

КОЗУБ Н.О.^{1,2}✉, СОЗІНОВ І.О.¹, БІДНИК Г.Я.^{1,2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1,2}, БЛЮМ Я.Б.², СОЗІНОВ О.О.²

¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua, natalkozub@gmail.com

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

✉ natalkozub@gmail.com, (097) 212-40-89, (044) 257-22-58

ПЕРЕХРЕСНЕ ЗАПИЛЕННЯ У ПШЕНИЦІ *TRITICUM AESTIVUM* L. ТА ЇЇ ДИКОГО РОДИЧА *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Триба *Triticeae* включає види з різними типами запилення – від перехресно запилюваних видів із самонесумісністю (наприклад, жито *Secale cereale* L.) до видів із клейстогамією (самозапилення в закритій квітці), – як, наприклад, у деяких видів роду *Hordeum* [1]. Більшість видів роду *Aegilops* L. є самозапилюваними [2]. Пшениця м'яка *Triticum aestivum* L. (AABBDD) є самозапилюваним видом, однак у нього може відбуватися перехресне запилення з низькою частотою [3]. Якщо звичайно частота перехресного запилення становить від кількох десятків відсотка до кількох відсотків [3–11], то в деякі роки у певних генотипів вона може зростати до 10 % і вище [3]. Найбільш поширеним типом цвітіння егілопсів і пшениці є відкрите цвітіння (хазмогамія), але в певних умовах можливе закриті цвітіння (клеистогамія) та поєднання цих типів залежно від розміщення квіток у колосі [2, 3, 12]. При відкритому цвітінні завдяки набуханням лодикул розкриваються луски, одночасно з цим лопаються пиляки, і тільки після цього тичинкові нитки викидають їх назовні [2, 12]. При цьому частина пилку потрапляє на приймочку своєї квітці, а частина висипається у повітря. Від 30 до 80 % пилку висипається за межі квітці, що дає потенційну можливість до перехресного запилення [12]. Крім того, показано несинхронність дозрівання приймочок і пиляків [13] у бокових квіток колоска, ці ж квітці цвітуть частіше хазмогамно, тоді як внутрішні квітці з найвищим рівнем синхронності – клейстогамно [3, 13].

У певних генотипів *T. aestivum* виявлено підвищений рівень перезапилення. Це сорти озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією 1BL/1RS Миронівська 10 (2,6 %), Миронівська низькоросла (3,6 %), Миронівська

26 (5,0 %), Миронівська 60 (4,4 %) [4], канадські ярі сорти Oslo (6,1 %) [6], Glinlea (10,6 %), Wildcat (6,3 %) [10]. При дослідженні трансгенних ліній пшениці також виявлено різницю в частоті перехресного запилення. Так, лінії сорту Bobwhite з трансгеном *Pm3b* частіше перезапилувалися (порівняно з відповідним нетрансгенним сортом) [14]. У нашій попередній роботі показано залежність рівня перезапилення від дози 1BL/1RS [15]. Рівень перезапилення швидко зменшується з віддаленням від джерела пилку [7, 8]. Важливою характеристикою з практичної точки зору є максимальна відстань від запилювача, на якому детектується перезапилення. Так, для сортів Katerwa і Biggar, максимальною відстанню, на якій детектувалося перезапилення, було 3 м від запилювача, тоді як для сортів Oslo і Roblin – 27 м [7]. У роботі Hanson et al., [9] максимальною відстанню, на якій був виявлений потік пилку (перезапилення), було 42 м. Veckie et al. [16] виявили перезапилення на відстані 80 м від поля з запилювачем. У дослідженні [8] Matus-Cadriz et al. випадок перезапилення був виявлений на відстані 300 м від джерела пилку. Більше того, в огляді [3] згадується випадок, коли пилки було виявлено за 1000 м від джерела пилку.

Основними погодними факторами, що впливають на частоту перезапилення, є температура повітря, вологість, а також опади та сила вітру (на максимальну відстань детекції перезапилення) [17].

