

УДК 581:633

## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ МЕЖДУ *TRITICUM TIMOPHEEVII* ZHUK. И *T. DURUM* DESF.

© 2015 г. Е. В. Твердохлеб

*Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева  
Национальной академии аграрных наук Украины  
(Харьков, Украина)*

Цитоплазма *Triticum timopheevii* не оказывает отрицательного влияния на частоту и степень появления трансгрессий по количественным признакам растения. Однако для получения трансгрессивных форм твёрдой пшеницы с высокой озёрнёностью целесообразно использовать цитоплазму *T. durum*. В гибридных поколениях F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> количество фертильных растений возрастает в результате элиминации нестабильных генотипов. Стабилизация генома ведёт к появлению трансгрессивных растений по показателю количество зёрен в колосе в поколении F<sub>5</sub> с частотой от 20,4% до 22,5% в зависимости от цитоплазмы. Провели сравнение продуктов амплификации, для валидации маркеров *Xbarc61* и *Xbarc207* к гену *Rf3*. Амплифицированные продукты в наших исследованиях отличались от литературных данных. Обнаружен ген восстановления фертильности у двух семей – TV 234-2-1 и TV 235-3-9 на цитоплазме *T. durum* и одной TV 237-1-4 – на цитоплазме *T. timopheevii*. У семей с идентифицированными генами *Rf3* размер продуктов амплификации соответственно – 162 п.н., 160 п.н., 162 п.н.

**Ключевые слова:** *Triticum timopheevii*, *Triticum durum*, гены восстановления фертильности, молекулярные маркеры, частота и степень трансгрессии

Вид *Triticum timopheevii* (Zhuk.) в большинстве случаев используют для интрогрессии генов устойчивости к основным грибным болезням, а также высокого содержания белка в зерне. Так, при участии этого вида создан ряд сортов мягкой и твёрдой пшеницы (Рабинович, 1972, Дорофеев, и др. 1987). В 60-80-х годах XX ст. *T. timopheevii* широко использовалась как наилучший из всех испытанных видов источник цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и генов восстановления фертильности при создании гибридной пшеницы (Wilson, Ross, 1961). Работы велись преимущественно на мягкой пшенице как основной хлебной культуре. В середине 80-х годов они были свернуты практически повсеместно. В настоящее время проблема гибридной пшеницы вновь стала актуальной, хотя решается большей частью с использованием гаметоцидов. Тем не менее, признается ряд недостатков этого метода и преимуществ использования ЦМС

(<http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0c.htm>).

Скрещивание *T. timopheevii* с *T. durum* не вызывает особых затруднений (Козловская, Григорьева, 1984, Твердохлеб, 2009), но гибридизация этих видов пшеницы не получила широкого использования. Прежде всего, это связано со стерильностью гибридов F<sub>1</sub> при интрогрессивной селекции твёрдой пшеницы с использованием *T. timopheevii* (Твердохлеб, 2011). Она обусловлена несбалансированностью геномов гамет вследствие низкого уровня гомологии геномов родительских видов. Получение потомства возможно, как правило, путем беккроссов, в поколениях которых фертильность возрастает. Частичная стерильность растений на цитоплазме *T. timopheevii* уже в меньшей мере определяется несбалансированностью хромосомных наборов и в большей степени наличием факторов ЦМС в цитоплазме и наличием/отсутствием генов восстановления фертильности. Проявление ЦМС у аллоплазматических форм связано с тем, что ядерные геномы *ВА* и *ВАД* видов подрода *Triticum*, как правило, не совместимы с плазмомом видов группы Тимофееви. Генетика ЦМС и восстановления

Адрес для корреспонденции: Твердохлеб Елена Владимировна, Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины, Московский пр., 142, Харьков, 61128, Украина; e-mail: etverd@meta.ua

## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ

**Таблица 1. Известные гены восстановления фертильности**

Ген	Хромосомная локализация	Литературный источник
<i>Rf1</i>	1A	Du et al., 1991
<i>Rf2</i>	7D	Bahl et al, 1984
<i>Rf3</i>	1B	Tahir, Tsunewaki, 1969; Zhou et al., 2005
<i>Rf4</i>	6B	Maan et al., 1984
<i>Rf5</i>	6D	
<i>Rf6</i>	5D	Bahl, Maan, 1973
<i>Rf7</i>	7B	
<i>Rf8</i>	2D	Sinha et al, 2013

фертильности у пшеницы изучена для типа ЦМС на цитоплазме *T. timopheevii*. Схема генетического контроля признака ЦМС у мягкой пшеницы с данным типом цитоплазмы предложена в США в 1964 г. (Livers, 1964). На сегодняшний день известно восемь *Rf* генов восстановления фертильности, и определена их хромосомная локализация (табл. 1).

