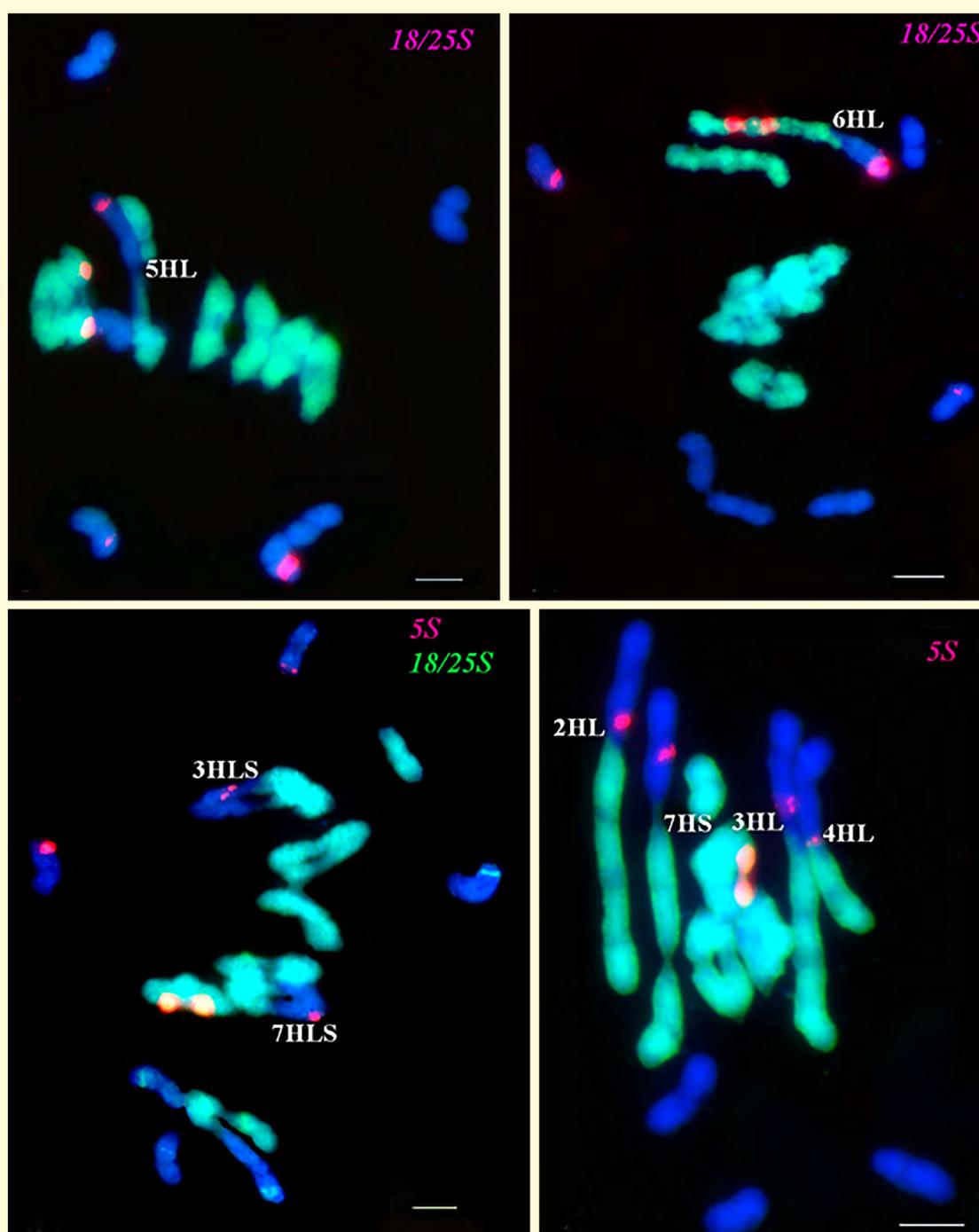


БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

3(2), 2020



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)



THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION
FEDERAL RESEARCH CENTER
THE N.I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2020, 3(2)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров, генетиков,
преподавателей вузов биологического
и сельскохозяйственного профиля.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2020, 3(2)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists, geneticists,
plant breeders and lecturers of biological
and agricultural universities and colleges.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center
the N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources (VIR)

Используемые на обложке фотографии:

Гомеологичные ассоциации хромосом Hv-Hb в метафазе I мейоза в материнских клетках пыльцы у триплоидных гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb).

Homoeologous pairing of individual chromosomes Hv-Hb at metaphase I of meiosis in pollen mother cells (PMC) of *H. vulgare* × *H. bulbosum* triploid hybrids (HvHbHb)

Главный редактор:

Е. К. Хлесткина – д.б.н., профессор РАН.

Заместитель главного редактора:

Т. А. Гавриленко – д.б.н.

Ответственные секретари:

И. Н. Анисимова – д.б.н.

Л. Ю. Новикова – д.с.-х.н.

Редакционный совет:

А. И. Аbugалиева – д.б.н. (Казахстан)

О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)

Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)

Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

А. И. Грабовец – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)

С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)

Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)

В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)

Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)

А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)

З. А. Козловская – д.с.-х.н. (Беларусь)

Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)

В. Н. Корзун – д-р (Германия)

А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)

Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)

В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)

С. Мишева – д-р (Болгария)

А. И. Моргунов – д-р (Турция)

В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)

А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)

И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)

П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)

Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)

В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия:

Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)

Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)

А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)

И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)

А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)

М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)

В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)

С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)

Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)

С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)

М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)

С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)

Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)

Я. Н. Демури – д.б.н. (Россия)

М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)

С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)

О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)

А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)

М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)

Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)

С. В. Зеленцов – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)

Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)

Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)

Н. Н. Карпун – к.б.н. (Россия)

В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)

Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)

Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)

Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)

К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)

С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)

И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)

И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)

В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)

П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)

Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)

Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)

И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)

Е. И. Михайлова – д.б.н. (Россия)

С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)

В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)

Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)

Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)

А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)

А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)

И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)

Е. К. Турусбеков – к.б.н. (Казахстан)

Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)

О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)

Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)

Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)

Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)

М. Н. Шаптуренко – д.б.н. (Беларусь)

О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)

Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)

Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

Editor-in-Chief:

E. K. Khlestkina – Dr. Sci. in Biol., Professor.

Deputy Editor-in-Chief:

T. A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol.

Executive Secretaries:

I. N. Anisimova – Dr. Sci. in Biol.

L. Yu. Novikova – Dr. Sci. in Agricul.

Editorial council:

A. I. Abugalieva – Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)

O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)

L. A. Bepalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)

G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)

A. I. Grabovets – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)

S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)

G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)

P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)

A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)

A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)

N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

V. N. Korzun – Dr. (Germany)

Z. A. Kozlovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)

N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)

V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

S. Misheva – Dr. (Bulgaria)

A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)

A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)

E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board:

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)

A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)

R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)

Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)

S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)

V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)

S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

E. T. Ilnitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)

N. N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)

I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

I. E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

E. I. Mikhailova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

V. N. Podorozhnyi – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)

T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

M. N. Shapturenko – Dr. Sci. Biology (Belarus)

O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)

I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.

E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)

M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)

G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)

R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 5

Хлесткина Е. К.

ВСТУПИТЕЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 6

Пендинен Г. И., Шольц М.

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

ОБЗОР 16

*Асадова Г. М., Ульянов А. В., Карлов М. В.,
Хатефов Э. Б.*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ГАПЛОИНДУКТОРОВ В СЕЛЕКЦИИ
КУКУРУЗЫ

ОБЗОР 30

Макарова Т. О.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ
В ИССЛЕДОВАНИЯХ ОТДАЛЕННЫХ
ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Contents

FROM THE EDITORIAL CHIEF 5

Khlestkina E. K.

INTRODUCTORY ARTICLE

ORIGINAL ARTICLE 6

Pendinen G. I., Scholz M.

HOMOEOLOGOUS CHROMOSOME
PAIRING AT METAPHASE
I OF MEIOSIS IN *HORDEUM*
vulgare L. × *H. bulbosum* L. TRIPLOID
HYBRIDS (HvHbHb)

REVIEW 16

*Asadova G. M., Ulyanov A. V., Karlov M. V.,
Khatfov E. B.*

THE PROSPECTS FOR USING
HAPLOINDUCERS IN MAIZE
BREEDING

REVIEW 30

Makarova T. O.

THE USE OF MOLECULAR
CYTOGENETIC METHODS IN THE
INVESTIGATION OF DISTANT POTATO
HYBRIDS.



Уважаемые читатели!

Мы представляем в настоящем номере результаты исследований и обзорные статьи, которые могут быть интересны практикующим селекционерам, разрабатывающим программы по гибридной селекции, и программы, в которых в селекционный процесс вовлекаются отдаленные межвидовые и межродовые гибриды. В обзорной статье «Перспективы использования гаплоиндукторов в селекции кукурузы» проводится анализ современных достижений в этом направлении. Подчеркивается, что данный метод позволяет создавать гомозиготные линии кукурузы за два года, а с использованием фитотронов или зимних питомников - в течение 1 года вместо 8-10 лет селекционной работы, что способствует существенному ускорению селекционного процесса гибридной кукурузы. Стопроцентная гомозиготность дигаплоидных линий содействует высокой выровненности всех морфологических признаков и существенно повышает качество семеноводческой продукции родительских линий и их гибридов. Идет работа по совершенствованию гаплоиндукторов, благодаря которой удалось повысить частоту гаплоиндукции у кукурузы с 0,1% до 10-15%. Дальнейшее совершенствование метода гаплоиндукции и создания гаплоиндукторных линий кукурузы имеет перспективы не только для гибридной селекции кукурузы, но и для развития методов доставки

редактирующих конструкций для модификации генов мишеней широкого спектра генотипов как самой кукурузы, так и других культур, например, пшеницы.

Обзор «Использование методов молекулярной цитогенетики в исследованиях отдаленных гибридов» картофеля представляет современное состояние исследований в области межвидовой гибридизации, полиплоидии и анализа филогенетических отношений между видами рода *Solanum* и представителями близких к нему таксонов, с использованием методов молекулярной цитогенетики, таких как гибридизация ДНК-ДНК *in situ*, включая методы GISH и FISH. С позиции значимости фундаментальных исследований особый акцент сделан на изучении диких аллополиплоидных видов картофеля при помощи методов молекулярной цитогенетики, а с практической точки зрения отдельное внимание уделено результатам исследований искусственно созданных межродовых и межвидовых гибридов рода *Solanum* и их потомства.

В статье «Спаривание гомеологичных хромосом в метафазе I мейоза у триплоидных гибридов *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* (HvHbHb)» приведены результаты исследования триплоидных межвидовых гибридов ячменя (*Hordeum* L.). Изучены межгеномные ассоциации хромосом в MI мейоза у гибридов *H. vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb), показана специфичность взаимодействия гомеологичных хромосом и их плеч, возможно зависящая от их способности к эктопической рекомбинации. Полученные результаты важны для дальнейшего контролируемого создания на основе таких гибридов генетически разнообразных интрогрессивных линий в качестве «мостика» для передачи ячменю культурному полезных аллелей от *H. bulbosum*. Здесь следует подчеркнуть, что перенос полезных признаков от диких сородичей в сорта культурных растений нередко сопровождается сопутствующей передачей нежелательных генов, снижающих урожайность и ухудшающих качество продукции, поэтому точность и целенаправленность, а также снижение размера интрогрессируемых участков хроматина - приоритетная задача пребридинговых программ, основанных на отдаленной гибридизации.

Главный редактор,
д.б.н., профессор РАН
Хлесткина Е.К.

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

Пендинен Г. И.^{1*}, Шольц М.²

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

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

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

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

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

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

Дополнительная информация/Additional information

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

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

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

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

Pendinen G. I.^{1*}, Scholz M.²

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

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

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

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

Для цитирования: Пендинен Г.И., Шольц М. Спаривание гомеологичных хромосом в метафазе I мейоза у триплоидных гибридов *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (HvHbHb). *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):6-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-o2

For citation: Pendinen G.I., Scholz M. Homoeologous chromosome pairing at metaphase I of meiosis in *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. triploid hybrids (HvHbHb). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2):6-15. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-o2

ORCID:

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

УДК 575.222.72

Поступила в редакцию: 01.12.2020

Принята к публикации: 14.12.2020

Введение

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

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

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

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

Материалы и методы.

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

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

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

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

* – две хромосомы 6H

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Результаты

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

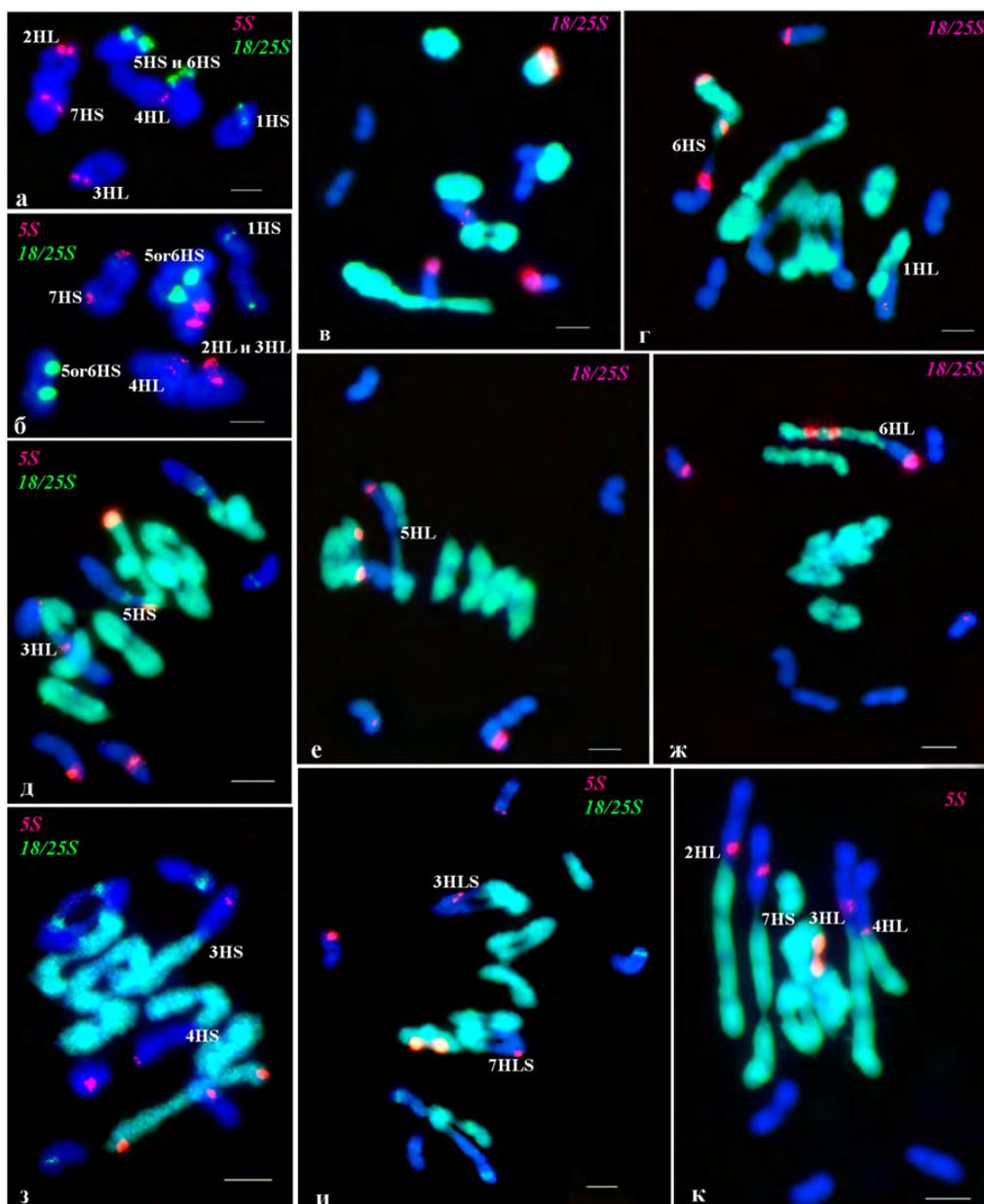


Рис. 1. Гомеологические ассоциации хромосом Hv-Hb в МI мейоза в материнских клетках пыльцы (МКП) триплоидных гибридов *H. Vulgare* × *H. bulbosum* (HvHbHb). (GISH с меченой ДНК *H. bulbosum* (DIG – зеленая метка), FISH с хромосомоспецифичными маркерами)

