)	0	0	44*, 46
F ₄	22	4 (18 %)	9 (41 %)	6 (27 %)	3 (14 %)	0	42*, 44
F ₅	28	5 (18 %)	6 (21 %)	8 (29 %)	9 (32 %)	0	41, 42*, 43
F ₆	32	2 (6 %)	4 (13 %)	10 (31 %)	14 (44 %)	2 (6 %)	41, 42, 43
П28 × 503p10							
F ₂	15	2 (13 %)	4 (27 %)	6 (40 %)	3 (20 %)	0	46*, 46 + t, 46 + 2t
F ₃	16	1 (6 %)	6 (38 %)	4 (25 %)	5 (31 %)	0	42*, 43, 43 + t, 44 + t, 44 + 2t
F ₄	26	2 (8 %)	3 (11 %)	2 (8 %)	16 (62 %)	3 (11 %)	41, 42*, 42 + t
F ₅	30	0	0	0	21 (70 %)	9 (30 %)	42*, 42 + t, 42 + 2t
F ₆	38	0	0	0	6 (16 %)	32 (84 %)	42, 42 + t

[#] Число зерен в главном колосе; * наиболее продуктивные цитотипы, использованные для формирования следующего поколения.**Таблица 3.** Цитологическая характеристика линий, выделенных из гибридной комбинации (П28 × 503p10) F₆

Линия	Изучено растений	Растения с конфигурацией хромосом в М1 мейоза		
		21''	20'' + 2'	21'' + t''
(П28 × 503p10) F ₆ p1	18	18 (100 %)	–	–
(П28 × 503p10) F ₆ p2	19	15 (79 %)	4 (21 %)	–
(П28 × 503p10) F ₆ p3	18	16 (89 %)	–	2 (12 %)

стично стерильные – 11 % и частично фертильные – 8 %) составляли лишь менее одной трети. Остальные растения были фертильными (62 %) и полностью фертильными (11 %). В F₄ среди изученных растений обнаружены цитотипы с 2n = 41, 42, 42 + t. В результате отбора наиболее продуктивных 42-хромосомных растений поколения F₅ и F₆ были представлены только фертильными растениями (в F₅ – 70 %, а в F₆ – 16 %) и растениями с полной фертильностью (в F₅ – 30 %, а в F₆ – 84 %) (см. табл. 2).

Чтобы произвести отбор мейотически стабильных 42-хромосомных растений для дальнейшей работы, три

линии, сформированные от отдельных растений гибрида П28 × 503p10 из поколения F₆, были охарактеризованы по конфигурации хромосом в М1 мейоза. Анализ М1 мейоза МКП показал, что эти эуплоидные линии характеризуются стабильным мейозом. Все изученные растения линии (П28 × 503p10) F₆ p1 и основная часть растений линии (П28 × 503p10) F₆ p2 (79 %) и линии (П28 × 503p10) F₆ p3 (89 %) имеют конфигурацию хромосом 21'' (табл. 3). Выявленные нарушения связаны с наличием унивалентов (20'' + 2'), в том числе с участием телоцентрических хромосом (21'' + 2t').

Идентификация пшенично-ячменной дисомной замещенной линии 4Н^{mar}(4В)

На следующем этапе в работу были включены растения с конфигурацией хромосом 21". С использованием GISH-анализа показано, что они содержат пару хромосом *H. marinum* (рис. 1).

Этот результат указывает на то, что в процессе образования эуплоидных форм у самоопыленных потомков гибрида (П28 × 503р10) произошла интрогрессия пары хромосом *H. marinum* в геном мягкой пшеницы. На основании данных С-окрашивания хромосом у выделенной линии подтверждено присутствие пары хромосом ячменя и установлен тип замещения 4Н^{mar}(4В) (рис. 2, а). Кроме того, с помощью С-окрашивания хромосом определена принадлежность телоцентрической хромосомы, которая оказалась производной хромосомы 4Н^{mar} ячменя *H. marinum* (см. рис. 2, б).

