

**ПОЛУЧАВАНЕ НА МЕЖДУВИДОВИ ХИБРИДИ ПРИ КРЪСТОСВАНЕ
НА ТЪВРДА ПШЕНИЦА С ДИВИЯ ВИД *AEGILOPS CYLINDRICA* (HOST.)**

Боряна Хаджииванова, Виолета Божанова
Институт по памука и твърдата пшеница, 6200 Чирпан
iptp@abv.bg

Резюме

Хаджииванова, Б., В. Божанова, 2010. Получаване на междувидови хибриди при кръстосване на твърда пшеница с дивия вид *Aegilops cylindrica* (Host.), FCS 6(3): 355-360

Получени са междувидови хибриди при кръстосване на твърда пшеница (*Triticum durum* var. *turgidum* L.) с дивия вид *Aegilops cylindrica*. Като майчин родител са използвани сортовете твърда пшеница Виктория, Възход и линията 7121. Изследвана е кръстосваемостта между отделните генотипове твърда пшеница и дивият родител. Установено е ниско ниво на кръстосваемост 9.3 % през трите години на изследването общо за всички генотипове твърда пшеница. Хибридни растения са получени единствено при използване метода на ембриокултурата. Способността на ембрионите за регенерация на растения при *in vitro* условия не зависи от кръстосваемостта на използваните генотипове твърда пшеница. От 63 изолирани хибридни зародиша са регенерирани 2 растения. От тях на втората година са адаптирани две хибридни растения, притежаващи белези характерни и за двете родителски форми. Цитологичният анализ на микроспорите и зрелия прашец от хибридните растения показва нарушения при протичане на мейозиса и наличие на стерилни поленови зърна.

Ключови думи: *Triticum durum* - *Aegilops cylindrica* - Междувидова хибридизация - Кръстосваемост - Метод на ембриоспасяване - Цитологичен анализ

Abstract

Boryana Hadzhiivanova, Violeta Bozhanova, 2010. Interspecific hybridisation between durum wheat and *Aegilops cylindrica* (Host.), FCS 6(3): 355-360

The possibility for obtaining of interspecific hybrids between 3 durum wheat genotypes (*Tr. durum* 2n = AABB) and one accession of *Aegilops cylindrica* (2n = CCDD) has been studied. A low crossability rate of 9.3 % average for all genotypes over three years was achieved. Hybrid plants were obtained only by means of embryo rescue method. The ability for *in vitro* regeneration was still independent of crossability of used durum wheat genotypes. All received F₁ hybrids plants were identical, they exhibited good tillering ability and manifested traits from both parents. The cytological observations of microspores and pollen grains reveal abnormalities in the passing of microsporogenesis and explain the sterility of hybrids plants.

Keywords: Interspecific hybridisation - Durum wheat - *Aegilops cylindrica* - Crossability - Embryo rescue - Meiotic abnormalities

УВОД

Стесняването на границите на генетично вариране, наблюдавано при обикновенната и твърда пшеница в резултат на използваните конвенционални селекционни практики, намалява възможностите за подобряване продуктивността на културите. Отдалечената междувидова хибридизация е метод използван често от редица изследователи за трансфер на чужд генетичен материал от дивите родственици към културните житни видове. (Sharma and Gill, 1983; Mujeeb-Kazi and Kimber, 1985; Mujeeb-kazi, 1993) Широкият формообразователен процес, който се наблюдава в хибридните потомства осигурява възможност за създаване на нови линии и сортове, отличаващи се с ценни стопански и биологични качества. Използването на междувидовата хибридизация обаче е затруднено от съществуването на редица бариери свързани с некръсваемост на видовете, хибридна стерилност и нежизненоспособност, което ограничава ефективността на метода. (Sagavanan *et al.*, 2007). Разработени са различни техники за преодоляване на тези бариери, като методът на ембрио културата се отличава с висока ефективност. (Valkoun *et al.*, 1990).

Широкият ареал на разпространение на видовете от р. *Aegilops*, адаптивността им към различни климатични условия са фактори определящи проявата на ценни от агрономическа гледна точка признаци. Дивите видове са източник на гени за устойчивост към биотични и абиотични стресови фактори на средата, които въведени в генома на твърдата пшеница могат да подобрят устойчивостта и. Според Barashkova (1981) и Limin and Fowler (1981), изследвали студоустойчивостта на видове от р. *Triticum* и *Aegilops*, видовете съдържащи *D*-геном са по-устойчиви от тези с *S*-геном. От тази гледна точка дивия вид *Aegilops cylindrica*, характеризиращ се с геномна конституция (CCDD), може да се превърне в потенциален източник на гени за подобряване студоустойчивостта на твърдата пшеница. Сходни данни характеризиращи *Aegilops cylindrica* като вид устойчив на измръзване докладват (Zaharieva *et al.*, 2003). Доказана е и съществуващата резистентност на *Aegilops cylindrica* към *Hessian fly* (Amri *et al.*, 1992)