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

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

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

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

Обсуждение

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

Благодарности/Acknowledgements

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

Литература/References/

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

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

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

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

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

Fukuyama T., Hosoya H. Genetic control and mechanism of chromosome elimination in the hybrids between *Hordeum bulbosum* (4x) and *H. vulgare* (4x). *Japanese Journal of Genetics*. 1983;58:241-250. DOI: 10.1266/jjg.58.241

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Michel M. Untersuchungen zur Übertragung von Resistenzgenen aus der Wildart *Hordeum bulbosum* L. in die Kulturgerste *Hordeum vulgare* L. PhD Thesis, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Technische Universität München; 1996. [in German]

Pendinen G.I., Chernov V.E., Scholz M. Biological characterization of introgressive barley lines obtained on the basis of the interspecific hybrid *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):16-24. [in Russian] (Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М. Характеристика интрогрессивных линий ячменя, полученных на основе межвидового гибрида *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b). *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):16-24). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

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

Pickering R.A., Hudakova S., Houben A., Johnston P.A., Butler R.C. Reduced metaphase I associations between the short arms of homoeologous chromosomes in a *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. diploid hybrid influences the frequency of recombinant progeny. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109:911-916. DOI: 10.1007/s00122-004-1725-6

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

Pickering R.A., Klatt S., Butler R.C. Identification of all chromosome arms and their involvement in meiotic homoeologous associations at metaphase I in 2 *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. hybrids. *Genome*. 2006a;49:73-78. DOI: 10.1139/G05-071

Pickering R.A., Malyshev S., Künzel G., Johnston P.A., Korzun V., Menke M., Schubert I. Locating introgressions of *Hordeum*

- bulbosum* chromatin within the *H. vulgare* genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000;100(1):27-31. DOI: 10.1007/PL00002904
- Pickering R., Ruge-Wehling B., Johnston P.A., Schweizer G., Ackermann P., Wehling P. The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS. *Plant Breeding*. 2006b;125:576-579. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01253.x
- Pickering R.A., Timmerman G.M., Cromey M.G., Melz G. Characterisation of progeny from backcrosses of triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. (2x) and *H. bulbosum* L. (4x) to *H. vulgare*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88(3-4):460-464. DOI: 10.1007/BF00223661
- Ruge B., Linz A., Pickering R., Proeseler G., Greif P., Wehling P. Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;107:965-971. DOI: 10.1007/s00122-003-1339-4
- Ruge-Wehling B., Linz A., Habekuß A., Wehling P. Mapping of *Rym16Hb*, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;113(5):867-873. DOI: 10.1007/s00122-006-0345-8
- Scholz M., Pendinen G. The Effect of homoeologous meiotic pairing in tetraploid *Hordeum bulbosum* L. × *H. vulgare* L. hybrids on alien introgressions in offspring. *Cytogenetics and Genome Research*. 2017;150(2):139-149. DOI: 10.1159/000455141
- Scholz M., Ruge-Wehling B., Habekuß A., Schrader O., Pendinen G., Fischer K., Wehling P. *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;119:837-849. DOI: 10.1007/s00122-009-1093-3
- Shtaya M.J.Y., Sillero J.C., Flath K., Pickering R., Rubeales D. The resistance to leaf rust and powdery mildew of recombinant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) derived from *H. vulgare* × *H. bulbosum* crosses. *Plant Breeding*. 2007;126:259-267. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01328.x
- Singh R.J., Tsuchiya T. Identification and designation of telocentric chromosomes in barley by means of Giemsa N-banding technique. *Theoretical and Applied Genetics* 1982;64:13-24. DOI: 10.1007/BF00303644
- Yakura K., Tanifuji S. Molecular cloning and restriction analysis of *EcoRI*-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiology*. 1983;24:1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650
- Zhang L., Pickering R., Murray B. Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*. 1999;83:304-309. DOI: 10.1038/sj.hdy.6885710

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАПЛОИНДУКТОРОВ В СЕЛЕКЦИИ КУКУРУЗЫ

Асадова Г.М.¹, Ульянов А.В.¹, Карлов М.В.²,
Хатефов Э.Б.^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ haed1967@rambler.ru

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Обнаружение спонтанно образовавшихся гаплоидных растений и разработка способов получения их в культуре *in vitro* определили новое направление, важное для селекции и для теоретических исследований в области репродуктивной биологии. Частота спонтанной гаплоидии в посевах культурных растений крайне низка и составляет не более 0,01-0,1%, поэтому поиск источников и доноров, способных к стимулированию гаплоидии в гибридных комбинациях, весьма актуален. Расширение поиска новых доноров признака гаплоиндукции, создание новых, более эффективных гаплоиндукторов способствует накоплению генетических источников, характеризующихся высоким ресурсным потенциалом для селекционно-генетических исследований. Причины, способствующие стимулированию гаплоидии, еще недостаточно изучены. Есть сведения, что за этот процесс ответственны гены, локализованные в *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* районах хромосомы 1 кукурузы. Использование генов, стимулирующих гаплоиндукцию кукурузы в сочетании с маркерным геном антоциановой окраски зерновки и зародыша *RI-nj*, а также антоциановой окраски растения *AI* и *BI*, позволило создать линии-гаплоиндукторы с частотой стимулирования гаплоидов до 15%. Фенотипическое проявление доминантных аллелей генов маркерной антоциановой окраски на различных частях гибридного растения, а также на зерновке и зародыше способствует качественному отбору гаплоидных зерновок на початке за счет проявления рецессивных аллелей этих генов на гаплоидном уровне. Наличие в кремнистой кукурузе генов подавителей синтеза антоцианов (*CI-1*, *C2-Idf*, *In1-D*) ограничивает использование гена *RI-nj* на других представителях подвида кремнистой кукурузы. Для преодоления данной проблемы ведутся исследования по созданию гаплоиндукторов, у которых маркерным признаком служит содержание масла в зерне или отсутствие лигулы на листьях. Использование матроклинного и андроклинного типов гаплоиндукции позволяет селекционерам получать в высокой степени гомозиготные дигаплоидные линии кукурузы как с материнским, так и с отцовским геномом. Благодаря этим достижениям стало возможным сокращение материальных и временных затрат на создание инбредных линий и их стерильных аналогов в 5 и более раз, ускорилась селекционная работа по созданию новых гибридов кукурузы, значительно улучшилось качество семеноводческой продукции, ее типичность и однородность. Приведенные в статье материалы помогут селекционерам и генетикам лучше ориентироваться в инновационных направлениях и проблемах селекции гибридной кукурузы.

Ключевые слова: гаплоиндукторы кукурузы, дигаплоидные линии, гомозиготность, колхицинирование, гибридная селекция, частота гаплоидии.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-03>

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

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

THE PROSPECTS FOR USING HAPLOINDUCERS IN MAIZE BREEDING

Asadova G.M.¹, Ulyanov A.V.¹, Karlov M.V.²,
Khatetov E.B.^{1*}

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ haed1967@rambler.ru

²National Research N.G. Chernyshevsky Saratov State University, 83 Astrakhanskaya Street, Saratov 410012, Russia

The discovery of spontaneous haploid plants and the development of ways to produce them in *in vitro* culture have set a new direction important for breeding and for theoretical research in reproductive biology. The frequency of spontaneous haploidy in cultivated plants is extremely low and does not exceed 0.01-0.1%, therefore, the search for sources and donors capable of stimulating haploidy in hybrid combinations is of current interest. Expansion of the search for new sources and donors of the haploinduction trait, the creation of new, more effective haploinducers contribute to the accumulation of scientific information and genetic sources, characterized by a high resource potential for selection and genetic research. The causes of haploidy are not well understood yet. According to the available information, the genes localized in the *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* regions of chromosome 1 in maize are responsible for this process. The use of genes that stimulate haploinduction in maize in combination with the marker gene *RI-nj* responsible for anthocyanin coloration of the caryopsis and embryo, as well as genes *AI* and *BI*, which are in control of the entire plant coloration, allowed the creation of haploinducer lines with a frequency of haploid stimulation up to 15%. Phenotypic expression of dominant alleles of the marker anthocyanin coloration genes in different parts of a hybrid plant, as well as in the caryopsis and embryo, contributes to the high-quality selection of haploid kernels in the cob due to the manifestation of recessive alleles of these genes at the haploid level. The presence of anthocyanin synthesis suppressor genes in siliceous maize (*CI-1*, *C2-Idf*, *In1-D*) restricts the use of the *RI-nj* gene in other representatives of siliceous maize. In order to overcome this problem, studies are underway to create other genotypes of haploinducers, which are not associated with the anthocyanin coloration of the caryopsis, but instead have other marker traits, such as the oil content in the kernel, the absence of ligules in the leaves, and root coloration in seedlings. The use of matroclinous and androclinous types of haploinduction allows breeders to obtain highly homozygous dihaploid maize lines, with both the maternal and paternal genomes. These achievements made it possible to cut five or more times the material and time inputs into the creation of inbred lines and their sterile analogs, accelerate the breeding of new maize hybrids, and significantly improve the quality of seed production in terms of typicality and uniformity. The materials presented in the article should help breeders and geneticists to learn more about the innovative directions and problems of hybrid maize breeding.

Key words: maize haploinducers, dihaploid lines, homozygosity, colchicination, hybrid selection, haploidy frequency.

Для цитирования: Асадова Г.М., Ульянов А.В., Карлов М.В., Хатефов Э.Б. Перспективы использования гаплоиндукторов в селекции кукурузы. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):16-29. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-03

For citation: Asadova G.M., Ulyanov A.V., Karlov M.V., Khatetov E.B. The prospects for using haploinducers in maize breeding. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2):16-29. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-03

ORCID:

Khatetov E.B. <https://orcid.org/0000-0001-5713-2328>

УДК 633.15:631.52.524:631.527

Поступила в редакцию: 31.08.2020

Принята к публикации: 05.11.2020

Введение

Кукуруза – третий по экономическому значению хлебный злак в мировом земледелии, в этом немаловажную роль сыграло ее постоянное селекционно - генетическое улучшение, и, в частности, создание гибридов кукурузы на основе инбредных родительских линий. Интенсивное внедрение в промышленное семеноводство гетерозисных гибридов с середины XX века способствовало массовому созданию инбредных линий по всему миру. На создание линий с долей гомозиготных селекционно значимых локусов в геноме равной 99,9% селекционер затрачивает 10 лет, а с долей гомозиготных локусов 99,99% - до 14 лет работы по самоопылению (инцухту) растений. Для получаемых гетерозисных гибридов очень важно достижение высокой доли гомозиготности у исходных родительских линий, поскольку от её значения зависит выровненность селекционно ценных признаков, синхронность наступления фенологических фаз развития растений и их созревание, что в свою очередь отражается на их технологичности в семеноводстве и промышленном производстве товарной продукции. Гибриды, созданные на осно-

ве инбредных линий, полученных с помощью инцухта, не позволяют семеноводческим компаниям и аграриям достигнуть абсолютной выровненности по селекционно ценным признакам, дружности всходов и созревания, одинаковой отзывчивости на агротехнику.

Первые гаплоидные растения, обнаруженные в 1922 г. Блэкли (Blakeslee et al., 1922) с соавторами, а также полученные Гуха и Магешвари в 1964 г. в культуре *in vitro* (Guha, Maheshwari, 1964), определили новое и важное направление для селекции и теоретических исследований в области репродуктивной биологии. Настоящий прорыв в селекции гибридов кукурузы и их родительских линий был совершен благодаря открытию Чейзом (Chase, 1949) метода гаплоиндукции. Это открытие послужило толчком к созданию первых гаплоиндукторов и созданию инбредных линий (дигаплоидных линий) с высоким уровнем гомозиготности, которые получали в результате митотического удвоения числа хромосом у гаплоида. Первые дигаплоидные (DH) линии кукурузы показали 100% гомозиготность по всем аллелям селекционно ценных генов, которая была достигнута отбором в течение двух циклов репродукции (рис. 1). При этом возросла фенотипиче-

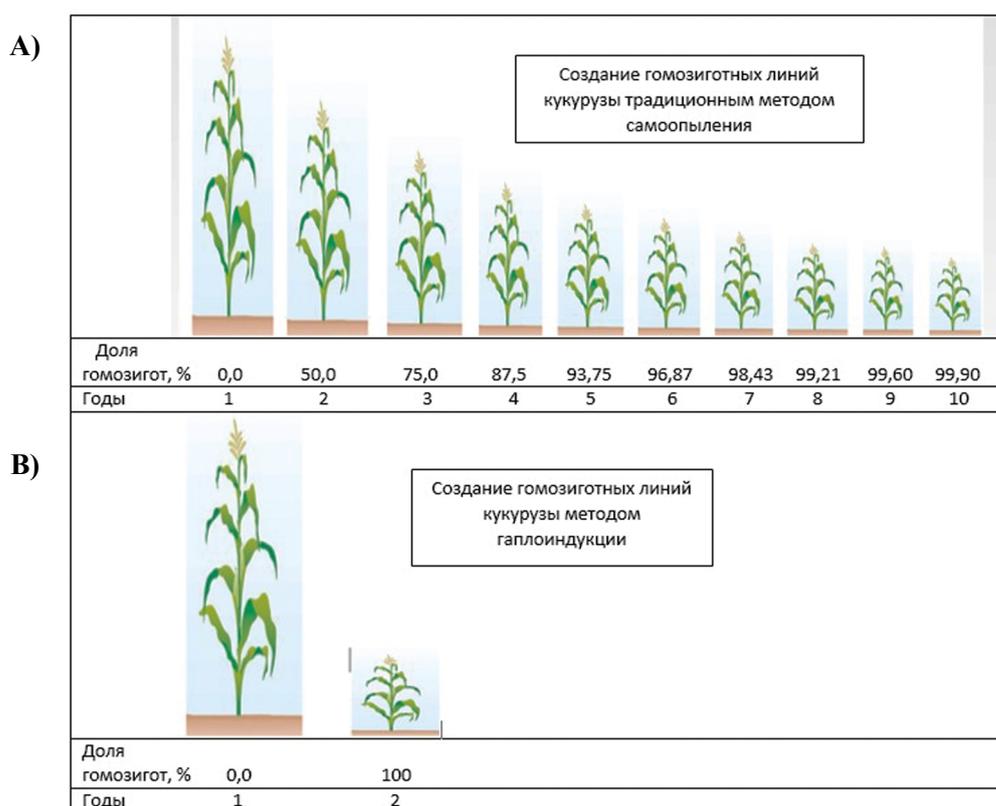


Рис. 1. Возрастание доли гомозигот в ряду поколений гибридов кукурузы в результате А) самоопыления (инцухта) и В) гаплоиндукции.

Fig. 1. Increase in homozygote fraction in several generations of maize hybrids as a result of А) self pollination (inzucht) and В) haploinduction.

ская однородность родительских линий гибридов кукурузы по всем признакам и, как следствие этого, технологичность созданных на их основе гибридных комбинаций (Mayor, Bernardo, 2009). В конце XX века началось распространение метода гаплоиндукции с целью массового получения ДН линий кукурузы по всему миру, в том числе и в России (Shatskaya, 2010a,b). Первые исследования по гаплоиндукции кукурузы были начаты в СССР В.С. Тырновым, А.Н. Завалишиной, Н.Х. Еналеевой в Саратовском университете под руководством проф. С.С. Хохлова. (Khokhlov, 1976; Tyrnov, Zavalishina, 1984). Ими были созданы первые отечественные гаплоиндукторные линии кукурузы.

Гаплоидия и механизм возникновения гаплоидов

У цветковых растений гаплоидия является результатом развития зародыша из редуцированных (гаплоидных) гамет или из родственных им гаплоидных клеток путем апомиксиса, т. е. без оплодотворения. Развитие гаплоидного зародыша возможно в случае элиминации хромосом одного из родительских видов в эмбриогенезе после оплодотворения и образования зиготы при межвидовой гибридизации, например, как в случае скрещиваний культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. (2x) с ячменем луковичным *H. Bulbosum* L. (2x) (Kasha, Kao, 1970; Hayes, et al., 2003; Devaux, 2003; Mishutkina et al., 2013). Гаплоидия встречается более чем у 150 видов растений из 70 родов 33 семейств (в том числе из семейства злаков, паслёновых, орхидных, бобовых и др.). Гаплоидия обнаружена у всех основных культурных растений: пшеницы, ржи, кукурузы, риса, ячменя, сорго, картофеля, табака, хлопка, льна, свёклы, капусты, тыквы, огурцов, томатов; у кормовых трав: мятликов, костра, тимофеевки, люцерны, вики и др. (Kirillova, 1966). В результате проявления гаплоидии у диплоидных цветковых растений формируются семена (у злаков – зерновки) с гаплоидным набором хромосом в тканях зародыша, из которых при прорастании развиваются гаплоидные растения (Kimber, Riley, 1963; Magoon, Khanna, 1963).