Молекулярный анализ подтвердил наличие 4Н^{mar} хромосомы ячменя *H. marinum* и отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4В в геноме дисомных пшенично-ячменных линий, выделенных среди самоопыленных потомков гибридной комбинации (П28 × 503р10). Отсутствие у этих линий продуктов амплификации SSR-маркеров, локализованных на хромосоме 4В пшеницы (рис. 3, а), и наличие маркеров хромосомы 4Н^{mar} хромосомы ячменя *H. marinum* (см. рис. 3, б) оценивали как замещение соответствующей хромосомы пшеницы гомеологической хромосомой дикого ячменя. В качестве контроля использована ДНК родительской линии пшеницы П28 и дикого ячменя *H. marinum*.

Характеристика дисомной пшенично-ячменной замещенной линии 4Н^{mar}(4В)

У растений линии 4Н^{mar}(4В) выявлены фенотипические признаки, отличные от родительской линии мягкой пшеницы Пиротрикс 28. Это сильно выраженная антоциановая окраска колеоптиле, характерная для дикого ячменя *H. marinum* (рис. 4, а), а также отсутствие пурпурной окраски ушек у основания листьев (см. рис. 4, б).

Замещение хромосомы 4В пшеницы на хромосому 4Н^{mar} дикого ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x) привело к развитию жизнеспособных растений, у которых значения показателей ряда количественных признаков были выше, чем у родительской линии Пиротрикс 28. По высоте растений и значениям показателей отдельных признаков, определяющих продуктивность растений, различия между линией 4Н^{mar}(4В) и родительской линией достоверны (табл. 4). Так, по высоте растений, числу побегов и колосьев в растении, длине колоса, числу колосков в колосе, числу зерен в колосе и растении линия 4Н^{mar}(4В) превосходит П28, а по массе 1000 зерен – уступает. На рис. 5 и 6 представлены колосья и зерна соответственно.

Обсуждение

Источниками генов дикорастущих сородичей для интрогрессивной гибридизации могут выступать не только исходные виды, но и полученные с их участием синтетические формы пшеницы (Давоян и др., 2012; Molnár-Láng, Linc, 2015; Li et al., 2018). В гибридизации с пшеницей тритордиум используют с целью переноса в геном пшеницы хромосом *H. chilense* (Martin, 2017), а тритикале – хромосом ржи (Щапова, Кравцова, 1990).

Ранее в наших работах амфиплоид *H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum* (2n = 70), носитель цитоплазмы дикого ячменя, был использован в качестве материнской формы в скрещиваниях с мягкой пшеницей при получении аллоплазматических дисомных пшенично-ячменных замещенных 7Н^{mar}(7В), 7Н^{mar}(7D), 7Н^{mar}L(7D) линий, а также дителосомных дополненных 2n = 42 + 2t (7Н^{mar}L) линий (Першина и др., 2004; Trubacheeva et al., 2019). В настоящей работе отдельные растения неполного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum* (2n = 54), носителя цитоплазмы дикого ячменя, использованы в качестве опылителей при скрещивании с линией П28 с целью интрогрессии генетического материала *H. marinum* в эуплазматическую генотипическую среду мягкой пшеницы. Частота

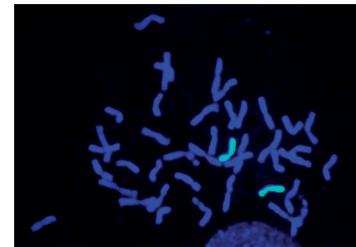


Рис. 1. Геномная *in situ* гибридизация линии с замещением пары хромосом пшеницы на пару хромосом *H. marinum* (окрашены зеленым цветом).