Перехресне запилення є одним із факторів збільшення різноманітності в популяціях самозапильних видів, появи нових асоціацій генів. Частота перехресного запилення в природних популяціях *Aegilops biuncialis* раніше не досліджувалася. Завданням нашого дослідження був

аналіз показників перезапилення у рослин *T. aestivum* залежно від умов вирощування та в природних популяціях її дикого родича *Ae. biuncialis*.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугувала популяція рослин F₂ озимої м'якої пшениці від реципрокного схрещення Б-16 х Одеська червоноколоса (зерна F₃ з окремих рослин). Популяцію було вирощено на дослідній ділянці широкорядним посівом по сусідству з іншим матеріалом пшениці (сорт, лінії, гібридні популяції) в 2003–2004 р. – Селекційно-генетичний інститут НААН (СГІ), м. Одеса (940 рослин F₂) – блоками, що чергуються. Блок включав по одному 3-м ряду кожного напрямку. Крім того, для аналізу було використано дані для популяцій, вирощених на дослідних ділянках в м. Києві в 2003–2004 р. (756 рослин F₂) та м. Одесі (2000 р., 1329 рослин F₂), опубліковані раніше [15]. Матеріал зерен F₂, з якого були вирощені популяції рослин у м. Києві і м. Одесі в 2004 р., має ідентичне походження: зерна з рослин F₁ були змішані та розділені на рівні частини для посіву в двох зонах. Схему вирощування матеріалу популяцій Київ 2004 і Одеса 2000 надано в [15].

Також аналізували зразки *Ae. biuncialis* із 12 популяцій з різних регіонів Криму: східної частини ареалу – Кара-Даг (KD1, KD2, KD3), Ечки-Даг (ED1), південної – Мис Мартьян (MM1, MM2), західної – Берегове (BD97, BD1-3, BD5), Піщане (P1-3, P4) Бахчисарайського р-ну, південно-західної – Севастополь (HS).

Електрофорез гліадинів окремих зернівок проводили за методикою [18]. Електрофорез високомолекулярних субодиниць глютенінів у присутності додецилсульфату натрію проводили за методикою Laemmli в 10 % розділяючому гелі [19]. З окремого колоса *Ae. biuncialis* для аналізу брали одну зернівку. З кожної рослини F₂ пшениці аналізували методами електрофорезу 5–30 окремих зернівок F₃. Аелі основних локусів гліадинів ідентифікували за каталогом [20]. Б-16 несе житню 1BL/1RS транслокацію, маркером якої є аель *Gli-B1* (*Gli-B1-3*) [20]. Генотип зернівок записували з врахуванням дози гена, де дві перші букви позначають генотип яйцеклітини, а третя – генотип яйцеклітини, що сформувала зернівку.

Перехресне запилення у пшениці детектували за присутністю зернівок із нетиповим генотипом за їх пилковим компонентом на росли-

ні F₂ [15]. Для характеристики рівня перезапилення визначали такі показники: частота рослин, на яких відбулося перезапилення (OCplant, %), частота перезапилення (OC, % = (сумарне число зернівок, що зав'язалися в результаті перезапилення, виявлене серед перших п'яти проаналізованих зернівок із рослини / загальне число проаналізованих рослин × 5) × 100); інтенсивність перезапилення (OCI, % = (сумарне число зернівок із перезапиленням / загальне число зернівок, проаналізованих із рослин із перезапиленням) × 100) [15]. Перехресне запилення у *Ae. biuncialis* визначали як відношення числа гетерозигот за 1–4 локусами запасних білків *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* до загальної кількості проаналізованих зерен.

Результати та обговорення

Як маркерні локуси для детекції перезапилення у *T. aestivum* і *Ae. biuncialis* використовували локуси запасних білків.

Серед проаналізованих 940 рослин F₂ Б-16 х Одеська червоноколоса популяції Одеса 2004 перезапилення виявлено на 77 рослинах. У загальній вибірці перших п'яти зерен, проаналізованих з кожної рослини, було 66 зернівок, сформованих у результаті перезапилення. Для визначення інтенсивності перезапилення з рослин із виявленими випадками перезапилення було проаналізовано сумарно 1476 зернівок, з яких 140 виявилися результатом перезапилення. Отже, частота перезапилення в сумарній реципрокній популяції рослин F₂ була 1,4 %, перезапилення детектовано у 8,2 % рослин F₂, а інтенсивність перезапилення на цих рослинах становила 9,5 %.

