

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНЫХ ГИБРИДОВ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ КИТАЯ С РОЖЬЮ ПОСЕВНОЙ

© 2019 г. В. П. Пюккенен¹, Г. И. Пендинен¹, О. П. Митрофанова^{1, *}

¹Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 27.03.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принята к публикации 13.06.2019 г.

Генофонд озимой мягкой пшеницы из Китая, сохраняемый в коллекции ВИР, уникален разнообразием аллелей генов селекционно-ценных признаков и свойств. Проведенные нами ранее исследования выявили среди этой пшеницы образцы, хорошо скрещивающиеся с рожью посевной, которые в большинстве случаев были низкозимостойкими. С целью вовлечения этого материала в российскую селекцию были получены пшенично-ржаные гибриды и проведен направленный отбор на зимостойкость и высокую продуктивность в ряде последующих поколений самоопыления гибридов. Оценка созданных гибридов F₁ в осенне-зимнем посеве в условиях Северо-Западного региона РФ (г. Пушкин) выявила их различия по жизнеспособности, зимостойкости и завязываемости гибридных зерновок F₂. Последующий направленный индивидуальный отбор растений в F₂–F₇ гибридных популяциях от самоопыления на высокие перезимовку и продуктивность привел к созданию первичных гексаплоидных пшенично-ржаных линий (2n = 6x = 42, ВВААRR). В настоящей статье дана характеристика 17 линиям. С использованием рангового критерия (H) Краскела–Валлиса показана статистически значимая гетерогенность линий по изученным признакам. С применением метода геномной *in situ* гибридизации у всех линий выявлены элиминация хромосом генома D и наличие полных геномов В, А и R. У одной линии наряду с гексаплоидными растениями обнаружены формы, содержащие дополнительно от одной до пяти хромосом генома D. Созданные первичные зимостойкие и высокопродуктивные гексаплоидные пшенично-ржаные линии представляют собой новый исходный материал для селекции пшеницы и тритикале.

Ключевые слова: коллекция пшеницы ВИР, *Triticum aestivum*/*Secale cereale* гибриды, фертильность колоса, зимостойкость, GISH, идентификация геномов.

DOI: 10.1134/S0016675819110110

В последнее десятилетие развитию селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Китае, ведущем мировом производителе и потребителе зерна этой культуры, способствовали не только интродукция зарубежных элитных сортов и внедрение новейших методов и технологий изучения растительного материала, но и генетическое разнообразие староместного материала [1, 2]. Отличительные признаки местной китайской мягкой пшеницы, такие как короткостебельность, многоцветковость, мелкозерность, раннее созревание, быстрый налив зерна, широкая адаптация к различным условиям, устойчивость к вредоносным болезням, были отмечены еще Н.И. Вавиловым [3]. С помощью гибридологического анализа и молекулярных маркеров у китайских староместных пшениц выявлены многие ценные для селекции аллели генов: контролируемые скрещиваемость пшеницы с другими видами [4], влияющие на спаривание гомеологичных хромосом

[5], снижающие высоту растения [6], детерминирующие тип развития растений пшеницы и их реакцию на фотопериод [7], обуславливающие устойчивость к фузариозу колоса [8, 9], определяющие состав пуриноидинов, от которых зависит твердозерность или мягкозерность эндосперма зерновки пшеницы [10].

В настоящее время коллекция мягкой пшеницы ВИР содержит более 1200 образцов из Китая (примерно половина из них получена за период с 1922 по 1961 г.) и представлена в основном старыми местными сортами, отборами из них и старыми селекционными сортами. Несмотря на длительное время нахождения этих образцов в составе коллекции ВИР, они остаются малоизученными. В.П. Пюккенен [11] были протестированы 165 образцов мягкой пшеницы из Китая по скрещиваемости с рожью посевной (*Secale cereale* L.) и выявлены 40 образцов, легко скрещивающихся с этим видом, из них 30 – с озимым типом разви-

Таблица 1. Родительские формы гибридов F₁ и результаты проверки фертильности линий при опылении рожью

Озимая мягкая пшеница (<i>T. aestivum</i>), ♀		Рожь (<i>S. cereale</i>), ♂	Завязываемость зерновок (в %) при опылении рожью	
исходный образец	линия		Ильмень	Л434
к-61263, Nonda 84015	Л _{к-61263}	Ильмень	76.7	—*
к-41563, № 72	Л9-ХСР	Л434	75.0	56.3
к-43276	Л27-ХСР	Л434	54.4	41.2

* Не проверяли.

тия. Мы решили вовлечь образцы с озимым типом развития в отечественную селекцию путем гибридизации с рожью, а не с мягкой пшеницей, чтобы полнее сохранить их генетическую основу и одновременно повысить зимостойкость, поскольку использованию озимой мягкой пшеницы из Китая в российской селекции очень часто препятствует ее низкая перезимовка даже в условиях Краснодарского края и Дагестана. У семи межродовых гибридов F₁ при посеве под зиму были обнаружены жизнеспособные растения, спонтанно завязавшие единичные зерновки F₂. Из этих гибридов отобраны три, характеризующиеся наиболее высоким процентом завязываемости жизнеспособных зерновок. Они и стали объектом настоящего исследования. Из литературы известно, что получаемые пшенично-ржаные гибриды не отличаются высокой перезимовкой вследствие ингибирования у них экспрессии генов ржи [12, 13]. Однако описаны отдельные случаи успешного отбора из расщепляющихся пшенично-ржаных гибридных популяций зимостойких форм пшеничного типа и тритикале [14]. Это послужило доводом в пользу проведения наших исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аллогаплоидные пшенично-ржаные гибриды F₁ были получены от скрещивания линий озимой мягкой пшеницы Л_{к-61263}, Л9-ХСР и Л27-ХСР с аллогамным высокозимостойким сортом ржи Ильмень (к-11000, Россия) и инбредной линией Л434 из Петергофской генетической коллекции ржи, которую любезно предоставили сотрудники Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики Российской академии наук. Образцы озимой мягкой пшеницы коллекции ВИР, из которых были отобраны линии, а также родительские формы гибридов приведены в табл. 1.

