

## ХИБРИДНАТА НЕКРОЗА ПРИ МЕЖДУВИДОВАТА ХИБРИДИЗАЦИЯ И ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ПРЕОДОЛЯВАНЕТО ѝ ЧРЕЗ ЕМБРИОКУЛТУРА

Драгомир Пламенов<sup>1</sup>, Иван Белчев<sup>2</sup>, Пенко Спецов<sup>2</sup>

1 – Технически университет – Варна, Факултет по морски науки и екология

2 – Добруджански земеделски институт – гр. Генерал Тошево

### Резюме

Пламенов, Д., И. Белчев, П. Спецов, 2009. Хибридната некроза при междувидовата хибридизация и възможности за преодоляването ѝ чрез ембриокултура.

Хибридната некроза се явява сериозен проблем в междувидовата хибридизация, когато се кръстосват различноплоидни пшеници (4x и 6x), съдържащи В генома, в който са локализирани двата доминантни гена (*Ne1* и *Ne2*). Настоящото изследване регистрира честотата на хибридната некроза в първа хибридна генерация при кръстоски с участието на хексаплоидна (*Triticum aestivum*, 2n=42, AABBDD), тетраплоидни пшеници (*T. durum*, *T. dicoccum*, 2n=28, AABB) и амфиплоидни форми (*T. durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, 2n=42, AABBBA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>). При хибридизация с участието на хлябната пшеница и двузърнестия лимец, е отчетена пълна хибридна некроза в 23% от кръстоските, а частична – в 7%. При комбинации, включващи хлябната и твърдата пшеница, 63% от кръстоските показват хибридна некроза. От 86 до 98% от хибридните растения, получени между амфиплоидните форми и сортове обикновена пшеница, също загиват до фаза цъфтеж. При кръстосване на амфиплоиди с твърда пшеница („Сатурн-1”, „Нептун-2”) получените семена не покълват при комбинацията *T. durum* x амфиплоид (AABBBA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>), а при реципрочната – всички растения загиват. Направен е опит за преодоляване на хибридната некроза в тези кръстоски чрез ембриокултура. Отчетен е успех само в хибридите, при които амфиплоидите (A1 и A2) са майчин родител, като 50% от растенията достигат жътвена зрялост.

**Ключови думи:** Пшеница – Междувидова хибридизация – Хибридна некроза – Ембриокултура

### Abstract

Plamenov, D., I. Belchev, P. Spetsov, 2009. The hybrid necrosis in interspecies hybridization and opportunities to overcome it by embryo culture.

The hybrid necrosis is a serious problem in interspecies hybridization, when we cross different ploidy wheats (4x and 6x), containing B genome. The twice dominant genes (*Ne1* and *Ne2*) are localized in this genome. The present study registered the frequency of the hybrid necrosis in the first hybrid generation in crosses with participation of hexaploid (*Triticum aestivum*, 2n=42, AABBDD), tetraploid wheats (*T. durum*, *T. dicoccum*, 2n=28, AABB) and amphiploid forms (*T. durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, 2n=42, AABBBA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>). We established, that a full hybrid necrosis was observed in 23% and partial

one in 7% of crosses between bread and einkorn wheat. In crosses, involving bread and durum wheat, hybrid necrosis occurred in 63%. Between 86 and 98% of the hybrid plants obtained between the amphiploid lines and common wheat cultivars died due to hybrid necrosis. The amphiploids was crossable to durum wheat parents (“**Saturn-1**”, “**Neptun-2**”) but hybrid seeds did not germinate or if young plants developed they failed to flower. Embryo culture was used in these crosses to overcome the hybrid necrosis. We recorded success only in hybrids, in which the amphiploids (lines A1 and A2) were female parent, where 50% of plants reached maturity.

