КРЪСТОСВАЕМОСТ НА AEGILOPS TAUSCHII С ВИДОВЕ ОТ РОД TRITICUM, SECALE И AEGILOPS (СЕМ. POACEAE)

Надя Даскалова, Соня Донева, Пенко Спецов

CROSSABILITY OF AEGILOPS TAUSCHII WITH SPECIES FROM THE GENERA TRITICUM, SECALE AND AEGILOPS (POACEAE)

Nadia Daskalova, Sonya Doneva, Penko Spetsov

Abstract: *The wild species Aegilops tauschii, which has been donated the D genome to bread wheat in the course of evolution, possesses high polymorphism for valuable breeding traits. That's why the production of hybrids of this species is very important to transfer useful genes into common wheat. This study aims to underline the possibilities of crossing the species to accessions from related genera in order to obtain hybrids in unregulated polycarbonate greenhouse. The most important results can be summarized as follows:*

1. Aegilops tauschii is a good pollinator in crosses to diploid Triticum monococcum and T. sinskajae, giving rise to seed set of 62.5 - 87.5%, especially when the wild species is a female parent. Hybrid grains are obtained in greenhouse, but they are shriveled in maturity and do not germinate.

2. The crossability is also high in crosses with T. ispahanicum accession 7260 and T. aestivum variety Sadovska ranozreika-4.

3. Production of hybrids with participation of Aegilops tauschii is only possible in polycarbonate greenhouse with controlled surroundings (t=23-25 °C and humidity>60%). Otherwise, the hybrids seeds obtained do not germinate due to injuries of high temperatures during maturity and lack of endosperm.

Keywords: *Aegilops tauschii, crossability, Triticum, Secale, Aegilops, seedset*

Докладът е осъществен с подкрепата на фонд „Научни изследвания" на ШУ „Епископ К. Преславски" – РД-08-278/11.03.2015.

Увод

Основна задача на съвременната селекция е производството на сортове растения с висока продуктивност в съчетание с толерантност към биотичните и абиотични фактори на средата. До настоящия момент, основен селекционен метод в селекцията на хлебната пшеница е междусортовата хибридизация. През последните 15-20 години развитие получава отдалечената (междувидова и междуродова) хибридизация в съчетание с биотехнологичните методи за създаване на форми пшеница и тритикале с повишена устойчивост към биотичен и абиотичен стрес [1, 3, 18]. В редица селекционни програми участва видът *Aegilops tauschii*, който е донор на D генома в хлебната пшеница [5; 10]. Дивият вид е отличен източник на нови гени за устойчивост към различни болестотворни агенти [8, 19]. *Aegilops tauschii* е широко разпространен в района на Каспийско море, на запад до Турция и на изток към Централна Азия и Афганистан, и показва големи приспособителни възможности към разнообразни условия на средата [13]. Характеризира се с морфологично разнообразие и съществени генетични различия между формите, въпреки че е диплоиден. Генетичният му потенциал остава неизползваем на хексаплоидно ниво, от древността до наши дни [12].

Видът се състои от два подвида: *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* и *Ae. tauschii* ssp. *strangullata*. Първият подвид расте в югозападната част на Каспийско море, в Иран и Афганистан, а вторият- в Задкавказието, Армения и Азербайджан [6, 13, 21]. Високата хомология между D генома на *Ae. tauschii* и този на пшеницата позволява на хромозомите им да рекомбинират с висока честота [4]. Трансфер на гени се постига чрез пряка хибридизация [9] или чрез създаване на синтетична пшеница [11,14]. Гени за устойчивост към различни биоагенти, както и редица нови резервни протеини- глутенини и глиадини, са прехвърлени в хлебната и твърдата пшеница чрез кръстосването им с хексаплоидни синтетични пшеници (ХСП) [7, 15].

Основна цел на настоящото изследване е оценяване на кръстосваемостта на различни образци от дивия вид с разнообразни по плоидност и морфология пшеници, две форми ръж и един образец от *Aegilops speltoides*. За успешен резултат се счита получаването и покълването на хибридни зърна за изследване на амфихаплоидни растения в зрялост и по-нататъшното им приложението в селекцията.