В 2008 г. гибридные зерновки F₁ были высеяны в поле (г. Пушкин, N 59°41', E 30°20') под зиму для оценки жизнеспособности и зимостойкости полученных растений в условиях Северо-Западного региона России. Жизнеспособность гибридных зерновок F₁ определяли по соотношению

числа полученных проростков в поле к числу высеянных зерновок, зимостойкость рассчитывали по соотношению числа выживших после зимовки растений к числу ушедших в зиму [15].

Климат в г. Пушкин характеризуется мягкой зимой и избыточно влажным теплым летом. Метеорологические условия, сложившиеся на время проведения эксперимента в 2008–2009 и 2010–2017 гг., были благоприятными для вегетации растений и формирования зерна, хотя следует отметить, что в декабре 2010 г., феврале 2011, 2012 и марте 2013 г. наблюдали отклонение температуры от значений средней многолетней на –4.4...–5.7°C [16]. Условия летних месяцев 2016 и 2017 гг. оказались наиболее экстремальными для роста и развития растений из-за избыточного количества среднемесячных осадков (июнь, июль, август составили от нормы соответственно 137, 191, 227% в 2016 г. и 115, 155, 175% в 2017 г.) и пониженной в среднем на 2°C температуры.

Чтобы оценить гибридные растения F₁ по способности завязывать зерновки F₂, каждое растение убирали отдельно и проводили его анализ. Фертильность колоса (в %) определяли как соотношение числа зерновок к числу цветков в колосе, а число цветков рассчитывали как число колосков × три условных цветка. Значения этого показателя могут превышать 100% при наличии в колосе колосков с числом цветков и завязавшихся зерновок более трех. В 2009 г. от отдельных гибридных растений F₂ были заложены линии. В последующих расщепляющихся популяциях F₃–F₈, полученных от самоопыления растений, при направленном индивидуальном отборе на зимостойкость, выполненность зерновок и продуктивность растения и колоса получено около 200 пшенично-ржаных линий. В настоящей работе представлены результаты изучения 17 линий: 462_{Р1}, 463_{Р1}, 464_{Р2}, 465_{Р2}, 466_{Р1}, 466-1_{Р1}, 467_{Р1}, 472_{Р1}, 473_{Р1}, 483_{Р4}, 484_{Р1}, 484-1_{Р1}, 485_{Р1} и 488_{Р3} комбинации скрещивания (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень), линии происходят от четырех растений F₂, на что указывает нижний индекс номера линии; 447 (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434);

451 и 453 (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434), обе линии – потомки одного растения F₂.

Все перечисленные линии выращивали без строгой изоляции, при этом линии 447, 451 и 453 представлены растениями поколения F₆, а остальные линии – растениями поколения F₈. Стандартами для сравнения по зимостойкости и продуктивности служили сорта гексаплоидного тритикале (× *Triticosecale* Wittmack) Корнет (к-3636) и Немчиновский 56 (к-3861), допущенные к использованию в Северо-Западном регионе РФ, а также сорт озимой мягкой пшеницы Мироновская 808 (к-43920, РСФСР, Украинская ССР), ежегодно хорошо зимующий в условиях г. Пушкин. Использование материнских линий как стандартов посчитали нецелесообразным, поскольку они менее приспособлены к почвенно-климатическим условиям данной зоны выращивания, чем названные выше стандарты, и существенно различались по зимостойкости. В 2003–2006 гг. и 2011/2012 гг. наблюдали полную гибель или очень низкую (менее 30%) перезимовку Л_{к-61263} и Л27-ХСР, но высокую (71–90%) Л9-ХСР.

Анализ линий по высоте растений и элементам продуктивности растения и колоса проводили на 5–12 растениях, у стандартов изучали по три растения. Характеристика линий дана в соответствии со шкалами [17].

Анализ однородности 17 пшенично-ржаных линий и их множественное сравнение проводили с использованием рангового критерия (*H*) Краскела–Валлиса и программного продукта Statistika 12.

Для анализа геномного состава гибридного материала использовали метод геномной *in situ* гибридизации (GISH) с дифференциально меченой ДНК различных базовых геномов.

Для получения препаратов митотических хромосом корешки изучаемых форм помещали на сутки в воду со льдом, затем фиксировали в растворе 3 : 1 (96%-ный этанол : ледяная уксусная кислота). Готовили давленные препараты из корневой меристемы, отмасерированной в течение часа в растворе ферментов целлюлазы Onozuka R10 (1.14 U/mg) и пектолиазы (0.94 U/mg) в концентрации 40 и 10 мг/мл соответственно.

Геномную ДНК из образцов к-65206 *T. durum* Desf., к-20400 *T. monococcum* L., к-1960 *Aegilops tauschii* Coss., к-2282 *Ae. speltoides* Tausch, к-11000 *S. cereale* выделяли стандартным фенольным методом [18] с обработкой РНКазой. ДНК образцов пшеницы, ржи и эгилопса метили методом Nick-трансляции с использованием DIG-Nick Translation Mix и Bio-Nick Translation Mix (Roche). В пробе для гибридизации использовали дифференциально меченные ДНК в разных сочетаниях: 1) *T. durum* (AB) + *Ae. tauschii* (D), 2) *T. durum* (AB) + *S. cereale* (R), 3) *T. monococcum* (A) + *Ae. speltoides* (B). В качестве блокирующей в первом и третьем ва-

риантах использовали ДНК ржи *S. cereale*, а во втором варианте – ДНК *Ae. tauschii*.

Геномную *in situ* гибридизацию проводили, взяв за основу стандартные методики [19, 20]. Для детекции биотиновой метки использовали streptavidin-Cy3 конъюгат (Dianova), для детекции дигоксигениновой метки – digoxigenin-FITC конъюгат (Roche Diagnostics). Хромосомы контрастировали раствором DAPI.