Мы в своей работе стремились создать фертильные формы типа твердой пшеницы с интрогрессией генов *T. timopheevii* на цитоплазмах обоих родительских видов.

В связи с этим, целью данного этапа исследований было установить закономерности становления фертильности у гибридов между *T. timopheevii* и *T. durum* Desf. сорта Спадщина.

### МЕТОДИКА

Почвенно-климатические условия места проведения исследований являются типичными для восточной части Лесостепи Украины. Годы проведения исследований (2007-2010) по ходу метеорологических факторов в течение вегетационного периода значительно отличались как друг от друга, так и от средних многолетних данных. Это создало необходимые условия для изучения проявления, изменчивости и наследования признаков в условиях типичных для восточной части Лесостепи Украины.

Материалом для исследований был представитель подрода *Boeoticum* из коллекции Национального банка генетических ресурсов растений Украины: *T. timopheevii* (UA0300107, Грузия) – геномная формула  $A^bA^bGG$ ,  $2n = 28$ ; представитель подрода *Triticum*: *T. durum* ( $A^uA^uBB$ ,  $2n = 28$ ) сорт Спадщина (UA0201075), предоставленный оригинатором – лабораторией селекции яровой пшеницы Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины.

Статистический анализ данных проводили классическими методами (Атраментова, Утевська, 2007). Расчёты проводились с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel. Существенность различий между средними показателями проявления признаков колоса растений  $F_2$ – $F_5$  оценивали по критерию Стьюдента –  $t$  с учётом независимых групп с неравными дисперсиями. Для сравнения классов растений в зависимости от их фертильности рассчитывали  $F$ -критерий для независимых групп и неравномерных комплексов. Анализировали все растения поколения  $F_2$ – $F_5$  простых гибридов. Индивидуальный анализ проводили по общепринятой методике. Измерения проводили после достижения растениями фазы полной спелости. В каждом поколении выявляли растения, превышающие лучшую из родительских форм по длине колоса, количеству колосков в колосе, количеству зёрен в колосе. Для оценки трансгрессий по каждому признаку определяли частоту трансгрессивных растений в каждом поколении и степень превышения лучшего из родителей, применяя формулы Г.С. Воскресенской и В.И. Шпота (Воскресенская, Шпот, 1967).

У гибридов в качестве наследственного фактора, обуславливающего фертильность, определяли наличие гена восстановления фертильности *Rf3* с использованием ДНК-маркеров. Выбор этого гена обусловлен тем, что он локализован в субгеноме *B*, присутствующем как у мягкой пшеницы (где он впервые выявлен (Tahir, Tsunewaki 1969)), так и у твердой пшеницы. Следовательно, не исключено наличие этого гена и у вида *T. durum*. Кроме того, маркеры для идентификации гена *Rf3* отработаны несколькими авторами с использованием значительного количества растительного материала.

ДНК выделяли из смеси муки пяти семян набором реагентов для выделения ДНК из биологического материала DiatomDNA Prep100 (Неоген). Наличие *Rf3* гена изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 5 мкл ДНК и 1 мкМ каждого праймера. Праймеры к локусам *Xbarc61* и *Xbarc207* были подобраны на электронном ресурсе: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>. Для амплификации использовали следующую программу: 95°C 5 мин., 1 цикл, с

последующими 40 циклами: 94°C 1 мин, Tm (57°C – *Xbarc61*, 67°C – *Xbarc207*) 30 с, 72°C 1 мин, 72°C 5 мин, 1 цикл.

Для валидации маркеров к гену восстановления фертильности *Rf3* использовали семена пшеницы мягкой сортов Minister и Primeri, предоставленные National Plant Germplasm System (NPGS) (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>).

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле в боратном буфере с низкой ионной силой, для мониторинга ДНК в ультрафиолете использовали бромистый этидий (на 300 мл 2 % агарозного геля – 20 мкл). Электрофорез проводили в горизонтальном приборе Hoefer SuperSub100 (Brody et al., 2004). В качестве маркеров молекулярной массы использовали DNA ladders 50 bp (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.н.). Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Nikon D50. Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли демоверсию программы TotalLab 120 (<http://www.totallab.com>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате реципрокных скрещиваний *T. durum* сорта Спадщина с *T. timopheevii* были получены гибридные зерновки, из которых выращены растения F<sub>1</sub>. Морфология и степень доминирования признаков у растений F<sub>1</sub> описана ранее (Твердохліб, 2011). В комбинации *T. timopheevii* × *T. durum* было получено 42 зерна, а в обратном скрещивании (*T. durum* × *T. timopheevii*) – 29 зёрен. В 2008 г. зерновки были высажены для получения потомства. По окончании вегетационного сезона было получено всего по одному фертильному растению из прямой и обратной комбинаций, которые самоопылялись. Фертильные растения F<sub>2</sub> имели существенные различия по морфологическим признакам. Растение на цитоплазме *T. timopheevii* имело три светлых остистых без опушения колоса, количество колосков от 18 до 19 шт., зёрен соответственно 15, 12 и 7 шт., длина колоса от 6,5 до 8,5 см. Растение на цитоплазме *T. durum* было остистым с неопушённым колосом тёмного цвета с 16 зёрнами. Мы полагаем, что фертильные растения имеют гены восстановления фертильности, унаследованные от *T. timopheevii*.