Материал и методи

Таблица 1. Видове и образци, използвани в изследването

Видове	Образци, №	Видове	Сортове/образци
Aegilops tauschii	144, 199, 204, 205, 213, 218, 219, 227, 1914, 19089, 26991, 30421, 30423, 30425, 31488	*T. aestivum*	Мизия, Карина, Садовска ранозрейка – 4 (СР-4), Мичиган амбер, Лидер-24
Aegilops speltoides	1 образец	*T. ispahanicum*	7260 9481
Secale cereale	R689, R1027	*T. karamishevi*	$F_1$310, $BC_1$17-4
T. monococcum	45126, БГ	Хибридни форми	
T. sinskajae	TS18397, 18401		
T. dicoccum	45253, 45241		

Материали: Извършени са различен брой кръстоски в две поредни години (2013 г.- 9 бр. и 2014 г. - 20 бр.) при нерегулируеми условия в поликарбонова оранжерия. Използвани са общо 15 образеца от вида *Aegilops tauschii (At)*: № 144, 199, 204, 205, 213, 218, 219, 227, 1914, 19089, 26991, 30421, 30423, 30425 и 31488 (получени от ИРГР-Садово и IPK-Gatersleben, Германия; видове пшеница: диплоидни-еднозърнест лимец, TS 18397, 45126 и 18401, тетраплоидни - № 45241, 45253, 7260 и 9481, хексаплоидни – сортове *T. aestivum* (Садовска ранозрейка=СР-4, М. амбер, Лидер, Мизия и Карина), две хибридни форми пшеница (F_1 310 и $BC_1$17-4), един образец *Aegilops*

speltoides, и два образеца ръж (с произход от ДЗИ-Генерал Тошево, IPK-Германия и ICARDA - Сирия). Майчините и бащини родители са показани в таблици 1, 2 и 3.

Таблица 2. Извършени кръстоски на образци от *Aegilops tauschii* с различноплоидни пшеници през 2013 г.

№ пор.	Майка/ образец	Баща/ образец	ДК	ДО	БОЦ	БПЗ	З(%)
1	199	45126[1*]	11.05	14.05	12	9	75.0
2	219	45126[1*]	11.05	14.05	10	8	80.0
3	205	45253[2*]	30.04	3.05	16	14	87.5
4	19089	45253[2*]	27.04	3.05	14	1	7.1
5	218	ЕЗ лимец – БГ[1*]	4.05	8.05	14	11	78.6
6	218	TS 18397[1♦]	4.05	7.05	32	20	62.5
				Общо	**98**	**63**	**64.3**
7	М. Амбер[3♦]	227	1.05	5.05	32	0	0
8	Лидер-24[3♦]	204	25.04	01.05	38	0	0
9	45241[2*]	144	25.04	01.05	28	0	0
				Общо	**98**	**0**	**0**

ДК, дата на кастриране; ДО-дата на опрашване; БОЦ-брой опрашени цветове; БПЗ-брой получени хибридни зърна; З(%)- завръз в %; № 45126 и ЕЗ (еднозърнест лимец- БГ) са образци *Triticum monococcum*; № 45241 и 45253 – *T. dicoccum*, TS 18397 – *T. sinskajae* (еднозърнест, голозърнест лимец), Мичиган амбер и Лидер-24 – *T. aestivum*; [1]-диплоидна форма; [2]-тетраплоидна форма; [3]-хексаплоидна форма; *-плевеста; ♦-голозърнеста форма.

Методи: Кастрирането и опрашването са извършени по класическия начин възприет в ДЗИ-Генерал Тошево [3].

Кастрирането на класовете е във фаза изкласяване, а опрашването се извършва с узрели тичинки, до 6-я ден след кастриране. Изчислен е процентът на завръза, като резултат от получените зърна, отнесени към броя на опрашените цветове. Извършен е дисперсионен анализ чрез статистическа програма Assistat beta 7.7.

Преди покълнване се оценява състоянието на хибридните зърна: нормално изхранени (Н), леко спаружени (ЛС, когато по зърната се наблюдават вдлъбнати участъци и голяма коремна бразда), спаружени (С, визуално без ендосперм, с или без различим зародиш и

запазена продълговата форма) и силно спаружени (СС, визуално без ендосперм и зародиш, в повечето случаи без обособена форма).