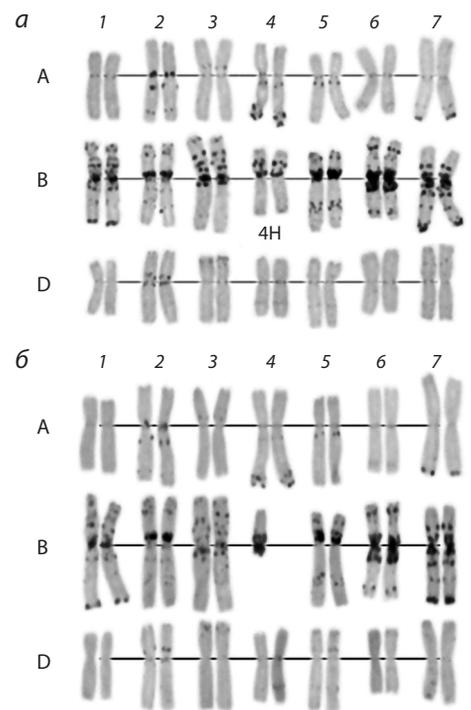


Рис. 2. С-окрашивание хромосом: а – линии с замещением хромосом 4Н^{mar}(4В) (2n = 42); б – линии с замещением хромосом 4Н^{mar}L (2n = 40 + t).

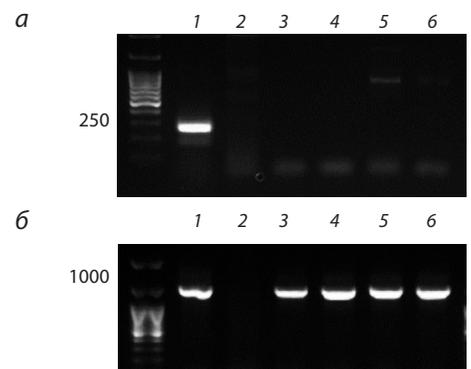


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием молекулярных маркеров.

а – SSR-маркер *Xgwm368*. 1 – *T. aestivum*; 2 – *H. marinum*; 3–6 – растения линии 4Н(4В); б – EST-маркер *BAWU808*. 1 – *H. marinum*; 2 – *T. aestivum*; 3–6 – растения линии 4Н(4В). Цифрами указана длина фрагмента в п. н.



Рис. 4. Колеоптиле (а); ушки у основания листа (б).
1 – линия 4H^{mar}(4B); 2 – линия мягкой пшеницы Пиротрикс 28.



Рис. 5. Колосья: 1 – линии мягкой пшеницы П28; 2–4 – линии 4H^{mar}(4B).



Рис. 6. Зерна: 1 – линии мягкой пшеницы П28; 2 – линии 4H^{mar}(4B).

завязываемости гибридных семян была низкой, но часть гибридных растений F₁ оказались жизнеспособными, а у двух гибридов F₁ (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10), завязались зерна, которые проросли. Это позволило, начиная с поколения F₂, провести отбор по продуктивности в ряду самоопыленных поколений данных гибридов с целью выявления эуплоидных (2n = 42) растений с высоким уровнем фертильности.

Анализ полученных данных показал различия между потомками гибридов (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10) по характеру формообразования и скорости цитологической стабилизации. Этот процесс проходил медленнее в гибридной комбинации (П28 × 503р5) по сравнению с (П28 × 503р10). Так, у потомков 42-хромосомных растений гибрида (П28 × 503р5) еще в поколениях F₅ и F₆ происходило расщепление на растения с разным уровнем фертильности, включая полностью стерильные. В F₆ только половина из 32 растений были фертильными и с полной фертильностью, остальные растения – стерильные, частично стерильные и частично фертильные. У гибридной комбинации (П28 × 503р10), напротив, уже в поколениях F₅ и F₆ формировались только фертильные растения или растения с полной фертильностью. Кроме того, у потомков гибрида (П28 × 503р10), в отличие от (П28 × 503р5), происходило образование телоцентрических хромосом. Такие результаты согласуются с данными исследователей, которые подчеркивали уникальность потомства каждого гибридного зерна как источника разнообразия при формообразовании у отдаленных гибридов (Щапова, Кравцова, 1990).

Как следует из полученных результатов, процесс стабилизации кариотипов 42-хромосомных форм в потомстве гибрида (П28 × 503р10) F₆ сопровождался замещением пары хромосом пшеницы на пару хромосом *H. marinum*. Это показали данные GISH-анализа, С-окрашивания хромосом и молекулярного анализа. У цитогенетически стабильных эуплоидных растений идентифицировано замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на 4H^{mar} хромосому *H. marinum*. Кроме того, обнаружено участие 4H^{mar} хромосомы в образовании телоцентриков.