В последующих поколениях F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> были высеяны и проанализированы все растения. Растения на цитоплазме *T. timopheevii* в поколениях F<sub>2</sub>-F<sub>5</sub> по длине колоса превышали роди-

тельские формы, а по количеству колосков в колосе и озернённости колоса, напротив, средние показатели уменьшались (табл. 2). Тем не менее, в поколениях F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> встречались растения, которые значительно превышали лучшую родительскую форму. Растения на цитоплазме *T. durum* по изученным показателям в целом не превышали родительский сорт Спадщина. Однако отдельные растения значительно превосходили его. Нам не удалось обнаружить существенных различий в скорости восстановления фертильности растений в ряду поколений реципрокных гибридов между *T. durum* и *T. timopheevii*. Для повышения фертильности растения межвидовых гибридов от скрещиваний *T. durum* с *T. timopheevii* необходимо беккроссировать твёрдой пшеницей (Козловская, Григорьева, 1986).

По аналогии с мягкой пшеницей можно предположить, что в геноме твёрдой пшеницы есть в наличии гены восстановления фертильности *Rf1*, *Rf3*, *Rf4* и *Rf7*, которые локализованы соответственно на 1A 1B 6B и 7B хромосомах. При скрещивании *T. durum* и *T. timopheevii* конъюгация хромосом проходила преимущественно между *B* и *G* геномами (Tomar, Vari, 1995), поскольку гомология геномов *A* у *T. durum* и *T. timopheevii* значительно меньше (Головнина и др., 2009). Следовательно, при гибридизации этих видов более вероятна интрогрессия генов *Rf3*, *Rf4* и *Rf7* в геном *B* твёрдой пшеницы.

Наши исследования показали, что в гибридных поколениях F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> количество фертильных растений возрастает, очевидно, в результате элиминации нестабильных генотипов (табл. 3).

В комбинациях на цитоплазме *T. timopheevii* количество растений с высокой озернённостью колоса в ряду поколений изменяется. В F<sub>3</sub> 33% растений имеют высокую озернённость (31-57 зёрен), что отчасти можно объяснить трансгрессией по этому признаку (табл. 3). В F<sub>4</sub> доля высокоозернённых растений уменьшилась до 20%, в F<sub>5</sub> осталась почти на том же уровне, что можно объяснить наличием факторов стерильности в цитоплазме. У комбинаций на цитоплазме *T. durum*, не несущей факторов стерильности, напротив, доля растений с высокой озернённостью возрастала от 10% в F<sub>3</sub> до 62% в F<sub>4</sub> и несколько снижалась в F<sub>5</sub>, оставаясь сравнительно высокой.

Таким образом, для получения трансгрессивных форм твёрдой пшеницы с высокой озернённостью целесообразно использовать

## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ

**Таблица 2. Проявление признаков колоса в поколениях гибридов между *T. timopheevii* и *T. durum***

Признак	Значение	Комбинация	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	<i>T. durum</i>	<i>T. timopheevii</i>
ДК, см	$\bar{x}$	<i>T. durum</i> ×	5,5	5,0	6,7	5,9	6,1	5,2
	min-max	<i>T. timopheevii</i>	-	3,2-6,8	5,0-9,5	4,5-8,2	5,5-6,5	
	$\bar{x}$	<i>T. timopheevii</i> ×	7,7	6,5	6,8	6,5	4,1-6,5	
	min-max	<i>T. durum</i>	6,5-8,5	3-8,2	5,0-9,5	4,0-9,0		
		<i>t</i>		150	0,05	0,24		
КК	$\bar{x}$	<i>T. durum</i> ×	14	15,5	18,1	16,8	20,2	20,4
	min-max	<i>T. timopheevii</i>	-	10-21	15-23	7-22	19-22	
	$\bar{x}$	<i>T. timopheevii</i> ×	18,3	20,1	18,2	17,9	18-23	
	min-max	<i>T. durum</i>	18-19	11-26	14-23	11-24		
		<i>t</i>		2,63	0,35	0,52		
КЗ	$\bar{x}$	<i>T. durum</i> ×	16	11,3	33,1	28,1	34,4	34,2
	min-max	<i>T. timopheevii</i>	-	0-33	1-50	0-57	31-37	
	$\bar{x}$	<i>T. timopheevii</i> × <i>T.</i>	11,3	18,3	24,3	22,5	29-42	
	min-max	<i>durum</i>	7-15	0-52	7-62	0-52		
		<i>t</i>		10,1	3,9*	1,43		

**Примечание:** ДК – длина колоса, КК – количество колосков, КЗ – количество зёрен, *t* – критерий Стьюдента, \* – критерий Стьюдента значимый при  $p \leq 0,001$ .

