

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

## Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>

М.Ф. Санамьян<sup>1</sup>✉, Ш.У. Бобохужаев<sup>1</sup>, Ш.С. Абдукаримов<sup>2</sup>, О.Г. Силкова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, Ташкент, Узбекистан

<sup>2</sup> Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ sanam\_marina@rambler.ru

**Аннотация.** Линии хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с чужеродным замещением хромосом тетраплоидных видов *G. barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem., *G. mustelinum* Miers ex Watt. являются ценным источником для селекции, увеличивающим генетическое разнообразие *G. hirsutum*. Замещение определенных хромосом хлопчатника вида *G. hirsutum* L. хромосомами вида *G. barbadense* оказывает влияние на удлинение, выход и прочность волокна, микронейр. Для повышения эффективности процесса создания линий необходимо изучение характера интрогрессии чужеродных хромосом в геном *G. hirsutum* L. В результате молекулярно-генетического анализа гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum* цитогенетической коллекции Узбекистана с моносомными беккроссными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> *G. hirsutum* × *G. barbadense* по одинаковым хромосомам, обнаружены генетические различия по профилю хромосом-специфичных микросателлитных SSR-маркеров между гибридами. Выявлена преимущественная интрогрессия хромосом 4, 6, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и 22 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense*, тогда как хромосомы 2, 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* характеризовались элиминацией, среди них хромосомы 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* элиминировали уже в первом беккроссном поколении. В настоящей работе проанализированы две линии, CS-B06 и CS-B07, американской цитогенетической коллекции с предполагаемым замещением по хромосомам 6 и 7 A<sub>1</sub>-субгенома. Обнаружены присутствие только полиморфных аллелей вида *G. hirsutum* и отсутствие полиморфных аллелей вида *G. barbadense*, что показало отсутствие замещения по этим хромосомам. Гибриды BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> с моносомией как по хромосомам *G. barbadense*, так и по хромосомам *G. hirsutum* характеризовались регулярной конъюгацией хромосом и высоким мейотическим индексом. Однако многие гибриды отличались снижением фертильности пыльцы. Два гибрида с моносомией по хромосоме 7 A<sub>1</sub>-субгенома *G. hirsutum* и хромосоме 6 A<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* имели наибольшую редукцию в жизнеспособности пыльцы (70.09 ± 1.57 и 75.00 ± 1.66 % соответственно). Таким образом, в этой работе показана особенность в интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum*.

**Ключевые слова:** хлопчатник; *Gossypium hirsutum*; *G. barbadense*; моносомные линии; хромосомно-замещенные гибриды; молекулярно-генетический анализ.

**Для цитирования:** Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Силкова О.Г. Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):958-970. DOI 10.18699/VJGB-23-110

## Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> hybrids

M.F. Sanamyan<sup>1</sup>✉, Sh.U. Bobokhujayev<sup>1</sup>, Sh.S. Abdugarimov<sup>2</sup>, O.G. Silkova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan

<sup>2</sup> Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ sanam\_marina@rambler.ru

**Abstract.** Substitution lines of the cotton *G. hirsutum* L. involving chromosomes of the tetraploid species *G. barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem., and *G. mustelinum* Miers ex Watt. are a valuable source for breeding, increasing the genetic diversity of *G. hirsutum*. The substitution of certain *G. hirsutum* L. chromosomes with *G. barbadense* chromosomes affect fibre elongation, fibre yield, fibre strength, and micronaire. To increase the efficiency of creating lines, it is necessary to study the nature of the introgression of alien chromosomes into the *G. hirsutum* L. genome. As a result of molecular genetic analysis of BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> hybrids obtained from crossing monosomic lines of the cotton *G. hirsutum* from the cytogenetic collection of Uzbekistan with monosomic backcross hybrids BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> *G. hirsutum* × *G. barbadense* on the

same chromosomes, genetic differences between the hybrids in the profile of chromosome-specific microsatellite SSR markers were found. The predominant introgression of chromosomes 4, 6 and 12 of the A<sub>1</sub>-subgenome and 22 of the D<sub>1</sub>-subgenome of *G. barbadense* was revealed, while chromosomes 2 and 7 of the A<sub>1</sub>-subgenome and 18 of the D<sub>1</sub>-subgenome of *G. barbadense* were characterized by elimination. Among them, chromosomes 7 of the A<sub>1</sub>-subgenome and 18 of the D<sub>1</sub>-subgenome of *G. barbadense* were eliminated in the first backcross generation. In this work, two lines, CS-B06 and CS-B07, from the American cytogenetic collection with a putative substitution involving chromosomes 6 and 7 of the A<sub>1</sub>-subgenome were analysed. The presence of only polymorphic alleles from the species *G. hirsutum* and the absence of polymorphic alleles from the species *G. barbadense* were revealed, which showed the absence of substitution involving these chromosomes. BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> hybrids with monosomy for both *G. barbadense* and *G. hirsutum* chromosomes were characterized by regular pairing of chromosomes and high meiotic indexes. However, many hybrids were characterized by a decrease in pollen fertility. Two hybrids with monosomy for chromosome 7 of the A<sub>1</sub>-subgenome of *G. hirsutum* and chromosome 6 of the A<sub>1</sub>-subgenome of *G. barbadense* had the greatest reduction in pollen viability (70.09 ± 1.57 and 75.00 ± 1.66 %, respectively). Thus, this work shows a specific feature in the introgression of individual chromosomes of the cotton species *G. barbadense* into the cotton *G. hirsutum* genome.

Key words: cotton; *Gossypium hirsutum*; *G. barbadense*; monosomic lines; chromosome-substituted hybrids; molecular genetic analysis.

**For citation:** Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Abdulkarimov Sh.S., Silkova O.G. Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):958-970. DOI 10.18699/VJGB-23-110

## Введение

В настоящее время в мире в коммерческих целях выращивают четыре вида хлопчатника, из них два вида, *Gossypium herbaceum* L. (A<sub>1</sub>-геном) и *G. arboretum* L. (A<sub>2</sub>-геном), – диплоиды, а другие два, *G. hirsutum* L. (AD<sub>1</sub>-геном) и *G. barbadense* L. (AD<sub>2</sub>-геном), – тетраплоиды (Wendel et al., 2009). Хлопчатник *G. hirsutum* является основной культурой, которая составляет более чем 90 % мирового урожая хлопка (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2019).

Мировое потребление хлопка демонстрирует устойчивое увеличение на 80 % в период с 1980/1981 по 2020/2021 г. (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2021), что требует повышения урожайности хлопка и качества его волокна. Увеличение урожайности хлопка было достигнуто путем создания трансгенных сортов, традиционной селекции, межсортового скрещивания. Однако большинство этих сортов получено при отборе из узкой генотипической среды и адаптировано к определенным почвенно-климатическим условиям (International Cotton Advisory Committee – ICAC, 2021). Таким образом, на сегодняшний день у культивируемого хлопчатника отмечается сокращение генетического разнообразия, что является причиной снижения качества волокна и повышения уязвимости к стрессовым факторам из-за близкой родственности высокоурожайных сортов.

Обогащение генома *G. hirsutum* аллелями хозяйственно ценных генов от других видов хлопчатника очень актуально (Grover et al., 2022). Например, *G. tomentosum* характеризуется жароустойчивостью, а *G. mustelinum* и *G. stocksii* – устойчивостью к вредителям и заболеваниям. Известно, что тонковолокнистый хлопчатник вида *G. barbadense* менее продуктивен и обладает меньшей адаптивностью к условиям выращивания, но имеет свойства волокна, значительно превышающие по качеству (длина, крепость и тонины волокна) культивируемые сорта *G. hirsutum*, хотя последний более урожайный. С учетом взаимодополняющих хозяйственно ценных признаков этих двух видов предприняты многочисленные попытки гибридизации в рамках традиционной селекции (Anwar

et al., 2022). Однако у межвидовых гибридов были плохие агрономически ценные признаки, гибриды характеризовались ограниченной рекомбинацией по причине несовместимости геномов из-за крупных инверсий на различных хромосомах двух субгеномов тетраплоидных видов. Как правило, гибриды F<sub>1</sub> *G. hirsutum* × *G. barbadense* плодovitы, но фенотипы F<sub>2</sub> и последующие поколения смещены в сторону одного из их родителей из-за стерильности пыльцы, подавления кроссинговера, селективной элиминации генов и нарушения расщепления (Zhang et al., 2014; Si et al., 2017; Fang et al., 2023).

Получение форм с замещением хромосом (CS – chromosome substitution) у различных видов растений позволяет осуществлять направленную интрогрессию конкретных хромосом или плеч отдельных хромосом, которые представляют собой ценный источник новых аллелей полезных генов. Ранее такие формы были созданы у многих сельскохозяйственных культур, что позволило улучшить некоторые агрономические признаки (Shchapova, Kravtsova, 1982; Силкова и др., 2006, 2007; Schneider et al., 2008; Tiwari et al., 2010; Rawat et al., 2011).

На протяжении ряда лет в США у хлопчатника проводятся исследования по созданию линий с чужеродным замещением хромосом с участием трех тетраплоидных видов (*G. barbadense*, *G. tomentosum*, *G. mustelinum*), причем с участием вида *G. barbadense* уже получено 20 линий с замещениями отдельных хромосом (Saha et al., 2006, 2013, 2015). Эти линии позволили выяснить, что замещения определенных хромосом хлопчатника вида *G. hirsutum* L. хромосомами вида *G. barbadense* L. (CS-B02, CS-B04, CS-B16, CS-B17, CS-B22Lo, CS-B22sh, CS-B25) оказывают влияние на удлинение, выход, прочность волокна, микронейр и др. в сравнении с исходными линиями TM-1 и Pima 3-79 (Saha et al., 2004). Показано, что такие линии являются важным источником для селекции, увеличивающим генетическое разнообразие *G. hirsutum* L. (Jenkins et al., 2006, 2007).