**Key words:** Wheat – Interspecies hybridization – Hybrid necrosis – Embryo culture

## УВОД

Хибридната некроза причинява преждевременна смърт на листата или на цели растения в  $F_1$  хибриди на пшеницата. Тя може да бъде наблюдавана в хибридни потомства, получени в рамките на обикновената пшеница (*Triticum aestivum* L.,  $2n=6x=42$ , AABBDD), както и между обикновената и тетраплоидната пшеница (*T. turgidum* L.,  $2n=4x=28$ , AABB) (Tsunewaki, 1992). Причинява се от два доминантни комплиментарни гена – *Ne1* и *Ne2*, в случаите когато са във взаимодействие в хибрида (Hermsen, 1963). Кръстосването между *Ne1* и *Ne2* носещи генотипове дава хетерозиготен хибрид, проявяващ некротични симптоми. Генът *Ne1* е локализиран в дългото рамо на хромозома 5B, а *Ne2* – в късото рамо на хромозома 2B (Nishikawa, 1974; Tsunewaki, 1960). По-късно, хромозомната локализация е потвърдена и от молекулярни изследвания (Chu et al., 2006). Степента на хибридната некроза зависи от алелните състояние на двата доминантни гена. За *Ne1* са характерни алелите *w*, *m*, *s*; за *Ne2* – *w*, *wt*, *m*, *ms*, *s* (Hermsen, 1963). Авторът ги разделя на три групи според степента им на експресия – слаби (*Ne1<sup>w</sup>*, *Ne2<sup>w</sup>*), средни (*Ne1<sup>m</sup>*, *Ne2<sup>m</sup>*) и силни алели (*Ne1<sup>s</sup>*, *Ne2<sup>s</sup>*).

Според гените за хибридна некроза, пшениците се разделят на три групи: *Ne1Ne1ne2ne2* (носят ген *Ne1*), *ne1ne1Ne2Ne2* (носят ген *Ne2*) и *ne1ne1ne2ne2* (свободни от доминантните гени). В тетраплоидните пшеници (*T. durum*, *T. dicoccum*) е идентифициран само генът *Ne1*, а в хексаплоидната (*T. aestivum*) – *Ne1* и *Ne2* (Zeven, 1981). Ето защо, хибридната некроза представлява сериозен проблем за селекционно-подобрителната работа с пшеницата, тъй като много от обещаващите генотипове са носители на *Ne1* или *Ne2* ген. Това ограничава изборът на родители и е бариера за прехвърляне на желани признаци при вътревидови (между хексаплоиди) и междувидови кръстоски (хексаплоиди х тетраплоиди) (Dalal et al., 1999). Освен това, хибридна некроза се наблюдава и в хибридни потомства на амфиплоиди (*T. durum* – *Haynaldia villosa* и *Hordeum chilense* – *T. durum*) със сортове хексаплоидна пшеница (Lata & Sethi, 1998). Явлението е констатирано и при  $F_1$  хибриди, получени от кръстосване на хлебна пшеница със синтетични линии пшеница (Chu et al., 2006). Хибридната некроза е основен проблем за прехвърляне на гени между зимна пшеница и тритикале, тъй като получените  $F_1$  хибриди загиват (Bizimungu et al., 1998).

Целта на настоящото изследване е да регистрира честотата на хибридната некроза в първа хибридна генерация при кръстоски с участието на хексаплоидна (*Triticum aestivum*), тетраплоидни пшеници (*T. durum*, *T. dicoccum*) и амфиплоидни форми (*T. durum* х *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*). Направен е и опит за преодоляване на хибридната некроза в част от кръстоските чрез ембриокултура.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използваният в изследването растителен материал включва 26 сорта и линии обикновена зимна пшеница (*T. aestivum*,  $2n=42$ , AABBDD), 3 сорта твърда пшеница (*T. durum*,  $2n=28$ , AABB), 19 образци двузърнест лимец (*T. dicoccum*,  $2n=28$ , AABB) и

две амфиплоидни форми (*T. durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, 2n=42, AABBBA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) (табл. 1). Голяма част от сортовете хлебна пшеница са селекция на ДЗИ – гр. Генерал Тошево, а 5 - с произход Чехия. Два сорта твърда пшеница са селектирани в ДЗИ, а третият – в ИПТП – Чирпан. Използваните образци от *T. dicoccum* са предоставени от колекцията на ICARDA – Сирия, с произход от 12 страни. Амфиплоидните форми са получени с участието на “Нептун-2”(линия А2) и “Сатурн-1”(линия А1) и образец №110 на дивия еднозърнест лимец, колекциониран по Черноморското крайбрежие у нас (Plamenov et al., 2009). В изследването са включени и други два амфиплоида (означени с А3 и А4), в които участва *T. boeoticum*, създадени в ДЗИ-Генерал Тошево.