Характер пшенично-ячменного замещения подтверждается и морфологическими признаками, которые обнаружены у линии 4H^{mar}(4B). Отсутствие пурпурной окраски ушек в основании листьев линии 4H^{mar}(4B) указывает на отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4В, поскольку этот признак контролируется геном *Ra2*, локализованным именно на этой хромосоме (Melz, Thiele, 1990), и проявляется у Пиротрикс 28. Формирование более мелкого

Таблица 4. Характеристика дисомной пшенично-ячменной замещенной линии 4H^{mar}(4B) по агрономическим признакам

Генотип	Высота растений, см	Число		Длина колоса	Число			Масса 1000 зерен
		побегов	колосьев		колосков в колосе	зерен в колосе	зерен в растении	
4H ^{mar} (4B)	133.63*	9.11*	5.6*	11.9*	22.3*	63.0*	236*	32.51*
П28	123.73	4.5	3.8	8.3	17.0	43.9	138.3	39.77
НСР ₀₅	3.63	2.2	0.8	0.94	0.8	4.56	41.32	3.44

* p < 0.05.

зерна у замещенной линии 4Н^{mar}(4В) можно связать как с отсутствием хромосомы 4В, которая оказывает влияние на размер и форму зерна у пшеницы (Rahman et al., 2020), так и с влиянием хромосомы 4Н^{mar} вида *H. marinum*, принадлежащего к мелкосеменным ячменным травам (Bothmer et al., 1991).

У линии 4Н^{mar}(4В) присутствовал четкий фенотипический маркерный признак, характерный для *H. marinum*, – это антоциановая окраска колеоптиле, отсутствующая у родительской линии П28 и ранее обнаруженная у аллоплазматической пшенично-ячменной замещенной линии 7Н^{mar}(7D) (Khlestkina et al., 2011). Накопление антоциана в вегетативных органах растений связано с устойчивостью к стрессовым факторам, а у пшеницы способность накапливать антоциан в колеоптиле контролируется геном *Rc* (red coleoptile) (Khlestkina et al., 2011). В связи с этим линия 4Н^{mar}(4В) в перспективе может представлять интерес для исследований устойчивости к абиотическим факторам, характерной для *H. marinum* (Garthwaite et al., 2005; Islam et al., 2007; Malik et al., 2009).

Установлено, что хромосомы 4-й гомеологической группы других видов ячменя также обладают признаками, важными для селекционных программ. Так, хромосома 4Н^{ch} дикого вида ячменя *H. chilense* оказывает влияние на устойчивость к *Septoria tritici* и к засолению (Said, Cabrera, 2009), а хромосома 4Н культурного ячменя *H. vulgare* в отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4D у дисомной пшенично-ячменной замещенной линии пшеницы 4Н(4D) повышает эффективность использования воды, что приводит к засухоустойчивости пшеницы (Molnár et al., 2007). Полученная в нашей работе линия 4Н^{mar}(4В) может представлять практический интерес, так как характеризуется высокими показателями признаков урожайности. По числу колосьев, длине колоса, числу колосков в колосе, числу зерен в колосе и растении линия 4Н^{mar}(4В) превосходит реципиент – линию пшеницы Пиротрикс 28. Эти результаты, как и цитогенетическая стабильность линии 4Н^{mar}(4В), свидетельствуют о гомеологии хромосомы 4Н^{mar} дикого ячменя *H. marinum* и хромосомы 4В мягкой пшеницы, а также указывают на высокую компенсационную способность хромосомы 4Н^{mar} по отношению к хромосоме 4В мягкой пшеницы.

Заключение

Таким образом, показана эффективность использования неполного амфилоида (*H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum*) ($2n = 54$), носителя цитоплазмы дикого ячменя, для переноса хромосом *H. marinum* в эуплазматическую генотипическую среду мягкой пшеницы.

Список литературы / References

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):44–51.
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zabanova Y.S. The use of synthetic forms in the preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2:480–485. DOI 10.1134/S2079059712060044.]