Ранее моносомные линии Цитогенетической коллекции хлопчатника Узбекистана (ЦКХУ), созданные в генотипической среде высокоинбредной линии Л-458 вида *G. hir-*

*sutum* L. (Sanamyan et al., 2014), с идентифицированной моносомией по хромосомам 2, 4, 6, 7, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и 17, 18, 21, 22 D<sub>1</sub>-субгенома, а также две линии с моносомией по телоцентрикам 6 и 11 A<sub>1</sub>-субгенома (Санамьян и др., 2016; Sanamyan et al., 2016; Санамьян, Бобохужаев, 2019) были использованы в скрещиваниях с линией Pima 3-79 вида *G. barbadense*, а также в скрещиваниях с гибридами F<sub>1</sub>, для получения анеуплоидных гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> и в последующем для создания линий хлопчатника с замещением хромосом. В работе был задействован двойной скрининг гибридов на всех этапах беккроссирования с помощью молекулярно-генетических маркеров и цитогенетического анализа (Sanamyan et al., 2022). Первый этап исследования заключался в молекулярно-генетическом анализе гибридных растений на стадии проростков с целью ускоренного выявления анеуплоидных форм с присутствием или отсутствием замещений хромосом или их плеч. На втором этапе выполнен цитогенетический анализ мейоза у гибридов на стадиях метафазы I и телофазы II, а также изучена фертильность пыльцы при окраске ацетокармином с целью подтверждения моносомного статуса беккроссных гибридных растений и нахождения у них особенностей в поведении хромосом.

Целью этой работы были молекулярно-генетическое и цитогенетическое изучение гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> от скрещиваний моносомных линий хлопчатника ЦКХУ с моносомными беккроссными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> и выяснение особенностей интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника вида *G. hirsutum*. В ходе работы на стадии проростков с помощью молекулярно-генетических маркеров (SSR) среди гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> обнаружены анеуплоидные формы, у которых подтверждены замещение хромосом 4, 6, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и хромосомы 22 D<sub>1</sub>-субгенома и элиминация хромосом 2, 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома с *G. barbadense*. У анеуплоидов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> изучено поведение индивидуальных хромосом *G. hirsutum* и *G. barbadense* в мейозе, а также проведена оценка мейотического индекса и фертильности пыльцы. Продемонстрирована перспективность использования молекулярно-генетических маркеров на стадии проростков для ускоренного отбора растений с чужеродным замещением отдельных хромосом *G. hirsutum*/*G. barbadense* в поколении BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Моносомные и монотелосомные линии ЦКХУ были созданы в единой генотипической среде высокоинбредной линии Л-458 *G. hirsutum*, полученной М.Ф. Абзаловым и Г.Н. Фатхуллаевой, в результате многолетнего самоопыления (F<sub>20</sub>) на основе сорта 108-Ф. Для создания коллекции применялись различные методы облучения семян и пыльцы, а также потомство растений с транслокациями и десинапсисом (табл. 1) (Санамьян, 2020). Линия Pima 3-79 вида *G. barbadense* не чувствительна к фотопериоду и высокогомозиготна, так как происходит от удвоенного гаплоида (Endrizzi et al., 1985). Эта линия является генетическим стандартом для вида *G. barbadense* L. в США (Hulse-Kemp et al., 2015), поэтому она использована в качестве родителя-донора замещенной

хромосомы (CS) или сегментов хромосом от *G. barbadense* как в США, так и в Узбекистане.

Для получения беккроссных гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> моносомные линии по хромосомам 2, 4, 6, 7, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и 18, 22 D<sub>1</sub>-субгенома беккроссировали моносомными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (Мо × F<sub>1</sub> (Мо × Pima 3-79)), а также монотелосомную линию с нехваткой одного из плеч хромосомы 11 беккроссировали с монотелосомным гибридом BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (Telo × F<sub>1</sub> (Telo × Pima 3-79)), у которых моносомия и монотелосомия были по тем же хромосомам, что и у исходных анеуплоидов *G. hirsutum*. Все растения исходных линий и гибридов разных поколений круглогодично содержались в теплице Национального университета Узбекистана.

**Цитологические анализы.** Поведение хромосом изучали в материнских клетках пыльцы (МКП) на стадии метафазы I (M1) и тетрад мейоза. Для этого проводили фиксацию 2–3 мм бутонов в этилово-уксусной смеси (7:3). Затем МКП окрашивали железом-ацетокармином. На временных давленных препаратах на стадии M1 учитывали характер конъюгации хромосом. Для анализа стадии тетрад анализировали по три бутона от каждого растения и подсчитывали процент нормальных тетрад от их общего количества. Для анализа фертильности пыльцы утром в день цветения собирали раскрывшиеся цветки, готовили временные ацетокарминовые препараты, которые укладывали в чашки Петри и оставляли в холодильнике на сутки с целью лучшего прокрашивания пыльцевых зерен. Затем анализировали по 10 полей зрения с каждого цветка.

Все цитологические наблюдения проводили с использованием микроскопов AxioScope A1, Laboval (Carl Zeiss, Германия) и Biomed (Leica, Швейцария) при увеличении объективов 10x, 100x, бинокулярной насадки 1.6x и GF 12.5 × 120 и окуляра 10x. Микрофотографирование выполняли с помощью цифровой фотокамеры Mikroskopkamera AxioCamERc5s. При экспонировании использовали зеленый светофильтр 3C-11-3. Статистическую обработку полученных данных осуществляли согласно Б.А. Доспехову (1985).

**Экстракция ДНК и генотипирование.** Геномную ДНК выделяли из образцов молодых листьев цитогенетически идентифицированных беккроссных анеуплоидных гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> и молодых проростков гибридных растений (BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>) методом СТАВ (Saha et al., 2015). Геномную ДНК проверяли с помощью электрофореза в 0.9 % агарозе, и разводили ДНК в 15 мкл до рабочей концентрации с применением контрольного раствора HindIII-расщепленной ДНК λ-фага (25 нг/мкл). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1.0 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (с 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 мкл БСА, 0.08 мкл НТФ (25 mM), 0.2 мкл праймеров, 0.1 мкл Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК-матрицы. Полимеразную цепную реакцию осуществляли с начальной денатурированной ДНК при 94 °C в течение 2 мин, затем следовали 35 циклов при 94 °C (шаг 1) в течение 20 с, 55 °C (этап 2) в течение 30 с и 72 °C (шаг 2, шаг 3) в течение 50 с. После 35 циклов температура растяжения 72 °C поддерживалась в течение 7 мин. Продукты ПЦР визуализировали в 3.5 % агарозном геле высокого разрешения,

**Таблица 1.** Моносомные и монотелосомные линии хлопчатника *G. hirsutum* L. цитогенетической коллекции Узбекистана

№ п/п	Номер каталога	Условное обозначение моносомика	Происхождение	Название линии	Моносомия по хромосоме	Размер унивалента
1	233	Мо16	Получен в M <sub>1</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Мо16	2 A <sub>1</sub> -субгеном	Крупный
2	255	Мо38	Получен в M <sub>2</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Мо38	4 A <sub>1</sub> -субгеном	Средний
3	275	Мо58	Получен из потомства десинаптика в M <sub>2</sub> после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Мо58		Средний
4	276	Мо59	Получен из потомства десинаптика в M <sub>2</sub> после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Мо59		Средний
5	277	Мо60	Получен из потомства десинаптика в M <sub>2</sub> после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 15 Гр)	Моносомная линия Мо60		Средний
6	292	Мо75	Получен в M <sub>2</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Мо75		Средний
7	251	Мо34	Получен в M <sub>2</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Мо34	6 A <sub>1</sub> -субгеном	Крупный
8	309	Мо92	Получен в M <sub>3</sub> после облучения семян линии Л-458 тепловыми нейтронами (доза 27 Гр)	Моносомная линия Мо92		Крупный
9	244	Мо27	Получен в M <sub>2</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Мо27	7 A <sub>1</sub> -субгеном	Средний
10	311	Мо94	Получен в M <sub>3</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 20 Гр)	Моносомная линия Мо94	12 A <sub>1</sub> -субгеном	Крупный
11	265	Мо48	Получен в M <sub>1</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Мо48	18 D <sub>1</sub> -субгеном	Среднемелкий
12	234	Мо17	Получен в M <sub>1</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 25 Гр)	Моносомная линия Мо17	22 D <sub>1</sub> -субгеном	Средний
13	238	Telo21	Выделен в потомстве моносомика, полученного в M <sub>1</sub> после опыления гамма-облученной пыльцой линии Л-458 (доза 15 Гр)	Телосомная линия Telo21	Telo11 A <sub>1</sub> -субгеном	Гетероморфный бивалент

окрашивали бромистым этидием и фотодокументировали с помощью системы документирования геля Alpha Imager (Innotech Inc., США).