**Таблица 1.** Списък на растителния материал, включен в кръстоски за изследване на хибридна некроза

**Table 1.** List of the plant material, involved in crosses for hybrid necrosis investigation

Тетраплоидни пшеници Tetraploid wheats		Хексаплоидна пшеница Hexaploid wheat	
Номер/сорт Number/variety	Произход Origin	Сорт/номер Variety/number	Произход Origin
<i>T. dicoccum</i> ( <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccon</i> )		<i>T. aestivum</i>	
44961	Турция	Аглика	ДЗИ-Г. Тошево
45240	Италия	Антица	ДЗИ-Г. Тошево
45351	Иран	Алана	Чехия
45363	Палестина	Власта	Чехия
45364	Швейцария	Енола	ДЗИ-Г. Тошево
45390	Гърция	Златина	ДЗИ-Г. Тошево
45398	Испания	Карат	ДЗИ-Г. Тошево
45403	Италия	Корона	ДЗИ-Г. Тошево
45412	Иран	Кристора	ДЗИ-Г. Тошево
45430	Русия	Лазарка	ДЗИ-Г. Тошево
45432	Швейцария	Мерилин	ДЗИ-Г. Тошево
45433	Германия	Мерито	Чехия
45439	Грузия	Милена	ДЗИ-Г. Тошево
45443	Турция	Олимпиада	ДЗИ-Г. Тошево
45445	Германия	Плиска	ДЗИ-Г. Тошево
88729	Етиопия	Полена	ДЗИ-Г. Тошево
88883	Русия	Пряспа	ДЗИ-Г. Тошево
91686	Етиопия	Саманта	Чехия
99252	Йемен	Свитана	Чехия
<i>T. durum</i> ( <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> )		Славя	
Загорка	ИПТП-Чирпан	Суламит	Чехия
Нептун-2	ДЗИ-Г. Тошево	Тодора	ДЗИ-Г. Тошево
Сатурн-1	ДЗИ-Г. Тошево	Тракия	ДЗИ-Г. Тошево
		Чародейка	ДЗИ-Г. Тошево
		Яница	ДЗИ-Г. Тошево
		Линия № 201	ДЗИ-Г. Тошево

Кръстоските са извършени в нерегулируема стъклена орънжерия през периода 2005-2008 г., като опрашването е с тичинки. Хибридна некроза се отчита в F<sub>1</sub> по скалата на Hermesen (1963), а регистрирането се извършва в две фази (5-6 лист и вретенене-изкласяване) като пълна (всички растения загиват) и частична (отделни растения завързват семена). Хибридните семена, получени с участието на амфиплоидите, се групират на нормално изхранени (Н) и спаружени (С).

Методът на ембриокultura е използван като алтернативен на конвенционалния, с оглед повишаване на ефективността при получаване на жизнеспособни хибридни

растения. За целта са повторени част от кръстоските, в които участват амфиплоидните форми, твърдата и хлебната пшеница. Хибридите семена се отделят средно 16-18 дни след опрашването с цел стерилизация, култивиране на зародишите и получаване на зелени регенеранти (Белчев, 2003).

## РЕЗУЛТАТИ

От общо извършени 44 кръстоски с участието на хлебната пшеница и двузърнестия лимец, при 10 е отчетена пълна хибридна некроза (22.7%) (табл. 2). Симптомите са изоставане в развитието, пожълтяване и постепенно отмиране. По време на първото наблюдение (фаза 5-6 лист) е констатирано загиването на растенията от 5 кръстоски, а при второто (фази вретенене-изкласяване) – от още 5. С частична хибридна некроза са 3 хибрида (№ 614, 623 и 552), т.е. 6.8% от кръстоските. При този тип некроза част от растенията достигат до зрялост и формират семена.

**Таблица 2.** Хибридна некроза на F<sub>1</sub> хибриди от кръстоски с участието на хлебната пшеница и двузърнестия лимец

**Table 2.** Hybrid necrosis in F<sub>1</sub> hybrids of crosses with participation of bread and einkorn wheat

НК NC	Кръстоска Cross	Брой отчетени растения Number registered plants	
		5-6 лист 5-6 leaf	В-И S-E
610	Антица x 99252	5	0
542	Карат x 45240	0	
614	Карат x 88883	3	2
549	Милена x 45240	0	
618	Чародейка x 44961	5	0
623	Суламит x 45363	6	2
631	45363 x Алана	1	0
624	45432 x Мерито	3	0
559	45443 x Тракия	0	
558	45443 x Чародейка	4	0
551	Тракия x 444 F <sub>1</sub> (45240 x Загорка)	0	
552	Тракия x 446 F <sub>1</sub> (45390 x Загорка)	10	6
565	442 F <sub>1</sub> (44961 x Загорка) x Полена	0	

НК – номер на кръстоската (NC – number cross)

В-И – вретенене-изкласяване (spindling-earring)

Кръстоските с участието на хлебната и твърдата пшеница са общо 38, като в тях са включени 19 сорта *T. aestivum* и 2 сорта *T. durum* („Нептун-2” и „Сатурн-1”) (табл. 3). Резултатите показват, че най-често са констатирани кръстоски с пълна хибридна некроза (22 броя или 57.9%). Не е регистрирана хибридна некроза в 14 F<sub>1</sub> хибрида (36.8%). Две от кръстоските (5.3%) проявяват частична хибридна некроза, като от 6 нормално поникнали растения при комбинацията „Карат” x „Нептун-2” до зрялост достигат 2, а при „Славей” x „Сатурн-1” – 4 растения.