Экспериментальное получение гаплоидов с использованием гаплоиндукторов основывается на двух типах нарушения оплодотворения цветковых растений – андрогенезе и гиногенезе.

1. Андрогенез – развитие организма только за счёт ядерного материала мужской гаметы, внесённого спермием в яйцеклетку в процессе оплодотворения. При этом ядерный материал яйцеклетки не сливается с мужским и элиминируется, оплодотворение при этом относится к псевдогамному (ложному) типу. Потомство, полученное путем андрогенеза, наследует гаплоидный или дигаплоидный (при спонтанном удвоении числа хромосом) генетический материал и признаки только отцовской формы (Astaurov, 1977; Darevsky et al., 1985; Golubovsky, 2000).

2. Гиногенез – одна из форм партеногенеза (апомиксиса) при котором проникновение спермия в яйцеклетку не завершается слиянием ядерного материала гамет, и в последующем развитии участвует только ядро яйцеклетки. Спермий может не проникнуть в яйцеклетку и, в таком случае, выступит в качестве стимулирующего агента для развития яйцеклетки. Организм, формирующийся путем гиногенеза несет гаплоидный или дигаплоидный (при спонтанном удвоении числа хромосом) материал материнского растения и наследует признаки только материнской формы (Wilson, 1936; Astaurov, 1966; Strunnikov, 1998).

Возникновение гаплоидных генотипов у кукурузы в естественных условиях происходит очень редко, вследствие нарушения процессов слияния ядра одного из двух спермиев с яйцеклеткой либо элиминации одного из спермиев, проникающих в зародышевый мешок в процессе оплодотворения (Tyrnov, Khokhlov, 1974; 1976). Второй спермий, успешно слившись с центральным ядром зародышевого мешка, образует триплоидное ядро, которое начинает серию интенсивных митотических делений, за которыми следует формирование вокруг зародыша триплоидной ткани эндосперма зерновки. Интенсивный рост и накопление в эндосперме крахмала стимулирует партеногенетическое развитие гаплоидной ткани из неоплодотворенной яйцеклетки и способствует формированию гаплоидного зародыша. Частота возникновения спонтанной гаплоидии у каждого вида растений специфична и чаще всего сохраняется низкой, не превышая 1%. У кукурузы частота спонтанной гаплоидии составляет в среднем 1/1000 (Chase, 1969). После осознания селекционерами перспективности применения гаплоидии в селекционных исследованиях, гаплоидная технология начала интенсивно развиваться. Первые успешные опыты по регенерации гаплоидных растений *in vitro* в культуре незрелых пыльников дурмана (*Datura innoxia* Mill.) были получены Гуха и Магешвари в 1964 году (Guha, Maheshwari, 1964). Вслед за этим открытием были получены *in vitro* гаплоиды табака (*Nicotiana tabacum* L.) (Nakata, Tanaka, 1968, Nistch, 1969) и риса (*Oryza sativa* L.) (Niizeki, Oono, 1968). Позднее группой исследователей в культуре пыльников были получены первые гаплоиды пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (Ouyang et al., 1973; Picard, Buysier, 1973). Получению гаплоидов пшеницы методом культуры изолированных микроспор было посвящено несколько исследовательских работ, показавших ее эффективность (Wei, 1982; Datta, Wenzel, 1987; Mejza et al., 1993; Tuvesson, Öhlund, 1993). Гаплоиды также получают, используя методы отдаленной гибридизации с диким ячменем (*Hordeum bulbosum* L.) и кукурузой (*Zea mays* L.) (Barclay, 1975; Laurie, Bennett, 1986; Inagaki, Tahir, 1990).

Некоторые генотипы кукурузы, накапливая определенные мутации, характеризуются из поколения в поколение повышенной частотой партеногенеза и способны индуцировать гаплоидию на материнских початках

при гибридизации с другими генотипами. Селекционеры на основе таких мутантных линий создают гаплоиндукторы для получения матроклиных гаплоидных зерновок (Сое, 1959; Khokhlov, 1976). На гибридных початках кукурузы селекционеру трудно отличить зерновки с диплоидным зародышем от гаплоидных, поэтому для упрощения идентификации гаплоидных зерновок на початке впервые в США С. Чейзом в 1949 г. (Chase, 1949) был предложен метод генетического маркирования. Суть метода генетических маркеров заключается в том, что в гибридном потомстве от таких скрещиваний мы можем наблюдать фенотипическое проявление доминантных аллелей генов, тогда как у матроклиных гаплоидов проявляются рецессивные (Gutorova et al., 2016). Отцовская форма (гаплоиндуктор) должна нести доминантные аллели с эффектами, хорошо визуализируемыми на зерновках или проростках, а материнская (донор) рецессивные аллели. Такое маркирование упрощает работу селекционера и позволяет эффективно выбраковывать все зерновки и пророст-

ки с доминантными проявлениями признаков (гибридные) и отбирать только гаплоидные, у которых их нет. На основе предложенного С. Чейзом метода маркирования, существенно упростивших эту технологию, был создан целый ряд гаплоиндукторов (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969).

Гаплоиндукторы кукурузы представляют собой специализированные, высокофертильные линии, которые в результате гибридизации с диплоидным растением способствуют формированию гаплоидной зерновки, а также формируют на его початке гибридные диплоидные зерновки. Благодаря определенной частоте гаплоиндукции, являющейся следствием нарушения функциональности одного из спермиев у гаплоиндуктора, часть зерновок на початке материнского растения имеет гаплоидное число хромосом в зародыше. При этом формируется полноценный триплоидный гибридный эндосперм, который развивается одинаково как в зерновках с гаплоидным, так и с диплоидным зародышем (Сое, Sarkar, 1964).

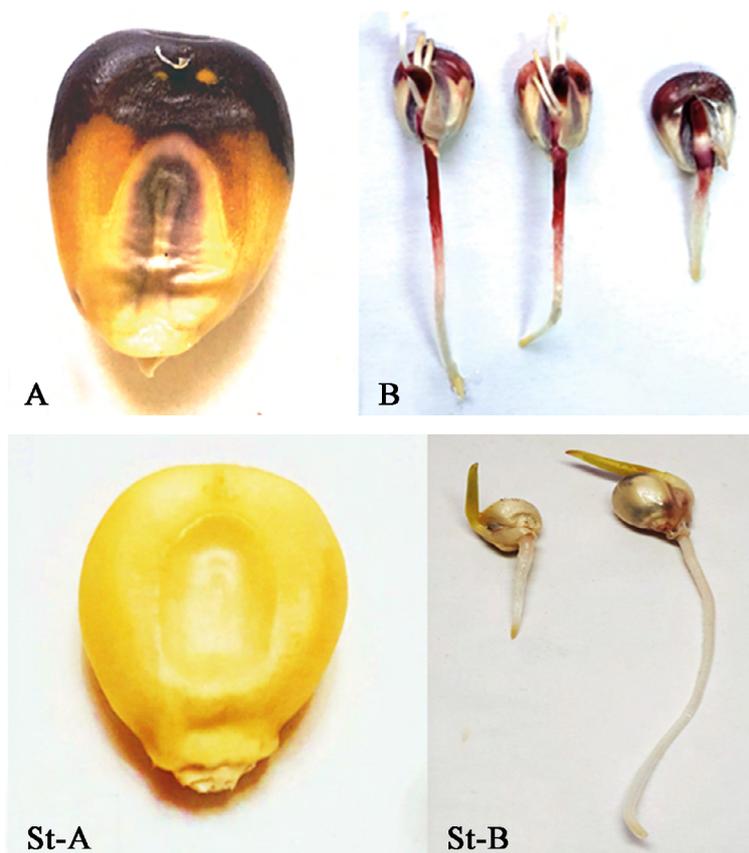


Рис. 2. Фенотипическое проявление эффекта гена *R-nj* в зерновке (А) и генов *B1* и *P11* в проростках (В) гаплоиндуктора кукурузы в сравнении с контрольной зерновкой (St-A) и проростками (St-B) без окраски.

Fig. 2. *R-nj* gene phenotypic manifestation in the caryopsis (A) and of the *B1* and *P11* genes in seedlings (B) of maize haploinducer in comparison with the control caryopsis (St-A) and seedlings (St-B) without color.

Частота формирования гаплоидных зерновок на гибридных початках зависит от гаплоиндуцирующей способности применяемого гаплоиндуктора, генотипа материнского растения и условий окружающей среды. Определение гаплоидности той или иной зерновки на початке осуществляют визуально по проявлению специфических маркерных генов, доминантные эффекты которых проявляются в виде антоциановой окраски частей зерновки, зародыша, проростков и некоторых частей растения (рис. 2).

Наиболее распространенными генами, используемыми в современных гаплоиндукторах кукурузы, являются гены локализованные в районах *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* хромосомы 1 (Hu et al., 2016), в сочетании с маркерным геном

антоциановой окраски зерновки и зародыша *R1-nj*, а также антоциановой окраски растения *A1* и *B1*. Источником доминантного маркера окраски у гаплоиндукторов служит генетический комплекс *R1 - Navajo (R1-nj)*, который экспрессируется в алейроне (самом внешнем слое эндосперма кукурузы), а также в зародыше (щитке), в отличие от иных генотипов, у которых обычно не проявляется какая-либо антоциановая окраска в зародыше или эндосперме. Таким образом, ген *R1-nj* в качестве доминантного маркера окраски помогает отличать гаплоидные зерновки (окрашенные зерновки и неокрашенные щиток с зародышем) от диплоидных (окрашенные как зерновки, так и щиток с зародышем) (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969) (рис. 3).



Рис. 3. Примеры гаплоидных, без окраски щитка и зародыша (отмечено стрелками), зерновок среди диплоидных, с окрашенными щитком и зародышем, гибридных зерновок на початках материнского растения.

Fig. 3. Samples of haploid caryopses, with colorless scutellum and embryo (marked with arrows), among diploid hybrid ones, with colored scutellum and embryo, in the cobs of the mother plant.

Следует отметить, что экспрессия маркерного гена окраски *R1-nj* может значительно варьировать в зависимости от генетического фона материнской линии, используемой для гибридизации, генотипа самого гаплоиндуктора, а также факторов окружающей среды (рис. 4) (Chase, 1952; Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011).

Отдельные зерновки, формирующиеся на початке в процессе гибридизации и не имеющие какой-либо маркерной окраски, относят к случайному загрязнению

селекционного материала. Несмотря на эффективность маркирования гаплоидных зерновок рецессивной аллелью гена *R1-nj* вследствие отсутствия доминантной аллели гаплоиндуктора, метод имеет свои недостатки. В случае, если у донора присутствуют доминантные аллели генов *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*, ингибирующие синтез антоцианов, то проявление маркирующих свойств гена *R-nj* на зерновках, зародыше или корешках может быть полностью подавлено (рис. 5) (Сое, 1994).



Рис. 4. Проявление гена *R-nj* в зерновках, сформированных на початках разных гаплоиндукторов кукурузы. В верхнем ряду представлены зерновки с максимальной, в нижнем ряду зерновки с минимальной экспрессией маркерных генов антоциановой окраски.

Fig. 4. *R-nj* gene expression in caryopses formed in the cobs of different maize haploinducers. Upper row: kernels with the maximum expression; lower row: kernels with the minimal expression of anthocyanin marker genes.

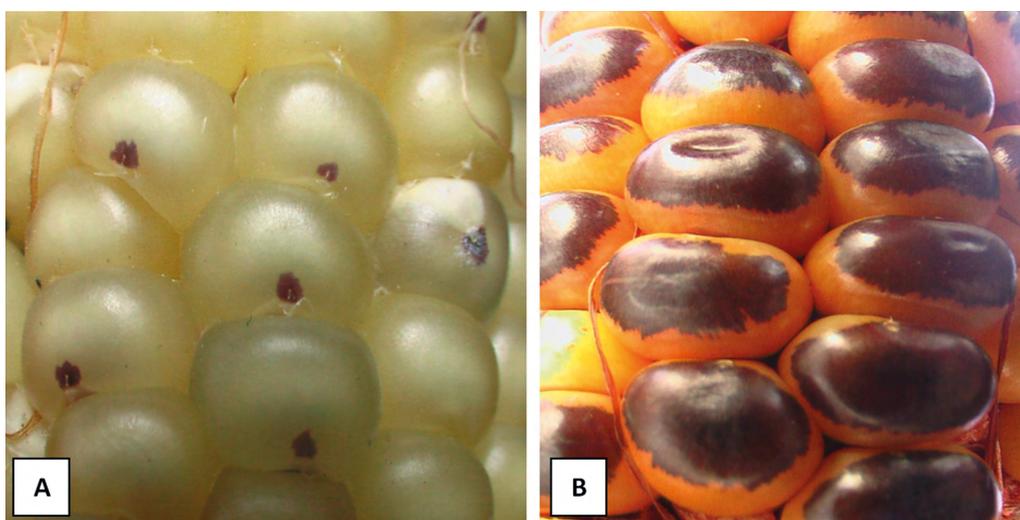


Рис. 5. Ингибирование генами *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* фенотипического проявления гена *R-nj* (гена антоциановой окраски в эндосперме зерновки) у кремнистой кукурузы (А) в сравнении со стандартом (В).

Fig. 5. Inhibition of the *R-nj* gene phenotypic manifestation (anthocyanin marker for kernel endosperm) by the *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* genes in siliceous maize (A) in comparison with the standard (B).

Исследования, проведенные в Международном центре улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT) в Мексике, позволили предположить, что экспрессия гена антоциановой окраски *R1-nj* ингибируется в пределах 8% скрещиваний между гаплоиндукторами в комбинациях с различными генотипами кукурузы (Röber et al., 2005; Prasanna et al., 2012). В.А. Ротаренко с соавторами (Rotarencu et al., 2010) предложили ввести в геном гаплоиндукторов гены *B1 (Booster1)* и *P11 (Purple1)* с эффектами синтеза антоцианов, которые приводят к независимой от солнечного света пурпурной пигментации в растительной ткани (колеоптиле и корне в тех случаях, когда отбор гаплоидов невозможен на стадии сухих семян (Rotarencu et al., 2010)). В этом случае пигментация колеоптиле или корня на проростках указывает на диплоидный (гибридный) генотип, а проростки без пигментации относят к гаплоидам (Geiger, Gordillo, 2009; Rotarencu et al., 2010). Для автоматизации процесса идентификации гаплоидных зерновок из общей выборки гибридных семян В.А. Ротаренко и др. (Rotarencu et al., 2007) предложили определять гаплоидные зерновки по содержанию масла в зерне с помощью ядерно-магнитного резонанса (ЯМР).

Li с соавторами (Li et al., 2009) удалось разработать гаплоиндуктор CAUHOI, полученный из гибрида между линией Stock-6 и высокомасличной популяцией, который характеризовался частотой гаплоиндукции до 2% и высоким содержанием масла в зародыше (7,8%). Этот гаплоиндуктор послужил основой для разработки технологии по автоматизированной идентификации, при помощи ЯМР и инфракрасной спектроскопии, гаплоидных зерновок с ингибированием фенотипического проявления генов *R1-nj*.

Технология получения дигаплоидных линий кукурузы, основанная на гаплоидной индукции *in vivo*, признана во всем мире как один из наиболее эффективных методов ускорения селекции. За последние 20 лет технология была усовершенствована несколькими коммерческими программами по улучшению кукурузы в Европе (Schmidt, 2003), Северной Америке (Seitz, 2005), Китае (Chen et al., 2009). Рост популярности технологии дигаплоидных линий в селекционных программах по улучшению кукурузы объясняется рядом преимуществ, которые они дают селекционеру (п. 1-7 цит. по: Prasanna et al., 2012):

1. Достижение 100% гомозиготности по анализируемым генам за короткий промежуток времени (2-3 года);
2. Значительная экономия материальных и временных затрат на создание линии, 100% гомозиготной по анализируемым генам;
3. Высокая эффективность и точность отбора селективируемых признаков, а особенно при использовании молекулярных маркеров и выращивании растений в условиях зимних питомников или фитотронов (Röber et al., 2005; Geiger, Gordillo, 2009);
4. Ускорение селекционного процесса создания линий за счет быстрого накопления благоприятных аллелей генов по полигенным признакам, влияющим на продук-

тивность и стрессоустойчивость, которые сложно и трудно объединить в адаптированной зародышевой плазме при традиционных методах размножения;

5. Идеальное соответствие требованиям DUS (distinctness, uniformity, stability testing methodologies) (методы тестирования на выровненность, однородность и стабильность) в системе UPOV (Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Végétales) благодаря полной гомозиготности и однородности родительских линий (Geiger, Gordillo, 2009);

6. Снижение трудозатрат на материально-техническое обслуживание линии в семеноводстве (Röber et al., 2005; Heckenberger et al., 2005);

7. Возможности для поиска новых связей маркер – признак, для маркер-опосредованной интрогрессии генов (Forster, Thomas, 2005), использования функциональной геномики, молекулярной цитогенетики и генной инженерии (Wijnker et al., 2007).