Пары праймеров к кодоминантным хромосом-специфичным SSR-маркерам были синтезированы в соответствии с работами по генетическому картированию (Delaporta et al., 1983; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015; Reddy et al., 2020), которые перечислены в Приложении 1<sup>1</sup>. Для каждой хромосомы выбрано в среднем по четыре локуса, полиморфных между Л-458 (*G. hirsutum*) и Pima 3-79 (*G. barbadense*). Результаты электрофореграммы для SSR были оценены как a/b/h, где локус a соответствовал реципиентному L-458, локус b – донорской линии Pima 3-79, а генотип h – дисомному гибриду BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Элиминацию хромосом *G. hirsutum* у моносомного гибрида хлопчатника BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> определяли по отсутствию амплификации маркера по хромосомам *G. hirsutum* (мате-

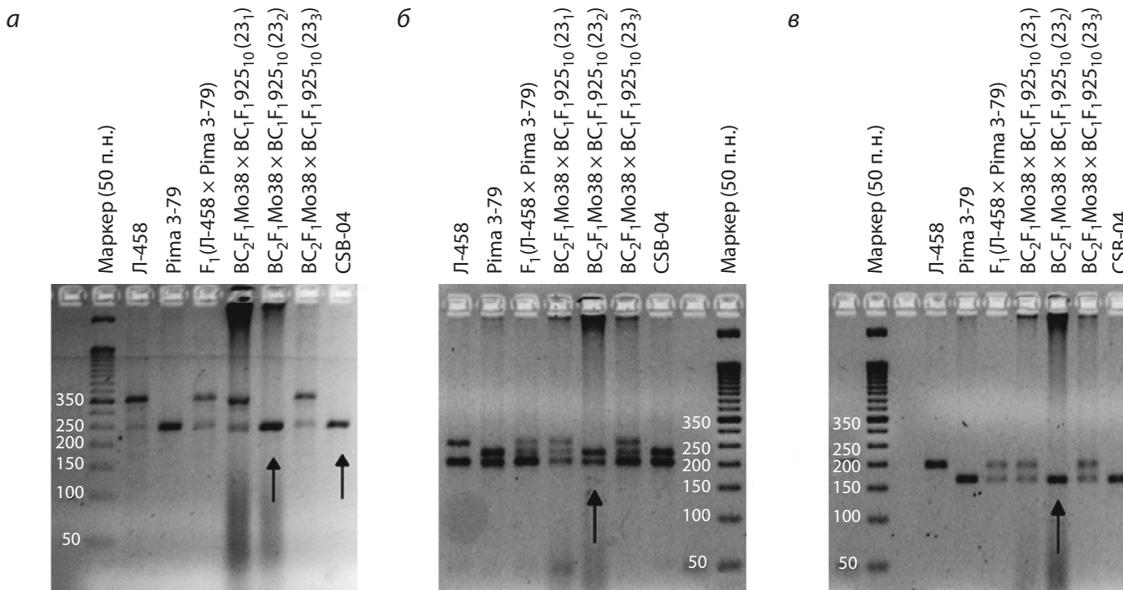
ринский) и присутствию только аллель-специфичных продуктов ПЦР *G. barbadense* (отцовский) (Liu et al., 2000). Для всех типов замещений отдельных хромосом в качестве контроля использовали ДНК хромосом-замещенных линий американской цитогенетической коллекции, за исключением хромосомы 2.

## Результаты

### Идентификация замещений хромосом *G. barbadense*/*G. hirsutum* у гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> с использованием хромосом-специфичных молекулярно-генетических маркеров

Согласно ранее разработанной нами схеме (Sanamyan et al., 2022), молекулярно-генетический анализ растений BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> проводили на стадии проростков до того, как они были пересажены в грунт теплицы для ускоренного выделенения моносомиков по хромосомам донорного вида, чтобы с помощью молекулярных маркеров отделить их

<sup>1</sup> Приложения 1–13 см. по адресу:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx31.pdf>



**Рис. 1.** Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо38 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>925<sub>10</sub>) по хромосоме 4 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника: а – Gh107; б – Gh117; в – TMB0809.

от растений с хромосомами вида-реципиента. Поскольку большинство моносомиков были идентифицированы ранее, только два варианта скрещиваний, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо16 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(923<sub>7</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо38 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(925<sub>10</sub>)) были проанализированы на стадии проростков.

Результаты анализа показали пять моносомиков (21<sub>1</sub>, 21<sub>2</sub>, 21<sub>4</sub>, 21<sub>7</sub> и 22<sub>1</sub>, где цифры указывают на посевные номера растений) в двух семьях (21n и 22n, где цифры обозначают посевные номера семей, а буква «n» – на разное число растений в семье) в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо16 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(923<sub>7</sub>)), где предполагалось замещение хромосомы 2 A<sub>1</sub>-субгенома. Эти растения характеризовались присутствием хромосом-специфичных аллелей только от линии Л-458 вида *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры, BNL834, BNL3971, TMB0471, JESPR179, были локализованы на хромосоме 2 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника (Gutiérrez et al., 2009; Lacape et al., 2009) (см. Приложения 1–3), полученные данные указали на отсутствие замещения хромосомы 2 у всех пяти беккроссных проростков в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо16 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>923<sub>7</sub>), что стало негативным результатом этого исследования, поскольку потребовало получения в дальнейшем новых гибридных беккроссных семян и изучения нового BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> гибридного потомства.

Один проросток (23<sub>2</sub>) с замещением хромосомы 4 был обнаружен в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо38 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>925<sub>10</sub>). Этот гибрид характеризовался присутствием аллелей только от *G. barbadense*, что было выявлено при получении ПЦР-продуктов в результате амплификации с четырьмя хромосом-специфичными SSR-маркерами – BNL2572, Gh107, Gh117, TMB0809 (Hoffman et al., 2007; Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложения 1, 2, рис. 1).

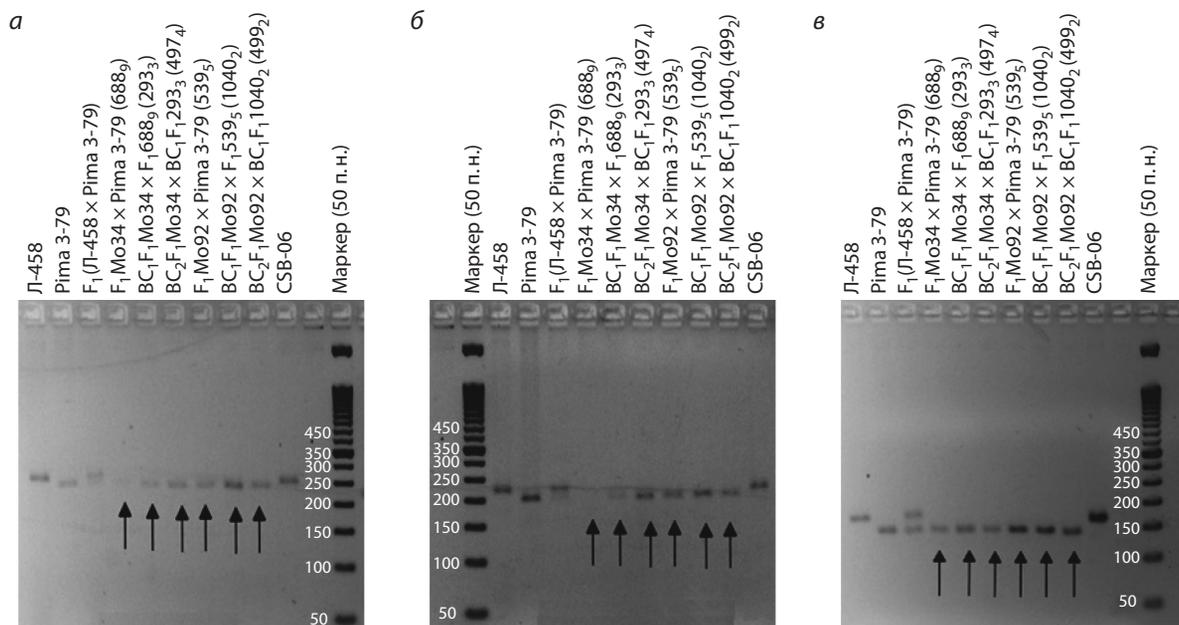
Замещение хромосом в других 10 вариантах проведено у ранее цитогенетически изученных моносомиков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Анализ моносомиков с предполагаемым замеще-

нием хромосомы 4 показал амплификацию пяти аллель-специфичных продуктов ПЦР SSR-маркеров, TMB0809, Gh107, Gh117, CIR249, JESPR234, только для *G. barbadense* у моносомика (530<sub>1</sub>) из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо58 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>115<sub>1</sub>), у двух моносомиков, 284<sub>1</sub> и 284<sub>11</sub>, в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо59 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>1041<sub>4</sub>), у моносомика (494<sub>3</sub>) из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо60 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>117<sub>5</sub>) и у моносомика (496<sub>1</sub>) в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо75 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>298<sub>2</sub>) (см. Приложения 1, 4, 5), что подтвердило замещение хромосом у них.

Анализ моносомика (497<sub>4</sub>) в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо34 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) и моносомика (499<sub>2</sub>) в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо92 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1040<sub>2</sub>)) с предполагаемым замещением хромосомы 6 выявил аллели только от *G. barbadense*, тогда как аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали, на что указала локализация 11 хромосом-специфичных SSR-маркеров – BNL1440, BNL3650, BNL2884, BNL1064, BNL3359, TMB1277, TMB0154, TMB0853, TMB1538, Gh039, Gh082 (Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложения 1, 5, рис. 2), что подтвердило присутствие замещения этих хромосом.