В световната научна литература няма данни тетраплоидните пшеници да носят *Ne2* ген, като са констатирани генотипове с *Ne1* ген или без доминантен ген. Следователно от нашите резултати може да бъде направено предположението, че сортовете „Нептун-2” и „Сатурн-1” носят *Ne1* ген за хибридна некроза. Вероятно сортовете хлебна пшеница с *Ne2* ген са „Енола”, „Златина”, „Лазарка”, „Милена”, „Плиска”, „Пряспа”, „Тракия”, „Тодора”, „Саманта”, „Свитана” и линия № 201. Този извод следва от факта, че F<sub>1</sub> хибридите на изброените генотипове хлебна и твърда пшеница проявяват пълна хибридна некроза. Резултатите сочат, че сортовете

„Аглика”, „Корона”, „Кристора”, „Мерилин” и „Олимпиада” вероятно не носят *Ne2* ген или същият е в най-слабото алелно състояние (*Ne2<sup>w</sup>*). Данните за „Антица”, „Карат” и „Славей” не са еднопосочни по отношение на хибридната некроза при включването им в кръстоски с тетраплоидни генотипове (двузърнест лимец и твърда пшеница). Предполагаме, че при трите сорта има силно влияние на разнообразните алелни състояния на *Ne2* гена, от които зависи неговата експресивност във  $F_1$  генерация.

**Таблица 3.** Хибридна некроза в хибридите от първо поколение на кръстоските с участието на хлебна и твърда пшеници

**Table 3.** Hybrid necrosis in the hybrids from first generation of the crosses with participation of bread and durum wheats

НК NC	Кръстоски с пълна хибридна некроза Crosses with full hybrid necrosis	НК NC	Кръстоски с частична хибридна некроза Crosses with partial hybrid necrosis
114	Енола х Нептун-2	121	Карат х Нептун-2
115	Енола х Сатурн-1	148	Славей х Сатурн-1
116	Златина х Нептун-2		
117	Златина х Сатурн-1		
129	Лазарка х Нептун-2		Кръстоски без хибридна некроза Crosses without hybrid necrosis
130	Лазарка х Сатурн-1	110	Аглика х Нептун-2
131	Лидер х Нептун-2	111	Аглика х Сатурн-1
132	Лидер х Сатурн-1	112	Антица х Сатурн-1
136	Милена х Нептун-2	113	Антица х Нептун-2
137	Милена х Сатурн-1	122	Карат х Сатурн-1
140	Плиска х Нептун-2	123	Корона х Нептун-2
141	Плиска х Сатурн-1	124	Корона х Сатурн-1
142	Пряспа х Нептун-2	127	Кристора х Нептун-2
143	Пряспа х Сатурн-1	128	Кристора х Сатурн-1
144	Сатурн-1 х Плиска	134	Мерилин х Нептун-2
146	Сатурн-1 х Тракия	135	Мерилин х Сатурн-1
149	Тодора х Сатурн-1	138	Олимпиада х Нептун-2
150	Тодора х Нептун-2	139	Олимпиада х Сатурн-1
151	Саманта х Нептун-2	147	Славей х Нептун-2
152	Саманта х Сатурн-1		
153	Свитана х Нептун-2		
154	Свитана х Сатурн-1		

НК – номер на кръстоската (NC – number cross)

Хибридната некроза е изследвана и при кръстоски с участието на пшеници (4х и 6х) и амфиплоидни форми (*T. durum* х *T. monosocum* ssp. *aegilopoides*, обозначени с А1 и А2) (табл. 4). Способността на амфиплоидите да продуцират хибридни растения в кръстоски с двата вида пшеници е сравнена с други по-рано получени и използвани амфиплоиди (*T. polonicum* х *T. boeoticum* и *T. boeoticum* х *T. dicocum* Kharli III, означени съответно А3 и А4). През две експериментални години са извършени 21 кръстоски с амфиплоидите А1 и А2 (11 през 2005 и 10 – 2006 г.). Използвани са 6 сорта хлебна („Кристора”, „Мерилин”, „Свилена”, „Аглика”, „Пряспа” и „Милена”) и 2 сорта твърда пшеница („Нептун-2” и „Сатурн-1”). В 3 кръстоски с А3 са включени сортовете обикновена пшеница „Русалка”, „Аглика” и линия № 373-4, а с А4 – „Тракия”. Хибридните семена, получени от комбинацията твърда пшеница х амфиплоидни форми А1 и А2 не покълват, а при реципрочната – всички растения загиват. Прави впечатление, че всички кръстоски, в които участват посочените амфиплоиди и сортове *T. durum* продуцират спаружени семена.