Таблица 3. Хибридни F_1 зърна, получени в оранжерията през втората година

Майка	Баща	ДК-ДО	БОЦ	БПЗ	%ПЗ	ОЗ
At. 144	*Ae. speltoides*[1*]	31.05/5.06	14	4	28.6	СС
At. 218	*Ae. speltoides*[1*]	31.05/3+5.06	10	2	20	СС
At. 227	*Ae. speltoides*[1*]	20.05/23.05	21	8	38.1	СС
At. 227	*T.karamishevi* 9481[2*]	21.05/27.05	18	1	5.6	СС
At. 204	TS 18401[1♦]	07.05/14.05	16	13	81.3	С-СС
At. 30425	TS 18397[1♦]	17.05/22.05	14	10	70.1	ЛС
At. 219	R 689 [1♦]	21.05/24.05	22	9	40.9	СС
At. 213	R 689 [1♦]	21.05/27.05	12	9	75.0	СС
At. 227	R 1027[1♦]	5.06/10.06	16	0	0	
At. 31488	R 1027[1♦]	8.06/10.06	10	0	0	
At. 213	*T.ispahanicum* 7260[2*]	21.05/24.05	12	8	66.7	СС
At. 26991	СР-4[3♦]	07.05/10.05	14	1	7.1	СС
At. 30421	СР-4[3♦]	07.05/10.05	42	15	35.7	СС
		Общо:	**221**	**80**	**36.2**	
Мизия[3♦]	*At.* 144	17.04/26.04	70	1	1.4	С
СР-4[3♦]	*At.* 1914	15.04/19.04	26	3	11.5	С-СС
Карина[3♦]	*At.* 204+205	26.04/2.05	40	0	0	
		Общо:	**136**	**4**	**2.9**	
F_1 310[3♦]	*At.* 204	26.04/2.05	40	1	2.5	СС
F_1 310[3♦]	*At.* 218	30.04/7.05	122	2	2.4	С
BC_1 17-4[3♦]	*At.* 204	26.04/2.05	30	1	3.3	СС
BC_1 17-4[3♦]	*At.* 213	11.04/17.04	42	9	21.4	СС
		Общо:	**234**	**13**	**5.6**	

ДК-ДО: дати на кастриране и опрашване; БОЦ-брой опрашени цветове; БПЗ-брой получени хибридни зърна; %ПЗ- процент завръз; ОЗ-охраненост на зърната (Н-нормални, ЛС-леко спаружени, С-спаружени, СС-силно спаружени); СР-4- Садовска ранозрейка-4; [1]-диплоидна форма; [2]-тетраплоидна форма; [3]-хексаплоидна форма; *-плевеста; ♦-голозърнеста форма.

Резултати и обсъждане

През първата година в кръстоски са включени 8 образеца от дивия вид и шест форми пшеница с различен хромозомен брой. Шест от опрашителите са диплоидни. Когато дивият вид е майка, в класовете има висок завръз (64.3% от 98 опрашени цвята), като процентите на

кръстоски с диплоидни бащини форми са сходни (62.5-80.0%). Получените 63 зрели семена са силно спаружени и нямат кълняемост при лабораторни условия. Когато обаче *Aegilops tauschii* е опрашител, в кастрираните цветове на пшениците не се завързват семена (Табл. 2). Завръзът, когато видът е майчин родител, варира между 1 и 20 новополучени зърна, или от 7.1 до 87.5%. За отбелязване е, че тези стойности са получени с един и същ опрашител, тетраплоидната пшеница №45253. Причините за ниския завръз и нулевата кълняемост през първата година може да са различни, а именно: високи температури (нерегулируема оранжерия за температура и влажност), особено през април, май и юни; включени различни генотипове в кръстоски като майки и опрашители; липса на ендосперм в хибридните зърна (спаружен тип семена).

През 2014 г. са извършени 20 кръстоски с по-голямо видово и плоидно разнообразие (табл. 3). В 13 кръстоски дивият вид е майка, а в 7 - опрашител. Условията в оранжерията са вариабилни, като в обедните часове на месеците май-юни температурите в слънчеви дни надвишават 50 ºC.

Резултатите са подобни на тези от първата година като процентът на получените зърна е по-висок, когато *Ae. tauschii* е майка. Подобно на нас, Sehdal et al. [17] установяват, че в класовете на дивия вид се завързват 50 пъти повече зърна след опрашване с прашец от *T. aestivum* в сравнение с реципрочната комбинация. В група от 5 кръстоски *Aegilops tauschii* x *T. aestivum*, около 35% от опрашените цветове дават зародиши.