Молекулярно-генетический анализ двух моносомиков, 500<sub>11</sub> и 500<sub>12</sub>, из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо27 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)) определил только аллели хромосомы 7 от линии Л-458 *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде четыре хромосом-специфичных SSR-маркера, BNL1694, Gh146, TMB0180, TMB0561, были локализованы на хромосоме 7 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника (Hoffman et al., 2007; Guo et al., 2008; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015) (см. Приложения 5, 6), полученные данные указали на отсутствие замещения хромосомы 7 у этих двух моносомиков.

Необходимо подчеркнуть, что замещенные линии CS-B06 и CS-B07 американской цитогенетической коллекции, служившие контролем в нашем исследовании, характеризовались отсутствием замещения хромосом 6 и 7 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника, поскольку у них присутствовали аллели только от вида *G. hirsutum*, тогда как



**Рис. 2.** Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных моносомных растений (BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo34 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo92 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>(1040<sub>2</sub>)) по хромосоме 6 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника: а – TMB0853; б – TMB1538; в – Gh082.

от вида *G. barbadense* отсутствовали, как отчетливо видно на рис. 2 и в Приложении 6 соответственно. Однако все другие контроли соответствовали замещениям тех хромосом, по которым проводилось исследование.

У двух моносомиков, 505<sub>4</sub> и 506<sub>2</sub>, из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo94 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>299<sub>1</sub>) идентифицирована только хромосома 12 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника *G. barbadense* согласно ПЦР-амплификации хромосом-специфичных SSR-маркеров – BNL3261, BNL3835 (Gutiérrez et al., 2009) (см. Приложение 5, 7).

Анализ моносомика (286<sub>14</sub>) из комбинации BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo48 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>114<sub>20</sub>) показал только аллели хромосомы 18 от *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали. Поскольку прежде восемь хромосом-специфичных SSR-маркеров, BNL193, BNL2544, BNL3280, BNL3479, CIR216, Gh142, TMB0114, TMB1603, были локализованы на хромосоме 18 D<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника (Reddy et al., 2020) (см. Приложение 5, 8), полученные данные указали на отсутствие замещения этой хромосомы.

Молекулярно-генетический SSR-анализ моносомика (288<sub>1</sub>) из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo17 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>110<sub>1</sub>) выявил присутствие только аллеля от *G. barbadense*, тогда как аллель вида *G. hirsutum* не был обнаружен на основе локализации хромосом-специфичного SSR-маркера BNL673. Так как прежде этот маркер был локализован на хромосоме 22 D<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника (Gutiérrez et al., 2009), то замещение хромосомы 22 было подтверждено у изученного моносомика (см. Приложение 5, 9).

Молекулярно-генетический анализ двух телоцентриков, 790<sub>2</sub> и 791<sub>1</sub>, из варианта BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Telo21 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(292<sub>1</sub>)) показал противоречивые данные, возможно, из-за локализации маркеров на разных плечах хромосомы 11. Поэтому изучение этих монотелосомиков будет продолжено с помощью меченых праймеров, поскольку они показывают более точную их локализацию.

### Изучение мейоза у гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>

#### с идентифицированными унивалентами

Анализ конъюгации хромосом на стадии МI мейоза выявил анеуплоидные растения в 12 вариантах гибридного потомства, полученного от скрещиваний моносомных линий вида *G. hirsutum* ЦКХУ с моносомиками BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>. Так, по два моносомика было изолировано в каждом из трех беккроссов (с участием линий Mo59, Mo27 и Mo94), и по одному моносомику выделено в каждом из оставшихся девяти беккроссных вариантов (с участием Mo16, Mo38, Mo58, Mo60, Mo75, Mo34, Mo92, Mo48 и Mo17) (Приложение 10). К сожалению, мы не смогли продолжить исследования с четырьмя линиями (Mo31, Mo56, Mo42 и Telo12), которые изучали в первом поколении беккроссов, из-за отсутствия завязываемости гибридных коробочек.

Анализ метафазы I мейоза у 15 моносомиков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, где четыре моносомика, 21<sub>1</sub>, 500<sub>11</sub> и 500<sub>12</sub>, 286<sub>14</sub>, трех вариантов скрещиваний с унивалентными хромосомами *G. hirsutum* (2, 7 и 18) и 11 других моносомиков восьми других вариантов скрещиваний с унивалентными хромосомами *G. barbadense* (4, 6 и 12) показал, что растения характеризовались модальной для моносомиков хлопчатника конъюгацией хромосом с 25 бивалентами и одним унивалентом (табл. 2). Один моносомик (288<sub>1</sub>) из варианта F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>(Mo17 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>110<sub>1</sub>) с замещением хромосомы 22 D<sub>1</sub>-субгенома выделялся присутствием дополнительных унивалентом (1.94 ± 0.19 в среднем на клетку), которые могли привести к появлению нуллисомных гамет.

У монотелосомиков (790<sub>2</sub> и 791<sub>1</sub>) в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Telo21 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(292<sub>1</sub>)) в отдельных МКП обнаружены парные униваленты (0.75 ± 0.37 и 1.00 ± 0.41 в среднем на клетку соответственно) наряду с гетероморфными бивалентами. У одного монотелосомика (791<sub>1</sub>) также формировался один квадριвалент (0.25 ± 0.25 в среднем на клетку) (см. табл. 2).

**Табл. 2.** Конъюгация хромосом на стадии метафазы I мейоза у анеуплоидных гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний рекуррентных родителей с межвидовыми анеуплоидными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(Mo × F<sub>1</sub>Mo × Pima 3-79) или BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(Telo × F<sub>1</sub>Telo × Pima 3-79)

Хромосома	Вариант скрещивания	Номер гибрида	Число изученных МКП	Размер унивалента	В среднем на клетку	
					унивалентов	бивалентов
	Л-458	–	11	–	0	26.00 ± 0.00
	Pima 3-79	–	12	–	0	26.00 ± 0.00
	F <sub>1</sub> (Л-458 × Pima 3-79)	680	10	–	0	26.00 ± 0.00
2	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo16 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (923 <sub>7</sub> ))	21 <sub>1</sub>	5	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
4	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo38 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (925 <sub>11</sub> ))	23 <sub>2</sub>	30	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo58 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (115 <sub>1</sub> ))	530 <sub>1</sub>	30	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo59 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (1041 <sub>4</sub> ))	284 <sub>1</sub>	26	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		284 <sub>11</sub>	11	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo60 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (117 <sub>4</sub> ))	494 <sub>3</sub>	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo75 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (298 <sub>2</sub> ))	496 <sub>1</sub>	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
6	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo34 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (293 <sub>3</sub> ))	497 <sub>4</sub>	25	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo92 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (1040 <sub>2</sub> ))	499 <sub>2</sub>	18	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
7	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo27 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (111 <sub>2</sub> ))	500 <sub>11</sub>	15	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		500 <sub>12</sub>	13	Средний	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
12	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo94 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (299 <sub>1</sub> ))	505 <sub>4</sub>	9	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
		506 <sub>2</sub>	6	Крупный	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
18	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo48 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (114 <sub>1</sub> ))	286 <sub>14</sub>	14	Мелкий	1.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00
22	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Mo17 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (110 <sub>1</sub> ))	288 <sub>1</sub>	16	Среднемелкий	1.94 ± 0.19	24.75 ± 0.11
Telo11	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> (Telo21 × BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (292 <sub>1</sub> ))	790 <sub>2</sub>	8	–	0.75 ± 0.37	25.63 ± 0.18
		791 <sub>1</sub> *	15	–	1.00 ± 0.41	24.75 ± 0.63

\* 0.25 ± 0.25 квадрилентов в среднем на клетку у монотелосомного растения 791<sub>1</sub>.

Анализы размера унивалентов у моносомиков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> обнаружили большой размер хромосомы 2 *G. hirsutum* в одной семье BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo16 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(923<sub>7</sub>)), хромосомы 6 *G. barbadense* в двух семьях BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo34 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo92 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1040<sub>2</sub>)) (см. рис. 3, з), а также хромосомы 12 *G. barbadense* в одной семье BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo94 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(299<sub>1</sub>)) (см. рис. 4, б). Моносомики BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> у пяти семей с хромосомой 4 *G. barbadense* BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo38 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(925<sub>11</sub>)), BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo58 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(115<sub>1</sub>)), BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo59 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1041<sub>4</sub>)), BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo60 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(117<sub>4</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo75 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(298<sub>2</sub>)) (см. рис. 3, а–в) так же, как и с хромосомой 7 *G. hirsutum* BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo27 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)) (рис. 4, а), имели средний размер унивалентов, что подтвердило их принадлежность к A<sub>1</sub>-субгеному.

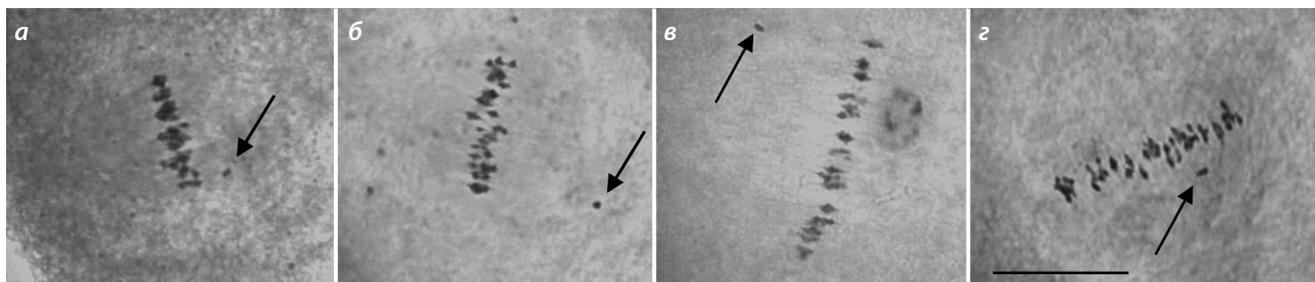
Изучение размера унивалента у растения (288<sub>1</sub>) варианта скрещиваний BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo17 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(110<sub>1</sub>)) с хромосомой 22 *G. barbadense* обнаружило среднемелкий размер унивалента (см. рис. 4, з), а у растения другого варианта – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo48 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(114<sub>1</sub>)) с хромосомой 18 *G. hirsutum* – мелкий размер, который дополнительно подтвердил принадлежность хромосом к D<sub>1</sub>-субгеному (см. рис. 4, б).