**Таблица 4.** Хибридна некроза при кръстоски с участието на хлябната и твърдата пшеници и амфиплоидни форми А1 и А2 (*T. durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*)  
**Table 4.** Hybrid necrosis in crosses with participation of bread and durum wheat and amphiploid lines A1 and A2 (*T. durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*)

Кръстоска Cross	Получени семена (брой) Received seeds (n)	Охране- ност на семената Seed plumpness	Покълнали семена (брой) Germinated seeds (n)	Отчетени растения във фаза 5-6 лист (брой) Plants in 5-6 leaf stage (n)	Достигнали до зрялост растения (брой) Matured plants (n)
<b>2005</b>					
Кристора x A1	22	H	14	0	0
Мерилин x(A1+A2)	21	H	19	10	0
Свилена x A2	16	H	16	4	0
Свилена x (A1+A2)	36	H	16	0	0
A2 x Аглика	8	H	7	7	1
A2 x Кристора	11	H	5	0	0
A1 x Кристора	29	H	8	2	1
A1 x Пряспа	39	H	16	0	0
A2 x Нептун-2	17	C	17	14	0
Сатурн-1 x A1	20	C	0		
Сатурн-1 x A2	9	C	0		
373-4 x A3	29	H	11	11	11
Русалка x A3	3	C	3	3	0
<b>2006</b>					
Кристора x A1	55	H	50	2	2
Мерилин x A1	45	H+C	37	0	0
Милена x A1	24	H	20	1	0
Пряспа x A1	59	H	53	0	0
Свилена x A1	8	H	3	0	0
A2 x Кристора	18	C	18	7	7
A2 x Мерилин	19	H+C	17	0	0
A2 x Пряспа	14	H+C	11	3	0
Нептун-2 x A1	74	C	0		
Сатурн-1 x A1	45	C	0		
Аглика x A3	21	C	14	14	14
Тракия x A4	8	H	7	7	6

Нормално охранени са семената на хибридите, получени от кръстоски (прави и реципрочни) на сортове обикновена зимна пшеница и амфиплоидните форми А1 и А2, като от тази комбинация са получени общо 424 семена. Във фаза 5-6 лист са отчетени общо 36 хибридни растения (8.5%) през двете експериментални години. От тях до зрялост достигат 11 F<sub>1</sub> растения, т.е. 2.6% от получените хибридни семена. Хибридните растения са продуцирани от 4 кръстоски (A2 x „Аглика” – 1 бр., A1 x „Кристора” – 1, „Кристора” x A1 – 2 и A2 x „Кристора” – 7 растения). За сравнение, от получените общо 61 семена от кръстоските с участието на амфиплоидите А3 и А4, до зрялост достигат 31 хибриди (50.8%). Следователно, хибридната некроза се явява сериозен проблем при получаване на хибридни растения между амфиплоидните форми А1 и А2 и обикновената пшеница, като 86 до 98% от тях загиват до фаза цъфтеж. Получените данни потвърждават по-горе изложеното ни предположение, че сортовете „Нептун-2” и „Сатурн-1” вероятно носят *Ne1*, а „Аглика” и „Кристора” – най-слабото алелно състояние на *Ne2* гена (*Ne2<sup>m</sup>*), позволяващо отделни хибридни растения да достигнат до зрялост.

Методът на ембриокултура е използван с оглед преодоляване на високия процент хибридна некроза в кръстоски с участието на пшеници (4x и 6x) и амфиплоидните форми А1 и А2 (табл. 5). Всички хибридни семена от комбинацията „Нептун-2” („Сатурн-1”) x А1 (А2) са с неразвити зародиши, поради което не е възможно същите да бъдат култивирани с оглед на покълнване и развитие на растения. Следователно, в това направление методът не дава положителен резултат. Успех е отчетен по отношение на кръстоските, в които А1 и А2 са майчин родител, а бащин – твърдата пшеница. При комбинацията А1 x „Сатурн-1” достигналите до зрялост хибридни растения са 8, т.е. 33.3% от получените F<sub>1</sub> семена, а при А2 x „Нептун-2” – 15 (65.2%). Следователно около 50% от продуцираните хибриди от кръстоските амфиплоид x твърда пшеница достигат до жътвена зрялост. За сравнение, всички хибридни растения от тази комбинация загинаха във фаза 5-6 лист, когато методиката не включваше ембриокултурата (табл. 4). Чрез този биотехнологичен метод до зрялост са отгледани 24 F<sub>1</sub> хибриди от кръстоската „Кристора” x „Сатурн-1” и 12 – от „Нептун-2” x „Аглика”, без да са регистрирани зърна с неразвит зародиш. Това потвърждава извода от конвенционалния метод, че вероятно „Аглика” и „Кристора” са носители на най-слабото алелно състояние на Ne2 гена или дори нямат този доминантен ген.