Дисперсионният анализ доказва разлики в полза на кръстоските с еднозърнест, голозърнест лимец (TS), следвани от тези с опрашител *T. ispahanicum* и ръжта R 689. Между тях различията не са доказани. Кръстосваемостта на *Ae. tauschii* е най-висока с диплоидните голозърнести форми (Табл. 4).

Таблица 4. Дисперсионен анализ на процент завръз в кръстоски с майка *Ae. tauschii*, извършени през 2014 г.

Кръстоска	Mean	$GD_{5\%}$	F	F-krit
Ae. tauschii x Ae. speltoides	28.9 bcd	21.3	15.5 ** P=0.0001	5.61
Ae. tauschii x T. karamishevi	5.6 d			
Ae. tauschii x TS18401	81.3 a			
Ae. tauschii x TS18397	70.1 a			
Ae. tauschii x R689	57.95 abc			
Ae. tauschii x R1027	0.0 d			
Ae. tauschii x T. ispahanicum	66.7 ab			
Ae. tauschii x CP-4	21.4 cd			

Mean-средна аритметична стойност на завръз в %; GD5%-минимална гранична разлика; F-експериментално; F-krit- критерий на Фишер; **-разликата е доказана за p<0.01

За разлика от 2013 г., завръзът с опрашител дивия вид е нулев само в една кръстоска, което отдаваме на високата полиплоидност и хибридност на част от майките (Табл. 3). При майки с 2n=42 най-висок е завръзът в кръстоска ‘$BC_1$17-4 x *At.*213’ (21.4%), следван от този със Садовска ранозрейка (11.5%). Почти всички хибридни зърна са силно спаружени (CC), с изключение на комбинациите: ‘*At.*30425 x TS18397’, ‘Мизия x *At.*144’, и ‘$F_1$310 x *At.*218’. Причините и резултатите за липсата на кълняемост на добитите F_1 семена са същите, както през предходната година.

У нас е установено, че междувидовата и междуродовата хибридизация при пшеницата зависи от генотипа на родителските форми, а така също от мястото и условията, при които е извършено кръстосването [2]. Използването на отдалечената хибридизация обаче е затруднено от съществуването на редица бариери,

свързани с некръстосваемост на видовете, хибридна стерилност и нежизненоспособност, които силно ограничават ефективността на метода [3,16]. Всички научни изследвания в областта на отдалечената хибридизация се извършват при строго контролирани климатични условия в оранжерия, за разлика от нас. Разработени са различни техники за преодоляване на тези бариери, от които методът на ембриокултурата е с най-голяма приложимост [20]. Sehdal et al. [17] получават средно 6.8% F_1 растения от 100 опрашени цвята в резултат от ембриоспасяване.

Изводи: 1. Най-висок процент завръз се наблюдава когато майка в кръстоските е *Aegilops tauschii* (64.3% за 2013 г. и 36.2% за 2014 г.).

2. Най-висок завръз е отчетен при кръстоски на вида с диплоидни форми (*T. monococcum*, *T. sinskajae*). Той е между 62.5 и 87.5% през 2013 г., а през 2014 г. завръзът със същите опрашители е между 70.1 - 81.3%.

3. На второ място по кръстосваемост се нареждат кръстоски между *Aegilops tauschii* и културната ръж R689. Значителен брой хибридни зърна дава дивият вид с *T. ispahanicum* № 7260 и Садовска ранозрейка-4. Най-ниска е продуктивността в кръстоските, когато обикновената пшеница е майка (първа година - 0%, втора – 2.9%).

4. За получаване на хибридни растения с *Aegilops tauschii* са необходими регулируеми оранжерийни условия, както и необходимост от стерилна среда за извършване на ембриокултура.

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Кържин,** Хр. Проучвания върху ръждите по пшеницата в България и средствата за борба с тях. Добруджански земеделски институт – Генерал Тошево, 2003.
2. **Станков,** И. Междуродова хибридизация на *Triticum sphaerococcum* Perc. с различноплоидни видове на рода *Aegilops* L. Генетика и селекция 2: 96-104, 1989.
3. **Спецов,** П. Автореферат на дисертация за присъждане на научната степен „Доктор на науките”. София, 1998.