У цій популяції не виявлено достовірних відмінностей за показниками перехресного запилення між групами рослин із різними генотипами за маркерним локусом *Gli-B1* для сумарної реципрокної популяції рослин F₂ (табл. 1), на відміну від аналогічної популяції, вирощеної в інших умовах [15], де показники перезапилення залежали від дози житнього плеча 1RS. Так, в популяції Київ 2004 частота перезапилення у гомозигот за пшенично-житньою транслокацією (10,9 %) була в 5 разів вищою, ніж частота у гомозигот без транслокації (2,2 %), рівень перезапилення у гетерозиготи був проміжним – 4,9 % [15]. Однак у популяції Одеса 2004 також спостерігається подібна тенденція відносної величини перезапилення у цих трьох генотипів.

Таблиця 1. Показники перезапилення у рослин F₂ реципрочної комбінації схрещення Б-16 × Одеська червоноколоса з різними генотипами за локусом *Gli-B1* (Одеса, 2003–2004)

Генотип	OC ± SE, %	OCplant ± SE, %	OCI ± SE, %
<i>Gli-B1l.l.</i>	1,89 ± 0,47	9,47 ± 2,25	10,75 ± 1,85
<i>Gli-B1l.c.</i>	1,41 ± 0,24	8,28 ± 1,25	9,54 ± 1,03
<i>Gli-B1c.c.</i>	1,11 ± 0,28	7,29 ± 1,53	8,46 ± 1,41

У табл. 2 наведено показники перезапилення в трьох популяціях рослин F₂ від реципрочного схрещення Б-16 × Одеська червоноколоса, вирощених у різні роки в різних місцевостях. Найвищі значення перезапилення спостерігалися в популяції м. Києва, 2003–2004, найнижчі – у популяції м. Одеси (1999–2000). Відмін-

ності за частотою перезапилення та часткою рослин з перезапиленням між трьома популяціями є істотними (P < 0,001). Також інтенсивність перезапилення в популяції м. Києва (2004 р) істотно вища, ніж у двох популяціях, вирощених в м. Одесі (P < 0,001).

Таблиця 2. Показники перезапилення у рослин F₂ реципрочної комбінації схрещення Б-16 × Одеська червоноколоса, вирощених у різних умовах

Місце, рік вирощування	OC ± SE, %	OCplant ± SE, %	OCI ± SE, %
Київ, 2004	5,11 ± 0,36	16,27 ± 1,34	26,05 ± 1,19
Одеса, 2004	1,40 ± 0,17	8,19 ± 0,89	9,49 ± 0,76
Одеса, 2000	0,33 ± 0,07	2,18 ± 0,40	9,50 ± 1,60

Відмінності в показниках перезапилення в популяціях рослин F₂ в різні роки в різних місцевостях (Київ, 2004 та Одеса, 2000, 2004) свідчать про значний вплив погодних факторів на частоту перезапилення пшениці, яка може мінятися, за нашими даними, від 0,5 (Одеса, 2000) до 11 % (Київ, 2004, гомозиготи за 1BL/1RS транслокацією) [15]. Тому присутність житньої транслокації не є достатньою умовою для підвищеного рівня перезапилення. Результати нашого дослідження вказують на те, що відмінності за рівнем перезапилення залежно від генотипу (присутності житньої транслокації) реалізуються лише при сприятливих для відкритого цвітіння погодних умовах.

Із літератури відомо, що ступінь перезапилення (потіку генів за допомогою пилку) у пшениці залежить від таких факторів навколишнього середовища, як температура повітря, вологість, опади, інтенсивність світла; ці факто-

ри впливають на ступінь відкриття квіток, тривалість сприйнятливості приймочкою пилку, кількість викинутих пиляків, кількість вивільненого пилку, час життєздатності пилку [3, 12, 17]. Тому нами було проаналізовано погодні умови під час цвітіння досліджених популяцій (за даними Держкомгідромету) (табл. 3).

Піком цвітіння досліджуваних популяцій були перша декада червня в умовах м. Києва та остання декада травня в умовах м. Одеси (на основі багаторічного досвіду гібридизації цих сортів). Порівняння показників погодних умов показало, що в 2004 році погодні умови під час цвітіння в м. Києві суттєво відрізнялися за кількістю опадів та відносною вологістю повітря (табл. 3), тоді як середня декадна температура була близькою. Більша частота перезапилення спостерігалася в умовах м. Києва при низькій вологості повітря (51 %) та повній відсутності опадів у досліджувану декаду.