Для анализа препаратов, создания и обработки изображений использовали эпифлуоресцентный микроскоп Zeiss AxioImager M2 с камерой AxioCamMRm и программное обеспечение AxioVision Rel 4.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

От 89 высеванных в поле (г. Пушкин, 2008/2009 гг.) пшенично-ржаных гибридных зерновок F₁ трех комбинаций скрещиваний было получено всего 37 проростков, жизнеспособность гибридных зерновок в зависимости от комбинации скрещивания варьировала от 39.1 до 44.2% (табл. 2). Все проростки развились в растения, которые в стадии кушения ушли в зиму. Степень зимостойкости гибридных растений F₁ различных комбинаций скрещивания после зимовки колебалась от 15.8 до 100%. Наиболее зимостойкими оказались гибриды F₁ (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень). Наличие перезимовавших растений свидетельствовало о возможности проведения отбора на это свойство в каждой из рассматриваемых комбинаций скрещивания.

Практически все перезимовавшие гибриды F₁ достигли стадии взрослого растения. Однако в комбинациях скрещивания (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434) и (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434) было получено лишь по одному растению, завязавшему зерновку от свободного опыления, а в комбинации (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) все гибридные растения имели зерновку (табл. 3). Всего в каждой из первых двух названных комбинаций было получено по 13, в третьей – 186 гибридных зерновок F₂. Степень фертильности колоса варьировала от 2.4 до 7.8%. Полученные зерновки F₂ различались по фенотипу как в пределах колоса, так и в пределах растения. У гибрида (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) их можно было условно объединить в группы – ржаного типа (17.5% от суммарного числа гибридных зерновок), пшеничного (18%), пшеничного с окраской, как у ржи (13.2%), промежуточного (28%), другие (23.3%). Среди всех зерновок 25 (13.4%) были щуплыми, и лишь одна из них, по визуальной оценке, имела недифференцированный зародыш.

В 2010 г. (г. Пушкин) для проведения дальнейшего направленного отбора на зимостойкость и

Таблица 2. Жизнеспособность и зимостойкость гибридных растений F₁ (г. Пушкин, 2008/2009 гг.)

Комбинация скрещивания (<i>T. aestivum</i> × <i>S. cereale</i>)	Число высеянных гибридных зерновок	Получено растений		Из них перезимовало	
		число	% от высеянных зерновок	число	%
Л _{к-61263} × Ильмень	23	9	39.1	9	100.0
Л9-ХСР × Л434	43	19	44.2	3	15.8
Л27-ХСР × Л434	23	9	39.1	4	44.4

Таблица 3. Характеристика пшенично-ржаных гибридов F₁ (2008/2009 гг.) и F₂ (2010 г.)

Комбинация скрещивания	Гибридные растения F ₁				Фертильность колоса, %	
	всего/из них с зерновками	число колосьев	число колосков	число зерновок F ₂	F ₁	F ₂
				всего/из них дали проростки		
Л _{к-61263} × Ильмень	9/9	32	800	186/96	7.8	54.7
Л9-ХСР × Л434	1/1	6	96	13/8	4.5	16.8
Л27-ХСР × Л434	1/1	7	182	13/4	2.4	21.6

фертильность колоса было высеяно 186 зерновок F₂ комбинации (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень). Из всех высеянных под зиму зерновок взошли 96, после перезимовки осталось 80 растений, а к концу вегетации — 68. В целом популяцию растений F₂ можно рассматривать как высокозимостойкую (83.3%). Показатель фертильности колоса, рассчитанный для каждого из 68 растений F₂, варьировал от 0 до 73.3%. Средняя фертильность колоса составила 54.7% (табл. 3), что может свидетельствовать в пользу восстановления цитогенетической стабильности. Встречаемость морщинистых, с недостаточной дифференциацией зародыша и шуплых зерновок суммарно в растениях F₂ составила 24.2% (от 0 до 57.1% по отдельным колосьям). Из всей совокупности колосьев 68 гибридных растений F₂ были отобраны 220 самых лучших по фертильности, массе зерна с колоса (не менее 2 г), степени выполненности зерновок. С одного растения брали от одного до семи колосьев, зерновки с каждого колоса высеивали отдельно. В комбинации скрещивания (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) было изучено потомство от лучших колосьев: в F₃ — 300, F₄ — 220, F₅ — 470 и в F₆ — 330. Во всех изученных поколениях F₃–F₇ проводили отбор на зимостойкость и направленный индивидуальный отбор лучших растений по фертильности колоса и главным элементам продуктивности (числу зерновок с колоса, массе зерна с колоса и растения, массе 1000 зерен, определяемой расчетным способом).

Аналогичным образом изучали пшенично-ржаные гибриды (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434) и (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434). Однако из-за небольшого числа полученных зерновок F₂ в этих комбинациях с целью размножения материала в течение двух сезонов (2012 и 2013 гг.) посев проводили не под зиму, а весной после прохождения проросшими семенами стадии яровизации в холодильных камерах. В последующие годы, начиная с F₄ и F₅ поколений, зерновки высеивали под зиму.

В результате направленного отбора на зимостойкость, фертильность и продуктивность колоса были получены 14 линий F₈ от самоопыления гибридных растений комбинации (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) и три линии F₆: 451 и 453 (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434) и 447 (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434). Степень зимостойкости гибридных линий была высокой и составляла 80–90%. Характеристика линий по признаку “высота растения” и по некоторым элементам продуктивности дана в: Приложение. Табл. 1.

Сравнение линий между собой с использованием рангового критерия (*H*) Краскела–Валлиса показало статистически значимую (*P*) их гетерогенность по изученным признакам. При множественном парном сравнении средних рангов линий (*z*) установлены (*p*) различия не только между отдельными линиями разных гибридных комбинаций, но и между линиями одной комбинации, причем происходящими как от разных растений

F₂, так и от одного растения F₂ (Приложение. Табл. 2).