Целта на настоящето изследване е да се проучи възможността за получаване на междувидови хибриди между различни генотипове твърда пшеница и дивия вид *Aegilops cylindrica* и да се характеризират получените хибридни потомства по морфологични и цитологични признаци.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Растителният материал използван в това изследване включва сортове и селекционни линии твърда пшеница създадени в ИПТП – Чирпан (посочени в таблица 1), и образец от *Aegilops cylindrica* (любезно предоставен ни от генбанката на ИРГР – Садово). Хибридизацията е осъществена при полски условия през три последователни години 2008-2010. Класовете на твърдата пшеница са кастрирани и покрити с изолатори 3 дни преди цъфтежа. Опрашването е извършено със свеж полен от дивия вид. Броят на завръзките в опрашените класове от твърда пшеница е преброяван 16-20 дни след опрашването.

Класовете с хибридните завръзи са отрязвани на 16 до 20 ден след опрашването. Завръзките са отделяни от класовете, стерилизирани са за 1 мин. в 70 % C_2H_5OH и 20 мин. в 10 % Na -хипохлорид и са промивани трикратно в стерилна дестилирана вода. Изваждането на зародишите се осъществява под бинокулярна лупа при асептични условия. Зародишите са култивирани в петриевы блюда върху модифицирана от нас хранителна среда, съдържаща макро- и микроелементи по MS (Muraschiege and Skoog, 1962), витамини по Chu *et al.*, 1990, глутамин – 200 mg/

I, казеин хидролизат 200 mg/l, kinetin - 0.1 mg/l, IAA – 0,1 mg/l, ABA – 0,1 mg/l на тъмно при 26 ± 2 °C през първите две седмици. Следва прехвърляне на светлина с интензивност 3000 lx и 16-часов фотопериод. Регенерираните растения се прехвърляни в почва след появата на 3-ти лист и са доотглеждани до зрялост във вегетационна къща.

За цитологични изследвания на мейозиса получените хибридни растения с антери в различна фаза от микроспорогенезиса са фиксирани в свеж разтвор на Карнои (95% етанол: ледена оцетна киселина, 3:1) за три часа, и съхранени в 70% етилов спирт при температура 4°C. Микроскопските наблюдения са извършени върху временни ацетокарминови препарати от скваширани тичинки.

Получените F₁ растения са използвани като майчин родител за беккросиране с полен от твърда пшеница.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Три генотипа твърда пшеница, сорт Виктория, сорт Възход и линията 7121 бяха кръстосани с дивия вид *Aegilops cylindrica*. Кръстосваемостта между тях, изразена като процент от опрашените цветчета, образували завръзи и съдържащи зародиши е представена в таблица 1. От общо 679 опрашени цветчета са получени 63 завръза, т.е. средната кръстосваемост от всички хибридни комбинации от три години е 9.3 %. Наблюдавано е вариране по отношение на броя на получените хибридни завръзи при кръстосването на *Aegilops cylindrica* с различните генотипове твърда пшеница. Най-ниска е кръстосваемостта на дивия вид със сорт Виктория – 2.3 %, а най-висока е със сорт Възход от 4.1 % през 2009 година и 15.4 % през 2010 година. Степента на кръстосваемост при хибридизацията на твърдата пшеница с видове от род *Aegilops* е много ниска в сравнение с тази при видовете от род *Triticum*. (Хадживанова и др., 2009). Този факт се обяснява с генетичната отдалеченост на видовете и степента на хомоложност на геномите. Дивият вид *Aegilops cylindrica* е тетраплоиден вид с геномна конституция CD и образуването на хомоложни хромозомни двойки по време на мейозиса с тетраплоидната твърда пшеница с геномна конституция AB е силно нарушено.