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985.
[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiments (With the Basics of Statistical Processing of Research Results. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

Кобылянский В.Д. Биологические особенности диких видов ячменя применительно к задачам селекции. *Биол. журн. Армении*. 1967;20(10):41–51.
[Kobylyanskiy V.D. Biological characters of wild barley species in relation to aims of breeding. *Biologicheskii Zhurnal Armenii = Armenian Journal of Biology*. 1967;20(10):41–51. (in Russian)]

Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Раковцева Т.С., Шумный В.К. Проявление фертильности в процессе формообразования у самоопыленных беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфидиплоидов [*Hordeum geniculatum* All. ($2n = 28$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$)] ($2n = 70$). *Генетика*. 2004;40(5):636–641.
[Persheina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P., Rakhovtseva T.S., Shumny V.K. Expression of fertility during morphogenesis in self-pollinated backcrossed progenies of barley-wheat amphiploids [*Hordeum geniculatum* All. ($2n = 28$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$)] ($2n = 70$). *Russ. J. Genet.* 2004;40:510–514. DOI 10.1023/B:RUGE.0000029153.61243.c2.]

Першина Л.А., Девяткина Э.П., Белова Л.И., Трубачеева Н.В., Арбузова В.С., Кравцова Л.А. Изучение особенностей аллоплазматических пшенично-ячменных замещенных и дополненных линий (*Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum*)-*Triticum aestivum*. *Генетика*. 2009;45(10):1386–1392.
[Persheina L.A., Devyatkina E.P., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Arbuzova V.S., Kravtsova L.A. Features of alloplasmic wheat-barley substitution and addition lines (*Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum*)-*Triticum aestivum*. *Russ. J. Genet.* 2009;45(10):1223–1229. DOI 10.1134/S102279540910010X.]

Першина Л.А., Белова Л.И., Трубачеева Н.В., Осадчая Т.С., Шумный В.К., Белан И.А., Росеева Л.П., Немченко В.В., Абакумов С.Н. Аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* с транслокацией 1RS.1BL: исходные генотипы для создания сортов яровой мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(5):544–552. DOI 10.18699/VJ18.393.
[Persheina L.A., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Osadchaya T.S., Shumny V.K., Belan I.A., Rosseeva L.P., Nemchenko V.V., Abakumov S.N. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL translocation: initial genotypes for production of common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(5):544–552. DOI 10.18699/VJ18.393. (in Russian)]

Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990.
[Shchapova A.I., Kravtsova L.A. Cytogenetics of Wheat-rye Hybrids. Novosibirsk: Nauka Publ., 1990. (in Russian)]

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192:117–145. DOI 10.1007/BF00985912.

Bothmer R.V., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R.B., Linde-Laurson I. An Ecogeographical Study of the Genus *Hordeum*. Rome: IBPGR, 1991.

Fang Y., Yuan J., Wang Z., Wang H., Xiao J., Yang Z. Development of *T. aestivum* L.–*H. californicum* alien chromosome lines and assignment of homoeologous groups of *Hordeum californicum* chromosomes. *J. Genet. Genomics*. 2014;41(8):439–477. DOI 10.1016/j.jgg.2014.06.004.

Garthwaite A.J., von Bothmer R., Colmer T.D. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl[–] into the shoots. *J. Exp. Bot.* 2005;56(419):2365–2378. DOI 10.1093/jxb/eri229.