Рассмотрение линий в системе рода *Triticum* L. позволило условно объединить их в три группы по высоте растений: полукарликовые – 451, 465_{p2}, 472_{p1}, 484-1_{p1}, 485_{p1}; среднерослые – 447, 462_{p1}, 463_{p1}, 464_{p2}, 466-1_{p1}, 467_{p1}, 473_{p1}, 483_{p4}, 484_{p1}, 485_{p1}, 488_{p3} и высокорослые – 453, 466_{p1}. Стандартные сорта имели среднерослые растения. Склонности к полеганию растений линий с разной высотой не отмечено. Растения линий из группы полукарликовых характеризовались большим числом (>55 шт.) зерновок в колосе, очень большой (>2.6 г) массой зерна с колоса и с растения (до 24 г) и большой массой 1000 зерен (47–50 г).

По длине колосоносного междоузлия различия установлены между теми же линиями, что и по высоте растения. В целом все линии имели длинное междоузлие (>30 см), по этому признаку их можно распределить в группы: от 29.9 до 31.6 см (все линии из группы полукарлики), от 52.7 до 53.1 см (высокорослые), от 35.3 до 48.5 см (среднерослые).

У большей части линий (13 из 17) был средний по размеру колос (от 8.8 до 10.5 см). У линий 447, 473_{p1}, 483_{p4}, 488_{p3} – длинный колос (10.6–11.8 см).

Число зерен в колосе, масса зерна с колоса и с растения, масса 1000 зерен – наиболее значимые критерии для характеристики продуктивности растений. Число колосков в колосе, которое является показателем потенциальной фертильности, у линий варьировало от 22.8 (линия 447) до 30.1 (линия 466_{p1}), но преобладали линии с очень большим числом колосков (>25). Практически все линии, за исключением 447 и 453, имели высокое (>55) число зерен в главном колосе. У стандартов эта величина составила 82 (Корнет) и 71 шт. (Немчиновский 56).

Масса зерна с колоса у полученных линий была большой и очень большой и варьировала от 2.2 до 4.3 г.

Масса зерна с растения, по мнению А.И. Грабовца и М.А. Фоменко [21], – один из критериев оценки адаптационной способности генотипа. В наших экспериментах величина этого признака у сортов-стандартов Корнет и Немчиновский 56 составила 10.5 и 9.8 г соответственно. У пшенично-ржаных гибридных линий она варьировала от 8.4 до 24 г. Наиболее высокое значение признака отмечено для полукарликовой ($H = 76.4$ см) линии 472_{p1}, которая также отличалась высоким числом зерновок с колоса (92.3 шт.), массой зерна с колоса (4.2 г), фертильностью колоса (100.3%) и стабильно высокой массой 1000 зерен. Превышение значений этого признака (113–229%) при сравнении с сортом Корнет установлено для 11, а

с сортом Немчиновский 56 (117–245%) – для 13 из 17 изученных линий.

Признак “масса 1000 зерен” является интегральным генетическим показателем. Среди созданных линий выявлены четыре группы: с очень большим (54.4–55.7 г), большим (50.2–53.2), средним (39.3–46.8) и с малым (36.6) значением этого показателя. Число линий, принадлежащих каждой группе, составило 5, 7, 4 и 1 соответственно. По результатам изучения в F₅–F₈ (г. Пушкин, 2014–2017 гг.) линии 472_{p1} и 483_{p4} отмечены как стабильные по массе 1000 зерен и находящиеся на уровне сорта озимой мягкой пшеницы Мироновская 808. В отличие от них линии 463_{p1} и 467_{p1} сильнее других реагировали на благоприятные условия 2015 г. увеличением массы 1000 зерен, а линии 462, 465_{p2}, 484_{p1} и 484-1_{p1}, наоборот, уменьшением массы 1000 зерен на неблагоприятные условия 2016 г.

Фертильность колоса у полученных линий варьировала от 62.2 до 107.1%. Менее других она изменялась у линий 451 (94.9 и 85.6%) и 464 (89.2 и 83.1%).

В целом созданные на основе озимой мягкой пшеницы из Китая и диплоидной ржи 17 первичных пшенично-ржаных линий F₆ и F₈ поколений от самоопыления различаются между собой, при этом характеризуются высокой (71–90%) и очень высокой (более 91%) зимостойкостью, имеют большое число зерновок в колосе, высокую массу зерна с колоса и массу 1000 зерен. Они стабильны по степени выраженности этих признаков, поэтому представляло интерес выяснить их геномный состав.

С использованием метода геномной *in situ* гибридизации нами ранее был охарактеризован геномный состав 21 растения F₄ (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) [22]. Показано, что все отобранные растения имеют гексаплоидный уровень числа хромосом: с 14 хромосомами ржи *S. cereale* и 28 хромосомами пшеницы *T. aestivum*. Анализ семи из этих линий с использованием дифференциально меченных ДНК геномов А и В пшеницы *T. aestivum* позволил установить, что эти линии имеют все 14 хромосом генома А и 14 хромосом генома В. Таким образом, уже в поколении F₄ отобранные линии были гексаплоидными с геномным составом ВВААRR.

В настоящей работе анализ геномного состава у растений 14 линий F₇ (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень) и двух линий F₆ (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434) показал, что все они также являются гексаплоидами со сбалансированным геномным составом ВВААRR (табл. 4, рис. 1, а–в, ж, з). У линии F₆ (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434) наряду с гексаплоидными формами ВВААRR выявлены растения, содержащие от од-

Таблица 4. Геномный состав полученных пшенично-ржаных линий

Исходное растение	Линия	Геномный состав
F ₇ [F ₁ (Л _{к-61263} × Ильмень), P1]	462, 463, 466, 466-1, 467, 472, 473, 484, 484-1, 485	28 (AABB) + 14 (RR)
F ₇ [F ₁ (Л _{к-61263} × Ильмень), P2]	464, 465	28 (AABB) + 14 (RR)
F ₇ [F ₁ (Л _{к-61263} × Ильмень), P3]	488	28 (AABB) + 14 (RR)
F ₇ [F ₁ (Л _{к-61263} × Ильмень), P4]	483	28 (AABB) + 14 (RR)
F ₆ [F ₁ (Л9-ХСР × Л 434), P1]	451, 453	28 (AABB) + 14 (RR)
F ₆ [F ₁ (Л27-ХСР × Л 434), P1]	447	28 (AABB) + 14 (RR)
		28 (AABB) + 14 (RR) + 1-5 (D)

