

Міністерство аграрної політики та продовольства України
Одеський державний аграрний університет

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насі́ннєзнавства та сортовивчення

УДОСКОНАЛЕНА ТЕХНОЛОГІЯ
СЕЛЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ
З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ
І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Науково-методичний посібник

Одеса 2016

Представлені результати досліджень з розробки та адаптації біотехнологічних методів отримання подвоєних гаплоїдів та молекулярного маркування в оптимальному поєднанні з модифікованими традиційними методами для вирішення конкретних задач селекції пшениці м'якої озимої.

Удосконалена технологія селекційного процесу скорочує термін створення нових сортів і вихідного матеріалу на 4-5 років, а ефективність селекційної роботи підвищується на 20-30%.

Науково-методичний посібник призначений для наукових працівників, які спеціалізуються в галузі селекції, генетики та біотехнології рослин, студентів вищих навчальних закладів.

Автори:

М. А. Литвиненко, д.с.-г.н., академік НААН

М. М. Топал, к.с.-г.н.

О. Л. Шестопа, к.б.н.

І. С. Замбріборщ, к.б.н.

О. В. Галаєв, к.б.н.

Рецензенти:

к.с.-г.н., доцент **В. І. Зорунько**

к.б.н. **І. І. Моцний**

Друкується за рішенням вченої ради СГІ – НЦНС
(протокол №7 від 09.03.2016 р.)

© Селекційно-генетичний інститут –
Національний центр насіннєзнавства
та сортовивчення (СГІ – НЦНС), 2016

Зміст

Список використаних скорочень	4
Вступ	5
1. Генетичні маркери в селекції рослин	7
1.1. Класичні маркери.	7
1.1.1. Морфологічні маркери	7
1.1.2. Біохімічні маркери.	8
1.2. Молекулярні маркери.	9
1.2.1. ПЛР-маркери.	11
1.2.2. Транскриптомний аналіз.	12
1.2.3. Переваги застосування молекулярних маркерів в селекційному процесі.	12
1.3. Молекулярні маркери в МАВ.	13
1.3.1. MAS-підхід у доборі батьків для схрещування і індивідуальних рослин в F ₁₋₆	13
1.3.2. Перспективи та проблеми МАВ-підходів.	14
1.4. Практичні результати використання МАВ у СГІ – НЦНС.	14
2. Технологія отримання подвоєних гаплоїдів, як один з основних методів біотехнології в селекції пшениці м'якої озимої.	19
2.1. Отримання подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої шляхом культури ізольованих пиляків.	20
2.1.1. Умови вирощування донорних рослин м'якої пшениці.	21
2.1.2. Добір матеріалу озимої м'якої пшениці в культуру пиляків <i>in vitro</i>	22
2.2. Отримання подвоєних гаплоїдів методом гаплопродюсера .	22
2.3. Практичні результати використання подвоєних гаплоїдів у схемі селекційного процесу у відділі селекції та насінництва пшениці СГІ – НЦНС.	25
3. Удосконалення схеми селекційної роботи із застосуванням біотехнологічних методів	32
Список літератури.	38

Список використаних скорочень

ПЖТ	пшенично-житня транслокація
РЛ	рекомбінантна лінія
ДЛ	дигаплоїдна лінія
КС	комбінація схрещування
СГІ – НЦНС	Селекційно генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення
НААН	Національна академія аграрних наук України
од.	одеська
Ер.	еритроспермум
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
МAB	(marker-assisted breeding) – селекція за допомогою молекулярних маркерів
MAS	(marker-assisted selection) – добір за допомогою молекулярних маркерів
MAI	(marker-assisted introgression) – інтрогресія за допомогою молекулярних маркерів
MABC	(marker-assisted beccrossing) – бекросування за допомогою молекулярних маркерів
MARS	(marker-assisted recurrent selection) – рекурентний добір за допомогою молекулярних маркерів
QTL	(quantitative trait loci) – локуси кількісних ознак

Вступ

Терміном «біотехнологія» в широкому розумінні визначають сукупність методів для виробництва нових видів продукції з використанням різних біологічних об'єктів. Традиційна селекція сільськогосподарських культур є також біотехнологічним процесом на основі існуючих методів створення генетичного різноманіття, оцінки та добору бажаних генотипів. Через недосконалість цих методів створення нового сорту самозапилюючих культур триває 10-12 років і більше й базується в основному на комбінації генів, які ідентифіковані в колекційних і селекційних зразках.

Застосування внутрішньовидової та віддаленої гібридизації в селекції рослин завжди супроводжується найскладнішими обмежувачими проблемами: передача бажаних генів з небажаними; введення одного цінного гена супроводжується втратою іншого; щеплення генів ускладнює можливості відокремлення позитивних ознак від шкідливих. Тому основним завданням для селекціонера є поєднання в одному генотипі якомога більшої кількості цінних ознак і властивостей.

У пошуку сортоутворюючих рекомбінантів селекціонер вивчає матеріал у великих обсягах (десятки тисяч номерів), досягаючи гомозиготності (однорідності) багаторазовим пересівом гібридів, створюючи відповідні фони добору. Керування спадковістю та добір за генотипом здійснюються у вузьких межах, а індукція нових генів з допомогою фізичних і хімічних мутагенних факторів взагалі є некерованим процесом. Більшість експериментальних мутацій є наслідком складних хромосомних перебудов, які призводять до зниження життєздатності рослин і їхньої генетичної стабільності. Надзвичайно рідко виникають позитивні мутації. Як правило, вони супроводжуються плейотропними ефектами негативних спадкових змін. Розірвати цей зв'язок надзвичайно складно.

Проте багато з цих питань вже вирішуються за допомогою сучасної біотехнології, яка базується на методах ДНК-технології та культури тканин і органів *in vitro*. ДНК-технології включають методи генно-інженерної модифікації рослин і використання молекулярних маркерів.

Технології генної інженерії дають змогу передавати один або кілька генів від одного генотипу до іншого, причому донор і реципієнт не обов'язково мають бути одного виду чи таксону. Це різко збільшує різноманіття за певними ознаками, прискорює процес отримання рослин із заданими властивостями, а також, що особливо важливо, забезпечує можливість відстежувати генетичні зміни та їхні наслідки.

Технології отримання подвоєних гаплоїдів *in vitro* в селекції пшениці базуються на методах андрогенезу (андроклінії) в культурі пиляків і мікроспор та гіногенезу за культивування незапліднених

насінневих зачатків, гаплопродюсерного методу. Дані методи дають можливість отримати від гібридів гомозиготні рослини з новими цінними ознаками за короткий термін.

Отже, ці досягнення біологічної науки відкривають нові можливості удосконалення технології селекційного процесу різних сільськогосподарських культур, в т. ч. пшениці м'якої озимої. Провідні наукові центри світу та селекційні компанії постійно ведуть науковий пошук підвищення ефективності селекційної роботи, доповнюючи традиційні методи новими біотехнологічними та молекулярно-генетичними. У цих установах стали рутинними методи отримання подвоєних гаплоїдів андрогенної індукції за допомогою гаплопродюсерів у кількості від однієї до кількох тисяч регенерантів. На базі дигаплоїдів формуються селекційні процеси з пшениці м'якої озимої в Угорському інституті сільськогосподарських досліджень (м. Мартонвашар), у французькій компанії «Лімагрейн», в німецькій компанії «Штрубе» і т. д.

Протягом останніх 10 років у провідних наукових центрах і компаніях Західної Європи, США, Австралії набули широкого використання в селекції пшениці молекулярні маркери (marker assisted breeding). Обсяги напрацювання різних молекулярних маркерів досягають десятків ознак пшеничної рослини, а сам процес маркування здійснюється на автоматичних лініях з продуктивністю декілька сотень аналізів за робочий день.

Для проведення біотехнологічних і молекулярних досліджень необхідно мати підготовлених спеціалістів, сучасне обладнання, прилади і реактиви, налагоджений синтез праймерів, що на сьогодні є достатньо коштовним. Тому в наукових установах НААН України, які проходять складний період реформування, не завжди є можливості проведення таких досліджень. В Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення дослідження культури клітин і тканин *in vitro*, розробка методів отримання подвоєних гаплоїдів у пшениці проводиться понад 40 років, а вивчення геному та ДНК технологій – майже 50 років. У цих напрямках робіт інститут має вагомий результати і, безумовно, є лідером не тільки в Україні.

Метою даних методичних рекомендацій є узагальнення перших результатів адаптації біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів у селекційний процес пшениці м'якої озимої у відділі селекції та насінництва пшениці СГІ – НЦНС і доведення до селекціонерів цієї культури, вчених біологів, студентів інформації про практичні можливості підвищення ефективності селекційної роботи за рахунок оптимального поєднання традиційних і нових методів.

1. Генетичні маркери в селекції рослин

Потенційна цінність генетичних маркерів та непрямого добору в селекції рослин була відома протягом більш ніж 80 років. Однак завдяки прогресу у дослідженні молекулярної організації і мінливості геному та з появою маркерних технологій стало можливим значно підвищити ефективність сільськогосподарського виробництва. Використання технології ДНК-маркування значно скорочує об'єми селекційного матеріалу і час отримання сортів та сприяє добору генотипів з цільовими генами в гомозиготному стані.

Селекція за допомогою молекулярних маркерів (marker-assisted breeding (MAB) визначається як застосування молекулярних біотехнологій, зокрема молекулярних маркерів, для зміни й поліпшення рослинних або тваринних ознак на основі генотипового аналізу. Термін MAS використовується для опису кількох сучасних селекційних стратегій: добір за допомогою молекулярних маркерів (MAS); інтрогресія за допомогою молекулярних маркерів (MAI); використовують також термін MABC- бекросування за допомогою молекулярних маркерів; рекурентний добір за допомогою молекулярних маркерів (MARS); створення піраміди генів за допомогою молекулярних маркерів (MAGP) [1]. Однією з головних вимог для застосування молекулярних маркерів у селекції є наявність самих цих маркерів, зчеплених або асоційованих з цільовим геном/генами.

Генетичний маркер відповідає гену, алелі якого мають чітко виражені відмінності на рівні фенотипу (для морфологічних маркерів), білкового продукту (для біохімічних маркерів) і ДНК (для молекулярних маркерів). Генетичні маркери можна розділити на дві категорії: класичні маркери і ДНК-маркери (синоніми – молекулярні маркери, молекулярно-генетичні маркери) [2]. Класичні маркери включають морфологічні, цитологічні, фізіологічні і біохімічні маркери. Є цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні: аналіз поліморфізму довжин фрагментів рестрикції (ПДФР) і аналіз поліморфізму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

1.1. Класичні маркери

1.1.1. Морфологічні маркери

Селекція рослин базується на варіабельності фенотипових ознак, яка виступає необхідною умовою для добору. Традиційно різноманітність в середині популяцій і між популяціями, сортами, лініями селекціонер визначає за допомогою оцінки морфологічних відмінностей (морфологічних маркерів). Морфологічні маркери легко

доступні, не потребують для їхньої ідентифікації складного обладнання, дають найбільш повне вимірювання показників фенотипу і прийнятні для безпосереднього використання. Найбільш вдалий приклад використання морфологічних маркерів в селекції, що сприяло успіху в отриманні високоврожайних сортів, є добір напівкарликових генотипів у пшениці.