8. Использование в качестве способа переноса агробактериальной Т-ДНК в геном во время оплодотворения (Mamontova et al., 2010).

Характеристика широко распространенных в мировой практике гаплоиндукторов кукурузы

Процесс создания гаплоиндукторов с высокой гаплоиндуцирующей способностью идет непрерывно в течение многих лет. Одним из первых эффективных гаплоиндукторов, заслуживших популярность среди селекционеров, была линия Stock-6. Позже, на ее основе либо с ее участием были созданы другие, более совершенные гаплоиндукторы:

- (1) KMS (Korichnevyy Marker Saratovskyy) и ZMS (Zarodyshevyy Marker Saratovskyy), оба получены из Stock 6 (Tyrnov, Zavalishina, 1984; Chebotar, Chalyk, 1996);
- (2) WS14, созданный на основе гибридов между линией W23ig и Stock 6 (Lashermes, Beckert, 1988);
- (3) KEMS (Krasnador Embryo Marker Synthetic), полученный на основе гибрида между линиями ЗМС и РЕМ (Shatskaya et al., 1994);
- (4) МНІ (Moldovian Haploid Inducer, полученный из гибрида KMS × ZMS (Eder, Chalyk, 2002);
- (5) RWS (KEMS + WS14), получен из потомства гибрида KEMS × WS14 (Röber et al., 2005);
- (6) UH400, выделен из KEMS в университете Хоэнхайма (Chang, Coe, 2009);
- (7) PK6 (Barret et al., 2008);
- (8) HZII, выделен из Stock 6 (Zhang et al., 2008);
- (9) CAUHOI, созданный в Китайском аграрном университете на основе гибрида между Stock 6 и популяцией Пекинская высокомасличная (Li et al., 2009);
- (10) РНІ (Procera Haploid Inducer), полученный из гибрида между МНІ и Stock 6 (Rotarencu et al., 2010).

Гаплоиндукторы UH400, RWS и RWS × UH400 были успешно использованы для индукции гаплоидов и полу-

чения дигаплоидных линий из зародышевой плазмы экзотических рас кукурузы CIMMYT, хотя авторы отмечают их плохую адаптированность к условиям тропической низменности (Prigge et al., 2011) и высокую подверженность болезням тропической кукурузы (Prasanna et al.,

2012). Первые гаплоиндукторные линии характеризовались низкой частотой гаплоиндукции, не выше 2-3%, тогда как современные линии показывают частоту до 15-17% (Таблица).

Таблица. Значения частоты гаплоиндукции, характеризующие основные гаплоиндукторы, имеющиеся в мировых селекцентрах кукурузы (по Hu et al., 2016 со ссылками)

Table. Haploid induction rate values characteristic of the main haploinducers available in maize breeding centers in the world (according to Hu et al., 2016 and references therein)

Гаплоиндуктор/ Name	Оригинатор/ Source	Родословная/Pedigree	Частота гаплоиндукции, %/ Haploid induction rate, %	Источник/ Reference
Stock6.M741B	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741C	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741F	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741H	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959; Eder, Chalyk, 2002
Stock6.M741I	MGCSC	Неизвестно		Coe, 1959
Stock6.HOH	UHOH	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.INRA	INRA	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.ROM	USAMV	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
ACIR	IARI	(Stock6×ACR)×Stock6	3	Sarkar et al., 1994
CAU079	CAU	CAUHOI×UH400	6	Xu et al., 2013
CAU5	CAU	CAUHOI×UH400	8	Xu et al., 2013
CAUHOI	CAU	BHO×Stock6	3	Prigge et al. 2011
HZII.1	HZAU	Synthetic including Stock6	6-8	Qiu, 2013*
HZII.2	HZAU	Synthetic including Stock6	4-6	Qiu, 2013*
HZII0	HZAU	Synthetic including CAUHOI	6-8	Qiu, 2013*
HZII2	HZAU	Synthetic including CAUHOI	5-6	Qiu, 2013*
IN003	UHOH	(UH400×CAUHOI)×UH400	9	Schipprack, 2013*
IN004	UHOH	UH400×UKW	9	Schipprack, 2013*
IN012a	UHOH	UH400×RWS	10	Schipprack, 2013*
IN012b	UHOH	UH400×RWS	11	Schipprack, 2013*
IN0604a	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	10	Schipprack, 2013*
IN0604c	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	3	Schipprack, 2013*
IN0605a	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	6	Schipprack, 2013*
IN0605b	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	8	Schipprack, 2013*
IN0703	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×RWS	11	Schipprack, 2013*
IN0803	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×(UH400×HOS)	5	Schipprack, 2013*
IN0805a	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	4	Schipprack, 2013*
IN0805b	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	Schipprack, 2013*
IN0805c	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	Schipprack, 2013*

Гаплоиндуктор/ Name	Оригинатор/ Source	Родословная/Pedigree	Частота гаплоиндукции, %/ Haploid induction rate, %	Источник/ Reference
LfL5010	LfL	MHI×RWS	17	Eder, 2013*
LfL5016	LfL	MHI×RWS	10	Eder, 2013*
LfL5017	LfL	MHI×RWS	17	Eder, 2013*
MHI	IG	KMS×ZMS	7-9	Chalyk, 1999
PHI.1	USAMV	MHI×Stock6	11-12	Rotarencu et al., 2010
PHI.2	USAMV	MHI×Stock6	12-15	Rotarencu et al., 2010
PHI.3	USAMV	MHI×Stock6	14-15	Rotarencu et al., 2010
PHI.4	USAMV	MHI×Stock6	10-16	Rotarencu et al., 2010
PK6	INRA	Synthetic of Stock6, WS14, FIGH1 and MS1334	6	Barret et al. 2008
RWK	UHOH	KEMS×WS14	9-10	Geiger, Gordillo, 2009
RWS	UHOH	KEMS×WS14	8	Röber et al., 2005
TAIL5	CIMMYT	(CML451×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	5	Prigge et al., 2011
TAIL7	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	11	Prigge et al., 2011
TAIL8	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	11	Prigge et al., 2011
TAIL9	CIMMYT	(CML494×(RWS×UH400))× (RWS×UH400)	10	Prigge et al., 2011
UH400	UHOH	KEMS	8	Prigge et al., 2011
UH401	UHOH	KEMS	8	Schippreck, 2013*
UH403	UHOH	UH400×CAUHOI	9	Schippreck, 2013*
UKW	UHOH	KEMS×WS14	11	Schippreck, 2013*
WS14	INRA	Stock6×W23ig	3-5	Lashermes, Beckert, 1988
ZMK1F3	KLARI	Zarodishev marker krasnodar (ZMK1) synthetic	5-8	Shatskaya, 2010b
ZMK1U	KLARI	ZMK1 synthetic	3-10	Zabirova et al., 1996
KMS	SSU	Brown Marker × Stock6	2-4	Zavalishina, 2014*
ZMS8	SSU	ZM × KMS	8-10	Zavalishina, Tyrnov, 1992

Примечания: * личные сообщения авторов (Hu et al., 2016)

Оригинатор:

CAU = Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин, Китай

CIMMYT = Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы, Мексика

HZAU = Сельскохозяйственный университет Хуачжун, Ухань, Китай

IARI = Индийский институт сельскохозяйственных исследований, Индия

IG = Институт генетики, Кишинев, Молдова

INRA = Национальный институт сельскохозяйственных исследований, Франция

KLARI = Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Россия

LfL = Баварский государственный институт сельского хозяйства, Фрайзинг, Германия

MGCSC = Фондовый центр сотрудничества в области генетики кукурузы, Иллинойс, США

SSU = Саратовский государственный университет, Россия

UHOH = Университет Хоэнхайма, Штутгарт, Германия

USAMV = Университет агрономических наук и ветеринарной медицины, Бухарест, Румыния

Аббревиатуры:

BHO = Beijing High Oil Synthetic HOS = Hohenheim High Oil Synthetic

KEMS = Krasnodar Embryo Marker Synthetic

MHI = Moldovian Haploid Inducer

KMS = Korichnevsky Marker Saratovsky и ZMS = Zarodyshevsky Marker Saratovsky

Использование гаплоиндукторов кукурузы в Российской Федерации

Разработкой и внедрением метода индукции гаплоидии кукурузы в России особенно успешно занимались в Новосибирске Б.Ф. Юдин и М.Н. Хватова, в Саратове – В.С. Тырнов, Н.Х. Еналеева и А.Н. Завалишина, в Краснодаре – М.В. Чумак, Э.Р. Забирова и О.А. Шацкая. Основными линиями отечественных гаплоиндукторов, применяемых в настоящее время в производстве дигаплоидных линий кукурузы в России, являются: ЗМС (Зародышевый Маркер Саратовский) и ЗМК (Зародышевый Маркер Краснодарский). Сотрудниками Саратовского государственного университета созданы линии, обладающие высокой гаплоиндуцирующей способностью (КМС, ЗМС-8 и др.) и линии, склонные к наследуемому партеногенезу (АТ-1, АТ-3) (Тырнов, Завалишина., 1984; Еналеева, Тырнов, 1997; Тырнов, 1983). В Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко (ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко») созданы гаплоиндукторы ЗМК (Зародышевый Маркер Краснодарский) и их модификации (ЗМК-1У,

ЗМК-3, ЗМК-5), на основе маркерных генов окраски зерновки *R1-nj*, которые характеризуются высокой частотой гаплоиндукции (10-15%) (Shatskaya, 2001; 2004; 2010a,b). Практическое использование метода гаплоиндукции в производстве гибридов кукурузы было начато в отделе селекции и первичного семеноводства кукурузы ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко», где впервые в России была разработана и внедрена в производство технология массового создания дигаплоидных линий кукурузы на основе собственных гаплоиндукторных линий, созданных группой селекционеров под руководством М.В. Чумака (Zabirova et al., 1996). Благодаря совершенствованию технологических операций метода гаплоидии в отделе кукурузы института ежегодно получают от 400 до 1000 дигаплоидных линий. Массовое производство матроклиных гаплоидных зерновок проводят при помощи опыления початков материнских растений пылью гаплоиндуктора с последующим выделением на спелых початках гаплоидных зерновок по отсутствию доминантных маркерных признаков (рис. 3, 6, 7).

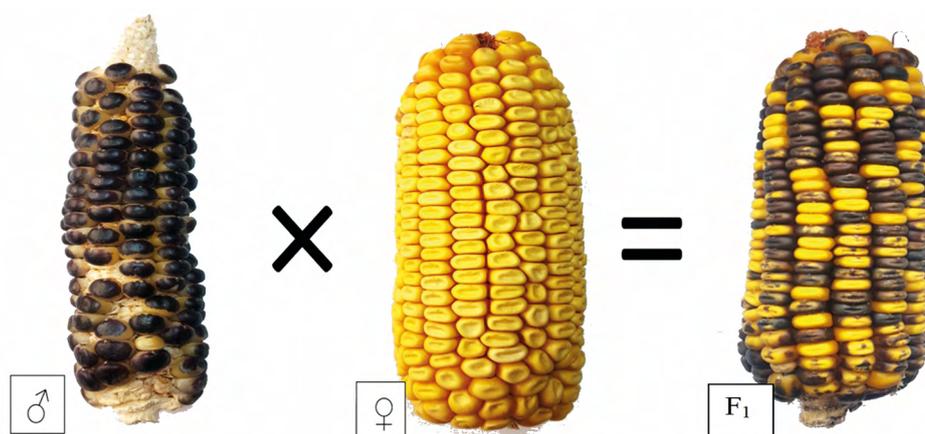


Рис. 6. Схема скрещивания между гаплоиндуктором (♂) и донором (♀) гаплоидных зерновок кукурузы.

Fig. 6. Crossing scheme between a haploid inducer (♂) and a donor (♀) of haploid maize kernels.

В ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» разработана технология ускоренного создания стерильных аналогов линий кукурузы с помощью ЦМС-*ig* гаплоиндукторов, несущих мутацию *ig*, обуславливающую нарушение слияния одного из спермиев с яйцеклеткой в зародышевом мешке, в сочетании с маркерными генами окраски зерновки *R1-nj* и стерильной цитоплазмой М- и С- типов ЦМС. Мутация *ig* хорошо охарактеризована (Lin, 1978; Enaleeva et al., 1995). В основу метода заложен принцип андрогинии, при котором ядро спермия замещает ядро яйцеклетки (Chumak, 1977; Shatskaya, Shcherbak,

1999). Благодаря этому методу в отделе кукурузы в течение двух лет создают стерильные аналоги линий кукурузы, что гораздо эффективнее традиционного метода насыщающих скрещиваний, занимающего 8 и более лет селекционной работы. Применение метода гаплоиндукции в селекционных программах отдела кукурузы ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» позволило создать за двадцать пять лет селекционной работы восемьдесят стерильных аналогов тридцати линий кукурузы на основе М- и С-типов ЦМС. В Государственный реестр селекционных достижений внесены 13 гибридов кукурузы

с участием дигаплоидных линий, относящихся к различным группам спелости: Краснодарский 282МВ, Краснодарский 377АМВ, Краснодарский 291АМВ, Краснодарский 385МВ, Краснодарский 292АМВ, Краснодарский 599МВ, Краснодарский 370МВ, Краснодарский 382МВ, Краснодарский 383МВ, Интеркрас 375, Интеркрас 390, Интеркрас 405, Краснодарнепровский 300МВ. (Shatskaya, 2010a,b). В генетической коллекции ВИР имеются доно-

ры генов *ig* (C-622), высокой частоты гаплоиндукции «High haploidy inducer line» (C-453), *R-nj* (C-221, C-222, C-799), высокой маслячности «High oil» (C-474), *B1* (*Booster1* C-905, C-911, C-916, C-917) и *PII* (*Purple1* C-905, C-924, C-925) и многих других, контролирующих окраску пыльников, стебля, стержня, перикарпа и колеоптиля зерновки.

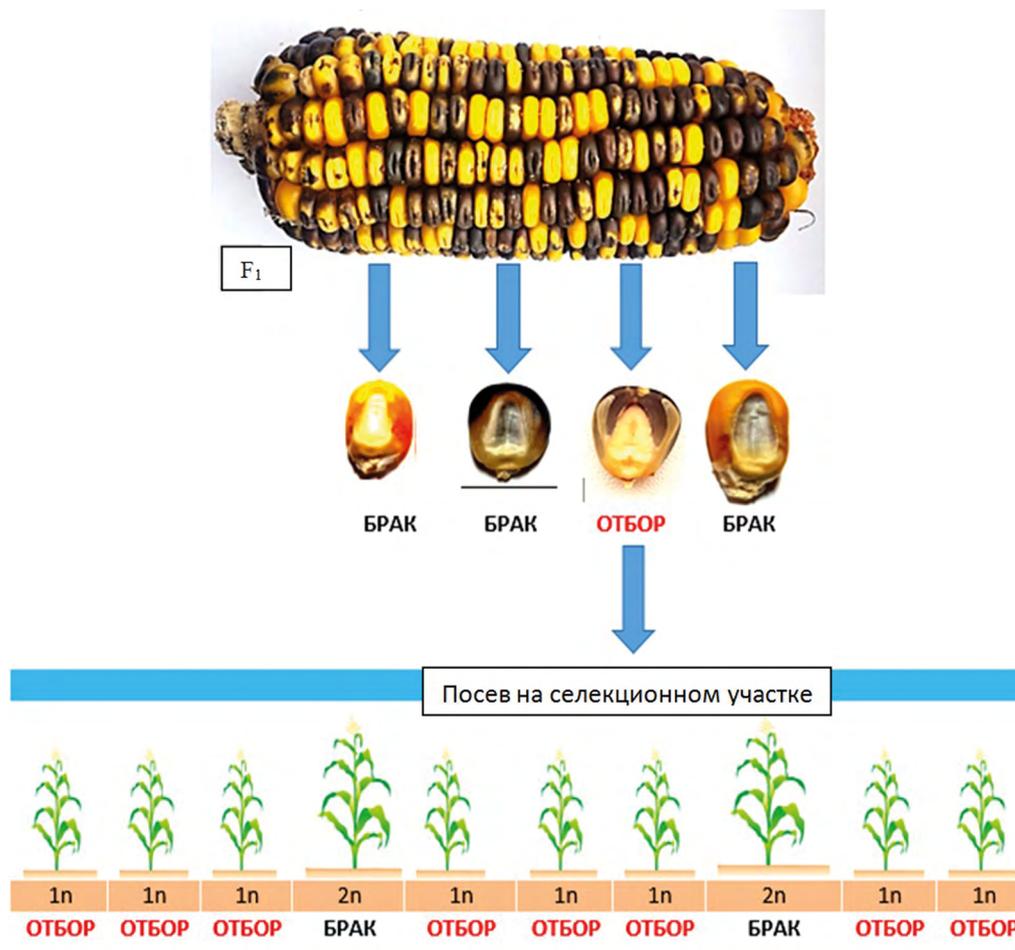


Рис. 7. Схема выделения гаплоидных зерновок кукурузы на початке и идентификация гаплоидных растений в посеве на селекционном участке.