Большинство моносомиков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> проявило высокий мейотический индекс, который свидетельствует, что их унивалентные хромосомы претерпевали регулярное расхождение (Приложение 11). Однако один моносомик в

варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo34 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) с замещением хромосомы 6 продемонстрировал снижение мейотического индекса (до 83.66 ± 0.62) и увеличение числа тетрад с микроядрами (до 9.23 ± 0.77 %) (рис. 5). Это указало на нарушения в расхождении хромосом и формировании несбалансированных гамет, которые могли привести к смене унивалента в потомстве. Еще пять моносомиков в вариантах BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo60 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(117<sub>4</sub>)), BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo92 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1040<sub>2</sub>)), BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo94 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(299<sub>1</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo17 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(110<sub>1</sub>)) тоже продемонстрировали небольшое увеличение числа тетрад с микроядрами (от 1.22 ± 0.43 до 1.84 ± 0.37 %), что также могло привести к таким же последствиям (Приложение 12, рис. 5). Сходно с конъюгацией хромосом, мейотический индекс не показал существенных различий между беккросными моносомиками с присутствием замещений отдельных хромосом или их отсутствием.

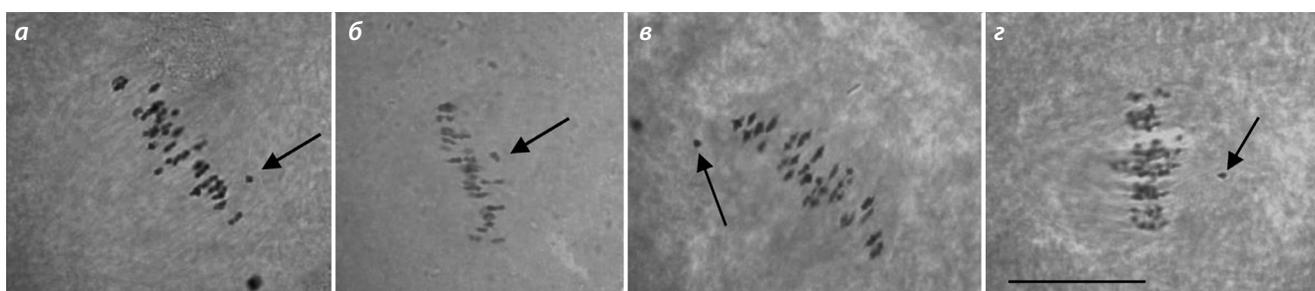
Два монотелосомика из семьи BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Telo21 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(292<sub>1</sub>)) показали увеличение процента тетрад с микроядрами от 2.17 ± 0.30 % (791<sub>1</sub>) до 2.32 ± 0.30 % (790<sub>2</sub>), которое могло быть следствием нарушения в расхождении телоцентрика и формировании несбалансированных гамет у этих гибридов (см. Приложение 12).

Жизнеспособность пыльцы была оценена у моносомиков BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> с помощью окраски ацетокармином. Большинство из них продемонстрировало высокую жизне-



**Рис. 3.** Конфигурации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий с межвидовыми моносомными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(25<sup>II</sup>+1<sup>I</sup>).

а – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо58×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(115<sub>1</sub>)) (530<sub>1</sub>); б – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо59×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(104<sub>1</sub>)) (284<sub>1</sub>); в – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо60×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(117<sub>5</sub>)) (494<sub>3</sub>) (25<sup>II</sup>+1<sup>I</sup>) с хромосомой 4 *G. barbadense*; з – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо34×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) (497<sub>4</sub>) с хромосомой 6 *G. barbadense*. Здесь и на рис. 4: стрелкой указаны унивенты. Масштабная линейка = 10 мкм.



**Рис. 4.** Конфигурации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий с межвидовыми моносомными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(25<sup>II</sup>+1<sup>I</sup>).

а – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо27×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)) (500<sub>12</sub>) с хромосомой 7 *G. hirsutum*; б – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо94×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(299<sub>1</sub>)) (505<sub>4</sub>) с хромосомой 12 *G. barbadense*; в – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо48×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(114<sub>20</sub>)) (286<sub>14</sub>) с хромосомой 18 *G. hirsutum*; з – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо17×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(110<sub>1</sub>)) (288<sub>1</sub>) с хромосомой 22 *G. barbadense*.

способность пыльцы (от 90.22±1.31 до 96.15±0.69 %), сходную с линией Л-458 (90.92±1.15 %) (Приложение 13). Специфически два моносомика (500<sub>12</sub> и 499<sub>2</sub>) в двух вариантах скрещиваний, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо27×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо92×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1040<sub>2</sub>)) с хромосомой 7 *G. hirsutum* и с хромосомой 6 *G. barbadense* имели наибольшую редукцию в жизнеспособности пыльцы (70.09±1.57 и 75.00±1.66 % соответственно) (рис. 6), но четыре моносомика показали небольшую редукцию жизнеспособности пыльцы (от 83.20±2.39 до 87.50±1.95 %). Однако в одном варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо59×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(1041<sub>4</sub>)) два моносомика характеризовались различиями в жизнеспособности пыльцы более 17 %, а в другом, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо27×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)), эти различия составили более 20 %.

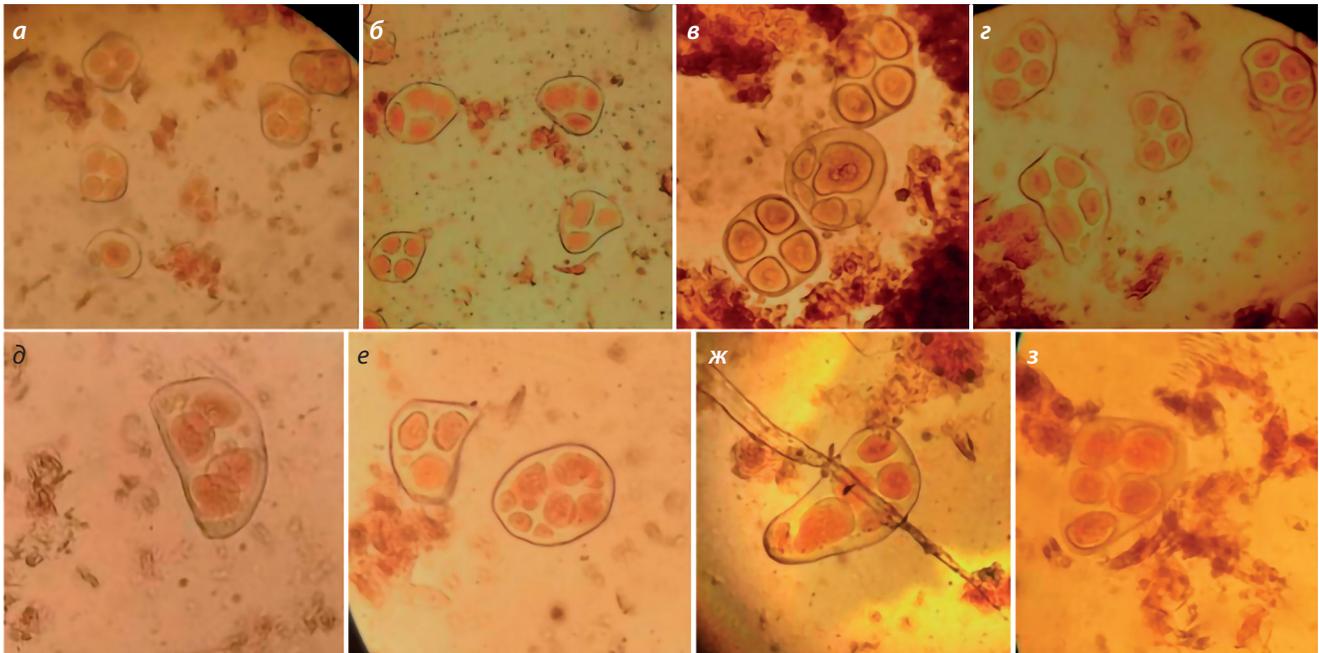
## Обсуждение

В последние годы хорошо зарекомендовал себя комплексный анализ чужеродно-дополненных и чужеродно-замещенных линий, включающий морфо-биологический, генетический, цитогенетический и молекулярно-генетический методы (Schneider et al., 2010; Tiwari et al., 2010; Rawat et al., 2011; Garg et al., 2016).