Однак морфологічні маркери, схильні до дії факторів довкілля, можуть розрізнятися на різних стадіях розвитку, їхня кількість обмежена; також багато з цих маркерів не пов'язані з важливими сільськогосподарськими ознаками (наприклад, врожайністю і якістю) [3].

1.1.2. Біохімічні маркери

Суттєвий прогрес у селекції та генетиці рослин досягнутий застосуванням біохімічних (білкових) маркерів. Використання їх для ідентифікації генів пов'язано з появою високочутливих методів їхнього аналізу: електрофорезу, ізоелектрофокусування [4], а також з успіхами у вивченні фізико-хімічних властивостей та характеристик білків [5].

Основа для використання білоккодуєчих генів в якості маркерів була закладена завдяки інтенсивному використанню нулітетрасомних і дітелосомних ліній сорту Chinese Spring для хромосомної локалізації генів і кластерів генів, що контролюють синтез ферментів і запасних білків. Понад півтори сотні структурних генів, що кодують білки, прив'язані до певних хромосом пшениці [6].

Білкові маркери з успіхом використовуються для ідентифікації міксортного заміщення хромосом у пшениці [7, 8], для виявлення чужорідних хромосом і сегментів хромосом, переданих їй при гібридизації з іншими видами, а також для вивчення походження пшениці м'якої та її родичів.

Одним з перших прикладів використання генів біохімічних ознак для аналізу хромосомної конституції продуктів віддаленої гібридизації може служити вивчення рослинного матеріалу, одержаного від схрещування з м'якою пшеницею амфідиплоїда (*T. turgidum* × *Ae. ventricosa*). Тоді була вперше показана можливість використання біохімічних маркерів для ідентифікації чужорідного генетичного матеріалу, включеного в геном пшениці [9].

Є чимало прикладів успішного застосування біохімічних маркерів при ідентифікації чужорідних транслокацій. Один з них – ідентифікація пшенично-житніх транслокацій та заміщень на різних ділянках пшеничних хромосом [10, 11].

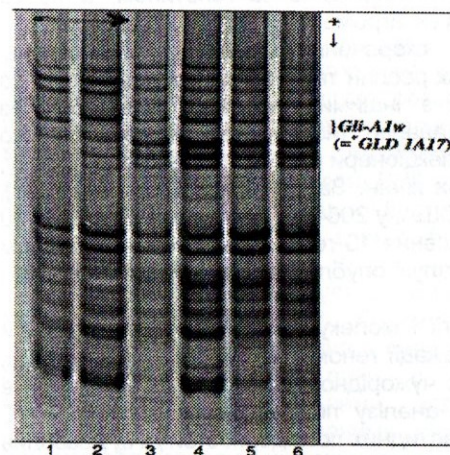


Рис. 1. Електрофореграма гліадинів пшениці м'якої озимої (Козуб та ін., 2010): 1 – Безоста 1; 2 – *Gli-B1-4*; 3 – Богданка; 4 – *Amigo*; 5 – Богданка; 6 – 7086AR. Білки алеля *Gli-A1w* (*GLD1A17*) характерні для сорту *Amigo* та сортів, що несуть транслокацію 1AL/1RS

Біохімічні маркери мають наступні властивості: 1) алельні варіанти завжди пов'язані зі зміною нуклеотидної послідовності ділянки гена, яка кодує синтез

білка; 2) зазвичай відома хромосомна локалізація генів; 3) досліджувані білки традиційно мають добре вивчену біохімічну функцію.

Однак біохімічні маркери мають ряд обмежень: 1) різні ділянки геному, а отже, і локалізовані в них гени, еволюціонують з різною швидкістю і для того, щоб маркувати складні полігенні ознаки, необхідно провести аналіз численних білків, кодованих різними хромосомами; 2) аналізом електрофореграм одного типу білків можна отримати деяке уявлення про генетичну подібність певної ознаки, але встановити діапазон кількісної мінливості генотипів вельми складно; 3) електрофоретична рухливість молекул білка не завжди може служити показником їхньої ідентичності, оскільки білкові молекули різного походження в процесі еволюції могли конвергентно набути однакового заряду; 4) гени, що кодують білки, у більшості вищих рослин представляють незначну частину геному, тому використання даних електрофоретичного аналізу білків має обмежені можливості.

Незважаючи на ці обмеження, генетично детермінований поліморфізм білків, що виявляється електрофоретично, використовується ефективно і у даний час для цілей селекції [10, 12].

1.2. Молекулярні маркери

Останніми роками використання молекулярних маркерів є одним з основних методів скорочення обсягів селекційного опрацювання генетичного матеріалу шляхом видалення небажаних генотипів у ранніх генераціях гібридів. Будучи зчепленими з генами, які відповідають за прояв найважливіших господарсько цінних ознак сільськогосподарських

рослин, вони дозволяють достовірно провести добір на рівні окремої рослини або селекційної лінії безпосередньо за генотипом, а не за фенотипом, який модифікується дією агрометеорологічних факторів.

При цьому можливе скорочення періоду досліджень, застосуванням аналізу вегетуючих рослин та отриманням результату до збирання врожаю в порівнянні з іншими методами (електрофорез запасних білків, гібридологічний аналіз). Молекулярні маркери широко використовують у своїй роботі селекціонери США, Європейського Союзу, Австралії, Японії, Китаю та інших країн. За даними J. Dubcovsky [13], програма «MAS wheat», що діє в США, у 2004 р. охоплювала близько 430 проектів, спрямованих на перенесення 43 генів у 75 батьківських форм пшениці. Світові розробки в цій галузі опубліковано в наукових працях і базах даних мережі Інтернет.

Успіхи молекулярної біології і молекулярної генетики дозволили розробити нові підходи в ідентифікації геномів, хромосом, їхніх ділянок, цільових генів і алелів, а також чужорідного генетичного матеріалу в зв'язку з введенням у практику аналізу поліморфізму геномної ДНК. Аналіз поліморфних ділянок нуклеотидних послідовностей ДНК дозволив практично вирішувати багато недоступних білковим та цитологічним маркерам проблем і охопити весь геном, включаючи як структурні, так і неструктурні ділянки. Крім того, прояв молекулярних маркерів нейтральний стосовно до фенотипу та їх можна виділити на будь-якій стадії розвитку рослин [14].

Є цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні: 1) аналіз поліморфізму довжин фрагментів рестрикції (ПДРФ); 2) аналіз поліморфізму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); і 3) транскриптомний аналіз.

ПДРФ-маркери – перше покоління ДНК-маркерів. ПДРФ виявляють у досліді з ДНК-гібридизації як зміни довжини фрагментів ДНК після розщеплення ферментами рестрикції. Ця методика заснована на варіації в послідовності ДНК, яка призводить до зміни або зникнення сайтів рестрикції або містить інсерції/делеції ДНК між сайтами [15].

S. Tanksley був першим, хто оцінив потенційні переваги добору за генотипом і в 1983 році одночасно з J. Beckmann запропонував використовувати ДНК-маркери (а саме ПДРФ-маркери) в селекції рослин [16].

Однак широкомасштабне застосування ДНК-маркерів у селекційних програмах, спрямованих на поліпшення м'якої пшениці, відбулося не в епоху ПДРФ-маркерів (через низький рівень поліморфізму ДНК, що виявляється ПДРФ-аналізом у м'якої пшениці, високу вартість і необхідність використання радіоактивно чи флуоресцентно мічених проб та вимогу великих кількостей високоочищеної ДНК), а з появою більш дешевих і зручних у застосуванні ПЛР-маркерів [17].

1.2.1. ПЛР-маркери

У порівнянні з ПДРФ, методи з використанням ПЛР вирізняються більшою чутливістю, швидкістю аналізу, можливістю роботи з невеликою кількістю ДНК і, часто, кращою роздільною здатністю. В основі ПЛР лежить ампліфікація окремих фрагментів ДНК *in vitro* за допомогою коротких олігонуклеотидів (праймерів). За кілька годин можна розмножити певну послідовність ДНК у кількості, що перевищує вихідну в мільйон разів і більше. Ампліфіковані продукти ПЛР визначають і аналізують звичайним електрофорезом в агарозному або поліакриламідному гелі (рис. 2).

На даний час налічується кілька десятків типів молекулярних маркерів на основі ПЛР. Однак серед ПЛР-маркерів найбільш придатними для використання в селекційних програмах є SSR-, CAPS-, SCAR-маркери, оскільки вони є переважно геномспецифічними, монолокусними, поліалельними, кодомінантними. Велика кількість зазначених маркерів, за даними літературних джерел, локалізована поблизу або всередині цільових генів.

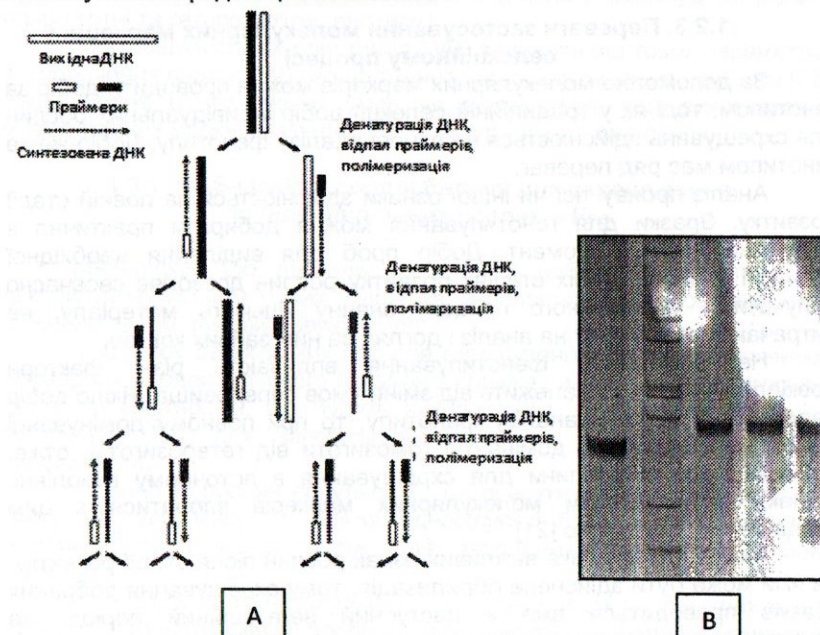


Рис. 2. Схематичне зображення ПЛР. А – перші цикли ПЛР; В – результат електрофоретичного розподілення продуктів ПЛР

1.2.2. Транскриптомний аналіз

Транскриптомний аналіз передбачає використання ДНК-мікрочипів (DNA microarray). ДНК-мікрочип являє собою скляну основу з упорядкованими рядками. На чип можуть бути нанесені унікальні клони комплементарної ДНК (кДНК) від 10 до 15 тисяч. Фрагменти кДНК на чипі геноспецифічні, розмір їх варіює в межах 200-2500 нуклеотидів [18,19]. Із тканин рослини виділяється інформаційна РНК, на основі якої за допомогою реакції зворотної транскрипції синтезується кДНК, при цьому використовують синтетичні олігонуклеотиди, які мічені флуоресцентною міткою. Зразок кДНК являє собою суміш транскриптів більшості генів, які активно експресуються на певному етапі онтогенезу рослин або при дії певного патогену [20]. При гібридизації такого зразка на мікрочип мічені транскрипти генів утворюють дуплекс з кДНК, яка закріплена на мікрочипі. За інтенсивністю флуоресценції можна визначити рівень експресії кожного гена в тканинах рослини на зміну умов середовища [19].