**Таблица 3. Классы растений в зависимости от их фертильности**

Комбинация	Поколение	Количество изученных растений	Фертильность, количество растений с озерённостью колоса					
			0-10 зёрен	%	11-30 зёрен	%	31-57 зёрен	%
<i>T. timopheevii</i> × <i>T. durum</i>	F <sub>3</sub>	12	6	50	2	17	4	33
	F <sub>4</sub>	35	5	14	23	66	7	20
	F <sub>5</sub>	172	46	27	84	49	42	24
<i>F-критерий</i>			10,1*		250		328	
<i>T. durum</i> × <i>T. timopheevii</i>	F <sub>3</sub>	29	18	18	8	8	3	10
	F <sub>4</sub>	47	1	2	17	36	29	62
	F <sub>5</sub>	283	14	5	142	50	127	45
<i>F-критерий</i>			2,9		101,5		3,0	

**Примечание:** \*  $p \leq 0,001$ .

цитоплазму *T. durum*. Вместе с тем, наши данные могут свидетельствовать о пониженной совместимости генома *T. Timopheevii* с цитоплазмой *T. durum*. К сожалению, мы не обнаружили в литературе информации об этом аспекте ядерно-плазменных взаимоотношений.

В наших исследованиях частота и степень трансгрессии изученных показателей в ряду поколений уменьшалась (табл. 4). Частота трансгрессии по длине колоса во всех поколениях в комбинации на цитоплазме *T. timopheevii* выше, чем в реципрокной комбинации. Однако по количеству колосков в колосе частота трансгрессии от F<sub>3</sub> к F<sub>5</sub> значительно уменьшалась: от 55,5% до 1,2% у комбинации на цитоплазме *T. durum*, и от 83,3% до 1,4% – на цитоплазме *T. timopheevii*. Частота появления трансгрессивных растений по показателю

количество зёрен в колосе в поколении F<sub>5</sub> составляла 20,4% и 22,5% в зависимости от цитоплазмы (табл. 4). Это связано со стабилизацией генома изученных семей.

У семей, на цитоплазме *T. timopheevii*, частота трансгрессивных форм и степень трансгрессии по всем изученным показателям в поколении F<sub>3</sub> превышала показатели семей на цитоплазме *T. durum*. А в поколении F<sub>5</sub> имело место значительное превышение лишь по частоте трансгрессивных растений по показателю длина колоса. Таким образом, цитоплазма *T. timopheevii* не оказывает отрицательного влияния на частоту и степень появления трансгрессивных растений. Количество фертильных растений в популяции увеличивается, следовательно, полученные линии несут гены восстановления фертильности.

## ТВЕРДОХЛЕБ

**Таблица 4. Частота и степень проявления трансгрессий по признакам колоса у семей твёрдой пшеницы**

Комбинация	F	Количество растений, шт.	Длина колоса, см			Количество колосков в колосе, шт.			Количество зёрен в колосе, шт.		
			min-max	Ч, %	С, %	min-max	Ч, %	С, %	min-max	Ч, %	С, %
<i>T. durum</i> × <i>T. timopheevii</i> <i>T. timopheevii</i> × <i>T. durum</i>	F <sub>3</sub>	29	3,2-6,8	48,3	3,6-29,1	10-21	55,2	4,1-26,9	0-33	31,0	15,6-36,1
		12	3,0-8,2	83,3	3,6-41,2	11-26	83,3	19,2-41,0	0-52	41,7	4,1-59,4
<i>T. durum</i> × <i>T. timopheevii</i> <i>T. timopheevii</i> × <i>T. durum</i>	F <sub>4</sub>	47	5,0-9,5	58,2	0,9-3,9	15-23	11,8	3,6-7,8	1-50	56,9	2,4-41,7
		35	5,0-9,5	62,0	2,5-29,6	14-23	5,7	3,6-7,8	7-62	11,4	4,9-27,8
<i>T. durum</i> × <i>T. timopheevii</i> <i>T. timopheevii</i> × <i>T. durum</i>	F <sub>5</sub>	283	4,5-8,2	29,2	0,9-29,6	7-22	1,2	3,6-11,6	0-57	20,4	2,4-30,5
		172	4,0-9,0	49,3	2,5-22,7	11-24	1,4	3,6	0-52	22,5	4,9-36,6

**Примечание:** min-max – минимальное и максимальное значения признака, Ч – частота встречаемости трансгрессивных растений, %, С – степень трансгрессии, %.