Fig. 7. Scheme of haploid maize kernel selection from the cob and haploid plant identification at the breeding site.

Заключение

Создание дигаплоидных линий кукурузы способствует существенному ускорению селекционного процесса гибридной кукурузы. В крупных селекцентрах благодаря применению метода гаплоиндукции появилась возможность создания гомозиготных линий кукурузы за два года, а с использованием фитотронов или зимних

питомников - в течение 1 года вместо 8-10 лет селекционной работы. Все дигаплоидные линии характеризуются 100% гомозиготностью по всем аллелям селекционно ценных генов, и соответственно высокой выравненностью всех морфологических признаков, что существенно повышает качество семеноводческой продукции родительских линий и их гибридов. Благодаря селекционной работе по совершенствованию гаплоиндукторов, частота

гаплоиндукции на початках кукурузы увеличилась с 0,1% до 10-15%. Учитывая, что при использовании гаплоиндуктора, характеризующегося частотой гаплоиндукции в среднем 5%, число завязываемых зерновок на гибридном початке составляет в среднем не менее 300 штук, данный метод позволяет получить селекционеру не менее 200 гаплоидных зерновок со стандартной 15-гнездной делянки. Этого количества достаточно для проведения процедуры дигаплоидизации колхицинированием, получения зерен и репродукции дигаплоидных линий кукурузы. Дальнейшее совершенствование метода гаплоиндукции и создания гаплоиндукторных линий имеет перспективы не только для селекции гибридной кукурузы, но и для развития биотехнологических методов (например, редактирования геномов) селекции других сельскохозяйственных растений.

Благодарности/Acknowledgements

Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

The present work was performed within the framework of the State Assignment to VIR, in accordance with the Thematic Plan, Project No. 0662-2019-0006 "Search, maintenance of viability and revealing of the hereditary variability potential in the VIR global collection of cereal and groat crops for the development of an optimized genebank and for rational use in breeding and crop production.

References/Литература

- Astaurov B.L. Genetics of sex (Genetika pola). In: S.I. Alikhanyan (ed.). *Actual problems of modern genetics (Aktualnye voprosy sovremennoy genetiki)*. Moscow: Publishing House of Moscow University; 1966. [in Russian] (Астауров Б.Л. Генетика пола. В кн.: *Актуальные вопросы современной генетики* / под ред. и с предисл. С.И. Алиханяна. Москва: Изд-во Изд-во Моск. ун-та; 1966).
- Astaurov B.L. Parthenogenesis, androgenesis, polyploidy (Partenogenez, androgenez, poliploidiya). Moscow: Nauka; 1977. [in Russian] (Астауров Б.Л. Партеногенез, андрогенез, полиплоидия. Москва: Наука; 1977).
- Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*. 1975;256:410-411. DOI: 10.1038/256410a0
- Barret P., Brinkmann M., Beckert M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;117(4):581-594. DOI: 10.1007/s00122-008-0803-6
- Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D. A haploid mutant in the Jimson weed, "*Datura stramonium*". *Science*. 1922;55(1433):646-647. DOI:10.1126/science.55.1433.646
- Chang M.T., Coe E.H. Doubled haploids. In: A.L. Kriz, B.A. Larkins (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 63. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009. p.127-142.
- Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics*. 1949;34(3):328-332.
- Chase S.S. Monoploids in maize. Ames (Iowa): Iowa State College Press; 1952. p.389-399.
- Chase S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews*. 1969;35:117-167. DOI: 10.1007/BF02858912
- Chebota O.D., Chalyk S.T. The use of maternal haploids for genetic analysis of the number of kernel rows per ear in maize. *Hereditas*. 1996;124(2):173-178. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1996.00173.x
- Chen S., Li L., Li H. Maize doubled haploid breeding [in Chinese]. Beijing: China Agricultural University Press; 2009.
- Chumak M.V. Experimental haploidy in maize (Experimentalnaya gaploidiya u kukuruzy [dissertation]. Leningrad; 1977. [in Russian] (Чумак М.В. Экспериментальная гаплоидия у кукурузы : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Ленинград; 1977).
- Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist*. 1959;93(873):381-382.
- Coe E.H. Anthocyanin genetics. In: M. Freeling, V. Walbot (eds). *The maize handbook*. New York: Springer-Verlag; 1994. p.279-281.
- Coe E.H., Sarkar K.R. The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*. 1964;55(5): 231-233. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107340
- Darevsky I.S., Kupriyanova L.A., Uzzell T. Parthenogenesis in reptiles. *Biology of the Reptilia*. 1985;15:412-526.
- Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Science*. 1987;48(1):49-54. DOI: 10.1016/0168-9452(87)90069-07
- Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*; 2003. p.15-19.
- Eder J, Chalyk S.T. *In vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104:7037-08. DOI: 10.1007/s00122-001-0773-4
- Enaleeva N., Otkalo O., Tyrnov V. Cytological expression of ig mutant in megagametophyte. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1995;69:121.
- Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological manifestation of apomixis in AT-1 plants of corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1997;71:74.
- Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breeding Reviews*. 2005;25:57-88. DOI: 10.1002/9780470650301.ch3
- Geiger H.H., Gordillo G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 2009;54(4):485-499.
- Golubovsky M.D. Age of Genetics: Evolution of Ideas and Concepts (Vek genetiki: Evolutsiya idey i ponyatiy). St. Petersburg: Borey Art; 2000. [in Russian] (Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. Санкт-Петербург: Борей Арт; 2000).
- Greenblatt I.M., Bock M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *Journal of Heredity*. 1967;58(1):9-13. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107543
- Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura*. *Nature*. 1964;204(4957):497. DOI: 10.1038/204497a0
- Gutorova O.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis (Sozdaniye geneticheski markirovannykh liniy kukuruzy s nasleduyemym i indutsirovannym tipami partenogeneza). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2016;18(2):341-344. [in Russian] (Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированными типами партеногенеза. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2016;18(2):341-344).
- Hayes P., Corey A., DeNoma J. Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds). *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Springer Science+Business

- Media New York; 2003. p.5-14. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4
- Heckenberger M., Muminovic J., Rouppe van der Voort J., Peleman J., Bohn M., Melchinger A.E. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds. *Crop Science*. 2005;45:1120-1131. DOI: 10.1007/s11032-005-3851-5
- Hu H., Schrag T.A., Peis R., Unterseer S., Schipprack W., Chen Sh., Lai J., Yan J., Prasanna B.M., Nair S.K., Chaikam V., Rotarenco V., Shatskaya O.A., Zavalishina A., Scholten S., Schön Ch.-C., Melchinger A.E. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics*. 2016;202(4):1267-1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234
- Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Japanese Journal of Breeding*. 1990;40(2):209-216. DOI: 10.1270/jsbbs1951.40.209
- Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970;225:874-876. DOI: 10.1038/225874a0
- Khokhlov S.S. Haploidy and breeding (Gaploidiya i selektsiya). Moscow: Nauka; 1976. [in Russian] (Хохлов С.С. Гаплоидия и селекция. Москва: Наука; 1976).
- Kirilova G.A. The phenomenon of haploidy in angiosperms (Yavleniye gaploidii u pokrytosemennih rasteniy) *Genetika*. 1966;2:137-147. [in Russian] (Кириллова Г.А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1966;2:137-147).
- Kebede A.Z., Dhillon B.S., Schipprack W., Araus J.L., Banziger M., Semagan K., Alvarado G., Melchinger A.E. Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica*. 2011;180(2):219-226. DOI: 10.1007/s10681-011-0376-3
- Kimber G., Riley R. Haploid angiosperms. *The Botanical Review*. 1963;29(4):480-531. DOI: 10.1007/BF02860814
- Lashermes P., Beckert M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;76:404-410. DOI: 10.1007/BF00265341
- Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 1986;28(2):313-316. DOI: 10.1139/g86-046
- Li L., Xu X., Jin W., Chen S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*. 2009;230(2):367-376. DOI: 10.1007/s00425-009-0943-1
- Lin B-Y. Structural modification of the female gametophyte associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutant in maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 1978;20(2):249-257. DOI: 10.1139/g78-028
- Magoon M.L., Khanna K.R. Haploids. *Caryologia*. 1963;16(1):191-255. DOI: 10.1080/00087114.1963.10796097
- Mamontova E.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated in planta transformation of maize germ cells. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(4):501-504.
- Mayor P.J., Bernardo R. Doubled haploids in commercial maize breeding: One-stage and two-stage selection versus marker assisted recurrent selection. *Maydica*. 2009;54(4):439-448.
- Mejza S.J., Morgant V., DiBona D.E., Wong J.R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*. 1993;12(3):149-153. DOI: 10.1007/BF00239096
- Mishutkina Ya.V., Neskorodov Ya.B., Novokreshchenova M.G., Malakho S.G., Turaev A.M. Doubled haploids of barley and their use in genetic and breeding studies (Udvoyenniye gaploidy yachmenya i ih ispolzovaniye v genetiko-selektzionnyh issledovaniyah). *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2013;5:476. [in Russian] (Мишуткина Я.В., Нескородов Я.Б., Новокрещенова М.Г., Малахо С.Г., Тураев А.М. Удвоенные гаплоиды ячменя и их использование в генетико-селекционных исследованиях. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;5:476. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=10252> [дата обращения: 30.09.2020]).
- Nakata K., Tanaka M. Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. *The Japanese Journal of Genetics*. 1968;43(1):65-71. DOI: 10.1266/jjg.43.65
- Nanda D.K., Chase S.S. An embryo marker for detecting monohaploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*. 1966;6(2):213-215. DOI: 10.2135/cropsci1966.0011183X000600020036x
- Nistch J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*. 1969;19:389-404.
- Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proceedings of the Japan Academy*. 1968;44:554-557. DOI: 10.2183/pjab1945.44.554
- Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Scientia Sinica*. 1973;16(1):79-95. DOI: 10.1360/ya1973-16-1-79
- Picard E., Buysier J.D. Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d'antheres *in vitro*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 1973;277:1463-1466. [in French]
- Prasanna B.M., Chaikam V., Mahuku G. Doubled haploid technology in maize breeding: Theory and practice. Mexico: CIMMYT, DF; 2012.
- Prigge V., Sanchez C., Dhillon B.S., Schipprack W., Araus J.L., Banziger M., Melchinger A.E. Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Science*. 2011;51:1498-1506. DOI: 10.2135/cropsci2010.10.0568
- Rotarenco V.A., Kirtoca I.H., Jacota A.G. Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2007;81:11.
- Rotarenco V., Dicu G., State D., Fuia S. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2010;84:21-22.
- Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. *In vivo* haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*. 2005;50(3-4):275-283.
- Shatskaya O.A. The results of using the haploidy method in corn breeding. *Kukuruz a i sorgo = Maize and sorghum*. 2001;4:14-17. [in Russian] (Шацкая О.А. Результаты использования метода гаплоидии в селекции кукурузы. *Кукуруза и sorgo*. 2001;4:14-17).
- Shatskaya O.A. Increase in the frequency of induction of maize matroclinal haploids under individual selection of pollinators in crop production (Povysheniye chastoty induktsii matroklennykh gaploidov kukuruzy pri individualnom otbore opyliteley v rasteniyevodstve). In: *Sbornik nauchnykh trudov, posvyashchenny 90-letiyu KNIISKH im. P.P. Lukyanenko = Collection of scientific papers dedicated to the 90th anniversary of the Krasnodar Agricultural Research Institute*. Krasnodar; 2004. p.322-331. [in Russian] (Шацкая О.А. Повышение частоты индукции матроклинных гаплоидов кукурузы при индивидуальном отборе опылителей в растениеводстве. В кн.: Сборник научных трудов, посвященный 90-летию КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Краснодар; 2004. С.322-331).
- Shatskaya O.A. Creation of maize haploinducers: three selection cycles for a high frequency of induction of matroclinal haploids (Sozdaniye gaploinduktorov kukuruzy: tri tzykla otbora na vysokuyu chastotu induktsii matroklennykh gaploidov). *Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural biology*. 2010;45(5):79-86. [in Russian] (Шацкая О.А. Создание гаплоиндукторов кукурузы: три цикла отбора на высокую частоту индукции матроклинных гаплоидов. *Сельскохозяйственная биология*. 2010a;45(5):79-86).
- Shatskaya O.A. Haploinducers isolation in maize: three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)* 2010b;45(5):79-86 URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/haploinducers-isolation-in-maize-three-cycles-of-selection-on-high-frequency-of-induction-of-matroclinal-haploids/viewer> [дата обращения 06.04.2020])
- Shatskaya O.A., Scherbak V.S. The use of a modified *ig*-system to create new forms of corn with increased androgenesis (Ispolzovaniye modifitsirovannoy *ig*-sistemy dlya sozdaniya novykh form kukuruzy s povyshennym androgenezom). In: *Genetika, selektsiya i tekhnologiya vzdelyvaniya kukuruzy. Yubileynyy vypusk, posvyashchenny 100-letiyu so dnya rozhdeniya akademika M.I. Khadzhinova = Genetics, breeding and technology of corn cultivation. Anniversary issue dedicated to the 100th anniversary of the birth of academician M.I. Khadzhinov*. Krasno-

- dar; 1999. p.211-218. [in Russian] (Шацкая О.А., Щербак В.С. Использование модифицированной *ig*-системы для создания новых форм кукурузы с повышенным андрогенезом. В кн.: *Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы Юбилейный выпуск, посвященный 100-летию со дня рождения академика М.И. Хаджинова*. Краснодар; 1999. С.211-218).
- Shatskaya O.A., Zabirowa E.R., Shcherbak V.S., Chumak M.V. Mass induction of maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1994;68:51.
- Schmidt W. Hybridmaiszüchtung bei der KWS SAAT AG. In: Bericht über die 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2003, Gumpenstein, Austria; 2004. p.1-6. [in German]
- Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders' School; 2005; Urbana-Champaign, Illinois, USA; 2005. p.1-7.
- Strunnikov V.A. Animal cloning: theory and practice (Klonirovaniye zhivotnykh: teoriya i praktika). *Priroda*. 1998;7:3-9. [in Russian] (Струнников В.А. Клонирование животных: теория и практика. *Природа*. 1998;7:3-9).
- Turesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993;34:163-167. DOI: 10.1007/BF00036097
- Tymov V.S. Autonomous development of the embryo and endosperm in maize (Avtonomnoye razvitiye zarodysha i endosperma u kukuruzy) *Doklady AN SSSR = Transactions of the USSR Academy of Sciences*. 1983;272(3):722-725. [in Russian] (Тырнов В.С. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы. *Доклады АН СССР*. 1983;272(3):722-725).
- Tymov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis in angiosperms. *Genetics*. 1974;10(9):154-167 [in Russian] (Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1974;10(9):154-167).
- Tymov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis (Androgenez). In: *Haploidy and breeding (Gaploidiya i selektsiya)*. Moscow; 1976. p.87-99. [in Russian] (Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез. В кн.: Гаплоидия и селекция. Москва; 1976. С.87-99).
- Tymov V.S., Zavalishina A.N. Induction of a high incidence of matroclinous haploids in maize (Induktziya vysokoy chastoty vzniknoveniya matroklinnnyh gaploidov u kukuruzy). *Doklady AN SSSR = Transactions of the USSR Academy of Sciences*. 1984;276(3):735-738. [in Russian] (Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов у кукурузы. *Доклады АН СССР*. 1984;276(3):735-738).
- Wei Z.M. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1982;67:71-73.
- Wijnker E., Vogelaar A., Dirks R., van Dun K., de Snoo B., van den Berg M., Lelivelt C., de Jong H., Chunting L. Reverse breeding: reproduction of F₁ hybrids by RNAi-induced asynaptic meiosis. *Chromosome Research*. 2007;15:87-88. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00450.x
- Wilson E.B. Cell and its role in development and heredity (Kletka i yeyo rol v razviti i nasledstvennosti). Vol. 1. Moscow ; Leningrad; 1936. [in Russian] (Вильсон Э.Б. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. Т. 1. Москва ; Ленинград; 1936).
- Zabirowa E.R., Chumak M.V., Shatskaya O.A., Shcherbak V.S. Technology of mass accelerated production of homozygous maize lines (Tekhnologiya massovogo uskorenno go polucheniya gomozygotnykh liniy kukuruzy). *Kukuruza i sorgo = Maize and sorghum*. 1996;4:17-19. [in Russian] (Забирова Э.Р., Чумак М.В., Шацкая О.А., Щербак В.С. Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы. *Кукуруза и сорго*. 1996;4:17-19).
- Zhang Z., Qiu F., Lui Y., Ma K., Li Z., Xu S. Chromosome elimination and vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*. 2008;27:1851-1860. DOI: 10.1007/s00299-008-0601-2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Макарова Т.О.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ tamaramakarova333@gmail.com

Данный обзор посвящен рассмотрению результатов изучения межвидовой гибридизации, полиплоидии и филогенетических отношений видов рода *Solanum* и представителей близких к нему таксонов, с использованием методов молекулярной цитогенетики, таких как гибридизация ДНК-ДНК *in situ*: геномная – GISH и флуоресцентная – FISH. Метод GISH был использован для определения геномного состава и происхождения ряда диких видов секции *Petota*. Метод FISH используют для выявления коллинеарности геномов разных видов. Такого рода исследования позволяют проводить сравнительный анализ кариотипов и геномов, а также способствуют лучшему пониманию взаимодействия хромосом в мейозе у гибридов. В данном обзоре сделан акцент на изучении диких аллополиплоидных видов картофеля с помощью методов молекулярной цитогенетики, рассмотрены результаты анализа искусственно созданных межродовых и межвидовых гибридов рода *Solanum* и их потомства.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, межвидовые гибриды, соматическая гибридизация, GISH, FISH.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

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

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-04>

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

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

THE USE OF MOLECULAR CYTOGENETIC METHODS IN THE INVESTIGATION OF DISTANT POTATO HYBRIDS

Makarova T.O.