1.2.3. Переваги застосування молекулярних маркерів у селекційному процесі

За допомогою молекулярних маркерів можна проводити добір за генотипом, тоді як у традиційній селекції добір індивідуальних рослин для схрещувань здійснюється на основі аналізу фенотипу. Добір же за генотипом має ряд переваг.

Аналіз прояву тієї чи іншої ознаки здійснюється на певній стадії розвитку. Зразки для генотипування можна добирати практично в будь-який зручний момент. Добір проб для виділення необхідної кількості ДНК на ранніх стадіях розвитку рослин дозволяє своєчасно вилучати з селекційного процесу значну кількість матеріалу, не витрачаючи при цьому на аналіз і догляд за ним зайвих коштів.

На результати фенотипування впливають різні фактори довкілля. Генотип не залежить від зміни умов середовища. Якщо добір ведеться на підставі аналізу фенотипу, то при повному домінуванні неможливо відрізнити домінантні гомозиготи від гетерозигот і, отже, добирати окремі рослини для схрещування в поточному поколінні. Однак, застосуванням молекулярних маркерів впоратися з цим завданням доволі легко [21].

Аналізується низка важливих ознак рослин після стадії розвитку, на якій може бути здійснена гібридизація, тому схрещування добраних зразків проводиться вже в наступний вегетаційний період. За молекулярними маркерами можна отримати інформацію про ознаку вже на ранніх стадіях розвитку, дібрати відповідні пари й здійснити

гібридизацію в поточному поколінні, що також прискорює селекційний процес.

1.3. Молекулярні маркери в МАВ

Впровадження молекулярних маркерів у традиційну схему селекції потребує проведення попередніх досліджень з вивчення їхньої ефективності при відборі та розробці індивідуальної методики з конкретної селекційної програми.

Важливою передумовою використання МАВ є дотримання основних вимог щодо молекулярних маркерів:

1. Зчеплення або асоціація з цільовим геном (перевірка дійсності, заявленої в літературних джерелах, зчеплення (асоціація) молекулярного маркера з цільовим геном або чужорідною транслокацією у рослинному матеріалі, який планується використовувати в селекційних програмах.

2. Специфічність (здатність молекулярного маркера ідентифікувати тільки цільовий ген).

3. Кодомінантність (здатність молекулярного маркера розрізняти гомозиготні та гетерозиготні генотипи).

Рентабельність використання МАВ залежить від трьох параметрів: 1) скорочення вартості; 2) заощадження часу; 3) отримання прибутку [22]. Якщо жодна із зазначених умов не виконується, тоді використання молекулярних маркерів в селекційних програмах не має сенсу.

1.3.1. MAS-підхід у доборі батьків для схрещування та індивідуальних рослин в F₁₋₆

MAS-підхід, що дозволяє проводити добір за генотипом при використанні молекулярних маркерів зчеплених або асоційованих з цільовим геном, використовують для:

1. Добору батьківських пар для схрещування. Перевірка наявності маркерних алелей цільового гена/генів і оцінка однорідності батьківських форм за маркерами, що будуть використані у подальшому доборі в популяціях F₁₋₆, для запобігання отриманню хибних гібридів при схрещуванні.

2. Аналізу рослин популяції F₁ на присутність маркерних алелей (якщо не здійснювалась оцінка однорідності батьків за маркерними алелями), проводиться також для запобігання отримання хибних гібридів.

3. Аналізу рослин популяцій F₂₋₃ за генотипом та фенотипом для добору індивідуальних рослин, що несуть цільовий маркерний алель/алелі та інші бажані ознаки.

4. Аналізу рослин популяцій F₄₋₆ для добору індивідуальних рослин, гомозиготних за маркерним алелем/алелями, із наступним

проведенням фенотипової оцінки цільової ознаки та інших агрономічно важливих ознак, що цікавлять селекціонера.

MAS частіше використовують для поліпшення моно- або олігогенних ознак, ніж для полігенних (кількісних). Це пов'язано з тим, що кількісні ознаки контролюються значною кількістю генів або QTLs.

1.3.2. Перспективи та проблеми МАВ-підходів

В останні два десятиліття велика кількість закордонних селекційних установ доволі широко використовують молекулярні маркери для підвищення ефективності добору в селекції та скорочення часу отримання сортів, ліній. В Україні впровадження молекулярних маркерів у селекційний процес відбувається надто повільно, що пов'язано, в основному, з неузгодженими діями селекціонерів та молекулярних генетиків (селекціонер не розуміє, як ефективно використовувати у своїй роботі дані, отримані за допомогою ДНК-маркування, а молекулярний генетик не знає, які саме ознаки будуть цікавити селекціонера при створенні майбутніх сортів). Тому селекціонер при доборі, як завжди, використовує «чуття», а молекулярному генетику залишається досліджувати сорти, лінії (кінцеві продукти селекції) і констатувати наявність у них тих чи інших генів, алелів. Але все ж у СГІ – НЦНС тісно співпрацює відділ загальної та молекулярної генетики з відділом селекції та насінництва пшениці, де інтенсивно впроваджується використання ДНК методів у насінництві та селекції як на ранніх, так і завершальних етапах.

1.4. Практичні результати використання МАВ у СГІ – НЦНС

У відділі загальної та молекулярної генетики виконується ряд спільних програм з іншими відділами СГІ – НЦНС, пов'язаних з детекцією у геномі пшениці генів стійкості до хвороб, чутливості до яровизації та фотоперіоду, морозостійкості, проростання на пні та чужорідного генетичного матеріалу від споріднених видів (табл. 1).

Таблиця 1
Маркери до генів, які використовуються у дослідженні геному пшениці у відділі загальної та молекулярної генетики

Ген	Ознака, транслокація	Маркери до генів і алелів
1	2	3
<i>Ppd-D1</i>	чутливість до фотоперіоду	<i>Ppd-D1a</i> , <i>Ppd-D1b</i> , <i>Ppd-D1d</i>
<i>Vrn-A1</i>	чутливість до яровизації	<i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-A1b</i> , <i>Vrn-A1c</i>
<i>Rht</i>	короткостебловість	<i>Rht-D1b</i> , <i>Rht-B1b</i> , <i>Rht8c</i>
<i>Wx</i>	синтез амілози	<i>Wx-A1</i> , <i>Wx-B1</i> , <i>Wx-D1</i>

Продовження таблиці 1

1	2	3
<i>Lr</i>	стійкість до бурої листової іржі ✓	<i>Lr9</i> (транслокація <i>Ae. umbellulata</i>); <i>Lr19</i> , <i>Lr24</i> (транслокація <i>Agropyron elongatum</i>); <i>Lr21</i> , <i>Lr41</i> , <i>Lr42</i> (транслокація <i>Ae. tauschii</i>); <i>Lr26</i> (транслокація <i>Secale cereale</i>); <i>Lr37</i> (транслокація <i>Ae. ventricosa</i>); <i>Lr10</i> , <i>Lr20</i> , <i>Lr22a</i> , <i>Lr34</i> , <i>Lr1</i> , <i>Lr13</i> , <i>Lr32</i> , <i>Lr39</i> , <i>Lr53</i>
<i>Sr</i>	стійкість до стеблової іржі	<i>Sr24</i> , <i>Sr25</i> (транслокація <i>Agropyron elongatum</i>); <i>Sr31</i> , <i>Sr36</i> (транслокація <i>T. timopheevi</i>); <i>Sr2</i> .
<i>Pm</i>	стійкість до борошнистої роси	<i>Pm4a</i> (транслокація <i>T. dicoccum</i>); <i>Pm8</i> (транслокація <i>Secale cereale</i>); <i>Pm35</i> (транслокація <i>Ae. tauschii</i>); <i>Pm37</i> (транслокація <i>T. timopheevi</i>); алелі гена <i>Pm3</i> ; <i>Pm17</i> ; <i>Pm34</i>
<i>Bt</i>	стійкість до твердої сажки, що перенесена від <i>Aegilops cylindrica</i>	<i>Bt_{new}</i> – <i>Xgwm259-1BL</i>
<i>Fr</i>	морозостійкість	<i>Xcfd7-5BL</i> , <i>Xwms182-5D</i> , <i>Xbarc330-5A</i> , <i>Xwmc415-5B</i> , <i>Xgprw3191-5B</i>
<i>Lr, Sr, Pm</i>	житні транслокації 1RS/1AL, 1RS/1BL та модифікована транслокація 1RS/1BL	<i>Rems1303</i> , <i>SR1R003</i> , <i>Taglut</i> , <i>Taglgap</i> , <i>Xwmc9</i>
<i>Tsn</i>	стійкість до <i>Pirenophora tritici</i>	<i>Tsn1</i> , <i>Tsn2</i>
<i>MFT</i>	стійкість до проростання насіння в колосі	<i>taMYB-10-3A</i> (<i>Lp7/Rp4</i>)

Експеримент 1

У СГІ – НЦНС з 2011 року виконується спільна робота між відділами селекції та насінництва пшениці, загальної та молекулярної генетики та лабораторією культури тканин зі створення вихідного селекційного матеріалу з житніми транслокаціями 1AL/1RS та 1BL/1RS (Литвиненко, 2014).