4. **Kalia,** B. Mining the *Aegilops tauschii* gene pool: evaluation, introgression and molecular characterization of adult plant resistance to leaf rust and seedling resistance to tan spot in sinthetic hexaploid wheat. AN ABSTRACT OF A DISSERTATION. Kansas State University, Manhattan, 1-131, 2015.
5. **Kihara,** H. Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. Agriculture and Horticulture 19: 889-890, 1944.
6. **Kihara,** H., Yamashita, K., and Tanaka, M. Morphological, physiological, genetical and cytological studies in *Aegilops* and *Triticum* collected from Pakistan, Afghanistan and Iran.In: Yamashita K (ed) Results of the Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush. Kyoto University, Kyoto, pp 1-118, 1965.
7. **Giles,** R.J., Brown T.A. *Glu Dy* allele variations in *Aegilops tauschii* and *Triticum aestivum*: implications for the origin of hexaploid wheats. Theor Appl Genet 112: 1563-1572, 2006.
8. **Gill,** B.S., Raupp, W.J., Sharma, H.C., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L., Moseman,J.G. and Waines, J.G. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and hessian fly. Plant Dis. 70: 553–556, 1986.
9. **Gill,** B.S. and Raupp, W.J. Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. Crop Sci. 27:445-450, 1987.
10. **McFadden,** E.S., Sears E.R. The artificial synthesis of Triticum spelta. Records of the Genetics Society of America 13: 26-27, 1944.
11. **McFadden**, E.S., and Sears, E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* **37**: 81–89,107–116, 1946.
12. **Mizuno,** N., Yamasaki M., Matsuoka Y.,Kawahara T., Takumi S. Population structure of wild wheat D-genome progenitor Aegilops tauschii Coss.: implications for intraspecific lineage diversification and evolution of common wheat. Molecular Ecology 19: 999-1013, 2010.
13. **Ogbonnaya,** F.C., Halloram, G.M. and Lagudah, E.S. D genome of wheat-60 years on from Kihara, Sears and McFadden. In: Tsunewaki K (ed) Frontiers of wheat bioscience, the 100th memorial issue of wheat information service. Kihara Memorial Foundation for the Advancement of Life Sciences, Yokohama, pp 205-220, 2005.

14. **Ogbonnaya,** F.C., Abdalla, O., Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A.G., Xu, S.S., Gosman, N., Lagudah, E.S., Bonnett, D., and Sorrells, M.E. Synthetic hexaploid in wheat improvement. In: Janick, J. (Ed.), Plant Breeding Reviews. 37, first ed. John Wiley & Sons, Inc., pp. 35–122, 2013.
15. **Plamenov,** D., P. Spetsov. Synthetic hexaploid lines are valuable resources for biotic stress resistance in wheat improvement. Journal of Plant Pathology 93 (2): 251-262, 2011.
16. **Saravanan, N.,** S. Ram, V. Thiruvengadam, R. Ravikesavan, T. Raveendran. Production and restoration of an interspecific hybrid between *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium raimondii* U. Cytologia 72(2): 195-203, 2007.
17. **Sehdal,** S.K., Kaur S., Gupta S., Sharma A., Kaur R., Bains N.S. A direct hybridization approach to gene transfer from *Aegilops tauschii* Coss. to *Triticum aestivum* L. Plant Breeding 130: 98-100, 2011.
18. **Singh,** R.P., Hodson D.P., Jin Y., Huerta-Espino J., Kinyua M.G., Wanyera R., Njau P., Ward R.W. CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources,1, No. 054, 2006.
19. **Valkoun,** J., Hammer, K., Kucerova, D. and Bartos, P. Disease resistance in the genus *Aegilops* L- stem rust, leaf rust, stripe rust and powdery mildew. Kulturpflanze 33:133-153, 1985.
20. **Valkoun,** J., J. Dostal, D. Kucerova. *Triticum* x *Aegilops* hybrids through embryo culture. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Wheat Springer. Verlag, Berlin. Ed. Bajaj Y.P.S. 13: 152-162, 1990.
21. **Wang,** J., Luo, M.C., Chen, Z., You, F.M., Wei, Y., Zheng, Y., Dvorak, J. *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat. *New Phytologist* 198: 925–937, 2013.