Таблиця 3. Метеорологічні показники в період масового цвітіння рослин Одеська червоноколоса × Б-16 та показник перезапилення

Місце, рік	Пік цвітіння	Середня декадна температура, °С	Сума опадів, мм	Вологість, %	OC, %
Київ, 2004	1 декада червня	16,7	0	51	5,11
Одеса, 2004	3 декада травня	15,1	69	80	1,40
Одеса, 2000	3 декада травня	19,1	21	67	0,33

Можна припустити, що посуха під час цвітіння виявилася головним фактором підвищення частоти перезапилення. Тільки при наявності цього фактора проявляється вплив іншого фактора – генотипу (присутності житньої 1BL/1RS транслокації в певній дозі) – на частоту перезапилення.

Оскільки погодні умови варіюють з року в рік, вони є випадковими факторами, що не піддаються регулюванню. Очевидно, що в окремі роки можуть скластися умови, що сприяють максимальному рівню перезапилення (як, наприклад, Київ, 2004). Можливість перезапилення необхідно враховувати при вирощуванні ко-

лекційних зразків, ліній-диференціаторів рас збудників хвороб, ліній з інтрогресіями тощо, оскільки в певних умовах до 30 % рослин можуть перезапилюватися, і тоді до 30 % зерен із таких рослин можуть бути результатом перехресного запилення.

Ae. biuncialis відноситься до самозапильних видів егілопсів, однак йому притаманне відкрите цвітіння [2], що може призводити до перехресного запилення в окремих випадках. У більшості популяцій *Ae. biuncialis* нами були виявлені гетерозиготи за 1–4 локусами запасних білків, що свідчить про перехресне запилення в популяціях (табл. 4).

Таблиця 4. Чисельність гетерозигот за локусами запасних білків та частоти перехресного запилення в кримських популяціях *Ae. biuncialis*

Популяція	Проаналізовано зерен	Число гетерозигот	Частота перезапилення, %
KD1	46	6	13,04
KD2	46	1	2,17
KD3	89	1	1,12
ED1	88	6	6,82
MM2	88	1	1,14
MM1	88	–	0
BD97	88	3	3,41
BD1-3	90	7	7,78
BD5	83	7	8,43
P1-3	84	3	3,57
P4	36	3	8,33
HS	88	2	2,27
Усього	914	40	4,38

Частота перезапилення в популяціях *Ae. biuncialis* коливається від 0 в популяції MM1 до 13 % в популяції KD1. У середньому для загальної вибірки зразків *Ae. biuncialis* Криму частота перезапилення становить $4,38 \pm 0,14$ %. Така частота перезапилення подібна до частоти перезапилення у м'якої пшениці [3–11]. Виявлені коливання частоти перезапилення в різних популяціях *Ae. Biuncialis*, найбільш імовірно, пояснюються різницею в погодних умовах під час цвітіння в різні роки в різних місцевостях, хоча не можна не враховувати і фактор генотипу.

Висновки

Із використанням запасних білків як генетичних маркерів виявлено значні відмінності в частоті перезапилення у пшениці м'якої – від

0,3 до 11 %, залежно від умов року та дози транслокації 1BL/1RS. Показано, що частота перезапилення у пшениці залежить, в першу чергу, від умов року, і відмінності між генотипами за перезапиленням реалізуються тільки в сприятливих для цього умовах. Високий рівень перезапилення спостерігався в умовах низької вологості і відсутності опадів, що дозволяє припустити, що посуха при помірних температурах у період цвітіння може сприяти перехресному запиленню. При цьому інтенсивність перезапилення виявилася високою – на рослині, в якій виявлено факт перезапилення, 20–30 % зерен сформувалися у результаті перехресного запилення.

Частота перезапилення у середньому становить 2,3 % у *T. aestivum* і 4,38 % – в *Ae. biuncialis* у природних популяціях.