На гібридах F₂ від парних схрещувань різних генетичних джерел пшенично-житньої транслокації 1AL/1RS – сорти Смуглянка, Княгиня Ольга, Золотоколоса та Вихованка одеська з сортами СГІ – НЦНС Дюк, Польовик, Епоха одеська, Ліра одеська було виявлено ефективність добору генотипів пшениці м'якої озимої за ПЖТ 1AL/1RS із застосуванням молекулярних маркерів на ранніх етапах

селекційного процесу за рахунок видалення гетерозиготних рослин. Так, з 300 зразків було видалено 146 (48,6%) гетерозиготних рослин за ПЖТ 1AL/1RS, 74 рослини (24,7%) з транслокацією в гомозиготному стані та 80 рослин (26,7%) за її відсутності. За таких співвідношень ефективність добору гомозиготних рослин за транслокацією та її відсутністю склала 51,4%. Проте, якщо використовувати маркування за кількома ознаками, то об'єм скорочення матеріалу буде набагато вищий.

Крім цього, виконана робота з виділення генотипів з транслокаціями у співвідношенні 1AL/1RS, 1BL/1RS, 1BL/1RSm (модифікація) та подвійними транслокаціями 1AL/1RS-1BL/1RS, 1AL/1RS-1BL/1RSm (модифікація) у популяціях F_2 за допомогою молекулярних маркерів. На цих рослинах проведено структурний аналіз елементів продуктивності, та кожна рослина окремо оцінена на стійкість до бурі, стеблової іржі на комплексному інфекційному фоні (рис. 3). Надалі, частина ліній з цього матеріалу, які мають селекційну цінність (стійкість до хвороб, урожайність, якість зерна і т. д.), проходять подальше вивчення у відділі селекції та насінництва пшениці.

Експеримент 2

Рекомбінантно-інбредні лінії (RIL) F_7 Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса та їхні батьківські форми аналізовано за 43 мікросателітними локусами, що локалізовані на хромосомах п'ятої гомеологічної групи. Виявлено нові мікросателітні локуси, пов'язані з морозостійкістю пшениці м'якої озимої, а саме Xbarc330-5A (хромосома 5A), Xwmc415-5B, Xgprw3191-5B, Xcfd7-5B (хромосома 5B) та Xgwm182-5D (хромосома 5D). Локуси Xwmc415-5B, Xgprw3191-5B, Xcfd7-5B та Xgwm182-5D асоціюються з морозостійкістю проростків. З морозостійкістю рослин у фазі кушіння в середині зими пов'язані локуси Xwmc415-5B та Xgprw3191-5B, а наприкінці зими – локуси Xbarc330-5A та Xcfd7-5B [23]. Ідентифіковані генотипи біля 200 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження та різних років створення за алелями локусів Xcfd7-5B та Xgwm182-5D, що пов'язані з морозостійкістю RIL пшениці, визначені частоти генотипів та алелів і показана різна селекційна цінність певних генотипів для конкретних регіонів вирощування [24].

У селекційних програмах на підвищення адаптивних властивостей рослин до умов перезимівлі при доборі батьківських пар для схрещувань рекомендується використовувати носіїв null-алеля локусу Xcfd7-5B та алеля 165 п. н. локусу Xgwm182-5D, що забезпечує більш високу стійкість генотипу до низьких температур.



Рис. 3: 1 – маркування рослин F_2 в польових умовах для виявлення ПЖТ 1AL/1RS методом ПЛР-аналізу; 2 – вибірка гетерозиготних рослин за результатами ПЛР-аналізу та строгий контроль при здійсненні структурного аналізу рослин F_2

Експеримент 3

Здійснена детекція алелів генів, що зумовлюють стійкість до проростання насіння в колосі. Проростання насіння у колосі є негативним явищем, яке призводить до значного зниження технологічної якості, погіршення посівних властивостей. Відомо, що стійкість до проростання насіння в колосі пшениці м'якої детермінується великою кількістю QTL. Серед значної кількості QTL, алельний стан яких впливає на стійкість до проростання насіння в колосі, відомі мажорні QTL та деякі конкретні гени: *Viviparous1*, *MFT* (кодують транскрипційні фактори MYB-родини) та *TaMYB-10* (контролюють забарвлення оболонки насіння). Ідентифіковано два алелі гена *MFT* у сортах СГІ – НЦНС. Виявлено достовірний зв'язок алельного стану гена *MFT* на стійкість до проростання у колосі. Ідентифіковано два алелі гена *Viviparous1-B*. Достовірною зв'язку алельного стану гена *Viviparous1-B* на стійкість до проростання у колосі не виявлено. Виявлено рецесивний алель гена *TaMAB-10-3A* у сортах м'якої пшениці селекції СГІ – НЦНС.

Експеримент 4

У СГІ – НЦНС спільно відділами селекції та насінництва пшениці і загальної та молекулярної генетики впроваджується MAS-підхід для добору індивідуальних рослин, що несуть цільовий ген/гени у гібридних популяціях F_{2-3} . Показана ефективність використання молекулярних маркерів при доборі індивідуальних рослин за одним, двома та більше цільовими генами (табл. 2).

Отже, проведені дослідження в інституті із застосування молекулярних маркерів у практичній роботі зі створення сортів та вихідного матеріалу пшениці показали, що їхнє використання може істотно підвищити ефективність і полегшити роботу селекціонера. З появою на ринку нового високопродуктивного обладнання для генотипування селекційного матеріалу ці аналізи істотно дешевшають, що дозволяє ширше впроваджувати їх у рутинну селекційну роботу. Необхідно також відзначити, що повноцінна робота з впровадження молекулярних маркерів потребує вивчення нових об'єктів з урахуванням вимог конкретної селекційної програми. Це можуть бути господарсько цінні ознаки з іще не з'ясованою генетичною основою, не вивчені алельні варіації місцевого генетичного фонду і т. д. Подібні роботи фундаментального характеру під замовлення прикладної наукової програми потребують комплексного підходу і мобілізації новітніх досягнень в галузі генетики, біотехнології, молекулярної біології та селекції. Тільки спільними зусиллями фахівців цих та інших галузей науки можна буде повноцінно використовувати всі переваги молекулярних маркерів для вирішення практичних завдань з виведення нових сортів сільськогосподарських культур.

Таблиця 2

Ефективність використання маркерів при доборі гомозиготних рослин за цільовим(и) геном/генами у популяціях F_{2-3}

Ген/гени	Кількість рослин, шт.		Кількість дібраних гомозиготних рослин			
			у популяціях F_2		у популяції F_3	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Lr34	200	100	50	25	60	30
Lr34+Lr24	200	100	12	6	22	11
Lr34+Lr24+Lr ^{Amigo}	200	100	3	1,5	6	3

2. Технологія отримання подвоєних гаплоїдів як один з основних методів біотехнології в селекції пшениці м'якої озимої

Для розширення генетичного різноманіття пшениці м'якої озимої селекціонери використовують різні методи зі створення гомогенного/однорідного селекційного матеріалу. При створенні гомозиготних/однорідних генотипів традиційними методами селекції (масовий та індивідуальний відбір, метод педігрі, бекроси) потрібно здійснювати кілька циклів інбридингу і добору. Виділення гомогенних/однорідних генотипів за допомогою добору є найбільш трудомістким і дорогим етапом будь-якої селекційної програми, оскільки в пошуках сортоутворюючих рекомбінантів селекціонер вивчає генетичний матеріал у великих обсягах (десятки тисяч номерів). При цьому добір гомозиготних ліній, в залежності від особливостей генетичного контролю ознак і властивостей, відбувається надзвичайно рідко і більшість відібраних ліній містять деяку кількість гетерозиготних локусів [25]. Щоб скоротити час отримання гомозиготного генетичного матеріалу або сорту була розроблена технологія отримання подвоєних гаплоїдів [26,27].

Дигаплоїдні лінії викликають великий інтерес у генетиків і селекціонерів через їхню повну гомозиготність, коротку тривалість створення (1-2 роки). У даний час технологію подвоєних гаплоїдів використовують у всьому світі (ЄС, Канада, Австралія, США, Китай тощо) для створення чистих ліній і сортів сільськогосподарських культур. Наприклад, у Китаї виведено сотні сортів рису і пшениці з використанням цієї технології впродовж останніх 15 років [26, 28].

Деякі дослідники [29] вважають, що технологія подвоєних гаплоїдів має кілька переваг порівняно з традиційними методами. Дигаплоїдна популяція часто використовується у генетичних дослідженнях, що включають створення молекулярних карт, локалізацію локусів, відповідальних за якісні і кількісні ознаки (QTL), перенесення цінних ознак при віддаленій гібридизації, розвиток зародкової плазми, а також в галузі геноміки та інших молекулярних дослідженнях [30]. Якщо молекулярні маркери використовуються для ідентифікації генів, контролюючих цінні ознаки, то технології отримання подвоєних гаплоїдів використовуються для досягнення гомозиготності. Поєднання цих методів зменшує час створення сорту і значно підвищує ефективність селекційної роботи. Геном пшениці А було секвіновано, використовуючи дигаплоїдну популяцію (рис.4) [31].

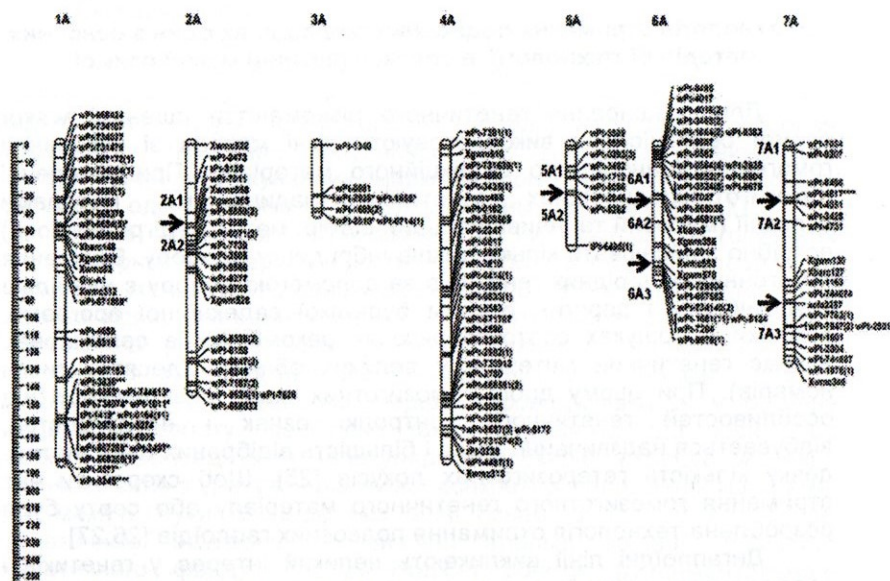


Рис. 4. Генетичне картування з використанням дигаплоїдних ліній (Zhang та ін., 2012)

Повна гомозиготація дигаплоїдних ліній робить їх ідеальним матеріалом для створення генетичних карт. Дигаплоїдні лінії пшениці використовують для виявлення і картування QTL ознак, пов'язаних зі стійкістю до хвороб пшениці: бурого іржі (*Lr*) [32], жовтої іржі (*Yr*), стеблової іржі (*Sr*) [33], а також ряду агрономічних ознак [34]. Отже, подвоєні гаплоїди допомагають у розумінні успадкування кількісних ознак, які так довго були проблемою для селекціонерів. У пшениці дигаплоїди можуть бути отримані методами гаплопродюсерів і культури пиляків або ізолюваних мікроспор [27, 35].