ной до пяти хромосом генома D (рис. 1, з, д, е). Таким образом, в этой комбинации, в отличие от двух других изученных, в поколении F₆ еще сохраняются растения с хромосомами генома D, которые имеют высокую фертильность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что легкая скрещиваемость мягкой пшеницы с другими видами родов *Triticum* L. и *Secale* L. контролируется рецессивными генами *kr1* (хромосома 5BL), *kr2* (5AL), *kr3* (5D), *kr4* (1A) и локусом *SKr*, который идентифицирован как главный QTL на расстоянии 12.7 сМ от дистального конца короткого плеча хромосомы 5B. *Kr*-гены по-разному влияют на уровень скрещиваемости пшеницы с рожью, наиболее сильный эффект у локуса *SKr*, другие гены по силе действия могут быть представлены следующим рядом: *kr1* > *kr4* > *kr2* > *kr3*. Функции генов окончательно не ясны, но показано, что доминантные аллели *Kr1* и *Kr2* (часто называемые геном *Kr*) проявляют кумулятивное действие, они ингибируют рост пыльцевых трубок в основании столбика пестика [4, 23]. По результатам анализа фрагментов нуклеотидных последовательностей гена *Kr* определены гены-кандидаты, участвующие в контроле процесса совместимости мягкой пшеницы с другими видами [24, 25].

Судя по уровню завязываемости гибридных зерновок и в соответствии с классификацией A.D. Lein [26], можно предположить, что Л_{к-61263} и Л9-ХСР были гомозиготными по рецессивным аллелям двух генов, а Л27-ХСР – по рецессивным аллелям одного гена, предположительно *kr1*. С участием каждой из линий были получены жизнеспособные и частично фертильные аллогамноидные пшенично-ржаные гибриды F₁. Основной путь восстановления фертильности таких гибридов – образование в процессе мейоза жизнеспособных гамет. В настоящее время изучены и описаны механизмы, приводящие к нередукции хромосом и частичной фертильности пшенично-ржаных гибридов [27, 28]. Среди них основными являются

нерасхождение хромосом в первом делении мейоза, эквационный тип деления и формирование монополярного веретена [27, 29, 30]. В ряде исследований, как и в нашем случае, среди пшенично-ржаных гибридов F₁ были обнаружены формы с частичной фертильностью [28, 31]. Весьма вероятно, что частичная фертильность полученных нами гибридов F₁ была следствием образования также нередуцированных гамет. В процессе создания линий цитогенетические исследования проводили, начиная с поколения F₄, поэтому нельзя однозначно судить о механизме возникновения нередуцированных гамет и составе геномов у гибридных растений F₂, от которых были заложены линии. Однако у гибридов этого поколения от скрещивания Л_{к-61263} и Л9-ХСР с рожью наблюдали стабилизацию хромосомного набора, а к F₆–F₇ были отобраны продуктивные гексаплоидные гибридные линии. Возможно, в настоящем исследовании получению стабильных гибридных форм в ранних поколениях способствовал направленный отбор на высокую фертильность растений, начиная с F₂. Проведенный цитологический анализ других гибридных растений F₂ тех же комбинаций скрещиваний (*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* сорт Ильмень) и (*T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434) выявил растения с геномным составом ВВААRR(3-7)D – I тип и ВВАADD(6-7)R – II тип [22]. Линии, изученные в настоящей работе, были получены, по-видимому, на основе гибридных растений I типа благодаря быстрой стабилизации генома на гексаплоидном уровне плоидности и полной элиминации хромосом генома D (Приложение. Рисунок). В 2016 г. при повторном скрещивании линий Л27-ХСР и Л9-ХСР с рожью *S. cereale*, но сортом Ильмень, мы наблюдали завязываемость лишь отдельных гибридных зерновок F₁. Анализ мейоза в микроспороцитах трех аллогамноидных растений F₁ (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* сорт Ильмень), полученных из этих зерновок, продемонстрировал, что для большинства мейоцитов характерен редукционный тип деления, для 9.5–14.3% микроспороцитов –