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ tamaramakarova333@gmail.com

This paper reviews the results of studies of interspecies hybridization, polyploidization, as well as phylogenetic relationships of *Solanum* species and members of closely related taxa by such molecular cytogenetic techniques as genomic (GISH) and fluorescent (FISH) DNA-DNA *in situ* hybridization. The latter was used to determine the genomic composition and origin of wild species of the *Petota* section, while the FISH technique was used for detecting intergenomic collinearity. The combination of these two types of research made possible a comparative analysis of karyotypes and genomes, thus allowing a better understanding of the meiotic interchromosomal interactions in hybrids. This review primarily focuses on the studies of wild allopolyploid potato species and artificially created intergeneric and interspecific hybrids of the genus *Solanum* and their offspring.

Key words: *Solanum tuberosum*, interspecific hybrids, somatic hybridization, GISH, FISH.

Для цитирования: Макарова Т.О. Использование методов молекулярной цитогенетики в исследованиях отдаленных гибридов картофеля. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):30-38. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-04

For citation: Makarova T.O. The use of molecular cytogenetic methods in the investigation of distant potato hybrids. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2)30-38. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-04

ORCID:

Makarova T.O. <https://orcid.org/0000-0002-0104-9418>

УДК 633.491:575.222.73:575.113:57.085.1:57.086.164

Поступила в редакцию: 31.07.2020

Принята к публикации: 06.10.2020

Введение

Картофель относится к роду *Solanum* L. секции *Petota* Dumort., включающей, согласно разным классификациям, от 107 до 235 видов. Так, согласно классификации Дж. Хокса к этой секции относят 235 видов, 228 из которых – дикие, 7 – культурные (Hawkes, 1990). Согласно системе Д. Спунера, в секции выделяют всего 107 видов картофеля: 103 из них относятся к диким видам, а 4 – к культивируемому (Spooner et al., 2014). Разнообразие видов картофеля в системе Дж. Хокса (1990) было разделено на 19 серий на основании схожести видов по морфологии, скрещиваемости, фертильности гибридов и геномному составу (Hawkes, 1990; 1994).

Дикие виды картофеля широко распространены: от юго-западных штатов США до южных границ Чили и Аргентины; от побережья Тихого океана до высот 4500 метров над уровнем моря; от болотистых лесов Венесуэлы до пустыни Атакама – с центром максимального видового разнообразия в Мексике (Hijmans et al., 2007; Spooner et al., 2014). Находясь в столь различных климатических условиях, дикие представители секции *Petota* демонстрируют широкий спектр генетических, физиологических, морфологических, биохимических и фитопатологических различий (Hawkes, 1990).

Виды секции *Petota* имеют базовое число хромосом $x=12$. Больше трети видов (36%) являются полиплоидами, а остальные (64%) – диплоидами (Hijmans et al., 2007; Gavrilenko et al., 2007; 2011). Дикие виды картофеля образуют полный полиплоидный ряд от $2x$ до $6x$, а культурные виды – от $2x$ до $5x$ (Rybin, 1929; 1933; Matsubayashi, 1991; Hawkes, 1994). Культурные виды картофеля и экономически самый важный из них – *Solanum tuberosum* L., как и большинство диких южно-американских видов картофеля, являются носителями базового генома А. Дикие диплоидные мексиканские виды серий *Bulbocastana* и *Pinnatisecta* являются носителями генома – В. Ряд аллополиплоидных видов картофеля наряду с субгеномом А, несут субгеномы: В, С, D и Р (Irikura, 1976; Matsubayashi, 1991; Gavrilenko, 2007; 2011).

Детальный анализ результатов цитогенетических исследований видов секции *Petota* рода *Solanum* и межвидовых гибридов картофеля, проведенных с использованием традиционных методов кариологического анализа, изучения характера спаривания хромосом в мейозе у полиплоидных видов и межвидовых гибридов, использования метода дифференциального С-окрашивания по Гимза хромосом картофеля, приведены в обзорах Y. Irikura, 1976 и M. Matsubayashi, 1991. В более поздних обзорах (Gavrilenko, 2007; 2011) проанализированы результаты первых работ по использованию FISH и GISH

для изучения геномного состава полиплоидных видов секции *Petota* и анализа отдаленных гибридов картофеля. В нашем обзоре мы постараемся осветить результаты исследований, полученные в последние десятилетия с использованием методов молекулярной цитогенетики.

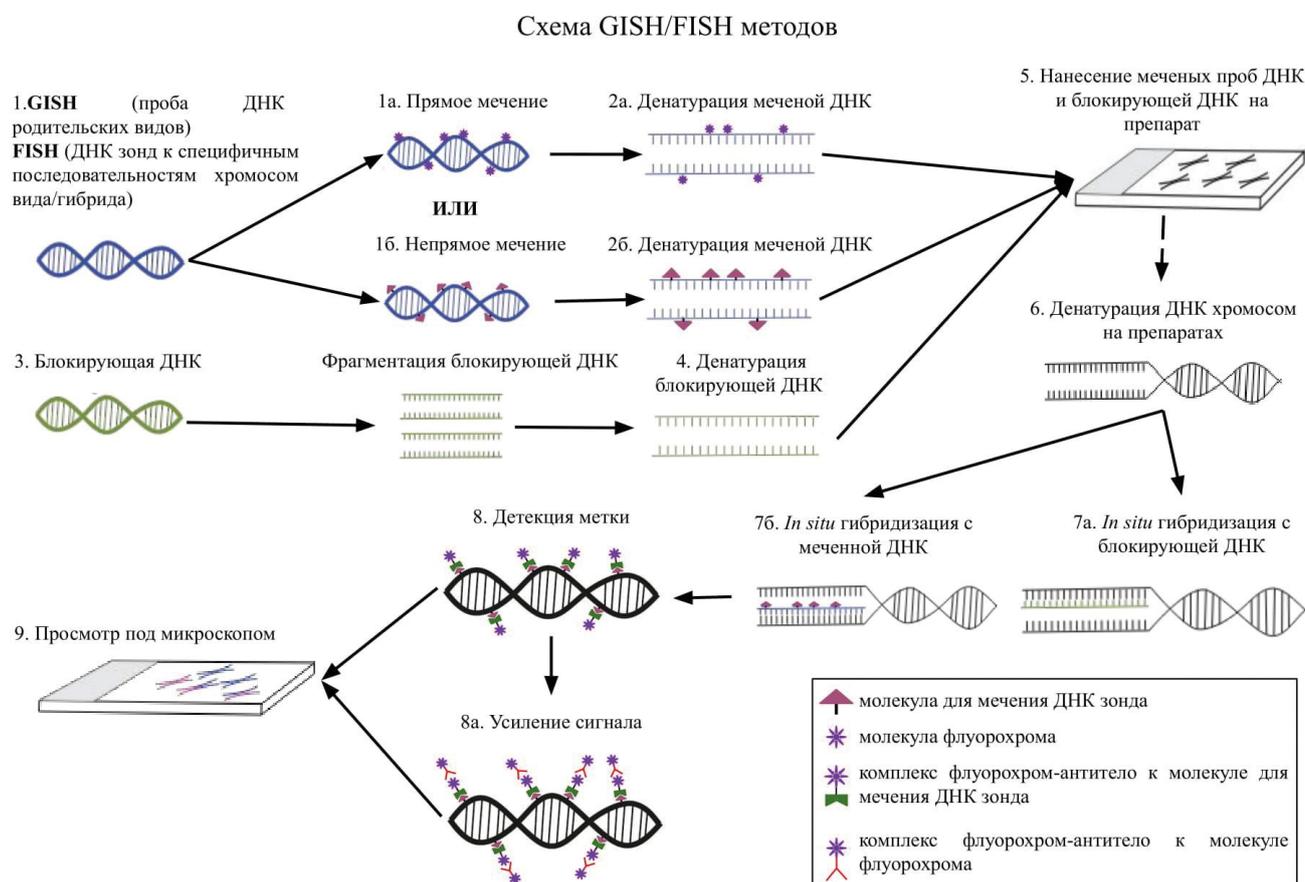
Современные методы молекулярной цитогенетики – GISH и FISH в исследованиях видов картофеля

В начале 70-х годов прошлого века была разработана методика *in situ* гибридизации молекул ДНК, позволяющая локализовать гибридные молекулы на хромосомах при изучении цитологических препаратов. Метод *in situ* гибридизации заключается в использовании ДНК-зондов специфичных к определенным последовательностям ДНК. Изначально для мечения ДНК использовали различные изотопы (^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P). В настоящее время используют нерадиоактивные метки, детектируемые с помощью методов микроскопического анализа по наличию флуоресцентного сигнала (Schwarzacher et al., 1989; Leitch et al., 1994). Этот метод получил название флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) и положил начало развитию методов молекулярной цитогенетики. Стало возможным различать и локализовывать специфические последовательности ДНК на хромосомах, например, рибосомальных генов 5S, 18S, 5.8S и 45S рРНК, повторяющиеся последовательности, свойственные теломерным районам (interstitial telomeric repeats – ITR), транспозоны, прицентромерные участки (Silva, Souza, 2013; Badaeva, Salina, 2013).

Существуют вариации метода *in situ* гибридизации, которые отличаются по характеру мечения ДНК-зонда. При прямом мечении ДНК используют флуорохромы, ковалентно связанные непосредственно с нуклеотидами ДНК-зонда. Суть непрямого мечения заключается в том, что связь флуорохрома с нуклеотидами ДНК-зонда образуется через молекулу-посредник или метку. Наиболее часто используемыми метками являются дигоксигенин и биотин, которые выявляют на цитологическом препарате с помощью антител к ним. Антитело, в свою очередь, помечено флуорохромом. Сигнал может быть усилен путем последующего использования антител к первичным флуорохромам, связанных с соответствующей флуоресцентной меткой. В качестве зондов для гибридизации могут быть использованы фрагменты ДНК, локализация которых на хромосомах и является задачей исследования (Leitch et al., 1994). Схема *in situ* гибридизации приведена в многочисленных обзорах, здесь мы приводим обобщенную схему (Рисунок).

Рисунок. “Схема *in situ* (GISH/FISH) гибридизации на препарате хромосом” (согласно Ramzan et al., 2017 с модификациями)

Fig. Diagram of GISH/FISH *in situ* hybridization using a chromosome preparation (according to Ramzan et al., 2017, modified)



Метод *in situ* гибридизации эффективен при изучении полиплоидных видов, межвидовых гибридов и их полового потомства. Для решения этих задач широко используется гибридизация с меченой геномной ДНК. Этот вариант FISH получил название геномной гибридизации *in situ* (genomic *in situ* hybridization – GISH).

В экспериментах GISH используют геномную ДНК родительских видов, участвовавших в гибридизации. Обычно геномы, которые имеют 80-85% идентичности, можно дифференцировать с использованием стандартного протокола GISH (без использования блокирующей ДНК) (Schwarzacher et al., 1989). Использование блокирующей ДНК обычно необходимо для гибридов, полученных при гибридизации близких видов с высокой степенью сходства геномов. Хромосомы близкородственных геномов со сходством последовательностей до 90–95% можно различать, используя меченую

ДНК одного из родительских геномов и немеченую блокирующую ДНК другого родительского генома в гибридизационной смеси (Parokonny et al., 1997). Метод GISH успешно используют для идентификации геномов полиплоидных видов и экспериментальных гибридов разных видов растений например: декоративных – хризантем *Chrysanthemum* sp. (Hussein, Katsuhiko, 2006; 2012) и лилий *Asiatic* sp. (Rodrigo et al., 2006); сельскохозяйственных – представителей семейств злаковые – пшениц *Triticum* sp. (Molnár-Láng et al., 2000), ячменя *Hordeum* sp. (Schwarzacher et al., 1989), овсяницы *Festuca* sp. (Zwierzukowski et al., 2008); семейства крестоцветные – капустных *Brassica* sp. (Lim et al., 2012; Yao et al., 2010); семейства банановых – бананов *Musa* sp. (Jeridi et al., 2011; Silva, Souza, 2013) и других.

Для представителей семейства пасленовых известно не так много работ, например, для отдаленных гибри-

дов томата *Solanum lycopersicum* L. (Garriga-Calderé et al., 1997; 1998; 1999; Gavrilenko et al., 2001), табака *Nicotiana* L. (Parokonny et al., 1997; Chase et al., 2003), паслена *Solanum villosum* Mill. (Tarwacka et al., 2013), картофеля *S. tuberosum* (Gavrilenko, 2007; 2011; Gaiero et al., 2017) (Приложение табл. 1/Supplementary table 1^a).

Используя метод GISH для анализа спаривания хромосом в профазе I – метафазе I мейоза, можно выявить ассоциации хромосом, как гомологичных, относящихся к одному геному, так и гомеологичных, относящихся к разным геномам. Результаты GISH позволяют сделать вывод об особенностях взаимодействия двух разных геномов и прогнозировать возможность спаривания и рекомбинации хромосом родительских видов, а также выявлять межгеномные перестройки у исследуемых гибридов и форм с интрогрессией генетического материала (Garriga-Calderé et al., 1997; 1998; 1999; Zwierzykowski et al., 2008; Yao et al., 2010; Jeridi et al., 2011; Silva, Souza, 2013; Gavrilenko et al., 2014).

Развитие методов флуоресцентной *in situ* гибридизации значительно расширило возможности цитогенетических исследований видов картофеля – представителей секции *Petota* рода *Solanum*. Культурный картофель *S. tuberosum* – сложный объект для цитогенетических исследований, поскольку длина метафазных хромосом находится в диапазоне от 1 до 35 мкм (Dong et al., 2000). До разработки методов молекулярной цитогенетики у видов картофеля было возможно идентифицировать индивидуальные хромосомы только на стадии пахитены в профазе I мейоза. Осложняло работу и то, что у *S. tuberosum* отсутствовали коллекции моносомных и нулисомных линий, а также коллекции мутантов со структурными изменениями хромосом (транслокации, делециями и инверсиями).