**Таблица 5. Характеристика изучаемых лучших семей по морфологическим признакам колоса**

Родительские формы, линии	Цвет		Наличие опушения
	колоса	остей	
<i>T. durum</i> Спадщина	белый с восковым налётом	белый	нет
<i>T. timopheevii</i>	белый	чёрный	есть
TV 225-3-1	белый	белый	нет
TV 228-2-1	светло коричневый	чёрный	нет
TV 229-4-5	коричневый	чёрный	слабое
TV 230-1-6	светло коричневый	коричневый	слабое
TV 231-3-2	коричневый	чёрный	слабое
TV 233-1-3	дымчатый	чёрный	слабое
<b>TV 234-2-1</b>	<b>дымчатый</b>	<b>коричневый</b>	<b>слабое</b>
<b>TV 235-3-9</b>	<b>коричневый с восковым налётом</b>	<b>чёрный</b>	<b>есть</b>
TV 236-3-1	коричневый	чёрный	слабое
<b>TV 237-1-4</b>	<b>белый</b>	<b>белый</b>	<b>нет</b>
TV 239-1-1	белый	коричневый	есть
TV 240-3-2	белый	коричневый	сильное
TV 241-1-2	белый	белый	сильное
TV 242-1-6	белый	коричневый	сильное
TV 242-1-3	белый	коричневый	сильное

**Примечание:** жирным шрифтом выделены линии с предполагаемым наличием гена восстановления фертильности *Rf3*

Наличие гена восстановления фертильности *Rf3* мы изучали у растений с повышенной озернёностью с помощью пар праймеров к микросателлитным локусам *Xbarc61* и *Xbarc207*, которые, согласно данным литературы, являются тесно сцепленными (Prakash et al., 2012). Zhou и др. (Zhou, et al., 2005) определили, что три SSR маркера, *Xbarc61*, *Xbarc207* и *Xgwm131*, находятся в одной группе сцепления с геном восстановления фертильности *Rf3*. Эти SSR маркеры расположены на хромосоме 1В.

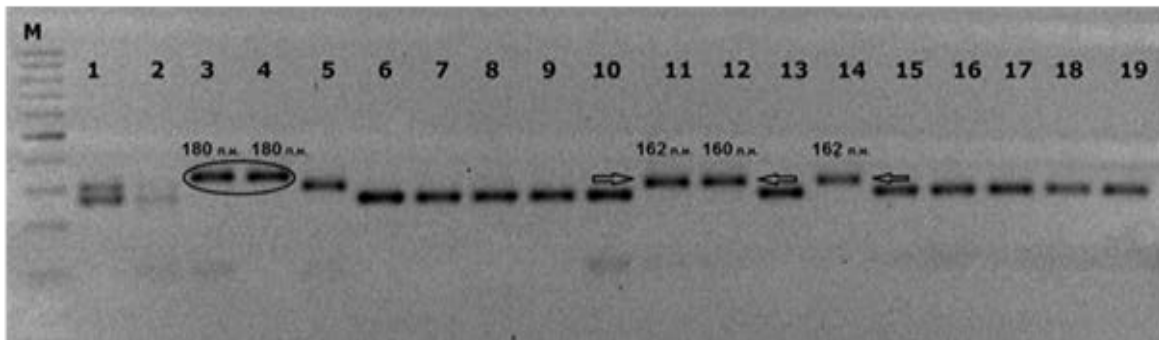
Кроме того, авторы выясняли взаимное расположение нескольких SSR маркеров и гена *Rf3*. Было выявлено, что ген очень близко к *Xbarc207* и на расстоянии только 10 см между *Xbarc61* и *Xbarc207*.

Растения выбирали с различными морфологическими признаками колоса (табл. 5). Семьи TV 225-3-1 – TV 236-3-1 имели цитоплазму *T. durum*; семьи TV 237-1-4 – TV 242-1-3 – цитоплазму *T. timopheevii*.

## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ

**Таблица 6. Список SSR маркеров, используемых для идентификации гена восстановления фертильности (*Rf3*)**

SSR Markers	Нуклеотидные последовательности	Продукты амплификации, п.н.	
		литературные данные	наши данные
<i>Xbarc61</i>	F:TGCATACATTGATTCATAACTCTCT R:TCTTCGAGCGTTATGATTGAT	215	160-208
<i>Xbarc207</i>	F:CCTTCACAGCCCAACAATCAACAAC R:CGTCTAGGGTTCATCCGCCACTG	221	246-272



**Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером *Xbarc61* высокоозернённых линий.**

М – маркер молекулярной массы DNA ladders 50 bp (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.н.). 1 – *T. durum* Спадщина, 2 – *T. timopheevii*, *T. aestivum*: 3 – сорт Minister, 4 – сорт Primepi; семьи: 5 – TV 225-3-1, 6 – TV 228-2-1, 7 – TV 229-4-5, 8 – TV 230-1-6, 9 – TV 231-3-2, 10 – TV 233-1-3, 11 – TV 234-2-1, 12 – TV 235-3-9, 13 – TV 236-3-1, 14 – TV 237-1-4, 15 – TV 239-1-1, 16 – TV 240-3-2, 17 – TV 241-1-2, 18 – TV 242-1-6, 19 – TV 242-1-3.