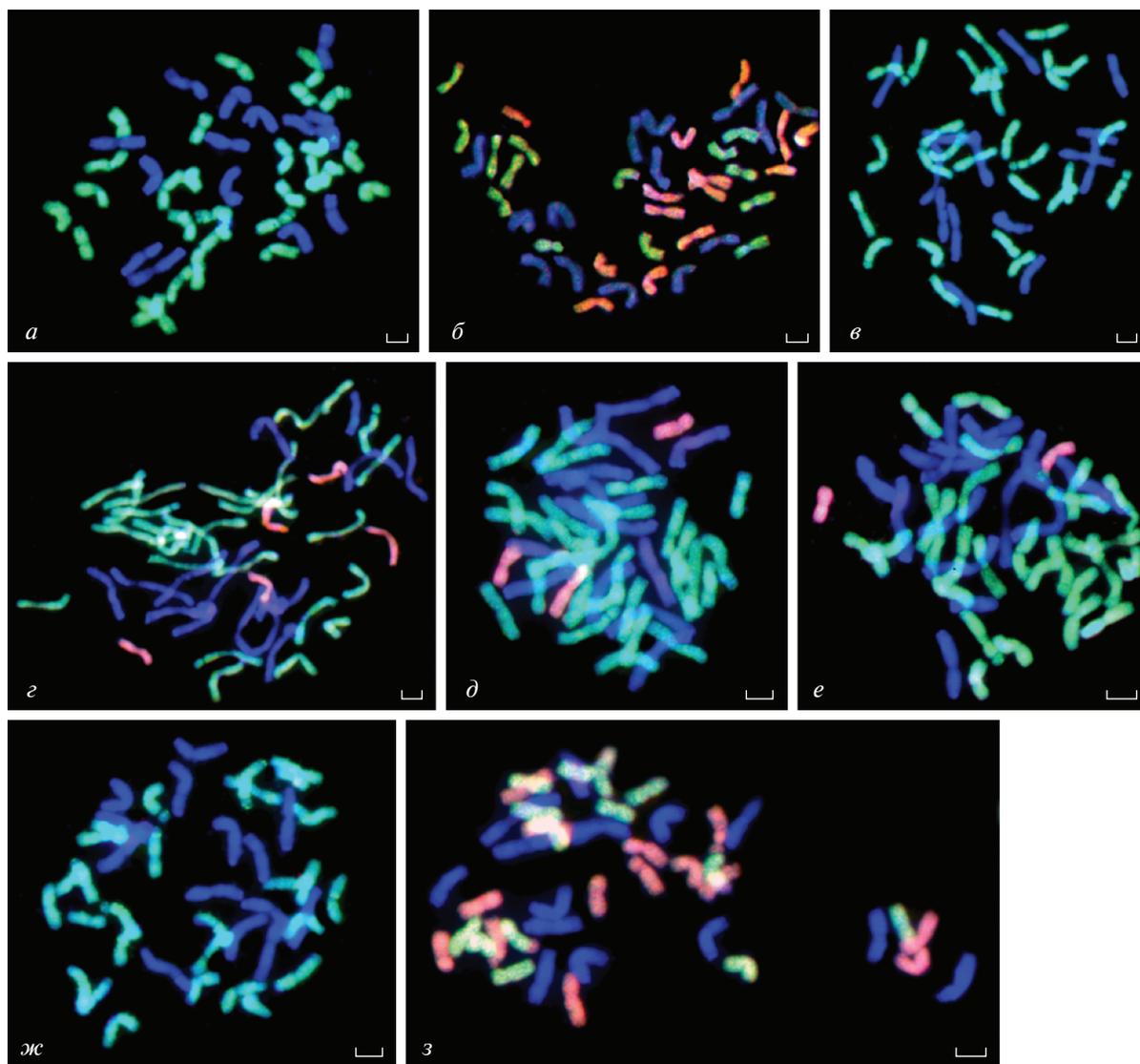


Рис. 1. Геномный состав пшенично-ржаных линий различных комбинаций скрещивания: результаты GISH с дифференциально мечеными ДНК геномов пшеницы, в качестве блокирующей использована ДНК генома R ржи (DAPI). *a, б* – F₄ [*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень]: GISH с ДНК геномов АВ *T. durum* (DIG – зеленая метка) и D *Ae. tauschii* (BIO – красная метка) – 28 хромосом геномов А и В, 14 хромосом генома R ржи, хромосомы генома D не выявлены (*a*); GISH с ДНК геномов А *T. monococcum* (DIG – зеленая метка) и В *Ae. speltooides* (BIO – красная метка) – идентифицировано по 14 хромосом геномов А (DIG – зеленая метка), В (BIO – красная метка) пшеницы и 14 хромосом генома R ржи (*б*); *в* – линия 473 – F₇ [*T. aestivum* Л_{к-61263} × *S. cereale* Ильмень]: GISH с ДНК геномов АВ *T. durum* (DIG – зеленая метка) и D *Ae. tauschii* (BIO – красная метка) – идентифицировано 28 хромосом геномов А и В, 14 хромосом генома R ржи; *г, д, e* – линия 447 (F₆ *T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434): GISH с ДНК геномов АВ *T. durum* (DIG – зеленая метка) и D *Ae. tauschii* (BIO – красная метка) – идентифицировано 28 хромосом геномов А и В, 14 хромосом генома R, различное число хромосом генома D: 5 (*г*), 3 (*д*) и 2 (*e*) у разных растений; *ж, з* – линия 453 (F₆ *T. aestivum* Л9-ХСР × *S. cereale* Л434): GISH с ДНК геномов АВ *T. durum* (DIG – зеленая метка) и D *Ae. tauschii* (BIO – красная метка) – 28 хромосом геномов А и В, 14 хромосом генома R (*ж*); GISH с ДНК геномов А *T. monococcum* (DIG – зеленая метка) и В *Ae. speltooides* (BIO – красная метка) – идентифицировано по 14 хромосом геномов А и В пшеницы и генома R ржи (*з*).

редукционно-эквационный тип, и лишь единичные микроспороциты имели эквационный тип деления.

Считают, что межродовая гибридизация является стрессовым фактором и уже на ранних стадиях приводит к быстрым геномным изменениям,

проявляющимся в увеличении транспозиционной активности, элиминации повторяющихся последовательностей ДНК, появлению хромосомных перестроек, потере и дупликации хромосом, активации и подавлении экспрессии генов, структурно-функциональной дивергенции гомеоло-

гичных генов [32, 33]. Благодаря генетическим изменениям у создаваемых аллополиплоидных форм стабилизируются геномы, восстанавливается фертильность и расширяется адаптационный потенциал. Экспериментально доказано, что у пшенично-ржаных форм геном R ржи подвержен большей реорганизации, чем геномы A и B пшеницы [34], в то время как хромосомы генома D преимущественно элиминируются. Элиминацию хромосом объясняют несовместимостью геномов D и R в генотипической среде мягкой пшеницы [31, 35].

Созданные нами первичные гексаплоидные пшенично-ржаные линии уже в ранних поколениях были цитологически стабильными, имели геномный состав BBAARR. Исключением была линия 447, отобранная в комбинации скрещивания (*T. aestivum* Л27-ХСР × *S. cereale* Л434). У этой линии в F₆ наряду с 42-хромосомными растениями с геномным составом BBAARR были выявлены анеуплоиды с 43–47 хромосомами, содержащие от одной до пяти хромосом генома D. В проведенном дополнительном изучении растений F₂ этой комбинации скрещивания было обнаружено одно октаплоидное (BBAADDDR) растение. Принимая во внимание этот факт, можно предположить, что линия 447 могла быть создана на основе такой гибридной формы и в F₆ еще сохранились растения с хромосомами генома D.