**Таблица 5.** Приложение на ембриокултура за преодоляване на хибридна некроза при междувидова хибридизация  
**Table 5.** Applying of embryo culture to overcome hybrid necrosis in interspecies hybridization

Кръстоска Cross	Получени семена (брой) Received seeds (n)	Семена с неразвит зародиш (брой) Seeds with undeveloped embryo (n)	Култивирани зародиши (брой) Cultivated embryos (n)	Покълнали зародиши (брой) Germinated embryos (n)	Отгледани растения (брой) Grown plants (n)
Кристора x Сатурн-1	30	-	26	24	24
Нептун-2 x Аглика	18	-	18	12	12
Сатурн-1 x Нептун-2	28	-	28	27	24
Сатурн-1 x А1	21	21	-	-	-
Сатурн-1 x А2	26	26	-	-	-
Нептун-2 x А2	31	31	-	-	-
Нептун-2 x А1	34	34	-	-	-
Кристора x А1	22	18	4	2	-
Кристора x А2	40	5	35	25	3
А1 x Сатурн-1	24	13	11	8	8
А2 x Нептун-2	23	1	22	20	15

## ОБСЪЖДАНЕ

Регистрираните в това проучване проблеми с получаването на хибридни растения от кръстоски между двузърнестия лимец и обикновената зимна пшеница намират потвърждение в редица изследвания (Gregory et al., 1980; Tomar et al., 1991). Pukhalskiy & Bilinskaaya (1999) анализират хибридна некроза при този вид плевеста пшеница и установяват, че 83% от генотиповете не носят доминантен ген, а останалата част притежават Ne1 ген. Не е констатиран образец с Ne2 ген, въпреки че локализацията му е в В генома. Това потвърждава резултатите и от по-рано проведени изследвания, сочещи липсата на този ген в тетраплоидните пшеници (Nishikawa, 1967; Zeven, 1981). В предходно наше проучване (Спецов и др., 2006) е установено, че сортовете хлебна пшеница с предполагаем Ne2 ген са „Свилена”, „Тракия” и „Чародейка”, тъй като

F<sub>1</sub> хибридите им с двузърнестия лимец са поразени от хибридна некроза. В настоящото изследване сорт „Свилена” не е включен, а хибридите на другите два сорта с *T. dicoccum* също загиват от некроза. За сорт „Чародейка” е доказано, че носи *Ne2* ген (Желев и Дечев, 1985).

Значителна част от изследваните сортове твърда пшеница носят в своя генотип *Ne1* ген и само малка част са свободни от доминантния ген за хибридна некроза (Nishikawa, 1967; Sharma et al., 2003). Пухальский и др. (2002) установяват, че от изпитвани 99 сорта *T. durum*, 88.9% са носители на *Ne1* ген. Нашите резултати сочат, че „Нептун-2” и „Сатурн-1” вероятно носят *Ne1* ген. Според дългогодишните наблюдения на Пухальский и др. (2002), всички сортове твърда пшеница носят най-силният алел на доминантния ген (*Ne1<sup>s</sup>*). По отношение на обикновената зимна пшеница, към гореизброените сортове с предполагаем генотип *ne1Ne2* можем да прибавим „Енола”, „Златина”, „Лазарка”, „Милена”, „Плиска”, „Пряспа”, „Тракия”, „Тодора”, „Саманта”, „Свитана” и линия № 201. Всички хибридни растения, получени от кръстосването на изброените сортове и двата генотипа твърда пшеница загиват поради хибридна некроза. Това е 6-7 степен по скалата на Hermsen (1963), когато растенията загиват до фаза братене (по Цветков, 1981). По литературни данни (Желев и Дечев, 1985), сорт „Плиска” е носител на *Ne2* ген. Tsunewaki & Nakai (1976) изследват 27 сорта обикновена зимна пшеница от България и установяват, че само един от тях носи *Ne1* ген. По-късно, Желев и Дечев (1985) констатира, че 10 български сорта са носители на *Ne2* ген, а 3 нямат нито един от доминантните гени. Получените в настоящото изследване резултати кореспондират с констатациите на Pukhalskiy et al. (2000), че се наблюдава повсеместно изчезване на ген *Ne1* при съвременните сортове хлебна пшеница. В друго проучване на същия автор (Pukhalskiy, 1997) се съобщава, че в последните години в Русия не е бил установен сорт с генотип *Ne1ne2*. Този факт се обяснява със значителното влияние на селекционния процес и условията на околната среда върху честотата на гените за хибридна некроза (Пухальский и др., 2002). Известно е, че генът *Ne2*, локализиран в хромозома 2BS, е тясно свързан с ген *Lr13* (обуславя възрастова устойчивост към кафява ръжда), а той от своя страна с *Lr23*. Освен тях, няколко други гени за устойчивост към кафява и черна ръжда също са локализирани в 2BS (*Lr16*, *Lr35*, *Sr40*, *Sr23*, *Sr32*, *Sr39*, *Sr36*, *Sr19*) (McIntosh et al., 1995). Генът *Ne1* е локализиран в хромозома 5BL. В тази хромозома се намират гени за устойчивост към жълта (*Yr3*) и кафява (*Lr18*) ръжди. Няма данни за връзката между тези гени и *Ne1* (McIntosh et al., 1995).