В работе J. Song с коллегами (Song et al., 2000) была создана библиотека ВАС клонов (bacterial artificial chromosomes), включающая 23808 клонов со средним размером вставки 155 кб дикого мексиканского вида *Solanum bulbocastanum* (Bitter) Hawkes (Song et al., 2000). С помощью хромосом-специфических маркеров RFLP (Restriction fragment length polymorphism) из этой библиотеки были отобраны ВАС-клоны для каждой из 12 хромосом картофеля. Маркеры RFLP были физически картированы методом ВАС-FISH на разных плечах каждой из 12 хромосом картофеля (Dong et al., 2000), то есть хромосом-специфические цитогенетические маркеры ДНК (chromosome-specific cytogenetic DNA markers – CSCDM) были использованы для идентификации индивидуальных метафазных хромосом картофеля. Среди главных преимуществ этого метода следует указать следующие: возможность идентификации всех 12 хромосом картофеля на любой стадии мейоза; возможность использования для анализа неполных клеток; возможность анализировать как диплоидные, так и полиплоидные кариотипы и сопоставлять генетические и цитологические кар-

ты хромосом картофеля (Dong et al., 2001). Таким образом, для кариотипирования видов картофеля и анализа гибридов был создан новый инструмент – набор CSCDM (Dong et al., 2001, Song et al., 2000) (Приложение, табл. 2/Supplementary table 2).

В работе X. Tang с коллегами (Tang et al., 2009) были отобраны 60 ВАС-клонов, ассоциированных с AFLP (amplified fragment length polymorphism - AFLP) маркерами, для которых было ранее установлено, что они представлены во всех 12 группах сцепления. На основе отобранных ВАС-клонов с использованием метода ВАС-FISH были созданы молекулярно-цитогенетические карты хромосом картофеля. Отобранные ВАС-маркеры, вследствие гибридизации фрагмента ДНК вставки с хромосомной ДНК, были локализованы на разных плечах пахитенных хромосом, за исключением хромосомы 2, для которой был отобран ВАС только для длинного плеча (Tang et al., 2009).

В дальнейшем, M. Iovene (Iovene et al., 2008) с соавторами отобраны 30 ВАС-клонов и провели FISH-картирование этих маркеров на пахитенной хромосоме 6 картофеля и определили генетическое положение центромеры и перичентромерного гетерохроматина. Кроме того, в этой работе проведен сравнительный анализ хромосом 6 картофеля и томата, с помощью метода ВАС-FISH, для установления их коллинеарности (Iovene et al., 2008). Авторы установили, что шестые хромосомы картофеля (*S. tuberosum*) и томата (*S. lycopersicum* L.) имеют сходную структуру на стадии пахитены, однако между этими хромосомами наблюдались четкие различия в распределении гетерохроматиновых участков. Сравнение физических карт 6-ых хромосом томата и картофеля с помощью ВАС-FISH также выявило общую коллинеарность расположения маркеров, однако в эухроматиновом районе короткого плеча 6-ой хромосомы томата была обнаружена инверсия (Iovene et al., 2008) (Приложение, табл. 3/Supplementary table 3).

Позже Q. Lou с соавторами провели сравнительный анализ распределения 13 ВАС-маркеров на хромосоме 6 у пяти видов рода *Solanum*: *S. tuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. chromatophilum* Bitt., *S. caripense* Dunal и *Solanum etuberosum* Lindl. Анализ, с помощью метода ВАС-FISH, показал полную коллинеарность физических карт хромосом 6 у всех исследованных видов за исключением не клубнеобразующего *S. etuberosum*, у которого была обнаружена перичентрическая инверсия (Lou et al., 2010). Следует отметить, что из изученных в работе Lou видов первые три относятся к секции *Petota*, как и культурный картофель *S. tuberosum*, тогда как два последних вида (включая *S. etuberosum*) являются не клубненосными и относятся к другим секциям рода *Solanum*.

C. Achenbach с соавторами провели сравнительное картирование хромосомы 5 картофеля (*S. tuberosum*) и томата (*S. lycopersicum*) с помощью пяти ВАС-клонов.

Supplementary tables 1-4 are available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-o4>

Было показано, что у томата в длинном плече хромосомы 5 находится инверсия по сравнению с хромосомой 5 картофеля (Achenbach et al., 2010).

В дальнейшем с использованием метода ВАС-FISH голландские исследователи продолжили работы по изучению коллинеарности геномов привлекая большее число видов рода *Solanum*: *S. bulbocastanum*, *S. chilense* Dunal., *S. etuberosum*, *S. habrochaites* S.Knapp&D.M.Spooner, *S. lycopersicum*, *S. lycopersicoides* Dunal., *S. megistracrolobum* Bitter, *S. melongena* L., *S. ochranthum* Dunal., *S. pennellii* Correll., *S. peruvianum* L., *S. pimpinellifolium* L., *S. pinnatisectum* Dunal., *S. tarijense* Hawkes. (Szinay et al., 2012). Авторы выявили многочисленные хромосомные перестройки, нарушающие коллинеарность геномов разных представителей рода *Solanum* (среди которых – культурный картофель *S. tuberosum*). Последние исследования с использованием ВАС-клонов картофеля и томатов при проведении многоцветной FISH позволили выделить три синтетические группы, внутри которых наблюдалась коллинеарность расположения сайтов гибридизации ВАС-маркеров на хромосомах. Группа А включала в себя культурный картофель и его диких сородичей (*S. bulbocastanum*, *S. tarijense*, *S. megistracrolobum*, *S. pinnatisectum*). Группа Б включала в себя культурный томат и его диких сородичей (*S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*). У *S. chilense* на коротком плече хромосомы 12 была выявленная проксимальная инверсия. Было показано, что короткое плечо хромосомы 6 полностью инвертировано у *S. ochranthum* по сравнению с видами, относящимися к группе Б и *S. chilense*. Две дистальные инверсии на коротких плечах хромосом 6 и 7 были обнаружены у двух видов *S. lycopersicoides* и *S. pennellii*. Также было показано, что порядок расположения ВАС-маркеров на хромосомах *S. etuberosum* очень похож на таковой порядок у синтетической группы А, но были обнаружены небольшие инверсии на коротких плечах хромосом 6 и 7 и на длинном плече 10-ой хромосомы (Szinay et al., 2012).

С помощью метода ВАС-FISH также было проведено сравнительное картирование хромосом картофеля (*S. tuberosum*), томата (*S. lycopersicum*) и перца (*Capsicum annuum* L.) Было показано, что длинное плечо 2-ых хромосом у перца и картофеля полностью коллинеарны, а у томата в данном плече есть инверсия. В этой работе были подтверждены данные о дистальной инверсии у томата в коротком плече хромосомы 6 по сравнению с картофелем и перцем (Peters et al., 2012; Iovene et al., 2008) (см. Приложение, табл. 3/Supplementary table 3).

В свою очередь с использованием метода GISH были проведены исследования полиплоидной природы и геномного состава нескольких диких полиплоидных мексиканских видов картофеля серии Longipedicellata. Анализ тетраплоидных видов *S. stoloniferum* и *S. hjertingii* Hawkes с помощью GISH позволил подтвердить их аллополиплоидную природу и охарактеризовать геномный состав этих видов – ААВВ (Pendinen et al., 2008). Позд-

нее этой же группой авторов с использованием GISH были установлены полиплоидная природа и геномный состав диких мексиканских гексаплоидных видов серии *Demissa*: *S. demissum* Lindl. (АААААА) и *S. hougasii* Correll. (ААВВВВ) (Pendinen et al., 2012). Геномную гибридизацию *in situ* использовали и для анализа экспериментально созданных межродовых и межвидовых соматических гибридов картофеля (Приложение, табл. 4/Supplementary table 4).

Современные методы молекулярной цитогенетики – GISH, FISH в исследованиях по межвидовой гибридизации картофеля

Первые успешные результаты по применению GISH для анализа хромосом картофеля были получены при исследовании отдаленных гибридов, полученных методом слияния протопластов видов, принадлежащих к различным секциям рода *Solanum*. Первые работы по исследованию соматических гибридов картофеля с помощью FISH провели на межродовых соматических гибридах *S. tuberosum* (+) *Lycopersicon esculentum* L. (= *Solanum esculentum*) (Jacobsen et al., 1996; Garriga-Calderé et al., 1997; 1998; 1999). В этих работах были идентифицированы геномы А и L родительских видов у соматических гибридов, а также в их половом потомстве BC₁-BC₂ (Jacobsen et al., 1994; 1996). Хромосомы томата и картофеля были легко отличимы у гибридов от возвратных скрещиваний, причем у гибридов BC₁ были утрачены 6 из 12 хромосом томата (Jacobsen et al. 1996).

Позже F. Garriga-Calderé с коллегами в серии работ с использованием прямого мечения и блокирующей ДНК томата идентифицировали родительские геномы у гексаплоидных и тетраплоидных соматических гибридов и их потомства, а также создали серию дополненных моносомных линий АААА + L' (Garriga-Calderé et al., 1997; 1998; 1999). Первым шагом в данной работе было создание соматических гибридов *L. esculentum* (+) *S. tuberosum* и их исследование с помощью RFLP хромосом-специфичных маркеров и GISH. В результате были отобраны соматические гибриды с сохранившимся полным набором хромосом томата. Затем тетраплоидные и гексаплоидные соматические гибриды были вовлечены в возвратные скрещивания, получено поколение BC₁. Последнее проанализировали с использованием комбинации молекулярных и цитогенетических методов и отобрали формы, несущие полный набор хромосом томата (Garriga-Calderé et al., 1997). Соматические гибриды использовали для возвратных скрещиваний. Затем гибриды BC₁-BC₂ были также проанализированы с помощью хромосом-специфичных RFLP маркеров томата и комбинацией методов GISH/FISH. С использованием цитогенетических методов был изучен геномный состав и характер образующихся ассоциаций хромосом в мейозе, что позволи-

ло отобрать семь форм BC₂, несущих полный набор хромосом картофеля и одну хромосому томата (1, 2, 4, 6, 8, 10 или 12) (Garriga-Calderé et al., 1998). Позже в 1999 году этой же группой авторов были отобраны формы BC₂, содержащие по одной хромосоме томата, и создана серия дополненных моносомных линий AAAA + 1L' (Garriga-Calderé et al., 1999). Впоследствии эта работа была продолжена Н. Али. Результатом этих исследований стала полная коллекция моносомных линий, в каждой из которых содержалась только одна из хромосом полного набора хромосом томата (Ali et al., 2001) (см. Приложение, табл. 1/Supplementary table 1).

Другой группой исследователей было показано, что с помощью метода GISH с блокирующей ДНК возможно различить геномы родительских видов у межвидовых соматических гибридов томата и *S. lycopersicoides* (Escalante et al., 1998).

Для комбинации не клубненосного вида *S. etuberosum* (геном EE) и культурного томата *S. esculentum* (геном LL) с использованием метода FISH показана четкая дифференциация родительских геномов у межродовых соматических гибридов (EELL, LLEEEE), а также у андрогенных регенерантов (EL) (полученных в культуре пыльников соматических гибридов). При исследовании мейоза у данных растений не выявлено спаривания между геномами родительских видов (Gavrilenko et al., 2001). Анализ мейоза показал, что наблюдалось спаривание только между гомологичными хромосомами двух геномов, гомеологичное спаривание хромосом наблюдалось редко.

Методы GISH были также успешно использованы для анализа экспериментально созданных межвидовых соматических гибридов картофеля и их потомства.

С использованием комбинации методов GISH и FISH с маркерами CSCDM удалось идентифицировать каждую из трех хромосом *Solanum brevidens* Phil., сохранившихся в поколениях BC₃, полученных на основе соматических гибридов между *S. tuberosum* (геном AAAA) и *S. brevidens* (геном EE) (Dong et al., 2001). Для этой же комбинации родительских видов использовали метод GISH для изучения тетраплоидных и гексаплоидных соматических гибридов (AAAAEE, AAEE и AAEeee), а также "второго поколения" соматических гибридов (AAAAE, AAAE и AAAEE), полученных через повторное слияние протопластов, поскольку отдаленные соматические гибриды были стерильны. Показано, что хромосомы родительских видов можно идентифицировать, используя данный метод (Gavrilenko et al., 2002). Позже, используя FISH со специфичными маркерами RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (McGrath et al., 1994; 1996) идентифицировали хромосомы дикого вида у BC₃ и выявили рекомбинантные хромосомы. Были созданы моносомные линии, несущие 1, 3, 4, 5, 8, 9 и 10 хромосому *S. brevidens* (Dong et al., 2005) (см. Приложение, табл. 2/Supplementary table 2).

С помощью метода GISH изучали наборы хромо-

сом тетраплоидных соматических гибридов диплоидного *S. tuberosum* (геном AA, 2n=2x=24) и не клубнеобразующего вида *S. etuberosum* (геномная формула 2n=2x=24, EE), а также их полового потомства BC₁-BC₂. Как и в случае комбинации *S. tuberosum* с *S. berthaultii* Hawk. хромосомы родительских видов удалось дифференцировать (Dong et al., 1999). Позже также дифференцировали хромосомы родительских геномов в случае тетраплоидных и гексаплоидных межвидовых соматических гибридов той же комбинации (AAEE, AAEEEEE, AAAAEE) и их полового потомства от возвратных скрещиваний BC₁-BC₃ (Gavrilenko et al., 2003).

Используя комбинацию методов FISH/GISH или GISH/FISH на одних и тех же препаратах хромосом отдаленных гибридов, можно выяснить какому из геномов принадлежит интересующая последовательность ДНК. С помощью комбинации методов GISH и FISH изучали характер образующихся ассоциаций хромосом в мейозе у аллоглоидов, полученных на основе соматических гибридов между диплоидным культурным картофелем и не клубнеобразующим видом *S. etuberosum* (EE) (Gavrilenko et al., 2014). Было показано, что полученные аллоглоиды (2n=2x=24, AE) имеют по 12 хромосом исходных родительских форм и все биваленты, наблюдаемые в метафазе I мейоза, представлены гомеологичными ассоциациями хромосом. В этой же работе был проведен репробинг ВАС-FISH/GISH для идентификации спаривания хромосом в мейозе у межродовых гибридов *S. etuberosum* с *S. lycopersicum* (2n=2x=24, LL). С помощью последовательного применения FISH с хромосомспецифичными ВАС-пробами и GISH с дифференциально мечеными ДНК родительских видов удалось идентифицировать хромосомы каждого из геномов у аллоглоидных гибридов (2n=2x=24, EL), а также регистрировать случаи спаривания хромосом в мейозе. На основании полученных данных был сделан вывод о различиях в частоте образования гомеологичных ассоциаций хромосом А-, Е- и L-геномов (Gavrilenko et al., 2014) (см. Приложение, табл. 2/Supplementary table 2).

Метод GISH был успешно применен для анализа экспериментально созданных межвидовых соматических гибридов между видами секции *Petota* (см. Приложение, табл. 2/Supplementary table 2).

Так, М. Иовене с соавторами (Iovene et al., 2007) с использованием данного метода провели анализ полученных ими соматических гибридов культурного картофеля *S. tuberosum* (геномная формула 2n=4x=48, AAAA) и дикого мексиканского диплоидного вида *S. bulbocastanum* (геномная формула 2n=2x=24, BB), что позволило им доказать гибридную природу полученных форм. Поскольку родительские виды являются носителями разных геномов, А и В, то можно четко ассоциировать хромосомы с родительским видом. Было проанализировано 7 соматических гибридов с 48 хромосомами, которые имели по 24 хромосомы каждого из родителей. Также был обнаружен гибрид с 49-ю

хромосомами, содержащий почти равное количество хромосом родительских форм. Отличный от ожидаемого хромосомный состав был выявлен у трех гексаплоидных гибридов (у двух – AAAABB, у одного – AABBBB) (Iovene et al., 2007).

Используя комбинацию методов GISH и BAC-FISH с хромосом специфичными маркерами и маркерами рибосомальных генов (5S и 45S) были исследованы соматические гибриды и их половое потомство BC₁-BC₂ комбинации *S. tuberosum* (+) *S. commersonii* Dunal. (Gaiero et al., 2017). Методом GISH не удалось различить хромосомы близкородственных родительских видов, поэтому был сделан вывод о том, что *S. tuberosum* и *S. commersonii* являются носителями генома типа А. При помощи BAC-FISH показано, что идентифицированные при помощи маркеров хромосомы вовлечены в образования тривалентных ассоциаций в мейозе (Gaiero et al., 2017).

Позже с помощью метода GISH были исследованы соматические гибриды между *S. tuberosum* и *S. bulbocastanum*, а также их половое потомство первого и второго поколений. С помощью данного метода было показано, что в поколениях беккроссов сохраняется от 4 до 10 хромосом дикого вида (Rakosy-Tican et al., 2020).

Именно благодаря методам *in situ* гибридизации стало возможным создавать моносомные линии. Фрагменты ДНК в составе BAC-клонов, используемые при проведении FISH в качестве маркеров, были картированы и было определено их взаимное расположение друг относительно друга на хромосомах у изучаемого вида и у родственных видов. Этот результат позволил судить о событиях, связанных с перестройкой кариотипов и дал возможность изучать эволюционные перестройки хромосом. С помощью метода GISH стало возможным определить геномный состав аллополиплоидных диких видов, отдаленных гибридов и их потомства.