Об элиминации полного генома D у октаплоидных пшенично-ржаных гибридов, полученных с участием пшеницы из Китая, сообщали разные авторы [36, 37]. Процесс элиминации сопровождается утратой многих ценных для селекции аллелей генов, которую обычно возмещают, проводя беккроссы с мягкой пшеницей или октаплоидными формами тритикале [35, 37]. Полученные нами первичные гексаплоидные гибриды F₆–F₈ с геномами B и A от озимой мягкой пшеницы из Китая и R от диплоидной ржи были цитологически стабильными (за исключением одной линии), фертильными, высокозимостойкими и продуктивными в условиях Северо-Западного региона РФ. Учитывая низкую зимостойкость взятых в скрещивания родительских форм Л_{к-61263} и Л27-ХСР, можно предположить, что высокий уровень перезимовки первичных пшенично-ржаных гибридных линий, по-видимому, контролируется генетическим материалом ржи, а производных от высокозимостойкой линии Л9-ХСР — генетическим материалом и мягкой пшеницы, и ржи. Показано, что в хромосоме 5A мягкой пшеницы, в которой локализован ген *Kr2*, расположены гены морозостойкости (*Frost resistance*) — *Fr-A1* и *Fr-A2*, а в хромосоме 5B — гомеологичные им гены *Kr1* и *Fr-B1* [38, 39].

В целом созданные нами пшенично-ржаные линии, содержащие генетический материал B и A

геномов местной озимой мягкой пшеницы из Китая и геном R ржи посевной, являются принципиально новыми формами и могут быть использованы в селекции пшеницы и тритикале как источники новой генетической изменчивости.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2019-0006 “Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”, номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР АААА-А16-116040710373-1, а также на базе уникальной научной установки “Коллекция генетических ресурсов растений ВИР”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. He Z.H., Rajaram S., Xin Z.Y., Huang G.Z. (eds). A History of Wheat Breeding in China. Mexico: D.F. CIMMYT, 2001. 95 p. <https://pdfs.semanticscholar.org/9e3e/cd41c29ee0b9921b52dc0b3adddcd6593c36.pdf>
2. Zhou Y., Chen Zh., Cheng M. et al. Uncovering the dispersion history, adaptive evolution and selection of wheat in China // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. № 1. P. 280–291. <https://doi.org/10.1111/pbi.12770>
3. Вавилов Н.И. Мировые ресурсы хлебных злаков. Пшеница. М.; Л.: Наука, 1964. 67 с.
4. Molnar-Lang M. The crossability of wheat with rye and other related species // Wheat-perennial Triticeae Introgressions: Major Achievements and Prospects. Springer, 2015. P. 103–120. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6_4
5. Hao M., Luo J., Yang M. et al. Comparison of homoeologous chromosome pairing between hybrids of wheat genotypes Chinese Spring ph1b and Kaixian-luohanmai with rye // Genome. 2011. V. 54. № 12. P. 959–964. <https://doi.org/10.1139/g11-062>
6. Wu J., Kong X., Wang J. et al. Dominant and pleiotropic effects of a *GAI* gene in wheat results from a lack of interaction between DELLA and GID1 // Plant Physiology. 2011. V. 157. P. 2120–2130. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185272>
7. Zhang H., Gao M., Wang S. et al. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) // Front Plant Sci. 2015. V. 6. Article 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00470>