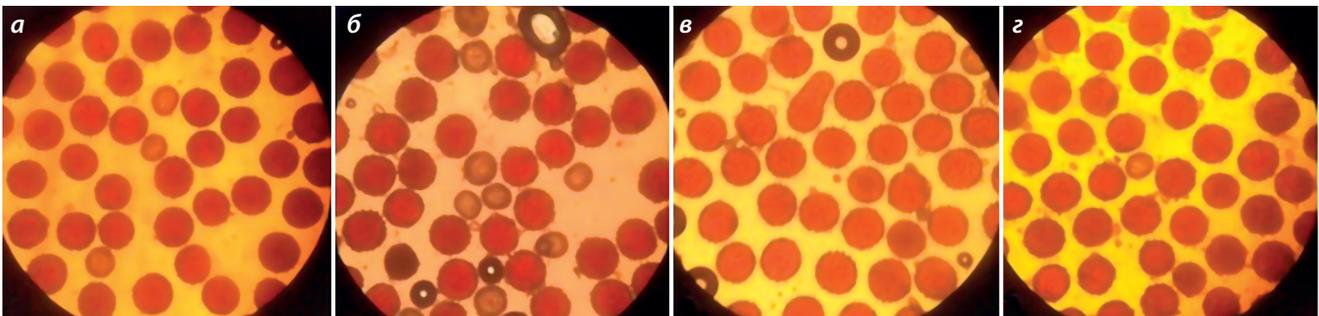
Комплексный подход с использованием дифференциальной С-окраски, флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и анализа глиадинов в анализах интрогрессивных линий *T. aestivum*×*Ae. columnaris* позволил выявить замещения, дополненные хромосомы или фрагменты отдельных хромосом у 15 линий, тогда как у пяти линий

присутствие чужеродного генетического материала не обнаружено (Шишкина и др., 2017). В исследовании интрогрессивных линий, полученных от беккроссов с сортами мягкой пшеницы синтетической формы RS7 (BBAAUS), с помощью С-окраски, FISH, а также ДНК-маркеров выявлены линии с замещением хромосом пшеницы, с перестройками хромосом, однако две линии характеризовались отсутствием чужеродных интрогрессий (Давоян и др., 2019). Стало очевидным, что в исследованиях геномного состава чужеродно замещенных форм крайне необходимо применение комплекса цитологических и молекулярно-генетических методов.

У хлопчатника также были начаты исследования с использованием SSR-маркеров и *in situ* геномной гибридизации (GISH), которые позволили изолировать пять моносомных чужеродных дополненных линий (MAALs) в беккроссном потомстве пентаплоида, полученного от скрещиваний вида *G. hirsutum* с австралийским диплоидным видом *G. australe* F. Muell. (Sarr et al., 2011). Применение у пяти диплоидных видов хлопчатника BAC-FISH зондов позволило успешно идентифицировать отдельные хромосомы и картировать 45S и 5S рДНК на специфических хромосомах пяти видов (Gan et al., 2012). Сравнение цитогенетической карты хромосомы 1 вида *G. herbaceum* L., построенной с помощью BAC-FISH, с генетическими картами хромосомы 1 у видов *G. hirsutum*, *G. arboreum*, *G. raimondii* показало, что большинство идентифицированных клонов BAC располагаются в оди-



**Рис. 5.** Спорады у моносомного гибридного растения BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо34×BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(293<sub>3</sub>)) (497<sub>4</sub>): а – монада с микроядрами; б – триады и тетрады; в – монада с микроядрами и тетрады; з – тетрады с микроядрами; ж – пентада с микроядрами; з – пентада.



**Рис. 6.** Фертильная (окрашенная) и стерильная (неокрашенная) пыльца у моносомных гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий с моносомными гибридами BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(Мо × F<sub>1</sub>Мо × Pima 3-79): а, б – BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Мо75 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>298<sub>2</sub>) (496<sub>1</sub>); в, з – F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>(Мо34 × F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>293<sub>3</sub>) (497<sub>4</sub>).

наковом порядке на разных картах, за исключением трех маркеров, указывающих на перестройки хромосом (Cui et al., 2015). К сожалению, подобные методы комплексного анализа пока не использованы для изучения хромосом-замещенных линий.

Современные генотипы культивируемого хлопчатника характеризуются ограничением аллелей полезных признаков из-за монофилетического происхождения и образования «генетически узкого горлышка», возникшего во время одомашнивания от общего предка и скрещиваний между однотипными генотипами элитных форм (Saha et al., 2018). Это стимулировало поиск генетического разнообразия среди различных видов хлопчатника.

Создание 17 замещенных линий хлопчатника (CS-B), где каждая гомологичная пара хромосом или хромосомное плечо вида *G. hirsutum* (TM-1) были замещены гомологичной хромосомой или плечом вида *G. barbadense* (Pima 3-79) (Stelly et al., 2005), позволило связать важнейшие признаки качества волокна с отдельной хромосомой

или ее плечом (Saha et al., 2004; Jenkins et al., 2006), начать интрогрессию благоприятных генов для улучшения культивируемого хлопчатника (Jenkins et al., 2006, 2007), а также изучать хромосомные эффекты агрономических признаков (выход волокна, масса одной коробочки, урожай хлопка-сырца, урожай волокна) и обработку данных с помощью генетической модели (ADAA) (Saha et al., 2010).

Позже некоторые из этих линий хлопчатника не получили молекулярно-генетического подтверждения (Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015; Ulloa et al., 2016). В недавней работе в популяции MAGIC, созданной в результате скрещиваний 18 CS-B линий с тремя сортами хлопчатника Upland были использованы хромосом-специфичные маркеры (SSR). В итоге выяснилось, что те же пять линий (CS-B05sh, CS-B06, CS-B07, CS-B12sh и CS-B15sh), которые были перечислены в предыдущих статьях, содержали «небольшую интрогрессию» или вообще не содержали соответствующей интрогрессии целой хромосомы или участка хромосомы (Fang et al., 2023). Только 13 CS-B ли-

ний имели «значительную интрогрессию» от вида *G. barbadense*, причем причины отсутствия молекулярно-генетического подтверждения у некоторых хромосом-замещенных линий хлопчатника остаются невыясненными.

При создании линий хлопчатника с замещением хромосом *G. barbadense*/*G. hirsutum* отбор растений с необходимым генотипом ускорялся благодаря молекулярно-генетическому тестированию беккроссных растений на стадии проростка (Sanamyan et al., 2022). Это способствовало также продолжению беккроссирования только тех гибридных форм, которые имели нужный генотип. Быстрый отбор растений с необходимым генотипом подчеркивал преимущества использования молекулярных маркеров (SSR) в таких исследованиях.

В настоящей работе с помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров в варианте BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo16 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(923<sub>7</sub>)) у шести проростков с моносомией обнаружены элиминация хромосомы 2 A<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* и присутствие хромосомы 2 A<sub>1</sub>-субгенома *G. hirsutum*, тогда как у одного проростка другой семьи BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo38 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(925<sub>10</sub>)) выявлено присутствие только хромосомы 4 A<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense*, что свидетельствует о замещении хромосом у данного растения. Подтверждение замещений хромосом, проведенное методом молекулярно-генетического анализа у ранее цитогенетически идентифицированных моносомных гибридов BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, установлено только по хромосомам 4, 6, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и хромосоме 22 D<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника в восьми вариантах, тогда как в двух вариантах, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo27 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(111<sub>2</sub>)) и BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo48 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(114<sub>20</sub>)), выявлено отсутствие замещения хромосом 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома. Следовательно, отсутствие элиминации хромосомы 4 A<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* в пяти изученных беккроссных вариантах (с участием линий Mo38, Mo58, Mo59, Mo60 и Mo75) косвенно указывает на ее преимущественную передачу через гаметы, в то время как элиминация хромосом 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* уже в первом беккроссном поколении указывает на их неконкурентоспособность в сравнении с гомеологами *G. hirsutum*.

Необходимо подчеркнуть, что наличие ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации только с хромосом-специфичными SSR-маркерами для хромосом 6 и 7 A<sub>1</sub>-субгенома *G. hirsutum* у двух линий, CS-B06 и CS-B07, американской цитогенетической коллекции, служивших контролем в нашем исследовании, стало новым подтверждением некорректного определения замещения хромосом 6 и 7 A<sub>1</sub>-субгенома, что прежде подчеркивалось другими исследователями (Gutiérrez et al., 2009; Ulloa et al., 2016). В связи с этим выяснение причин отсутствия интрогрессии донорной хромосомы 2 A<sub>1</sub>-субгенома вида *G. barbadense* при беккроссировании гибридов представляет большой интерес для будущих исследований.

До настоящего времени причины элиминации донорных хромосом у беккроссных гибридов остаются невыясненными, однако известно, что у пшенично-ржаных линий частота интрогрессии чужеродной хромосомы зависит как от генотипа линии, так и от генотипа сорта, используемого в скрещивании (Красилова и др., 2011). Анализ интрогрессивных линий гибридной пшеницы с *Aegilops columnaris* Zhuk. показал, что процессы интрогрессии зависят от

родительского генотипа пшеницы и уровня дивергенции гомеологичных хромосом родительских видов (Badaeva et al., 2018). Низкой компенсационной способностью отличаются хромосомы тех видов, которые в большей степени таксономически отошли от мягкой пшеницы, что могло быть вызвано структурными перестройками. Поскольку у хлопчатника пока не проводились исследования по выяснению причин, влияющих на частоту интрогрессии чужеродной хромосомы, изучение интрогрессивных линий пшеницы может способствовать пониманию сходных процессов у других видов растений.