Овалом выделены продукты амплификации контроля наличия гена *Rf3*, стрелками указаны продукты амплификации близкие по размеру к наличию гена *Rf3*.

Для валидации маркеров *Xbarc61* и *Xbarc207* к гену *Rf3* провели сравнение продуктов амплификации образцов с идентифицированными генами *Rf3*. По нашим результатам амплифицированные продукты отличались от литературных данных (табл. 6) (Prakash et al, 2012). Поскольку молекулярные маркеры генов восстановления фертильности установлены для мягкой пшеницы, а не для твердой, в наших опытах продукты амплификации у изученных линий отличаются от описанных в литературе.

Для выявления гена восстановления фертильности у изученных линий мы использовали маркер *Xbarc61*. Нами выделены три высокоозернённые семьи – возможные носители гена *Rf3* (рис. 1). Размер продуктов амплификации соответственно – 162 п.н., 160 п.н., 162 п.н.

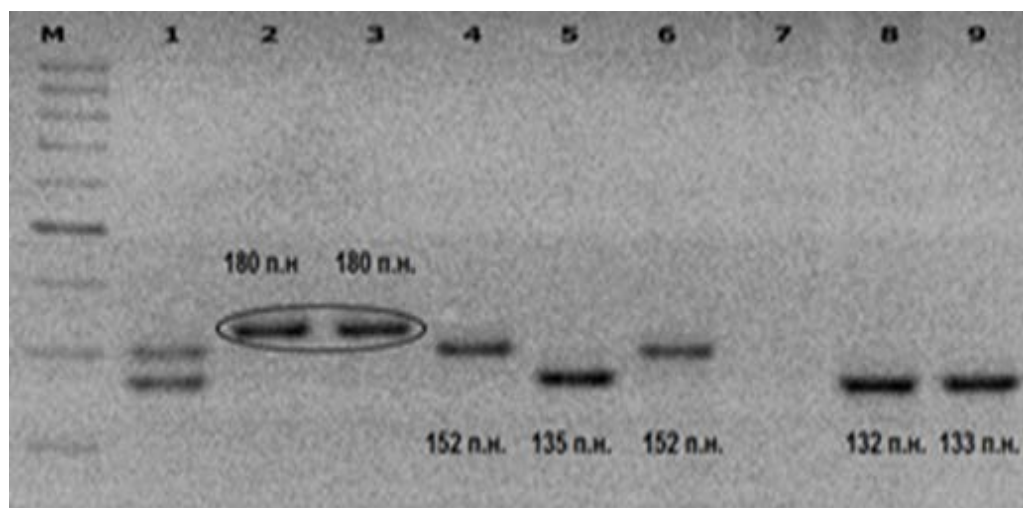
Для подтверждения отсутствия гена *Rf3* у изученных образцов мы взяли четыре семьи (TV 235-1-9, TV 225-1-1, TV 243-1-2, TV 243-1-6) с низкой озёрностью (3-16 зёрен в коло-

се) на разной цитоплазме (рис. 2) и две линии (TV 225-3-1, TV 242-1-3) с высокой озёрностью для контроля. В результате идентификации линии с продуктами амплификации 160-208 п.н. не были обнаружены. Таким образом, низкая фертильность отчасти может объясняться отсутствием гена восстановления фертильности *Rf3*, который в этом случае является эффективным.

Выявленный нами ген восстановления фертильности обнаружен у двух семей – TV 234-2-1 и TV 235-3-9 на цитоплазме *T. durum* и одной TV 237-1-4 на цитоплазме *T. timopheevii*. Данные линии имеют различия по морфологическим признакам (табл. 5).

Таким образом, высокоозернённые растения, полученные при отдалённой гибридизации, имеют гены восстановления фертильности. У части этих растений выявлен ген *Rf3*, у других высокоозернённых линий он отсутствует. С другой стороны, у низкоозернённых линий ген *Rf3* не выявлен. Это может свидетель-

## ТВЕРДОХЛЕБ



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером *Xbarc61* низкоозернённых линий.

М – маркер молекулярной массы DNA ladders 50 bp (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.н.). 1 – *T. durum* Спадщина, *T. aestivum*: 2 – сорт Minister, 3 – сорт Primepi, семьи: 4 – TV 225-3-1\*, 5 – TV 242-1-3\*, 6 – TV 235-1-9, 7 – TV 225-1-1, 8 – TV 243-1-2, 9 – TV 243-1-6, \* – высокоозернённые линии.