- Hao M., Zhang L., Ning S., Huang L., Yuan Z., Wu B., Yan Z., Dai S., Jiang B., Zheng Y., Liu D. The resurgence of introgression breeding, as exemplified in wheat improvement. *Front. Plant Sci.* 2020;11:252. DOI 10.3389/fpls.2020.00252.
- Islam S., Malik A.I., Islam A.K.M.R., Colmer T.D. Salt tolerance in a *Hordeum marinum*–*Triticum aestivum* amphiploid, and its parents. *J. Exp. Bot.* 2007;58(5):1219–1229. DOI 10.1093/jxb/erl293.
- Khlestkina E.K., Antonova E.V., Pershina L.A., Soloviev A.A., Badaeva E.D., Borner A.A., Salina E.A. Variability of *Rc* (red coleoptile) alleles in wheat and wheat-alien genetic stock collections. *Cereal Res. Commun.* 2011;39(4):465–474. DOI 10.1556/CRC.39.2011.4.1.
- Kruse A. *Hordeum* × *Triticum* hybrids. *Hereditas.* 1973;73(1):157–161. DOI 10.1111/j.1601-5223.1973.tb01078.x.
- Li A., Lui D., Yang W., Kishii M. Synthetic hexaploid wheat: yesterday, today, and tomorrow. *Engineering.* 2018;4(4):552–558. DOI 10.1016/j.eng.2018.07.001.
- Malik A.I., English J.P., Colmer T.D. Tolerance of *Hordeum marinum* accessions to O₂ deficiency, salinity and these stresses combined. *Ann. Bot.* 2009;103(2):237–248. DOI 10.1093/aob/mcn142.
- Martín A. Tritordeum: a man-made cereal. In: 4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding Jointly Organized by EUCARPIA Cereal Section November 6–9, 2017, Budapest, Hungary. Budapest, 2017;5–6.
- Martín A., Álvarez J.B., Martín L.M., Barro F., Ballesteros J. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *J. Cereal Sci.* 1999;30(2):85–95. DOI 10.1006/jcrs.1998.0235.
- Melz G., Thiele V. Chromosome locations of genes controlling ‘purple leaf base’ in rye and wheat. *Euphytica.* 1990;49:155–159. DOI 10.1007/BF00027265.
- Molnár-Láng M., Linc G. Wheat–barley hybrids and introgression lines. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Dolezel J. (Eds.). *Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology and Genomics*. Cham: Springer, 2015;315–346. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6_12.
- Molnár I., Linc G., Dulai S., Nagy E.D., Molnár-Láng M. Ability of chromosome 4H to compensate for 4D in response to drought stress in a newly developed and identified wheat–barley 4H(4D) disomic substitution line. *Plant Breed.* 2007;126(4):369–374. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01300.
- Molnár-Láng M., Linc G., Szakács É. Wheat–barley hybridization: the last 40 years. *Euphytica.* 2014;195:315–329. DOI 10.1007/s10681-013-1009-9.
- Rahman S., Islam S., Yu Z., She M., Nevo E., Ma W. Current progress in understanding and recovering the wheat genes lost in evolution and domestication. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(16):5836. DOI 10.3390/ijms21165836.
- Rey M.-D., Calderón M.-C., Rodrigo M.J., Zacarías L., Alós E., Prieto P. Novel bread wheat lines enriched in carotenoids carrying *Hordeum chilense* chromosome arms in the *ph1b* background. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134598. DOI 10.1371/journal.pone.0134598.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149(4):2007–2023. DOI 10.1093/genetics/149.4.2007.
- Rubiales D., Moral A. Resistance of *Hordeum chilense* against loose smuts of wheat and barley (*Ustilago tritici* and *U. nuda*) and its expression in amphiploids with wheat. *Plant Breed.* 2011;130(1):101–103. DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01818.x.
- Said M., Cabrera A. A physical map of chromosome 4H^{ch} from *H. chilense* containing SSR, STS and EST–SSR molecular markers. *Euphytica.* 2009;167:253–259. DOI 10.1007/s10681-009-9895-6.
- Taketa S., Takeda K. Production and characterization of a complete set of wheat–wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) chromosome addition lines. *Breed Sci.* 2001;51(3):199–206. DOI 10.1270/jsbbs.51.199.
- Trubacheeva N.V., Badaeva E.D., Osadchaya T.S., Pershina L.A. Use of *H. vulgare* EST markers, GISH and C-banding to study bread wheat–*H. marinum* subsp. *gussoneanum* (2n = 28) introgression lines. *Cereal Res. Commun.* 2019;47(4):593–603. DOI 10.1556/0806.47.2019.37.

ORCID ID

L.A. Pershina orcid.org/0000-0002-9941-2026
N.V. Trubacheeva orcid.org/0000-0002-6701-6811
V.K. Shumny orcid.org/0000-0003-1939-6140
E.D. Badaeva orcid.org/0000-0001-7101-9639

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (научный проект № 20-016-00196) и в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.03.2023. После доработки 17.05.2023. Принята к публикации 18.05.2023.