Это исследование может прояснить в дальнейшем процессы, из-за которых происходит элиминация донорной хромосомы *G. barbadense* при беккроссировании в некоторых вариантах скрещиваний, но уже сегодня известно, что у хромосом D<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника мелких инверсий меньше, чем у хромосом A<sub>1</sub>-субгенома (Chen et al., 2020). Кроме того, у тетраплоидного хлопчатника имеются две реципрокные транслокации, Chr.4/Chr.5 и Chr.2/Chr.3, возникшие после полиплоидизации, которые были подтверждены наличием гомологичных локусов (Wang et al., 2016). На многих хромосомах, исключая хромосомы Chr.1, Chr.6, Chr.10, Chr.11, Chr.14, Chr.16, Chr.21, Chr.22 и Chr.24, обнаружены инверсии. Все вышеперечисленные структурные изменения хромосом тетраплоидного хлопчатника могли способствовать тем затруднениям, которые возникли при интрогрессии гомеологичных хромосом.

Сравнительный анализ конъюгации хромосом у беккроссных моносомиков разных вариантов скрещиваний выявил лишь единичные моносомии с дополнительными унивалентами BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo17 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>(110<sub>1</sub>)), что теоретически могло привести к «смене унивалента» в потомстве. Однако, как показало проведенное исследование, элиминация хромосомы *G. barbadense* в процессе беккроссирования наблюдалась в потомствах других беккроссных гибридов с модальной конъюгацией хромосом, что указало на существование механизма элиминации чужеродной хромосомы, не зависящего от конъюгации хромосом и последующего их расхождения.

Тем не менее ожидалось, что в одном варианте скрещиваний, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>(Mo34 × BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>)) (293<sub>3</sub>) у гибридного моносомика (497<sub>4</sub>) с модальной конъюгацией хромосом могли произойти какие-либо нарушения в генотипе потомков из-за формирования частично несбалансированных гамет вследствие сниженного мейотического индекса (83.66 ± 0.62) и увеличенного процента тетрад с микроядрами (до 9.23 ± 0.77). Поэтому обнаружение в следующем беккроссном поколении, BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>(Mo34 × BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>497<sub>4</sub>), пяти проростков без замещения хромосомы 6 A<sub>1</sub>-субгенома хлопчатника было предсказуемо и указало на исключительность предсказанного события (Санамьян, неопубл.).

Оценка фертильности пыльцы после окраски ацетокармином у анеуплоидных беккроссных растений хлопчатника выявила ее снижение в разных вариантах, что указало на абортацию нуллисомных гамет. Нередко в одних и тех же вариантах скрещиваний моносомные гибриды характеризовались различиями в числе жизнеспособной пыльцы. С другой стороны, объяснить различия в генотипах моносомных гибридов только отличиями в фертильности пыльцы не представляется возможным.

Ранее было показано, что оценка фертильности пыльцы после окраски ацетокармином в потомстве моносомиков хлопчатника является не вполне убедительной в качестве способа разделения моносомных и дисомных растений вследствие абортации несбалансированных микроспор в раннем развитии (Brown, Endrizzi, 1964). Такая оценка указывает на структурную изменчивость геномов межвидовых моносомных гибридов с чужеродным замещением хромосом и без него. Эта изменчивость на уровне поведения хромосом в первом делении мейоза с помощью рутинных методов окраски не обнаруживается, но на уровне жизнеспособности пыльцы четко прослеживается.

## Заключение

В настоящей работе показана особенность в интрогрессии индивидуальных хромосом хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum*. Хромосомы 4, 6, 12 A<sub>1</sub>-субгенома и 22 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* показали преимущественную интрогрессию, по этим хромосомам получены гибриды BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> с моносомным замещением *G. barbadense*/*G. hirsutum*. Хромосомы 2, 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* характеризовались элиминацией, среди них хромосомы 7 A<sub>1</sub>-субгенома и 18 D<sub>1</sub>-субгенома *G. barbadense* L. элиминировали уже в первом беккросном поколении.

## Список литературы / References

- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7): 827-835. DOI 10.18699/VJ19.556
- [Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556 (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985
- [Dospikhov B.A. Methodology of Field Experience (with the Basics of Statistical Processing of Research Results). Moscow: Agropromizdat Publ., 1985 (in Russian)]
- Красилова Н.М., Адонина И.Г., Силкова О.Г., Шумный В.К. Особенности передачи хромосомы ржи 2R при беккросировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D) различными сортами мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011;15(3):554-562
- [Krasilova N.M., Adonina I.G., Silkova O.G., Shumny V.K. Transmission of rye chromosome 2R in backcrosses of wheat-rye 2R(2D) substitution lines to various common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):554-562 (in Russian)]
- Санамьян М.Ф. Цитогенетика мутаций, транслокаций, моносомии и межвидовой гибридизации у хлопчатника. Ташкент: Изд-во «Университет», 2020
- [Sanamyayn M.F. Cytogenetics of Mutations, Translocations, Monosomy and Interspecific Hybridization in Cotton. Tashkent: University Publ., 2020 (in Russian)]
- Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У. Идентификация унivalentных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557
- [Sanamyayn M.F., Bobokhujayev Sh.U. Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019; 23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557 (in Russian)]
- Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахмонов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией нехваток отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016; 20(5):643-652. DOI 10.18699/VJ16.186
- [Sanamyayn M.F., Bobokhujayev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5): 643-652. DOI 10.18699/VJ16.186 (in Russian)]
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Родер М.С., Салина Е.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. *Генетика*. 2006;42(6):793-802
- [Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Salina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K., Dubovets N.I., Roeder M.S. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2006;42(6):645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093]
- Силкова О.Е., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Получение пшенично-ржаных замещенных линий на основе озимых сортов ржи с идентификацией кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. *Генетика*. 2007;43(8):1149-1152
- [Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Production of wheat-rye substitution lines based on winter rye cultivars with karyotype identification by means of C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2007;(43)8:957-960. DOI 10.1134/S102279540708 0200]
- Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Рубан А.С., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Бадаева Е.Д. Разработка генетической классификации хромосом *Aegilops columnaris* Zhuk. *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2): 241-249. DOI 10.18699/VJ17.243
- [Shishkina A.A., Dragovich A.Yu., Rouban A.S., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D. Development of the genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. chromosomes based on the analysis of introgression lines *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):241-249. DOI 10.18699/VJ17.243 (in Russian)]
- Anwar M., Iqbal M.Z., Abro A.A., Memon S., Bhutto L.A., Memon S.A., Peng Y. Inter-specific hybridization in cotton (*Gossypium hirsutum*) for crop improvement. *Agronomy*. 2022;12(12):3158. DOI 10.3390/agronomy12123158
- Badaeva E.D., Ruban A.S., Shishkina A.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Surzhikov S.A., Dragovich A.Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. (2n = 4x = 28, U<sup>c</sup>U<sup>c</sup>X<sup>c</sup>X<sup>c</sup>) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat × *Ae. columnaris* introgressive lines. *Genome*. 2018;61(2):131-143. DOI 10.1139/gen-2017-0186