ствовать о его эффективности у тетраплоидной пшеницы. Что касается высокоозерненных растений, не имеющих гена *Rf3*, то их фертильность может быть обусловлена другими генами, возможно, работающими в комплексе. Это является предметом дальнейших исследований. Для подтверждения наличия гена восстановления фертильности у выделенных семей мы планируем скрестить их в качестве опылителя со стерильными формами.

Цитоплазма *T. timopheevii* не оказывает отрицательного влияния на частоту появления трансгрессивных растений и степень трансгрессии. Количество фертильных растений в популяции увеличивается, следовательно, полученные линии несут гены восстановления фертильности. Однако для получения трансгрессивных форм твёрдой пшеницы с высокой озернённостью целесообразно использовать цитоплазму *T. durum*.

У гибридных поколений  $F_3$ - $F_5$  количество фертильных растений возрастает в результате элиминации нестабильных генотипов. Стабилизация генома ведёт к появлению трансгрессивных растений в поколении  $F_5$  по показателю количество зёрен в колосе от 20,4% до 22,5% в зависимости от цитоплазмы.

Отсутствуют существенные различия в скорости восстановления фертильности растений в ряду поколений реципрокных гибридов между *T. durum* и *T. timopheevii*. Это свидетель-

ствует о взаимной несовместимости цитоплазм этих видов с ядрами партнеров скрещиваний.

Не обнаружено связи уровня фертильности с наличием тех или иных морфологических признаков либо их сочетаний. Частота трансгрессии по длине колоса во всех поколениях в комбинации на цитоплазме *T. timopheevii* выше, чем в реципрокной комбинации. Однако по количеству колосков в колосе частота трансгрессии от  $F_3$  к  $F_5$  значительно уменьшается. Цитоплазма *T. timopheevii* не оказывает отрицательного влияния на частоту и степень трансгрессии по признакам колоса в поколениях гибридов с *T. durum*.

## ЛИТЕРАТУРА

- Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. – Х.: ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
- Воскресенская Г.С., Шнопа В.И. Трансгрессия признаков у гибридов BRASSICA и методика количественного учета этого явления // Селекция и семеноводство. – 1967. – № 6. – С. 18-20.
- Головнина К.А. Филогения А-геномов диких и возделываемых видов пшениц // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 11. – С. 1540-1547.
- Козловская В.Ф., Григорьева Л.П. Скрещиваемость, автофертильность гибридов  $F_1$  и успех беккроссирования при гибридизации *Triticum durum* Desf. × *Triticum timopheevii* Zhuk. // Защита растений на Алтае. – Новосибирск: РПО СО ВАСХНИЛ, 1984. – С. 3.

## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ

- Козловская В.Ф., Григорьева Л.П. Генетическая и модификационная изменчивость результата возвратного скрещивания межвидовых гибридов *Triticum durum* Desf. × *Triticum timopheevi* Zhuk. // Генетика. – 1986. – Т. 22. – № 10. – С. 2469-2476.
- Пшеницы мира / В.Ф. Дорофеев, Р.А. Удачин, Л.В. Семёнова и др. – Ленинград: Агропромиздат, 1987. – 560 с.
- Рабинович С.В. Современные сорта пшеницы и их родословные. – Киев: Урожай, 1972. – 328 с.
- Твердохлеб Е. В. Скрещиваемость и фертильность гибридов между формами пшеницы – носителями субгенома G и сортами мягкой и твёрдой пшениц // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія. – 2009. – № 856. – С. 89-96.
- Твердохлеб О. Успадкування ознак у гібридів видів і форм підроду *Voeoticum* з твердою пшеницею та їхньому потомстві від ступінчастих схрещувань // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011. – Вип. 55. – С. 73-80. – (Сер. Біологічна).
- Bahl P.N., Maan S.S. Chromosomal location of fertility restoring genes in six lines of common wheat. // Crop Sci. – 1973. – V. 13. – P. 317-320.
- Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E., Creavalle T.D., Kern S.E. Ultra-fasthigh-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Bio-techniques. – 2004. – V. 37, № 4. – P. 598-602.
- Du H, Maan S.S., Hammond J.J. Genetic analyses of male fertility restoration in wheat. III. Effects of aneuploidy // Crop Sci. – 1991. – V. 31. – P. 319-322.
- Liver R.W. Fertility restoration and its inheritance in cytoplasmic male-sterile wheat // Crop Sci. – 1964. – V. 144. – P. 420.
- Maan S.S., Lucken K.A., Bravo J.M. Genetic analysis of male fertility restoration in wheat. I. Chromosome location of Rf genes // Crop Sci. – 1984. – V. 24 – P. 17-20.
- Prakash V., Tiwari S., Kumar S., Shukla Rama S., Tripathi N. Validation of male sterile, fertility restorer and hybrid lines in wheat (*Triticum aestivum* L.) with linked SSR markers // AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. – 2012. – V. 20 (2). – P. 65-71.
- Sinha P., Tomar S.M.S., Vinod Singh V.K., Balyan H.S. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene Rf8 for *Triticum timopheevii* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers 2013. <http://oar.icrisat.org/7180/>
- Tahir C.M., Tsunewaki K. Monosomic analysis of *Triticum spelta* var. duhamelianum, a fertility restorer for *T. timopheevii* cytoplasm. // Jap. J. Genet. – 1969. – V. 44. – P. 1-9.
- Tomar S.M.S., Vari A.K. Genomic affinity in wheat based on chromosome pairing in F1 hybrid // Genetic Research and Education: Current Trends and the Next Fifty Years / Indian Soc. Genetics Plant Breed. – New Delhi, 1995. – P. 1256-1264.
- Wilson J.A., Ross W.M. Cross breeding in wheat, *Triticum aestivum* L. Frequency of the pollen-restoring character in hybrid wheats having *Aegilops ovata* L. cytoplasm // Crop Sci. – 1961. – V. 1. – P. 191-193.
- Zhou W., Kolb F.L., Domier L.L., Wang S. SSR markers associated with fertility restoration genes against *Triticum timopheevii* cytoplasm in *T. aestivum* // Euphytica. – 2005. – V. 141. – P. 33-40.