2.1. Отримання подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої шляхом культури ізолюваних пиляків

Для злакових культур, і зокрема м'якої пшениці, біотехнологія одержання гомозиготного матеріалу з мікроспор є найбільш розповсюдженою. Культура пиляків пшениці привертає увагу дослідників простотою виконання і дозволяє одержати протягом одного покоління генетично однорідний і стабільний селекційний матеріал, відкриває можливість отримання широкого спектра константних рекомбінантів із гібридів перших поколінь [36, 37].

В основі біотехнології отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків лежить процес андрогенезу (андроклінії) *in vitro*, оснований на формуванні гаплоїдних рослин-регенерантів із новоутворень, які розвиваються з морфогенних мікроспор за культивування пиляків на штучному живильному середовищі в умовах *in vitro* (рис 5).



Рис. 5. Біотехнологія отримання гомозиготних рослин у культурі пиляків пшениці

2.1.1. Умови вирощування донорних рослин м'якої пшениці

Сприятливі кліматичні умови вирощування рослин *in vivo* забезпечують оптимальний фізіологічний стан донорних рослин, що, в свою чергу, визначає результативність методу культури пиляків пшениці в умовах *in vitro*. Для досягнення високого виходу рослин-регенерантів у культурі пиляків озимої м'якої пшениці є необхідним дотримання оптимальних строків посіву донорного матеріалу в польових умовах, що прийняті у конкретному регіоні вирощування.

Донорні рослини можливо вирощувати у камері штучного клімату. У цьому випадку для озимої пшениці проводять яровизацію паростків при температурі +2°C, 16-годинному фотоперіоді протягом 30-60 діб залежно від потреби у тривалості яровизації генотипу. Умови вирощування рослин у камері штучного клімату: нічна температура +16°C, денна – +20...+22°C, інтенсивність освітлення – 18-20 тис. люкс лампами «ДРИ-2000» при 16-годинному фотоперіоді.

2.1.2. Добір матеріалу озимої м'якої пшениці в культуру пиляків *in vitro*

Визначено, що генотипи, які характеризуються слабкою ФПЧ та потребою у нетривалому періоді яровизації і нетривалим періодом «сходи-вакуолізована мікроспора» [38], відрізняються більш високими показниками гаплопродукції в культурі пиляків пшениці. Тому для добору найбільш чутливих до андрогенезу генотипів та ефективного проходження процесу гаплопродукції рекомендовано залучати форми із слабкою ФПЧ, тривалістю яровизації (ТЯ) 20-30 діб і нетривалим періодом «сходи-вакуолізована мікроспора». Для підвищення результативності андрогенезу можливим є також залучення у схрещування із дібраним матеріалом так званих «донорів гаплопродукції», тобто генотипи, які мають високі показники гаплопродукції (продукують у культурі пиляків *in vitro* багато новоутворень та мають великий регенераційний потенціал). Донори добирають за результатами попереднього тестування в культурі пиляків генотипів, що будуть залучатися у подальшу селекційну роботу, або за результатами аналізу даних літератури.

Добір матеріалу (пагони с колоссям) пшениці для наступного введення в культуру пиляків *in vitro* проводять, коли більша частина мікроспор у пиляках знаходиться на фазі вакуолізації. Фазу розвитку мікроспор визначають цитологічним методом на тимчасових мікропрепаратах пиляків, забарвлених оцетокарміном [39], під світловим мікроскопом.

2.2. Отримання подвоєних гаплоїдів методом гаплопродюсера

Міжвидова гібридизація – це селективний прийом, що широко використовується в селекції злакових для переносу важливих генів з диких видів в культуру. Дослідниками з усього світу отримується велика кількість подвоєних гаплоїдів методом гаплопродюсера. Вперше метод віддаленої гібридизації був застосований для отримання подвоєних гаплоїдів ячменю при схрещуванні *Hordeum vulgare* (2x) з *Hordeum bulbosum* (2x) [40]. Цей метод використовується також і для отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці *Triticum aestivum*. Однак більш ефективним для пшениці є використання в якості запилювача лінії кукурудзи (pus. 5) (*Zea mays* L.) [29]. Принцип отримання гаплоїдних рослин методом міжвидової гібридизації полягає у розвитку жіночої статевий гамети у рослину (партеногенез). Після запилення пшениці донорським пилком чужорідного виду-запилювача та утворення зиготи хромосоми запилювача елімінуються з клітин ембріону, що розвивається. Тоді, використовуючи технологію культивування ембріонів *in vitro*, можна отримати гаплоїдні проростки,

які після подвоєння хромосом стають повністю гомозиготними подвоєними гаплоїдами.

При схрещуванні м'якої пшениці і кукурудзи злиття ядра чоловічої статевої клітини кукурудзи з яйцеклітиною пшениці утворює зиготу. Це перша гібридна клітина ембріону і вона містить хромосоми обох батьків – пшениці і кукурудзи. Пізніше, під час 3-4 початкових мітотичних поділів, хромосоми кукурудзи елімінуються, у результаті цього утворюється гаплоїдна зигота пшениці.

Ефективність методу залежить від кожного етапу. Для ефективного виходу гаплоїдних рослин батьківські рослини мають бути здоровими і не зазнавати впливу фітопатогенних організмів. Беручи до уваги проблеми польового інфекційного фону і неспівпадіння строків цвітіння, доцільніше вирощувати батьківські рослини в умовах штучного клімату. Штучний клімат дозволяє створити оптимальні для проведення запилення умови та отримувати дигаплоїди 2-3 рази на рік.

У якості рослин-заплідників доцільно використовувати ранньостиглі сорти рослин роду *Panicoideae*: кукурудзи, проса, сорго. При виборі сорту-запилювача слід орієнтуватися на терміни його цвітіння і обирати ранні сорти, які б квітнули водночас з пшеницею. Генний склад запилювача не відіграє ключової ролі, так як хромосоми батьківської.

Запилення рослин проводиться методом нанесення на рильце зав'язі свіжого пилку за допомогою щітки або скальпеля. Пилок має бути дозрілим, жовтого кольору. Найкращий час для запилення – за день чи два до початку періоду пилення. Запилення проводять через 2-4 дні після кастрації. Кожен колос запилюється вдруге на наступний день. Обробка запиленого колоса попереджує відмирання зародку та стимулює його розвиток. Зазвичай обробляють запилене колосся розчином гормонів ауксинової природи, який може бути нанесений на запилені квітки кількома способами (шприцем, спреєм та ін.) протягом 1-3 днів після схрещування.

Успішне отримання подвоєних гаплоїдів залежить від трьох стадій: 1) запліднення яйцеклітини пшениці пилком кукурудзи і утворення здорової зиготи; 2) формування гаплоїдного зародка після елімінації хромосом кукурудзи і 3) розвитку гаплоїдного зародка в дорослу, гаплоїдну рослину.

Для культивування недорозвинених зародку використовують технологію *embryo rescue*. Стандартна процедура культивування зародка складається з двох етапів: збір та стерилізація зерен і виділення та культивування зародків в асептичних умовах. Оптимальна стадія для збору зерен – це 14-18 день. Зародки на 17-18 день легше зберегти, проте 14-денні зародки краще проростають.

Групу зерен з ендоспермом не залучають до дослідження, оскільки вони утворились у результаті самозапилення. Гібридні зародки вільно висять в рідині всередині м'якої зернівки. Нестача ендосперму в зернівці слугує початковим критерієм для визначення гаплоїдності зародку. Зародки відділяються від зернівки в асептичних умовах ламінарного потоку та переносяться до чашок Петрі з поживним середовищем для дорощування. Повний біотехнологічний процес отримання дигаплоїдів методом гаплопродюсера відображений на рис. 6.

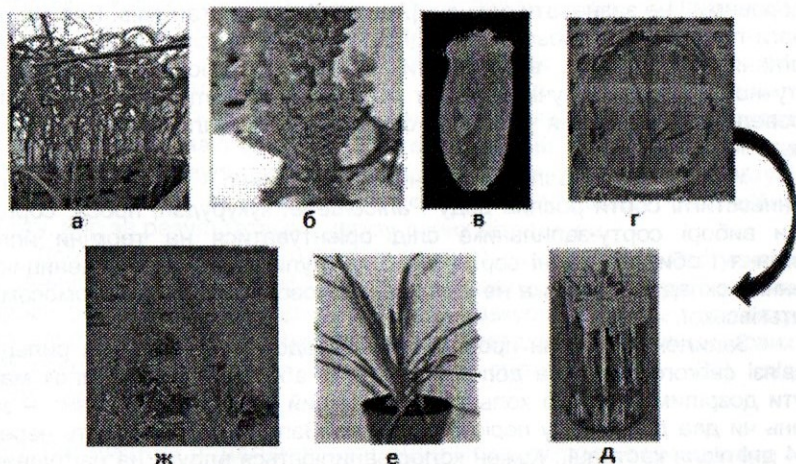


Рис. 6. Біотехнологія отримання подвоєних гаплоїдів методом гаплопродюсера:

- а) вирощування рослин кукурудзи; б) запилення колосків пшениці пилком кукурудзи; в) вилучення гібридного зародка на 16-17 добу після запилення; г) розвиток рослини в *embryo rescue*; д) колхіцинування; е) яровизація, дорощування рослин-регенерантів в умовах штучного клімату; з) вирощування в польових умовах

Ефективність методу віддаленої гібридизації із запиленням пилком кукурудзи є в 10 разів вищою від методу культури ізолюваних пиляків за рахунок низької гаметоклональної мінливості, меншої кількості спонтанних регенерацій і хромосомних аномалій, відсутності альбінорослин, високої регенеруючої здатності та високої швидкості формування зародка, що дає можливість зекономити 4-6 тижнів в отриманні гаплоїдних рослин однієї і тієї ж регенерації в порівнянні з методом культури пиляків.

2.3. Практичні результати використання подвоєних гаплоїдів у схемі селекційного процесу в СГІ – НЦНС

Експеримент 1

Основним критерієм для отримання високого виходу подвоєних гаплоїдів з гібридної комбінації $F_{1,2,3}$ є їхня висока гаплопродукційна здатність в культурі *in vitro*. Для цього вкрай необхідне тестування вихідного матеріалу на чутливість до андрогенезу та добір батьківських форм з високою гаплопродукційною здатністю. При отриманні подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої важливою проблемою є залежність ефективності гаплопродукції в культурі пиляків від генотипу. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є використання в схрещуваннях донорів гаплопродукції з чіткою визначеними генетичними детермінантами. Тестування зразків пшениці м'якої озимої для визначення гаплопродукційної спроможності в культурі *in vitro* здійснювалось 3 роки на різному генетичному матеріалі.