Таблица 1. Кръстосваемост на твърда пшеница с дивия вид *Aegilops cylindrica*
Table 1. Crossability of durum wheat with wild species *Aegilops cylindrica*

Кръстоски Cross combination	Опрашени цветчета (бр.) Florets Pollinated (No.)	Получени завръзи (бр.) Seed Set (No.)	Кръстосваемост Crossability (%)
2008			
Виктория (Victoria) × <i>Aegilops cylindrica</i>	88	2	2.3
2009			
Възход (Vazhod) × <i>Aegilops cylindrica</i>	245	10	4.1
2010			
Възход (Vazhod) × <i>Aegilops cylindrica</i>	188	29	15.4
7121 × <i>Aegilops cylindrica</i>	158	22	13.9
Общо за 2010	346	51	14.7
Общо за три години	679	63	9.3

Установиха се и генотипни различия в кръстосваемостта, дължащи се на майчиния родител *Triticum durum*, като процентът на кръстосваемост варира от 2.3 до 15.4 % (табл. 1). Различията в кръстосваемостта, получени при хибридизацията

на сорт Възход с *Aegilops cylindrica* през 2009 и 2010 година, съответно 4.1 % и 15.4 %, най-вероятно се дължат на различните климатични условия характерни за всяка конкретна година и показват важноста на условията на средата за успеха на отдалечената хибридизация.

Бяха получени хибридни растения единствено чрез използване метода на ембриокултурата (табл. 2). От общо 63 изолирани ембриона бяха регенерирани 2 хибридни растения и адаптирани 2. Като цяло процентът на регенерираните растения е нисък – 5.9 %. Слабата диференцираност и малките размери на изолираните ембриони при всички хибридни комбинации рефлектира върху развитието им при *in vitro* условия. Способността на ембрионите за регенерация на растения при *in vitro* условия не зависи от кръстосваемостта на използваните генотипове твърда пшеница. Бяха регенерирани растения единствено от хибридната комбинация със сорт Виктория, показващ най-слаба кръстосваемост с *Aegilops cylindrica*. Успешно бяха адаптирани и двете регенерирани хибридни растения.

Таблица 2. Регенерация на растения след ембриоспасяване от междувидови кръстоски на твърда пшеница с *Aegilops cylindrica*

Table 2. Plants regeneration of interspecific hybrids between durum wheat and *Aegilops cylindrica* after embryo rescue

Хибридна комбинация Hybrid combinations	Заложени зародиши (бр.) Cultivated embryos No.	Регенерирани растения Regenerated plants		Адаптирани растения (бр.) Adapted plants No.
		(бр.) No.	(%)	
Виктория (Victoria) × <i>Aegilops cylindrica</i>	2	2	100	2
Възход (Vazhod) × <i>Aegilops cylindrica</i>	27	-	-	-
7121 × <i>Aegilops cylindrica</i>	5	-	-	-
Общо	34	2	5.9	2

Част от получените F₁ хибридни растения бяха оставени да се самоопрашват, а друга част бяха бекросирани като майчин родител с полен от твърда пшеница. При



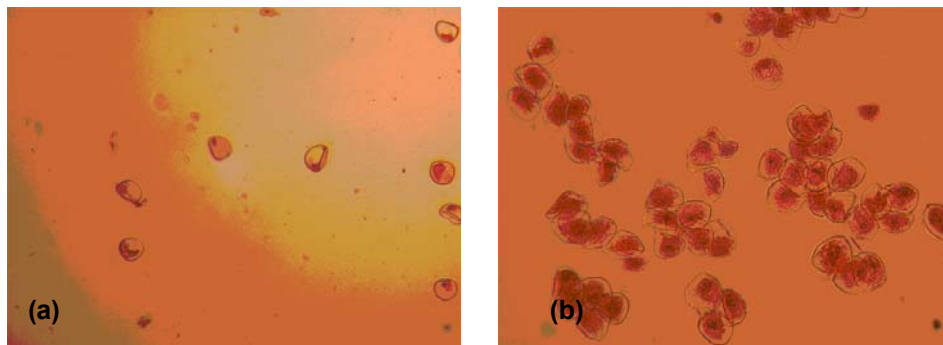
Сн. 1. Класове: F₁ хибрид и *Triticum durum*

Fig.1. Spikes of F₁ hybrid and *Triticum durum*

F₁ хибридите беше установена пълна стерилност – мъжка и женска. Не бяха получени F₂ и BC₁ поколения. Присъствието на гаметоцидален ген в 2С-хромозомата на *Aegilops cylindrica* може да попречи на прехвърлянето на хромозоми от дивия вид към културния посредством женските и мъжки гамети в получените хибридни потомства (Schneider *et al.*, 2007). Хибридното растение образува два типа гамети, такива които носят този ген и такива, в които той липсва. Обикновено функционални са гаметите носещи Gc-фактора. Те индуцират хромозомни разкъсвания, аберации и делеции в гаметите, в които липсва този ген (Endo and Tsunewaki 1975; Endo and Katayama 1978). Образуването на нежизнеспособни гамети с различни типове нарушения, обуславя наблюдаваната пълна стерилност в F₁ хибридното поколение при кръстоската Виктория Ч *Aegilops cylindrica*.