Поступила в редакцію  
09.12.2015 з.

## FORMATION OF FERTILITY IN HYBRIDS BETWEEN *TRITICUM TIMOPHEEVII* ZHUK. AND *T. DURUM* DESF.

E. V. Tverdokhleba

V.Ya. Yuriev Plant Production Institute  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Kharkiv, Ukraine)  
e-mail: etverd@meta.ua

The cytoplasm of *T. timopheevii* not affects negatively on frequency and degree of transgressions by quantitative traits of the plants of hybrids with *T. durum*. However, for obtaining transgressive forms of durum wheat with high grain number per ear, it is preferable to use the cytoplasm of *T. durum*. In hybrid generations F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> increases the amount of fertile plants as the result of elimination of unstable genotypes. Stabilization of the genome leads to the appearance of transgressive plants in terms of the grain number per ear in the F<sub>5</sub> generation with a frequency of 20.4% to 22.5% depending on the cytoplasm. A comparison of the amplification products was carried out to validate markers *Xbarc61* and *Xbarc207* to the gene *Rf3*. The amplification products in our study differs from published data.



## СТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ

Markers of the fertility restorer gene *Rf3* are discovered in two families – TV 234-2-1 and TV 235-3-9 on the cytoplasm of *T. durum* and one – TV 237-1-4 on the cytoplasm of *T. timopheevii*. A size of amplification products in these families is respectively 162 bp, 160 bp, 162 bp.

**Key words:** *Triticum timopheevii*, *Triticum durum*, fertility restoration genes, molecular markers, frequency and degree of transgression

## СТАНОВЛЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ У ГІБРИДІВ МІЖ *TRITICUM TIMOPHEEVII* ZHUK. І *T. DURUM* DESF.

О. В. Твердохліб

*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва  
Національної академії аграрних наук України  
(Харків, Україна)  
e-mail: etverd@meta.ua*

Цитоплазма *T. timopheevii* не впливає негативно на частоту і ступінь прояву трансгресій за кількісними ознаками рослини. Проте для отримання трансгресивних форм твердої пшениці з високою кількістю зерен доцільно використовувати цитоплазму *T. durum*. У гібридних поколіннях F<sub>3</sub>-F<sub>5</sub> кількість фертильних рослин зростає в результаті елімінації нестабільних генотипів. Стабілізація геному веде до появи трансгресивних рослин за показником кількість зерен в колосі в поколінні F<sub>5</sub> з частотою від 20,4% до 22,5% залежно від цитоплазми. Провели порівняння продуктів ампліфікації, для валідації маркерів *Xbarc61* і *Xbarc207* до гена *Rf3*. Ампліфіковані продукти в наших дослідженнях відрізнялися від літературних даних. Виявлено ген відновлення фертильності у двох сімей – TV 234-2-1 і TV 235-3-9 на цитоплазмі *T. durum* і однієї – TV 237-1-4 на цитоплазмі *T. timopheevii*. У сімей з ідентифікованими генами *Rf3* розмір продуктів ампліфікації відповідно – 162 п.н., 160 п.н. та 162 п.н.

**Ключові слова:** *Triticum timopheevii*, *Triticum durum*, гени відновлення фертильності, молекулярні маркери, частота і ступінь трансгресії