У 2012 році вихідним матеріалом були пиляки 16 гібридних популяцій F_1 та 8 батьківських форм: сорти Золотоколоса, Княгиня Ольга містять транслокацію 1AL/1RS, а сорти Легенда Миронівська, Колос Миронівщини з транслокацією 1BL/1RS, були залучені в схрещування з сортами селекції СГІ – Годувальницею одеською, Дальницькою, Куяльником, Антонівкою, що характеризуються високими адаптивними властивостями до кліматичних умов Півдня України.

Так, виявлено, що серед сортів найвищими показниками гаплопродукційної здатності (кількість новоутворень та кількість зелених рослин-регенерантів) характеризувався сорт Куяльник (8,61 шт. та 9,43 шт. на 100 пиляків відповідно). Високий рівень формування новоутворень показав і сорт Золотоколоса – 8,05 шт./100 пиляків, однак він характеризувався значно нижчим показником «кількість зелених рослин-регенерантів» – 1,22 шт./100 пиляків.

Другу групу за рівнем індукції новоутворень склали сорти Княгиня Ольга, Легенда Миронівська, Колос Миронівщини (2,12, 2,58 та 2,49 шт. на 100 пиляків відповідно). Проте регенерація в цій групі сортів була невисокою, а самі регенеранти характеризувались низькою життєздатністю та погано перенесли яровизацію.

Стосовно гібридів F_1 , то в більшості випадків вони мали вищий за батьківські сорти рівень формування новоутворень. Виявлено відмінності між показниками гаплопродукційної здатності простих реципрокних гібридів. Показано, що в гібридних популяціях, де за батьківську форму залучали сорт Княгиня Ольга, рівень індукції новоутворень був вищий у порівнянні з гібридами, де даний сорт виступав як материнський компонент.

У 2013 році для тестування гаплопродукційної здатності в культурі пиляків *in vitro* залучили 12 реципрокних гібридних популяцій F₁ та 4 батьківських сорти пшениці м'якої озимої – Щедрість одеська (несе транслокацію 1BL/1RS), Традиція одеська, Гарантія одеська, Мудрість одеська. Дані сорти є новинками, які створені у відділі селекції та насінництва пшениці СГ – НЦНС і вирізняються високими показниками адаптивності та продуктивності. За умов експерименту усі досліджені генотипи були чутливими до андрогенезу *in vitro* (табл. 5, 7).

Серед сортів найвищими показниками гаплопродукційної здатності (формування новоутворень та зелених рослин-регенерантів) характеризувався сорт Щедрість ($8,85 \pm 0,79$ шт. та $3,23 \pm 0,49$ шт. на 100 висаджених пиляків відповідно).

Вкрай цінними для подальшої роботи з отримання подвоєних гаплоїдів пшениці є отримані дані щодо чутливості до умов андрогенезу реципрокних гібридів першого покоління. За рівнем індукції новоутворень у гібридів виявлені різні типи прояву даної ознаки. Так, у трьох з них (Традиція x Щедрість, Мудрість x Гарантія і Гарантія x Мудрість) виявили гетерозисний ефект, тоді як індукція новоутворень більшості досліджених гібридів була на рівні одного з батьківських сортів, частіше проявлявся «материнський ефект».

Сорт Щедрість (високі показники гаплопродукції) може бути рекомендованим для введення у схрещування при виконанні селекційних програм як потенційний «донор гаплопродукції».

Однак виявлений ефект негативного впливу на показники гаплопродукції *in vitro* у міжсортних гібридів пшениці між двома сортами, що є потенційними «донорами гаплопродукції», підтверджує необхідність проведення обов'язкового тестування властивостей «донора» у конкретних комбінаціях схрещувань.

У 2014 році було досліджено 9 гібридних комбінацій F₁ від прямих та зворотних схрещувань різних генетичних джерел з пшенично-житніми транслокаціями 1BL/1RS (Кавказ, Щедрість одеська), модифікована транслокація 1BL/1RSm (Ер.3305/13) та 1AL/1RS (Житниця одеська, Ер.310/13) з місцевими сортами Зміна, Мудрість одеська, Антонівка, Гарантія одеська.

Показано, що серед досліджених генотипів високими показниками формування новоутворень та зелених рослин-регенерантів характеризувалися генотипи, що несуть у геномі пшенично-житню транслокацію 1RS/1BL. Найвищий рівень формування новоутворень у культурі пиляків *in vitro* показали два реципрокних гібриди F₁ – Кавказ x Модифікована лінія та Модифікована лінія x Кавказ ($38,84 \pm 1,23$ і $35,11 \pm 1,07$ шт./100 пиляків відповідно). Значно нижчими показниками, що характеризують ефективність першого етапу андрогенезу, визначались гібриди, що не містили даної транслокації (від $0,58 \pm 0,13$ до $10,48 \pm 1,04$ шт./100 пиляків).

Сьогодні селекція м'якої пшениці широко застосовує в своїх програмах з отримання високопродуктивних сортів вихідний матеріал пшениці, який містить житні транслокації 1RS.1BL (далі В) та 1RS.1AL (далі А). Проведено дослідження чутливості до андрогенезу 12 генотипів пшениці м'якої озимої, які різнилися за наявністю та алейним станом житніх транслокацій: дві лінії В, сорт А та дев'ять гібридів F₁ – по два ВxB, АxA і Аx0; по одному В0 і АВ. Виявлено відмінності між показниками гаплопродукційної здатності (як за показником «індукція новоутворень», так і за показником «регенерація зелених рослин») між даними групами генотипів (рис. 7).

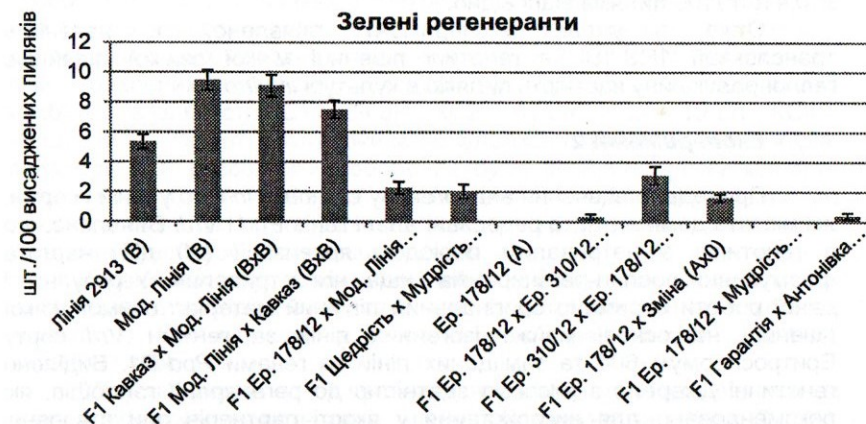


Рис. 7. Показники гаплопродукції в культурі пиляків генотипів пшениці м'якої озимої, що різняться за складом та наявністю пшенично-житніх транслокацій

Показано, що у сортів та гібридів, які містили транслокацію 1RS.1BL, рівень індукції новоутворень та регенерації з них рослин був достовірно вищим у порівнянні з такими, де мала місце транслокація 1RS.1AL (за виключенням двох комбінацій: Еритроспермум 310/12 x Еритроспермум 178/12 та Еритроспермум 178/12 x Зміна, що можливо пов'язане з властивостями батьків, які не несли у геномі транслокацію на А хромосомі). Так, індукційна здатність перших коливалась від $5,16 \pm 0,74$ до $38,84 \pm 1,23$ шт. новоутворень на 100 висаджених пиляків, а для генотипів з транслокацією 1RS.1AL – від $2,07 \pm 0,47$ до $10,48 \pm 1,04$.

Подібні ж результати були отримані і за показником «регенерація рослин», що є відображенням другого етапу гаплопродукції. Від кожного генотипу, що містив житню транслокацію на В хромосомі

пшениці, отримали зелені рослини-ренегеранти. Кількість їх на 100 висаджених пиляків для окремих генотипів різнилася, але була досить високою – від 2,02 до 9,46 рослин на 100 висаджених пиляків. Щодо сортів та гібридів пшениці з транслокацією на 1А хромосомі, то від двох зразків не отримано жодного регенеранту, а від одного – $0,33 \pm 0,17$ шт./100 пиляків, що було на рівні з даним показником у гібрида Гарантія $\times$ Антонівка, який не містив у геномі жодної транслокації. Слід зазначити, що за двома показниками, що вивчалися, гібрид F_1 Еритроспермум 178/12 (А) $\times$ Модифікаційна лінія (В), який містив обидві транслокації, показав проміжні результати – $9,95 \pm 0,82$ та $2,26 \pm 0,41$ шт./100 пиляків відповідно.

Отже, в умовах експерименту виявлено, що наявність транслокації 1RS.1BL в генотипі пшениці м'якої озимої підвищує гаплопродукційну здатність пиляків в культурі *in vitro*.

Експеримент 2

Проведено вивчення андрогенезу в умовах *in vitro* у ліній і сортів, які містять домінантні та рецесивні алелі генів *Ppd* і *Vrd*. Виявлено, що в генотипів з нетривалим періодом яровизації (30 діб) частота формування рослин-регенерантів вища, ніж з тривалим. У результаті даної роботи отримано оригінальний лінійний матеріал озимої м'якої пшениці на основі майже ізогенних ліній за генами *Vrd* сорту Еритроспермум 604 та заміщених ліній за генами *Ppd-D1*. Виділено генетичні джерела з високою здатністю до регенерації гаплоїдів, які рекомендовано для використання у якості партнерів при створенні гібридного матеріалу для селекційних цілей. Це сорти Чайка, Одеська червоноколоса, Мага і лінія Mercia із заміщеною хромосомою 2D від сорту Сіано, що володіють високою гаплопродукційною здатністю й високим виходом спонтанно подвоєних фертильних форм з підвищеною насінневою продуктивністю.

Рекомендуються для використання у селекційному процесі та генетичних дослідженнях 147 гомозиготних ліній, отриманих з гібридних і сортових популяцій озимої м'якої пшениці.

Експеримент 3

Здійснено порівняльне вивчення ліній подвоєних гаплоїдів (ДЛ) і рекомбінантних ліній (РЛ) пшениці, отриманих від одних і тих же комбінацій за господарсько і біологічно цінними ознаками і властивостями. Визначили рівень гомогенності/однорідності ліній, створеними різними методами в однакових умовах вирощування.