В настоящото изследване при комбинацията A2 x „Нептун-2” са регистрирани 14 растения във фаза 5-6 лист, които обаче не достигнаха до цъфтеж. Подобен пример е описан от The & Baker (1975) при опит за прехвърляне на някои признаци от *T. molossicum* в хлебната пшеница, като получените хибриди загиват в млада или възрастова фаза (преди цъфтеж). При реципрочните кръстоски (твърда пшеница x A1 или A2) са получени спаружени семена, които нямат кълняемост. Следователно, нашите резултати показват, че прехвърляне на генетична информация от амфиплоидни форми (AABBA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) към „Нептун-2” и „Сатурн-1” не може да бъде извършено поради или нежизнеспособност на получените семена или отмиране на младите растения от хибридна некроза. При кръстоските между сортове хлебна пшеница и A1 (A2), до зрелост достигат отделни растения. Те произлизат само от комбинации, в които участват „Аглика” и „Кристора”. Различният брой на достигналите до зрелост хибриди през двете години (2005 – 2, 2006 – 9) може да бъде обяснен с влияние на условията на годината и генотипа. Данните ни се потвърждават и от резултатите на Kochumadhavan et al. (1980) и Singh et al. (2000), които наблюдават подобно вариране в степента на хибридна некроза, като авторите изтъкват, че това се дължи на взаимодействието между условията на средата и алелните състояния на гените *Ne1* и *Ne2*. Положителните резултати от приложението на ембриокултурата при кръстоските с A1 и A2 намират потвърждение в изследването



на Chen et al. (1989), които прилагат тъканна култура за преодоляване на хибридната некроза при кръстоски на *T. aestivum* и *T. durum*.

### ИЗВОДИ

При хибридизация с участието на хлебната пшеница и двузърнестия лимец, е отчетена пълна хибридна некроза в 23% от кръстоските, а частична - в 7%.

При комбинации, включващи хлебната и твърдата пшеница, 63% от кръстоските показват хибридна некроза.

От 86 до 98% от хибридни растения, получени между амфиплоидните форми (A1 и A2) и обикновената пшеница, също загиват до фаза цъфтеж.

При кръстосване на амфиплоиди (A1 и A2) с твърдата пшеница („Сатурн-1”, „Нептун-2”) получените семена не покълват при комбинацията *T. durum* x амфиплоид (AABVVA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>), а при реципрочната – всички растения загиват.

Направен е опит за преодоляване на хибридната некроза в тези кръстоски чрез ембриокултура. Отчетен е успех само в хибридните, при които амфиплоидите са майчин родител, като 50% от растенията достигат жътвена зрялост.