Благодарности/Acknowledgements

Обзор подготовлен при поддержке РФФИ (проект № 20-54-00043 Бел_a)

*Хочу выразить благодарность в подготовке обзора д.б.н. Татьяне Андреевне Гавриленко – моему научному руководителю и к.б.н. Галине Ивановне Пендинен, которая оказала мне помощь в освоении методов *in situ* гибридизации.*

The review was prepared with the support of the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 20-54-00043Bel_a)

*I would like to express my gratitude for the preparation of the review to my scientific advisor Dr. (Biol.Sci.) Tatiana A. Gavrilenko and to Ph.D. Galina I. Pendinen, who assisted me in mastering *in situ* hybridization methods.*

References/Литература

- Achenbach U.C., Tang X., Ballvora A., de Jong H., Gebhardt C. Comparison of the chromosome maps around a resistance hot spot on chromosome 5 of potato and tomato using BAC-FISH painting. *Genome*. 2010;53:103-110. DOI: 10.1139/G09-086
- Ali S.N.H., Ramanna M.S., Jacobsen E., Visser R.G.F. Establishment of a complete series of a monosomic tomato chromosome addition lines in the cultivated potato using RFLP and GISH analyses. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103:687-695. DOI: 10.1007/s001220100652
- Badaeva E.D., Salina E.A. Genome structure and chromosome analysis in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1017-1043 [in Russian] (Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Структура генома и хромосомный анализ растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1017-1043).
- Chase M.W., Knapp S., Cox A.V., Clarkson J.J., Butsko Y., Joseph J., Savolainen V., Parokony A.S. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Annals of Botany*. 2003; 92(1):107-27. DOI: 10.1093/aob/mcg087
- Collonnier C., Fock I., Mariska I., Servaes A., Vedel F., Siljak-Yakovlev S., Souvannavong V., Sihachakr D. GISH confirmation of somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. torvum*: assessment of resistance to both fungal and bacterial wilts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003;41:459-470. DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00054-8
- Dong F., Novy R.G., Helgeson J.P., Jiang J. Cytological characterization of potato – *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their backcross progenies by genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 1999;42(5):987-992. DOI: 10.1139/g99-037
- Dong F., Song J., Naess S.K., Helgeson J.P., Gebhardt C., Jiang J. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000;101(7):1001-1007. DOI: 10.1007/s001220051573
- Dong F., McGrath J.M., Helgeson J.P., Jiang J. The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome*. 2001;44(4):729-734. DOI: 10.1139/gen-44-4-729
- Dong F., Tek A.L., Frasca A.B.L., McGrath J.M., Wielgus S.M., Helgeson J.P., Jiang J. Development and characterization of potato-*Solanum brevidens* chromosomal addition/substitution lines. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005;109(5):368-372. DOI: 10.1159/000082421
- Escalante A., Imanishi S., Hossain M., Ohmido N., Fukui K. RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization (GISH) in somatic hybrids and their progeny between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;96(6):719-726. DOI: 10.1007/s001220050794
- Gaiero P., Mazzella C., Vilaró F., Speranza P., de Jong H. Pairing analysis and *in situ* hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica*. 2017;213(7):137-144. DOI: 10.1007/s10681-017-1922-4
- Garriga-Calderé F., Huigen D.J., Filotico F., Jacobsen E., Ramanna M.S. Identification of alien chromosomes through GISH and RFLP analysis and the potential for establishing potato lines with monosomic additions of tomato chromosomes. *Genome*. 1997;40(5):666-673. DOI: 10.1139/g97-088
- Garriga-Calderé F., Huigen D.J., Angrisano A., Jacobsen E., Ramanna M.S. Transmission of alien tomato chromosomes from BC₁ to BC₂ progenies derived from backcrossing potato (+) tomato fusion hybrids to potato: the selection of single additions for seven different tomato chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;96(2):155-163. DOI: 10.1007/s001220050722
- Garriga-Calderé F., Huigen D.J., Jacobsen E., Ramanna M.S. Prospects for introgressing tomato chromosomes into the potato genome: An assessment through GISH analysis. *Genome*. 1999;42(2):282-288. DOI: 10.1139/gen-42-2-282
- Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.-M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103(2): 231-239. DOI: 10.1007/s001220100626

- Gavrilenko T., Larkka J., Pehu E., Rokka V.-M. Identification of mitotic chromosomes of tuberous and non-tuberous *Solanum* species (*Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*) by GISH in their interspecific hybrids. *Genome*. 2002;45(8):442-449. DOI: 10.1139/g01-136
- Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme Th. Fertile somatic hybrids of *Solanum tuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationships of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y. *Euphytica*. 2003;131(3):323-332. DOI: 10.1023/A:1024041104170
- Gavrilenko T. Potato cytogenetics. In: D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D.K.L. MacKerron, M.A. Taylor, H. Ross (eds). *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Oxford; Amsterdam: Elsevier; 2007. p.203-216.
- Gavrilenko T. Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato. In: J.M. Bradeen, C. Kole (eds). *Genetics, Genomics and Breeding of Potato*. Enfield, NH, USA: Science Publishers; 2011. p.184-206. DOI: 10.1201/b10881-10
- Gavrilenko T.A., Pendinen G.I., Rokka V.-M., Antonova O.Y., Thieme R. Intragenomic chromosome pairing in allohaploid hybrids of genus *Solanum*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/1):660-671. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Пендинен Г.И., Рокка В.-М., Антонова О.Ю. и Тиме Р. Спаривание гомеологических хромосом у отдаленных гибридов рода *Solanum*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):660-671).
- Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press; 1990. Available from: oclc:record:1150961186 [accessed October 14, 2020].
- Hawkes J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato Genetics*. Wallingford: CAB International; 1994. p.3-42.
- He L., Liu J., Torres G.A., Zhang H., Jiming J., Xie C. Interstitial telomeric repeats are enriched in the centromeres of chromosomes in *Solanum* species. *Chromosome Research*. 2012;21(1):5-13. DOI: 10.1007/s10577-012-9332-x
- Hijmans R.J., Gavrilenko T., Stephenson S., Bamberg J., Salas A., Spooner D.M. Geographical and environmental range expansion through polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). *Global Ecology and Biogeography*. 2007;16(4):485-495. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2007.00308.x
- Horsman K., Gavrilenko T., Bergervoet M., Huigen D.J., Joe A.T.W., Jacobsen E. Alteration of the genomic composition of *Solanum nigrum* (+) potato backcross derivatives by somatic hybridization: selection of fusion hybrids by DNA measurements and GISH. *Plant Breeding*. 2001;120:201-207. DOI: 10.1046/j.1439-0523.2001.00591.x
- Hussein A., Katsuhiko K. Fluorescence *in situ* hybridization and genomic *in situ* hybridization to identify the parental genomes in the intergenic hybrid between *Chrysanthemum japonicum* and *Nipponanthemum nipponicum*. *Chromosome Botany*. 2006;1(1):7-11. DOI: 10.3199/isb.1.7
- Hussein A., Katsuhiko K. Genome Mutation Revealed by Artificial Hybridization between *Chrysanthemum yoshinaganthum* and *Chrysanthemum vestitum* Assessed by FISH and GISH. *Journal of Botany*. 2012;ID 480310(8). DOI: 10.1155/2012/480310
- Iovene M., Savarese S., Cardi T., Frusciant L., Scotti N., Simon P.W., Carputo D. Nuclear and cytoplasmic genome composition of *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *Genome*. 2007;50(5):443-450. DOI: 10.1139/g07-024
- Iovene M., Wielgus S.M., Simon P.W., Buell R., Jiang J. Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato. *Genetics*. 2008;180(3):1307-1317. DOI: 10.1534/genetics.108.093179
- Irikura Y. Cytogenetic studies on the haploid plants of tuber-bearing *Solanum* species. II. Cytogenetic investigations on haploid plants and interspecific hybrids by utilizing haploidy. *Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station*. 1976;115:1-80.
- Jacobsen E., Daniel M.K., Bergervoet J.E.M., Huigen D.J., Ramanna M.S. The first and second backcross progeny of the intergeneric fusion hybrids of potato and tomato after crossing with potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88:181-186. DOI: 10.1007/BF00225895
- Jacobsen E., de Jong J.H., Kamstra S.A., van den Berg P.M.M.M., Ramanna M.S. Genomic *in situ* hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids. *Heredity*. 1996;74(3):250-257. DOI: 10.1038/hdy.1995.38
- Jeridi M., Bakry F., Escoute J., Fondi E., Carreel F., Ferchichi A., D'Hont A., Rodier-Goud M. Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany*. 2011;108(5):975-981. DOI: 10.1093/aob/mcr207
- Ji Y., Pertuzé R., Chetelat R.T. Genome differentiation by GISH in interspecific and intergeneric hybrids of tomato and related nightshades. *Chromosome Research*. 2004;12:107-116. DOI: 10.1023/B:CHRO.0000013162.33200.61
- Ji Y., Chetelat R.T. GISH analysis of meiotic chromosome pairing in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. *Genome*. 2007;50(9):825-833. DOI: 10.1139/g07-069
- Kulawiec M., Tagashira N., Bartoszewski G., Kuc D., Snieszko R., Malepszy S. Chromosome number variation in somatic hybrids between transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) and *Solanum lycopersicoides*. *Journal of applied genetics*. 2003;44(4):431-447.
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jacson D., Leitch I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd.; 1994.
- Lim S.J., Lee S.S., Bang J.W. Karyotype and genomic *in situ* hybridization pattern in xBrassicoraphanus, an intergeneric hybrid between *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and *Raphanus sativus*. *Plant Biotechnology Reports*. 2012;6:107-112. DOI: 10.1007/s11816-011-0202-3
- Lou Q., Iovene M., Spooner D.M., Buell C.R., Jiming J. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Chromosoma*. 2010;119:435-442. DOI: 10.1007/s00412-010-0269-6
- M de Boer J., Datema E., Tang X., Borm T.J.A., Bakker E.H., van Eck H.J., van Ham R.C.H.J., de Jong H., Visser R.G.F., Bachem C.W.B. Homologues of potato chromosome 5 show variable collinearity in the euchromatin, but dramatic absence of sequence similarity in the pericentromeric heterochromatin. *BMC Genomics*. 2015;16(1):374. DOI: 10.1186/s12864-015-1578-1
- Matsubayashi M. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. In: Tsuchiya T. and Gupta PK (eds.). *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding and evolution*, part B. Elsevier, Amsterdam. 1991;2:93-118. DOI: 10.1016/B978-0-444-88260-8.50011-2
- McGrath J.M., Wielgus S.M., Uchytel T.F., Kim-Lee H., Haberlach G.T., Williams C.E., Helgeson J.P. Recombination of *Solanum brevidens* chromosomes in the second backcross generation from a somatic hybrid with *S. tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88(8):917-924. DOI: 10.1007/BF00220797
- McGrath J.M., Wielgus S.M., Helgeson J.P. Segregation and recombination of *Solanum brevidens* synteny groups in progeny of somatic hybrids with *S. tuberosum*: intragenomic equals or exceeds intergenomic recombination. *Genetics*. 1996;142(4):1335-1348.
- Molnár-Láng M., Linc G., Logojan A., Sutka J. Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) x winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. 2000;43(6):1045-54. DOI: 10.1139/gen-43-6-1045
- Parokony A.S., Marshall J.A., Bennett M.D., Cocking E.C., Davey M.R., Power J.B. Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;94(10):713-723. DOI: 10.1007/s001220050470
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 2008;51(9):714-220. DOI: 10.1139/G08-052
- Pendinen G., Spooner D.M., Jiang J., Gavrilenko T. Genomic *in situ* hybridization reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species. *Genome*. 2012;55(6):407-415. DOI: 10.1139/g2012-027
- Peters S.A., Bargsten J.W., Szinay D., van de Belt J., Visser R.G.F., Bai Y., de Jong H. Structural homology in the *Solanaceae*: anal-

- ysis of genomic regions in support of synteny studies in tomato, potato and pepper. *The Plant Journal*. 2012;71(6):602-614. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05012.x
- Rakosy-Tican E., Thieme R., Konig J., Nachtigall M., Hammann T., Denes T.-E., Kruppa K., Molnar-Lang M. Introgression of two broad-spectrum late blight resistance genes, *Rpi-blb1* and *Rpi-blb3*, from *Solanum bulbocastanum* into plus Rase-specific *R* genes into potato pre-breeding lines. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:699. DOI: 10.3389/fpls.2020.00699
- Ramzan F., Younis A., Lim K.-B. Application of genomic *in situ* hybridization in horticultural science. *International Journal of Genomics*. 2017;ID 7561909. DOI: 10.1155/2017/7561909
- Rodrigo B.-G., Van Silfhout A.A., Visser R.G.F., Munikote S. Ramanna, Van Tuyl J.M. Progenies of allotriploids of Oriental×Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica*. 2006;151:243-250. DOI: 10.1007/s10681-006-9148-x
- Rokka V.-M., Lapitan N.L.V., Knudson D.L., Pehu E. Fluorescence *in situ* hybridization of potato somatohaploids and their somatic hybrid donors using two *Solanum tuberosum* specific sequences. *Agricultural and Food Science*. 1998;7(1):31-38. DOI: 10.23986/afsci.72853
- Rybin V.A. Karyological investigation on some wild growing and indigenous cultivated potatoes of America. *Bulletin of applied botany, of genetics and plant breeding*. 1929;20:655-720. [in Russian] (Рыбин В.А. Кариологическое исследование некоторых видов дикорастущего и выращиваемого в сельском хозяйстве картофеля Америки. *Труды по прикладной ботанике генетике и селекции*. 1929;20:655-720).
- Rybin V.A. Cytological investigation of the South American cultivated and wild potatoes, and its significance for plant breeding. *Bulletin of applied botany, of genetics and plant breeding*. Ser. 2. 1933;2:3-100. [in Russian] (Рыбин В.А. Цитологическое исследование южноамериканского культивируемого и дикого картофеля и его значение для селекции растений. *Труды по прикладной ботанике генетике и селекции*. Сер. 2. 1933;2:3-100).
- Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*. 1989;64(3):315-324. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087847
- Silva G.S., Souza M.M. Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and molecular research*. 2013;12(3):2953-2965. DOI: 10.4238/2013.August.12.11
- Song J., Dong F., Jiang J. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome*. 2000;43(1):199-204. DOI: 10.1139/gen-43-1-199
- Spooner D.M., Sytsma K.J. Reexamination of series relationships of Mexican and Central American wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany*. 1992;17(3):432-448.
- Spooner D.M., Van Den Berg R.G., Miller J.T. Species and series boundaries of *Solanum* series *Longipedicellata* (*Solanaceae*) and phonetically similar species in ser. *Demissa* and ser. *Tuberosa*: implications for a practical taxonomy of section *Petota*. *American Journal of Botany*. 2000;88(1):113-130.
- Spooner D.M., Rodriguez F., Polgár Z., Ballard H.E., Jansky S.H. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Crop Science*. 2008;48:27-36. DOI: 10.2135/cropsci2007.09.0504tpg
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *The Botanical Review*. 2014;80(4):283-383. DOI: 10.1007/s12229-014-9146-y
- Stupar R.M., Song J., Tek A.L., Cheng Z., Dong F., Jiming J. Highly condensed potato pericentromeric heterochromatin contains rDNA-related tandem repeats. *Genetics*. 2002;162(3):1435-1444.
- Szinay D., Wijnker E., van den Berg R., Visser R.G.F., de Jong H., Bai Y. Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. *New Phytologist*. 2012;195:688-698. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04195.x
- Tang X., de Boer J.M., van Eck H.J., Bachem C., Visser R.G., de Jong H. Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosomes by BAC-FISH technology. *Chromosome Research*. 2009;17(7):899-915. DOI: 10.1007/s10577-009-9077-3
- Tarwacka J., Polkowska-Kowalczyk L., Kolano B., Śliwka J., Wielgat B. Interspecific somatic hybrids *Solanum villosum* (+) *S. tuberosum*, resistant to *Phytophthora infestans*. *Journal of plant physiology*. 2013;170(17):1541-8. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.013
- Yao X., Ge X., Chen J., Li Z. Intra- and intergenomic relationships in interspecific hybrids between *Brassica* (*B. rapa*, *B. napus*) and a wild species *B. maurorum* as revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Euphytica*. 2010;173:113-120. DOI: 10.1007/s10681-010-0131-1
- Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Taciak M., Jones N., Kosmala A., Krajewski P. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Research*. 2008;16(10):575-585. DOI: 10.1007/s10577-008-1198-6