Матеріалом для дослідження слугували 5 гібридних комбінацій F_1 , отриманих при внутрішньовидовій гібридизації місцевих сортів

пшениці, які відрізняються між собою окремими ознаками адаптивності та продуктивності. Всі комбінації схрещування відзначені, як КС1 – Епоха од./Княгиня Ольга, КС2 – Заграва од./Княгиня Ольга//Антонівка, КС3 – Сирена од./Княгиня Ольга//Антонівка, КС4 – Ліра од./Щедристь од., КС5 – 752/06/Щедристь од. Вивчали матеріал порівнянням двох методів отримання ліній пшениці м'якої озимої: 1) отриманням ліній подвоєних гаплоїдів методом культури пиляків *in vitro*; 2) за традиційною схемою проведення індивідуальних доборів у популяціях $F_2 - F_4$.

Однією з поставлених завдань було визначення ефективності добору РЛ і ДЛ у ланках селекційного процесу. Така схема дає можливість вивчати матеріал паралельно і порівнювати ефективність добору при різних методах отримання ліній. У 2011 році були отримані лінії подвоєних гаплоїдів методом культури пиляків по кожній комбінації в кількості: КС1 – 39 шт., КС2 – 44 шт., КС3 – 19 шт., КС4 – 48 шт., КС5 – 15 шт. Ґрунтуючись на кількості отриманих дигаплоїдів, паралельно в розсаднику добору F_2 було відібрано рівну кількість колосків по кожній комбінації. Порівняння РЛ і ДЛ здійснювали по кожній комбінації схрещування окремо, враховуючи біологічні і генетичні властивості батьківських форм.

У селекційному розсаднику добір здійснювали за фенотипом ліній (однорідність рослин у рядку, архітектоніка рослин) і частково за допомогою ДНК-маркерів для визначення транслокацій 1BL/1RS, 1AL/1RS (табл. 3).

ДЛ у порівнянні з РЛ проявили високий рівень однорідності за всіма морфологічними ознаками, що і відобразилося на доборі (77,3%). У всіх комбінаціях схрещування в РЛ рівень добору склав у середньому 51,46%, що свідчить про неоднорідність і нестабільність матеріалу за проявом морфологічних ознак. У подальшому відібрані лінії були висіяні за зразком контрольного розсадника (ділянка 5 м²) і розсадника попереднього сортовипробування (ділянка 10 м²) без повторень, з частим розміщенням національного стандарту сорту Антонівка. Основним критерієм добору в цих ланках селекційного процесу стало визначення врожайності. Також велися спостереження і щодо однорідності й вирівняності досліджуваних ліній. Так, у контрольному розсаднику спостерігається різний рівень урожайності в залежності від комбінацій схрещування і груп ліній. У кожній КС спостерігається істотне перевищення (при $НСР_{0,01; 0,001}$) РЛ над ДЛ за врожайністю, крім КС1, де група ДЛ істотно ($НСР_{0,01}$) перевищує групу РЛ. Така суттєва різниця між групами ліній безпосередньо залежить від варіаційного ряду і розмаху максимальних і мінімальних величин. У КС1, КС4, КС5 коефіцієнт варіацій знаходиться на одному рівні, а в КС2, КС3 спостерігається тенденція до підвищення CV у ДЛ. Розмах *min-max* величин показує, що в КС2-5 у ДЛ рівень мінливості вищий за рахунок мінімальних величин.

При цьому у всіх КС було зафіксовано високу врожайність як у групах РЛ, так і у ДЛ, де перевищення над стандартом складало 10-28,2%. Рівень добору за перший рік за врожайністю показав перевагу РЛ над ДЛ. Їхній відсоток відбору був досить високий і становив 64,7 до 91,3% крім КС1, де відбір був на рівні 38,9%. У той час як добір ДЛ склав 17,6-51,4%.

Таблиця 3

Таблиця 3

Рівень добору за врожайністю у РЛ та ДЛ												
Значення		КС1		КС2		КС3		КС4		КС5		Ст.
		РЛ	ДЛ	РЛ	ДЛ	РЛ	ДЛ	РЛ	ДЛ	РЛ	ДЛ	
Селекційний розсадник 2011/12 р. (рядок 1 м ²)												
n*		39	39	44	44	19	19	48	48	15	15	-
Добір, 2013 р.	%	46,2	48,7	38,6	88,6	57,9	89,5	47,9	72,9	66,7	86,7	-
	шт.	18	19	17	39	11	17	23	35	10	13	-
Контрольний розсадник 2012/13 р. (ділянка 5 м ²)												
X, т/га		7,0	7,5	7,9	6,9	7,8	6,7	8,4	7,6	8,1	7,4	7,1
HIP		0,4**		0,9***		1***		0,7***		0,7**		-
n*		18	19	17	39	11	17	23	35	10	13	-
CV, %		6,6	7	7,5	14,8	7,9	11,4	8,9	9	7,1	7,9	-
Max, т/га		7,8	8,7	8,8	8,7	8,9	8,1	9,9	8,8	8,8	8,9	-
Min, т/га		5,8	6,5	6,7	4,5	6,7	5,3	7,0	5,6	7,2	6,7	-
Добір, 2014 р.	%	38,9	42,1	64,7	35,9	72,7	17,6	91,3	51,4	80,0	46,2	38,9
	шт.	7	8	11	14	8	3	21	18	8	6	-
Попереднє сортовипробування 2013/14 р. (ділянка 10 м ²)												
X, т/га		6,7	6,9	7,3	6,7	7,2	6,4	6,8	7,5	7,0	7,6	7,7
HIP		-		0,6*		0,8*		0,5***		0,5**		-
n		7	8	11	14	8	3	21	18	8	6	-
CV, %		8,4	14,4	5,1	14,6	6,8	8,5	8,8	4,5	4,5	2,8	-
Max, т/га		7,3	7,9	8,0	8,0	7,8	7,0	7,7	8,1	7,5	7,9	-
Min, т/га		5,8	5,3	6,7	4,5	6,5	5,9	5,1	6,9	6,5	7,4	-
Добір, 2015 р.	%	14,3	37,5	36,4	21,4	37,5	0	14,3	72,2	12,5	83,3	-
	шт.	1	3	4	3	3	0	3	13	1	5	-

* – Суттєво при HIP_{0,05}; ** – Суттєво при HIP_{0,01};

*** – Суттєво при HIP_{0,001}; n* – кількість ліній, шт.

§КС1 – Епоха од./Княгиня Ольга, КС2 – Заграва од./Княгиня Ольга/

Антонівка, КС3 – Сирена од./Княгиня Ольга/Антонівка,

КС4 – Ліра од./Щедрість од., КС5 – Ер.752/06 /Щедрість од.,

Ст – нац. стандарт, сорт Антонівка

Надалі відібрані лінії були висіяні за типом попереднього сортовипробування. За другий рік вивчення врожайності спостерігаються суттєві зміни в КС4-5, ДЛ істотно перевищують РЛ на високому рівні значущості. У КС2-3 тенденція зберіглася з перевагою РЛ (при НСР_{0,5}), у КС1 не спостерігається істотної різниці. CV у КС1-2 у ДЛ перевищував РЛ, а КС3 був на одному рівні. Розмах мінливості min-max

величин у КС1-3 підтверджує результати, отримані в контрольному розсаднику. Мінімум зафіксований у ДЛ, а у КС4-5 мінімум спостерігається у РЛ. На цьому етапі рівень відбору залежно від КС був різний. У КС4-5 високий рівень відбору зафіксований у ДЛ (72,2, 83,3%), в той час як у РЛ – 13,3, 12,5%. У КС1 у ДЛ – 37,5, РЛ – 14,3%. У КС2 ДЛ – 21,4, РЛ – 36,4%, а в КС3 ДЛ – 0, РЛ – 37,5%.

У період дослідження здійснено оцінку РЛ і ДЛ на морозостійкість. Морозостійкість оцінювали за станом перезимівлі рослин за 9-бальною шкалою, а рівень морозостійкості визначали в лабораторних умовах методом прямого проморожування рослин (пучків) в морозильних камерах при температурі -16 і -18°C з 24-годинною експозицією і подальшим відрачуванням і підрахунком живих і загиблених рослин (%). Виявлено, що групи РЛ і ДЛ незалежно від КС, у польових умовах мали однаковий рівень зимостійкості (6-8 балів) і виявляли здатність до раннього відновлення весняної вегетації та інтенсивного росту й розвитку в цей період. Така ж ситуація спостерігається при визначенні морозостійкості. При t = -16°C у всіх КС, незалежно від груп ліній РЛ або ДЛ, спостерігається високий рівень морозостійкості від 67,9 до 95,5%. При t = -18°C рівень морозостійкості, в залежності від КС, трохи знизився, але залишився на досить високому рівні, крім КС1, де рівень морозостійкості, був середній. Рівень варіювання за морозостійкістю безпосередньо пов'язаний з комбінацією схрещування, і не має суттєвих відмінностей при порівнянні РЛ і ДЛ.

РЛ і ДЛ було досліджено на штучному інфекційному фоні на стійкість до бурі і стеблової іржі. Перш за все увага зверталась на рівень однорідності РЛ і ДЛ за типом та інтенсивністю ураження рослин хворобами. Для цього в селекційному розсаднику в польових умовах з РЛ і ДЛ було відібрано по 7 кращих за фенотипом РЛ і ДЛ з кожної КС. З кожної лінії було здійснено добір по 5 колосків і висіяні на комплексному інфекційному фоні бурі і стеблової іржі. У результаті високий прояв гетерогенності/неоднорідності спостерігався у РЛ (28,6 – 57,1% в залежності від КС) за стійкістю до бурі та стеблової іржі на відміну від ДЛ, де проявляється повна однорідність (100%) за стійкістю до зазначених хвороб.

Додатково на всіх відібраних колосках з кожної РЛ і ДЛ була здійснена детекція на наявність ПТЖ 1AL/1RS, 1BL/1RS для визначення однорідності/гомогенності ліній за генотипом (табл. 4). ДНК-аналіз також підтвердив повну гомозиготизацію ліній подвоєних гаплоїдів за наявністю пшенично-житніх транслокацій в гомогенному стані на відміну від рекомбінантних ліній, де проявляється висока гетерогенність за транслокаціями в залежності від КС.