- Brown M.S., Endrizzi J.E. The origin, fertility and transmission of monosomics in *Gossypium*. *Am. J. Bot.* 1964;51(1):108-115. DOI 10.2307/2440070
- Chen Z.J., Sreedasyam A., Ando A., Song Q., De Santiago L.M., Hulse-Kemp A.M., Ding M., Ye W., Kirkbride R.C., Jenkins J., Plott Ch., Lovell J., Lin Yu-M., Vaughn R., Liu B., Simpson Sh., Scheffler B.E., Wen L., Sasaki Ch.A., Grover C.E., Hu G., Conover J.L., Carlson J.W., Shu Sh., Boston L.B., Williams M., Peterson D.G., McGee K., Jones D.C., Wendel J.F., Stelly D.M., Grimwood J., Schmutz J. Genomic diversifications of five *Gossypium* allopolyploid species and their impact on cotton improvement. *Nat. Genet.* 2020;52(5):525-533. DOI 10.1038/s41588-020-0614-5
- Cui X., Liu F., Liu Yu., Zhou Zh., Zhao Y., Wang C.H., Wang X., Cai X., Wang Y., Meng F., Peng R., Wang K. Construction of cytogenetic map of *Gossypium herbaceum* chromosome 1 and its integration with genetic maps. *Mol. Cytogenet.* 2015;8(1):2. DOI 10.1186/s13039-015-0106-y
- Gan Y., Liu F., Peng R., Wang Ch., Li Sh., Zhang X., Wang Yu., Wang K. Individual chromosome identification, chromosomal colinearity and genetic-physical integrated map in *Gossypium darwinii* and four D genome cotton species revealed by BAC-FISH. *Genes Genet. Syst.* 2012;87(4):233-241. DOI 10.1266/ggs.87.233
- Dellaporta S.J., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983;1(4):19-21. DOI 10.1007/BF02712670
- Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Adv. Genet.* 1985;23:271-375. DOI 10.1016/S0065-2660(08)60515-5
- Fang D.D., Thyssen G.N., Wang M., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jones D.C. Genomic confirmation of *Gossypium barbadense* introgression into *G. hirsutum* and a subsequent MAGIC population. *Mol. Genet. Genomics.* 2023;298(1):143-152. DOI 10.1007/s00438-022-01974-3
- Garg M., Tsujimoto H., Gupta R.K., Kumar A., Kaur N., Kumar R. Chromosome specific substitution lines of *Aegilops geniculata* alter parameters of bread making quality of wheat. *PLoS One.* 2016; 11(10):e0162350. DOI 10.1371/journal.pone.0162350
- Guo Yu., Saha S., Yu J.Z., Jenkins J.N., Kohel R.J., Scheffler B.E., Stelly D.M. BAC-derived SSR markers chromosome locations in cotton. *Euphytica.* 2008;161:361-370. DOI 10.1007/s10681-007-9585-1
- Gutiérrez O.A., Stelly D.M., Saha S., Jenkins J.N., McCarty J.C., Raska D.A., Scheffler B.E. Integrative placement and orientation of non-redundant SSR loci in cotton linkage groups by deficiency analysis. *Mol. Breeding.* 2009;23:693-707. DOI 10.1007/s11032-009-9266-y
- Grover C.E., Arick M.A., Thrash A., Sharbrough J., Hu G., Yuan D., Snodgrass S., Miller E.R., Ramaraj T., Peterson D.G., Udall J.A., Wendel J.F. Dual domestication, diversity, and differential introgression in Old World cotton diploids. *Genome Biol. Evol.* 2022;14(12):evac170. DOI 10.1093/gbe/evac170
- Hoffman S.M., Yu J.Z., Grum D.S., Xiao J., Kohel R.J., Pepper A.E. Identification of 700 new microsatellite loci from cotton (*G. hirsutum* L.). *J. Cotton Sci.* 2007;11:208-241
- Hulse-Kemp A.M., Lemm J., Plieske J., Ashrafi H., Buyyarapu R., Fang D.D., Frelichowski J., Giband M., Hague S., Hinze L.L., Kochan K.J., Riggs P.K., Scheffler J.A., Udall J.A., Ulloa M., Wang S.S., Zhu Q.H., Bag S.K., Bhardwaj A., Burke J.J., Byers R.L., Clavierie M., Gore M.A., Harker D.B., Islam M.S., Jenkins J.N., Jones D.C., Lacape J.M., Llewellyn D.J., Percy R.G., Pepper A.E., Poland J.A., Mohan Rai K., Sawant S.V., Singh S.K., Spriggs A., Taylor J.M., Wang F., Yourstone S.M., Zheng X., Lawley C.T., Ganal M.W., Van Deynze A., Wilson I.W., Stelly D.M. Development of a 63K SNP array for cotton and high-density mapping of intraspecific and interspecific populations of *Gossypium* spp. *G3.* 2015;5(6): 1187-1209. DOI 10.1534/g3.115.018416
- International Cotton Advisory Committee-ICAC-2019. [https://www.researchgate.net/publication/228581277\\_International\\_Cotton\\_Advisory\\_Committee](https://www.researchgate.net/publication/228581277_International_Cotton_Advisory_Committee)
- International Cotton Advisory Committee-ICAC-2021. <https://www.icac.org>
- Jenkins J.N., Wu J., McCarty J.C., Saha S., Gutiérrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: I. Yield and yield components. *Crop Sci.* 2006;46(3): 1169-1178. DOI 10.2135/cropsci2005.08-0269
- Jenkins J.N., McCarty J.C., Wu J., Saha S., Gutierrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: II. Fiber quality traits. *Crop Sci.* 2007;47(2):561-570. DOI 10.2135/cropsci2006.06.0396
- Lacape J.M., Jacobs J., Arioli T., Derijcker R., Forestier C.N., Llewellyn D., Jean J., Thomas E., Viot C. A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G. barbadense*, RIL population: towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* 2009; 119(2):281-292. DOI 10.1007/s00122-009-1037-y
- Liu S., Saha S., Stelly D.M., Burr B., Cantrell R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *J. Hered.* 2000;91(4): 326-332. DOI 10.1093/jhered/91.4.326
- Rawat N., Neelam K., Tiwari V.K., Randhawa G.S., Friebe B., Gill B.S., Dhaliwal H.S. Development and molecular characterization of wheat – *Aegilops kotschy* addition and substitution lines with high grain protein, iron, and zinc. *Genome.* 2011;54(11):943-953. DOI 10.1139/G11-059
- Reddy K.R., Bheemanahalli R., Saha S., Singh K., Lokhande S.B., Gajanayake B., Read J.J., Jenkins J.N., Raska D.A., Santiago L.M., Hulse-Kemp A.M., Vaughn R.N., Stelly D.M. High-temperature and drought-resilience traits among interspecific chromosome substitution lines for genetic improvement of upland cotton. *Plants.* 2020; 9(12):1747. DOI 10.3390/plants9121747
- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C. Jr., Gutierrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. *J. Cotton Sci.* 2004;8(3):162-169
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) F<sub>1</sub> hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. *J. Cotton Sci.* 2006;10(4):263-272
- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Hayes R., Stelly D.M. Genetic dissection of chromosome substitution lines of cotton to discover novel *Gossypium barbadense* L. alleles for improvement of agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(6):1193-1205. DOI 10.1007/s00122-009-1247-3
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali Sh., Gutierrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution F<sub>1</sub> hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. *J. Cotton Sci.* 2013;17(2): 102-114
- Saha S., Stelly D.M., Makamov A.K., Ayubov M.S., Raska D., Gutiérrez O.A., Shivapriya M., Jenkins J.N., Dewayne D., Abdurakhmonov I.Y. Molecular confirmation of *Gossypium hirsutum* chromosome substitution lines. *Euphytica.* 2015;205:459-473. DOI 10.1007/s10681-015-1407-2
- Saha S., Jenkins J.N., McCarty J.C., Hayes R.W., Stelly D.M., Campbell B.T. Registration of two CS-B17-derived Upland cotton recombinant inbred lines with improved fiber micronaire. *J. Plant Regist.* 2018;12(1):97-100. DOI 10.3198/jpr2015.09.0061erg
- Saha S., Bellaloui N., Jenkins J.N., McCarty J.C., Stelly D.M. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem and *G. mustelinum* Watt into *G. hirsutum* L. on cotton seed protein and oil content. *Euphytica.* 2020;216: 118. DOI 10.1007/s10681-020-02644-4
- Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Cytogenetic collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). World Cotton Germplasm Resources. InTech, 2014;247-287. DOI 10.5772/58589
- Sanamyan M.F., Makamov A.K., Bobokhujaev Sh.U., Usmonov D.E., Buriev Z.T., Saha S., Stelly D.M. The Utilization of translocation

- lines and microsatellite markers for the identification of unknown cotton monosomic lines. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). Cotton Research. InTech, 2016;167-183. DOI 10.5772/64558
- Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Abduraimov Sh.S., Makamov Kh.A., Silkova O.G. Features of chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into *G. hirsutum* L. during the development of alien substitution lines. *Plants*. 2022;11(4):542. DOI 10.3390/plants11040542
- Sarr D., Lacape J.-M., Rodier-Goud M., Jacquemi N.J.-M., Benbouza H., Toussaint A., Palm R., Ahoton L., Baudoïn J.-P., Mergeai G. Isolation of five new monosomic alien addition lines of *Gossypium australe* F. Muell. in *G. hirsutum* L. by SSR and GISH analyses. *Plant Breed.* 2011;130(1):60-66. DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01819.x
- Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*. 2008;163(1):1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y
- Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Selection of U and M genome-specific wheat SSR markers using wheat-*Aegilops biuncialis* and wheat-*Ae. geniculata* addition lines. *Euphytica*. 2010;175:357-364. DOI 10.1007/s10681-010-0180-5
- Shchapova A., Kravtsova L. The production of wheat-rye substitution lines by using the Giemsa staining technique. *Cereal Res. Commun.* 1982;10(1-2):33-39
- Si Z., Chen H., Zhu X., Cao Z., Zhang T. Genetic dissection of lint yield and fiber quality traits of *G. hirsutum* in *G. barbadense* background. *Mol. Breed.* 2017;37:9. DOI 10.1007/s11032-016-0607-3
- Stelly D.M., Saha S., Raska D.A., Jenkins J.N., McCarty J.C. Jr., Gutiérrez O.A. Registration of 17 upland (*Gossypium hirsutum*) cotton germplasm lines disomic for different *G. barbadense* chromosome or arm substitutions. *Crop Sci.* 2005;45(6):2663-2665. DOI 10.2135/cropsci2004.0642
- Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Harcharan S.D. Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschy* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(2):259-269. DOI 10.1007/s00122-010-1307-8
- Ulloa M., Wang C., Saha S., Hutmacher R.B., Stelly D.M., Jenkins J.N., Burke J., Roberts P.A. Analysis of root-knot nematode and fusarium wilt disease resistance in cotton (*Gossypium* spp.) using chromosome substitution lines from two alien species. *Genetica*. 2016;144(2):167-179. DOI 10.1007/s10709-016-9887-0
- Wang B., Liu L., Zhang D., Zhuang Zh., Guo Hui., Qiao Xin., Wei L., Rong J.O., May L., Paterson A.H., Chee P.W. A genetic map between *Gossypium hirsutum* and the Brazilian endemic *G. mustelinum* and its application to QTL mapping. *G3*. 2016;6(6):1673-1685. DOI 10.1534/g3.116.029116
- Wendel J.F., Brubaker C.L., Alvarez I., Cronn R., Stewart J.M. Evolution and natural history of the cotton genus. In: Paterson A.H. (Ed.). Genetics and Genomics of Cotton, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Vol. 3. New York: Springer, 2009;3-22. DOI 10.1007/978-0-387-70810-2\_1
- Zhang J., Percy R.G., McCarty J.C. Introgression genetics and breeding between Upland and Pima cotton: a review. *Euphytica*. 2014;98:1-12. DOI 10.1007/s10681-014-1094-4

---

#### ORCID

O.G. Silkova orcid.org/0000-0003-3299-2975

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан в рамках проекта Ф-ОТ-2021-155.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.01.2023. После доработки 29.09.2023. Принята к публикации 29.09.2023.