Література

- Campbell C.S. Cleistogamy in grasses // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* – 1983. – V. 14. – P. 411–441.
- Богуславский р.Л., Голик О.В. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции. – Харьков, 2004. – 236 с.
- Waines J.G., Hegde S.G. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers // *Crop Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 451–463.
- Колючий В.Т., Животков Л.А., Созинов А.А. Полиморфизм глиадина и различная способность к спонтанному перепылению у сортов пшеницы мироновской селекции // Докл. ВАСХНИЛ. – 1987. – N 4. – С. 5–7.
- Martin T.J. Outcrossing in twelve hard red winter wheat cultivars // *Crop Sci.* – 1990. – V. 30. – P. 59–62.
- Hucl P. Out-crossing rates for 10 Canadian spring wheat cultivars // *Can. J. Plant Sci.* – 1996. – V. 76. – P. 423–427.
- Hucl P., Matus-Cadriz M. Isolation distances for minimizing out-crossing in spring wheat // *Crop Sci.* – 2001. – V. 41. – P. 1348–1351.
- Matus-Cadriz M.A., Hucl P., Horak M.J., Blomquist L.K. Gene flow in wheat at the field scale // *Crop Sci.* – 2004. – V. 44. – P. 718–727.
- Hanson B.D., Mallory-Smith C.A., Shafii B., Thill D.C., Zemetra R.S. Pollen-mediated gene flow from blue aleurone wheat to other wheat cultivars // *Crop. Sci.* – 2005. – V. 45. – P. 1610–1617.
- Lawrie R.G., Matus-Cadriz M.A., Hucl P. Estimating out-crossing rates in spring wheat cultivars using the contact method // *Crop Sci.* – 2006. – V. 46. – P. 247–249.
- Miroshnichenko D., Pushin A., Dolgov S. Assessment of the pollen-mediated transgene flow from the plants of herbicide resistant wheat to conventional wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Euphytica.* – 2016. – V. 209, N 1. – P. 71–84.
- De Vries A.Ph. Flowering biology of wheat, particularly in view of hybrid seed production – A review // *Euphytica.* – 1971. – V. 20. – P. 152–170.
- Lukac M., Gooding M.J., Griffiths S., Jones H.E. Asynchronous flowering and within-plant flowering diversity in wheat and the implications for crop resilience to heat // *Ann. Bot.* – 2012. – V. 109, N 4. – P. 843–850.
- Rieben S., Kalinina O., Schmid B., Zeller S.L. Gene flow in genetically modified wheat // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6, N 12. – e29730. doi: 10.1371/journal.pone.0029730.
- Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А. Зависимость показателей перекрестного опыления от генотипических особенностей у мягкой пшеницы // *Цитология и генетика.* – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 87–93.
- Beckie H.J., Warwick S.I., Hall L.M., Harker K.N. Pollen-mediated gene flow in wheat fields in Western Canada // *AgBioForum.* – 2012. – V. 15, N 1. – P. 36–43.
- Gustafson D.I., Horak M.J., Rempel C.B., Metz S.G., Gigax D.R., Hucl P. An empirical model for pollen-mediated gene flow in wheat // *Crop. Sci.* – 2005. – V. 45. – P. 1286–1294.
- Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A., Kolyuchii V.T., Kuptsov S.V., Sozinov A.A. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine // *Цитология и генетика.* – 2009. – V. 43, № 1. – С. 69–77.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227, N 5259. – P. 680–685.
- Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat // *J. Genet. Breed.* – 1991. – V. 45. – P. 325–344.

KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, BIDNYK H.Ya.^{1,2}, DEMIANOVA N.A.^{1,2}, BLUME Ya.B.², SOZINOV A.A.²

¹ *Institute of Plant Protection, NAAS,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: sia1@i.com.ua, natalkozub@gmail.com

² *Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,*

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

CROSS-POLLINATION IN WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L. AND ITS WILD RELATIVE *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Aim. The aim of the study was analysis of outcrossing indices in *Triticum aestivum* L. plants depending on growth conditions and in natural populations of its wild relative *Aegilops biuncialis* Vis. using storage proteins as genetic markers. **Methods.** SDS and APAG electrophoresis was used to identify genotypes at the *Glu-1* and *Gli-1* loci for single seeds from F₂ plants of *T. aestivum* and in samples from natural populations of *Ae. biuncialis*. **Results.** In *T. aestivum*, significant differences in the frequency of cross-pollination were revealed, from 0.3 to 11 % depending on year's conditions and the dose of the 1BL/1RS translocation. The high outcrossing rate was observed under low humidity and the absence of precipitations. The frequency of cross-pollination is, on average, 2.3 % in *T. aestivum* and 4.38 % in *Ae. biuncialis*. **Conclusions.** Differences in outcrossing indices between genotypes with different doses of 1BL/1RS are realized only in certain conditions: drought at moderate temperatures favors cross-pollination. The rate of outcrossing is similar in *T. aestivum* and *Ae. biuncialis*.

Keywords: cross-pollination, *Triticum aestivum* L., *Aegilops biuncialis* Vis, storage proteins.