Морфологично всички получени F₁ хибриди бяха

напълно еднакви и проявяваха белези характерни и за двете родителски форми. Формата на хибридно растение, формата на хибридният клас, овласяването на листата и склонността към засилено образуване на братя бяха типични за дивия вид. Дължината и широчината на листата и височината на растението бяха белези междинни като проява на двете родителски форми. Дължината на класа при хибридните растения беше по-голяма от тази на дивия и културния родител (снимка 1).



Сн. 2. Нарушения при формиране на микроспорите при междувидовата кръстоска (*Triticum durum* Ч *Aegilops cylindrica*): (a) - микроспори с малки размери; (b) - микроспори с неправилна форма

Fig. 2. Abnormality of microspores formation at interspecific hybrid (*Triticum durum* Ч *Aegilops cylindrica*): (a) – microspores with small size (b) – microspores with irregular shape

Бяха наблюдавани нарушения при формирането на микроспорите. Те се характеризираха с неправилна форма и размери по-малки от нормалните (снимка 2). При изследването върху зрелият прашец също бяха установени отклонения. Броят на поленовите зърна беше силно редуциран, беше наблюдаван и полен с много малки размери и неправилна форма, с прозрачна протоплазма и не добре диференцирани ядра.

ИЗВОДИ

Проучена е кръстосваемостта между *Aegilops cylindrica* и три генотипа твърда пшеница - сорт Виктория, сорт Възход и линията 7121, и са установени генотипни различия дължащи се на майчиния родител *Triticum durum*.

Получени са междувидови хибриди при кръстосването на сорт Виктория с дивият вид *Aegilops cylindrica* с помощта на ембриоспасяване.

Цитологичните наблюдения върху микроспорите и зрелия прашец показаха наличие на нарушения в протичането на микроспорогенезиса, които обуславят пълната стерилност на получените хибридни растения.

ЛИТЕРАТУРА

- Хадживанова, Б., Божанова, В., Дечев, Д., 2009. Проучване на кръстосваемостта на твърда пшеница с близки и далечни видове от сем. Житни и получаване на междувидови хибриди. В сборник от Международна научна конференция, организирана от съюза на учените, 4-5.06 2009, Стара Загора - под печат
- Amri, A., El Bouhssini, M., Jlibene, M., Cox, T.S. and Hachett, J.H., 1992. Evaluation of *Aegilops* and *Triticum* species for resistance to the Moroccan Hessian Fly (*Diptera* :

- Cecidomyiidae*). *Al Awamia*, 77:109-118.
- Barashkova, E.A., 1981.** Role of the D-genome in increasing the frost resistance of winter wheat. *Referativnyi Zhurnal*, 2: 65-124.
- Chu, C., Hill, R. and Brule-Babel, A., 1990.** High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media, *Plant Sci.*, 66, 252-279
- Endo T.R., Tsunewaki K., 1975.** Sterility of common wheat with *Aegilops triuncialis* cytoplasm. *Journal of Heredity*, 66 13-18.p.
- Endo, T. R. and Y. Katayama, 1978.** Finding of a selectively retained chromosome of *Aegilops caudata* L. in common wheat. *Wheat Inf. Serv.* **47**, **48**:32-35.
- Limin, A.E. and Fowler, D.B., 1981.** Cold hardiness of some wild relatives of hexaploid wheat. *Can. J.Bot.*, 59: 572-573
- Mujeeb-Kazi, A., and G. Kimber, 1985.** The production, cytology and practicality of wide hybrids in the *Triticeae*. *Cereal Res. Commun.* 13:111-124.
- Mujeeb-Kazi, A. 1993.** Interspecific and intergeneric hybridization in the *Triticeae* for wheat improvement. p. 95-102. *In* A.B. Damania (ed.) *Biodiversity and wheat improvement*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Muraschiege, T. and Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497
- Saravanan, N., S. Ram, V. Thiruvengadam, R. Ravikesavan, T. Raveendran., 2007.** Production and Restoration of an Interspecific Hybrid between *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium Raimondii* U. *Cytologia* 72(2): 195-203
- Schneider, A., I. Molnar, M. Molnar-Lang, 2008.** Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, 163:1-19
- Sharma, H.C., and B.S. Gill. 1983.** Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32:17-31.
- Valkoun, J., J. Dostal, D. Kucerova, 1990.** *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
- Zaharieva, M., A. Dimov, P. Stankova, J. David, P. Monneveux, 2003.** Morphological diversity and potential interest for wheat improvement of three *Aegilops* L. species from Bulgaria. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 507-517