8. Xue S., Li G., Jia H. et al. Fine mapping Fhb4, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. № 1. P. 147–156. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1298-5>
9. Xue S., Xu F., Tang M. et al. Precise mapping Fhb5, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 123. № 6. P. 1055–1063. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1647-z>
10. Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. № 3. P. 400–409. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0095-z>
11. Пюккенен В.П. Коллекция мягкой пшеницы по признаку хорошей скрещиваемости с рожью // Вавиловская междунар. конф. “Генетические ресурсы культурных растений в XXI в.: состояние, проблемы, перспективы”. СПб.: ВИР, 2007. С. 583–585.
12. Blum A. The abiotic stress response and adaptation of *Triticale*. A Review // Cereal Res. Comm. 2014. V. 42. № 3. P. 359–375. <https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.3.1>
13. Limin A.E., Dvorak J., Fowler D.B. Cold hardiness in hexaploid *Triticale* // Can. J. Plant Sci. 1985. V. 65. P. 487–490.
14. Стёпочкин П.И. Формообразование в популяциях тритикале, пшеницы, ржи и его использование для условий Западной Сибири: Дис. ... д-ра с.-х. наук. Новосибирск: ГНУ СибНИИРС, 2008. 372 с.
15. Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев Е.В. и др. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале. (Методические указания) / Под ред. Мережко А.Ф. СПб.: ВИР, 1999. 82 с.
16. Погода и климат. Климатический монитор. Санкт-Петербург. <http://www.pogodaiklimat.ru/monitor.php?id=26063>.
17. Широкий унифицированный классификатор СЭВ рода *Triticum* L. / Под ред. Корнейчук В.А. Ленинград, 1989. 42 с.
18. Wienand U., Feix G. Zein specific restriction enzyme fragments of maize DNA // FEBS Lett. 1980. V. 116. P. 14–16. [https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1016/0014-5793\(80\)80518-7](https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1016/0014-5793(80)80518-7)
19. Leitch A., Schwarzacher T., Jacson D., Leitch I. *In situ* Hybridization: A Practical Guide. Oxford, BIOS Sci. Publ., 1994. 118 p.
20. Pendinen G., Gavrilenko T., Spooner D.M., Jiang J. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization // Genome. 2008. V. 51. P. 714–720. <https://doi.org/10.1139/G08-052>
21. Грабовец А.И., Фоменко М.А. Создание и внедрение сортов пшеницы и тритикале с широкой экологической адаптацией // Зернобобовые и крупяные культуры. 2013. № 2. С. 41–47. <https://journal.vniizbk.ru/ru/backup/13-22013.html>
22. Пюккенен В.П., Пендинен Г.И. Получение стабильных аллополиплоидных линий на основе частично фертильных гибридов F₁ пшеницы *Triticum aestivum* L. происхождением из Китая с рожью *Secale cereale* L. // Сб. статей междунар. научно-практ. конф. “Научное обеспечение агропромышленного комплекса на современном этапе”. Ростов-на-Дону: Рассвет, 2015. С. 37–44.
23. Alfares W., Bouguennec A., Balfourier F. et al. Fine mapping and marker development for the crossability gene *SKr* on chromosome 5BS of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genetics. 2009. V. 183. № 2. P. 469–481. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107706>
24. Cai H., Liu C. Characterizing the sequences of Kr gene in different genotypes of common wheat // *Triticaceae Genomics and Genetics*. 2012. V. 3. № 4. P. 38–43. <https://doi.org/10.5376/tgg.2012.03.0004>
25. Manickavelu A., Koba T., Mishina K. Molecular characterization of crossability gene Kr1 for intergeneric hybridization in *Triticum aestivum* (Poaceae: Triticeae) // *Plant Systematics and Evolution*. 2009. V. 278. № 1. P. 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0139-3>
26. Lein A.D. Die genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen // *Zeitschrift für inductive Abstammungs- und Vererbungslehre*. 1943. V. 81. № 1. S. 28–61.
27. Логинова Д.Б., Силкова О.Г. Митотическое поведение центромер в мейозе как механизм восстановления фертильности у пшенично-ржаных амфигаплоидов // *Генетика*. 2014. Т. 50. № 8. С. 930–939. <https://doi.org/10.7868/S001667581407011X>
28. Silkova O.G., Adonina I.G., Krivosheina E.A., Shchapova A.I. Chromosome pairing in meiosis of partially fertile wheat-rye (ABDR) hybrids // *Plant Reproduction*. 2013. V. 26. P. 33–41. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0207-2>
29. Cai X., Xu S.S., Zhu X. Mechanism of haploidy-dependent unreductional meiotic cell division in polyploidy wheat // *Chromosoma*. 2010. V. 119. № 3. P. 275–285. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0256-y>
30. Xu S.J., Joppa L.R. First-division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa* // *Plant Breeding*. 2000. V. 119. № 3. P. 233–241. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00472.x>
31. Li H., Guo X., Wang C., Ji W. Spontaneous and divergent hexaploid *Triticale* derived from common wheat × rye by complete elimination of D-genome chromosomes // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120421>
32. Щербань А.Б. Реорганизация генома растений в ходе аллополиплоидизации // *Вавиловский журн. генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 2. С. 277–285.
33. Kalinka A., Achrem M. Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid *triticale* (× *Triticosecale*) // *Planta*. 2018. V. 247. № 4. P. 807–829. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2827-0>
34. Ma X.F., Gustafson J.P. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in *Triticale* // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. № 6. P. 825–832. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm331>

35. Dou Q., Tanaka H., Nakata N., Tsujimoto H. Molecular cytogenetic analyses of hexaploid lines spontaneously appearing in octoploid *Triticale* // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 114. P. 41–47.
<https://doi.org/10.1007/s00122-006-0408-x>
36. Hao M., Luo J., Zhang L. et al. Production of hexaploid triticale by a synthetic hexaploid wheat-rye hybrid method // *Euphytica*. 2013. V. 193. P. 347–357.
<https://doi.org/10.1007/s10681-013-0930-2>
37. Hills M.J., Halli L.M., Messenger F. et al. Evaluation of crossability between triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) and common wheat, durum wheat and rye // *Environ. Biosafety Res.* 2007. V. 6. Issue 4. P. 249–257.
<https://doi.org/10.1051/ebr:2007046>
38. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. 12th Intern. Wheat Genetics Symp. Yokohama, Japan, 2013 // *Wheat Genetic Resources Database KOMUGI*. 2013. Available on line at <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/>.
39. Motomura Y., Kobayashi F., Iehisa J.C.M., Takumi S. A major quantitative trait locus for cold-responsive gene expression is linked to frost-resistance gene Fr-A2 in common wheat // *Breeding Sci.* 2013. V. 63. P. 58–67.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.58>

Features of Primary Hybrids Obtained in Crosses between Common Wheat from China and Cultivated Rye

V. P. Pyukkenen^a, G. I. Pendinen^a, and O. P. Mitrofanova^{a,*}

^a*Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia*

^{*}*e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru*

The gene pool of winter common wheat from China, maintained at the VIR collection, is unique in its diversity of alleles responsible for valuable traits and properties from pointstand of breeding. Our previous studies revealed among the winter common wheat the accessions which characterized by high crossability with rye and were poor winter-hardy in most cases. In order to involve this material in Russian breeding, wheat-rye hybrids were produced and a directional selection was carried out for winter hardiness and high productivity in a number of subsequent generations from selfing of hybrids. Evaluation of the F₁ hybrids in the autumn-winter seeding in the climatic conditions of the North-West region of the Russian Federation (t. Pushkin) revealed their differences in viability, winter hardiness and F₂ seed setting. The subsequent directional individual selection on high overwintering and productivity in F₂–F₇ hybrid selfing populations led to the producing of primary hexaploid wheat-rye lines ($2n = 6x = 42$, BBAARR). Characteristics of 17 lines are given in the article. The statistically significant heterogeneity of the lines according to the studied traits is shown using the rank criterion (H) of Kruskal–Wallis Test. Using the method of genomic in situ hybridization, all lines revealed the elimination of the D genome chromosomes and the presence of the complete genomes B, A, and R. Along with hexaploid plants, forms containing additionally from one to five chromosomes of the D genome were found in one of the highly fertile lines. The produced primary winter-hardy and highly productive hexaploid wheat-rye lines are a new initial material for wheat and triticale breeding.

Keywords: the VIR wheat collection, *T. aestivum*/*S. cereale* hybrids, fertility, winter hardiness, GISH, genome identification.