### ЛИТЕРАТУРА

- Белчев, И., 2003.** Изследвания върху антерна култура от зимна обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.) и приложение на дихаплоидните линии в селекцията. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”, 193 с.
- Желев, Ж.Г. и Д.И. Дечев, 1985.** Гени за хибридна некроза в някои нови сортове мека и твърда пшеница. Генетика и селекция 18: 417-420.
- Пухальский, В.А., С.П. Мартынов и Т.В. Добротворская, 2002.** Гени гибридного некроза пшениц. Москва, Издательство МСХА, с. 316.
- Спецов, П., Д. Пламенов и И. Белчев, 2006.** Приложение на *Triticum turgidum* ssp. *dicosson* в селекцията на зимната пшеница. I. Кръстосваемост и получаване на хибриди. Field Crops Studies, vol. III – 3: 327-333.
- Цветков, С.М., 1981.** Генетическое изучение гибридного некроза в связи с селекцией Triticale (2n=6x=42). Генетика 10: 1850-1855.
- Bizimungu B, J. Collin, A. Comeau and C.A. St-Pierre, 1998.** Hybrid necrosis as a barrier to gene transfer in hexaploid winter wheat x triticale crosses. Can J Plant Sci 78: 239-244.
- Chen, Z., D.A. Evans and A. Vasconcelos, 1989.** Use of tissue culture to bypass wheat hybrid necrosis. Theor Appl Genet 78: 57-60.
- Chu, C.-G., J.D. Faris, T.L. Friesen and S.S. Xu, 2006.** Molecular mapping of hybrid necrosis genes *Ne1* and *Ne2* in hexaploid wheat using microsatellite markers. Theor Appl Genet: 1374-1381.
- Dalal, M., K.V.S.V. Lakshmi, R.K.-Chopra and S. Bharti, 1999.** Ear culture as a technique to overcome hybrid necrosis in wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 151-154.
- Gregory, R.S., 1980.** Hybrid necrosis as a problem in handling hexaploid x tetraploid wheat crosses. The Journal of Agricultural Science 94: 377-382.
- Hermesen, J.G.Th., 1963.** Hybrid necrosis as a problem for the wheat breeder. Euphytica 12: 1-16.
- Kochumadhavan, M., S.M.S. Tomar and P.N.N. Nambisan, 1980.** Investigations on hybrid necrosis in wheat. Indian J. Genet. 44: 496-502.
- Lata, S. and G.S. Sethi, 1998.** Expression of necrosis in the hybrids of amphiploids *Triticum durum* – *Haynaldia villosa* and *Hordeum chilense* – *Triticum durum* with some bread wheat cultivars. Indian J. Genet. 58: 279-283.
- McIntosh, R.A., C.R. Wellings and R.F. Park, 1995.** Wheat rusts: atlas of resistance

- genes. CSIRO Australia, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Nishikawa, K., 1967.** Identification and distribution of necrosis and chlorosis genes in tetraploid wheat. *Seiken Ziho* 19: 37-42.
- Nishikawa, K., 1974.** Mapping of necrosis genes *Ne1* and *Ne2*. *EWAC Newsl* 4:73-74.
- Plamenov, D, I. Belchev and P. Spetsov, 2009.** Anther culture response of *Triticum durum* x *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* amphiploid. *Cereal Research Communications* 37: 255-259.
- Pukhalskiy, V.A., 1997.** Analysis of necrotic genotypes in *Triticum aestivum* L. cultivars produced in the former USSR republics. *Annual Wheat Newsletter* 43: 202-204.
- Pukhalskiy, V.A. and E.N. Bilinskaya, 1999.** The distribution of hybrid necrosis genes in *T. turgidum* subsp. *dicoccum* genotypes. *Annual Wheat Newsletter* 45.
- Pukhalskiy, V.A., S.P. Martynov and T.V. Dobrotvorskaya, 2000.** Analysis of geographical and breeding-related distribution of hybrid necrosis genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 114: 233-240.
- Sharma, D.J., D.K. Sharma and J.L. Chandrawanshi, 2003.** Necrosis in wheat hybrids in Chhattisgarh. *International journal of tropical agriculture* 21: 69-71.
- Singh, S, H.K. Chaudhary and G.S. Sethi, 2000.** Distribution and allelic expressivity of genes for hybrid necrosis in some elite winter and spring wheat ecotypes. *Euphytica* 112: 95-100.
- The, T.T. and E. P. Baker, 1975.** Basic studies relating to the transference of genetic characters from *Triticum monococcum* L. to hexaploid wheat. *Aust. J. Biol. Sci.* 28: 189-199.
- Tomar, S.M.S., M. Kochumadhavan and P.N.N. Nambisan, 1991.** Hybrid weakness in *Triticum dicoccum* Schubl. *Wheat Inf Serv* 72:9-11.
- Tsunewaki, K., 1960.** Monosomic and conventional gene analysis in common wheat. III. Lethality. *Japan. J. Genet.* 35: 71-75.
- Tsunewaki, K. and Y. Nakai, 1976.** Necrosis genes in common wheat varieties from the South Europe. *Wheat Inf Serv* 41-42: 59-65.
- Tsunewaki, K., 1992.** Aneuploid analysis of hybrid necrosis and hybrid chlorosis in tetraploid wheats using the D-genome chromosome substitution lines of durum wheat. *Genome* 35: 594-601.
- Zeven, A.C., 1981.** Eight supplementary list of wheat varieties classified according to their genotype for hybrid necrosis. *Euphytica* 30: 512-539.