Таблиця 4
Однорідність РЛ і ДЛ за присутністю ПЖТ 1AL/1RS, 1BL/1RS

Метод створення	ПЖТ	№ лінії						
		1	2	3	4	5	6	7
Епоха од./Княгиня Ольга								
РЛ	1AL/1RS	⊕	⊖	⊖	±	±	⊕	±
ДЛ		⊖	⊕	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Заграва од./Княгиня Ольга//Антонівка								
РЛ	1AL/1RS	±	±	±	⊕	⊖	±	±
ДЛ		⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊕	
Сирена од./КнягиняОльга//Антонівка								
РЛ	1AL/1RS	±	±	⊖	±	⊕	±	⊖
ДЛ		⊖	⊕	⊕	⊖	⊕	⊖	⊖
Ліра од./Щедрість од.								
РЛ	1BL/1RS	±	⊖	⊖	±	±	±	⊕
ДЛ		⊕	⊖	⊖	⊖	⊕	⊖	⊕
Ер.752/06 /Щедрість од.								
РЛ	1BL/1RS	±	⊖	⊖	⊖	±	±	⊖
ДЛ		⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊕	⊕

⊕ - гомозигота за транслокацією; ⊖ - відсутність транслокації;
± гетерогенність за транслокацією

У результаті досліджень було виділено ряд ДЛ, які вивчаються на завершальних етапах селекційного процесу у відділі селекції та насінництва пшениці СГІ – НЦНС і характеризуються високою однорідністю/гомогенністю, високими адаптивними властивостями до біотичних та абіотичних стресових факторів і формують високу продуктивність: це DH-Ер.803/13, DH-Ер.804/13, DH-Ер.860/13, DH-Ер.868/13, DH-Ер.873/13, DH-Ер.936/13, DH-Ер.940/13, DH-Ер.943/13, DH-Ер.949/13, DH-Ер.967/13, DH-Ер.979/13, DH-Ер.858/13, DH-Ер.937/13, DH-Ер.950/13, DH-Ер.983/13.

3. Удосконалення схеми селекційної роботи із застосуванням біотехнологічних методів

Серед багатьох чинників біотехнологічних методів, які забезпечують підвищення ефективності селекційної роботи з пшениці м'якої озимої, до практично найважливіших слід віднести такі:

1. Швидке (одноактне) досягнення повної гомозиготації селекційного матеріалу на основі подвоєних гаплоїдів.
2. Контроль цінних ознак за генотипом за молекулярними маркерами, які не змінюються під впливом умов вирощування рослин.

3. Можливості значного скорочення обсягів досліджень селекційного матеріалу (на 50% і більше) за рахунок вибірки генотипів у ранніх генераціях (F₂, F₃) за молекулярними маркерами при відсутності чи гетерозиготного стану цільових (селективних) ознак у вегетуючих рослин без втрати їхнього насіннєвого потомства.

Оскільки із застосуванням ДНК технологій на гібридах пшениці ранніх генерацій неможливо методом добору за цільовою ознакою досягти повної гомозиготації генотипів із-за невідомих ділянок геному, то найбільш суттєве підвищення ефективності селекційного процесу досягається при поєднанні методів отримання подвоєнних гаплоїдів з одночасним контролем цільових ознак за молекулярними маркерами. Такий хід удосконалення технології селекційного процесу пшениці м'якої озимої найбільш доцільний для вирішення наступних задач:

1. Прискорене введення нової генетичної плазми в генофонд місцевого селекційного матеріалу.
 2. Маркування чужорідних включень в геном пшениці при внутрішньовидовій чи віддаленій гібридизації.
 3. Молекулярне маркування ознак і властивостей за якими контроль, оцінка та добір генотипів неможливі або дуже ускладнені традиційними методами внаслідок відсутності механізму прямого контролю, а також із-за значного впливу на мінливість ознак взаємодії генотип – середовище.
 4. Для прискореного отримання нового сорту на базі гібридного матеріалу від схрещування добре адаптованого матеріалу.
- 3 врахуванням зазначених аспектів нами розроблено і апробовано удосконалену схему селекційного процесу, основним завданням якої є максимальне скорочення терміну отримання нового сорту чи цінного вихідного матеріалу та значного підвищення ефективності селекційної роботи шляхом оптимального поєднання традиційних і біотехнологічних методів (рис. 8).
- Як показано на рис. 8, схема відрізняється від традиційної (рис. 9) за процедурами ведення окремих розсадників.

Розсадник гібридизації – у цій ланці, як і у традиційній схемі селекційного процесу, комбінації та тип схрещувань (простих чи складних) планує селекціонер у залежності від поставлених задач.

У подальшому схему поділено на 2 варіанти в залежності від конкретної селекційної програми. Така модифікація дає можливість правильніше та ефективніше застосовувати технологію отримання подвоєних гаплоїдів для створення сорту/вихідного матеріалу за короткий строк.

Варіант 1 пов'язаний з програмою селекції пшениці при:

- а) внутрішньовидовій гібридизації батьківських компонентів з добре вираженими адаптивними властивостями;
- б) залученні компонентів схрещування, які не впливають на тип розвитку пшениці

та адаптивні властивості (зимо-морозостійкість, посухо-жаростійкість), такими ознаками можуть бути стійкість до хвороб, якість зерна, морфометричні ознаки тощо.

Добір зразків для отримання подвоєних гаплоїдів здійснюється, за вибором селекціонера, на гібридах F_1 чи F_{2-3} .

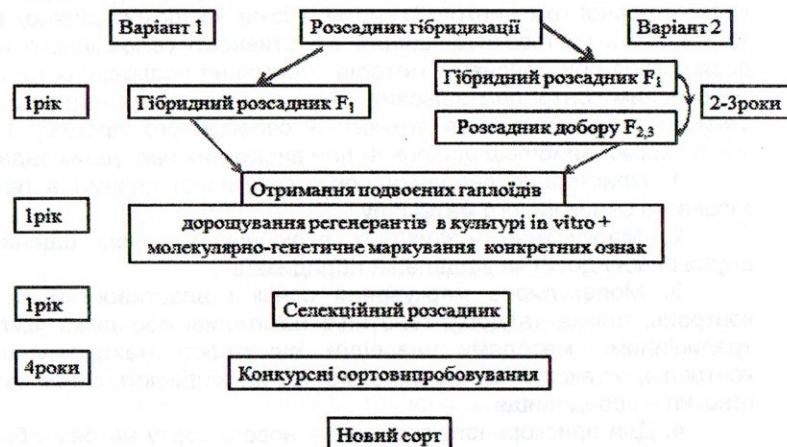


Рис. 8. Удосконалена схема селекційного процесу пшениці м'якої озимої із застосуванням біотехнологічних та молекулярно-генетичних методів для отримання чистолінійних сортів

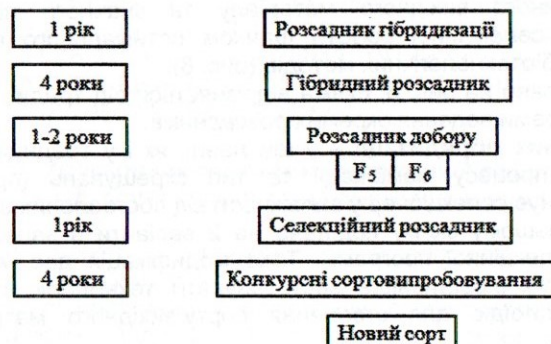


Рис. 9. Традиційна схема селекційного процесу пшениці м'якої озимої для отримання чистолінійних сортів

Варіант 2 пов'язаний з програмою селекції пшениці при: а) віддаленій гібридизації; б) схрещуванні за ознаками, які впливають на тип розвитку пшениці (озимий/ярий) та адаптивні властивості (високозимоморозостійкий генотип/низькозимоморозостійкий генотип, високопосухожаростійкий генотип/низькопосухожаростійкий генотип).

За наведеним варіантом удосконаленої схеми для добору за конкретними ознаками необхідно створювати провокаційні фони або методи, які дозволяють виявляти відмінності між зразками в залежності від програми селекції (це – інфекційні та провокаційні фони, методи для виявлення адаптивних властивостей і типу розвитку озимої пшениці). Основним критерієм є те, що добір здійснюється на популяціях; таким чином селекціонер здатний контролювати мінливість всередині популяції і добирати генотипи за конкретними ознаками. При цьому головне завдання – дібрати генотип тільки за конкретною ознакою, не звертаючи уваги на інші, які знаходяться в стані сегрегації. Якщо добір ведеться не тільки за фенотипом, а й за генотипом, то слід використовувати МАВ за відомими маркерами. У цьому варіанті добір зразків для отримання дигаплоїдів здійснюється на гібридах $F_{2,3}$, при цьому гібриди потрібно висівати широкорядним способом сівалками точного висіву або вручну, з відстанню 5 см у рядку між насінням. Ефективнішим є добір у поколінні F_3 після одноразового добору за колосом F_2 , де можливо вже повноцінно оцінити кожну лінію окремо за конкретною чи конкретними ознаками та здійснити браковку.

Наступна ланка – отримання ліній подвоєних гаплоїдів, де у кожному з варіантів є свої відмінності.

У **варіанті 1** добір зразків для отримання дигаплоїдів здійснюється на гібридах F_1 , де селекціонер не може контролювати мінливість у комбінації і залишається сподіватися тільки на вдачу. Результативність роботи підвищується шляхом збільшення кількості отриманих дигаплоїдів (мінімальна кількість – не менше 1000 шт.)

Варіант 2 залежить від вибору селекціонера, і основною задачею для біотехнологів залишається отримати максимальний (не менше 90%) вихід дигаплоїдних рослин з кожної відібраної лінії (культура пиляків 5-7 колосків з лінії, метод гаплопродюсерів, кастрація 2 колосків), при цьому кількість ліній може варіювати в межах 50- 500.

При обранні методу отримання дигаплоїдів слід звернути увагу на можливість лабораторії та специфіку обраних методів. Етапи методів – у табл. 5.

Тільки за рахунок цієї ланки на 3-5 років в залежності від програми селекції (варіант 1, 2), швидше від застосування інших методів досягається необхідний рівень гомозиготності селекційного матеріалу, в той час як від схрещувань за звичайною схемою селекційного процесу, щоб отримати чисті лінії, необхідно отримати

кілька гібридних генерацій і провести неодноразові індивідуальні добори і витратити на це від 3 до 5 років.

Наступні ланки удосконаленої схеми залишаються без змін, як і за традиційної схеми селекційного процесу (рис. 10).

Таблиця 5

Етапи отримання дигаплоїдів методом гаплопродюсерів та культури ізольованих пиляків

Етап	Метод культури пиляків <i>in vitro</i>	Метод гаплопродюсера
	При наявності фітотрона робота здійснюється цілорічно	
Культивування пиляків, регенерація рослин	Застосування техніки <i>embryo rescue</i> для незрілих гаплоїдних зародків, отримання гаплоїдних рослин	10 - 14 тижнів
Яровизація	6 - 7 тижнів	4 - 5 тижнів
Коліцинування (обов'язкове для методу гаплопродюсера)	8 - 10 тижнів	6 - 7 тижнів
Дорощування рослин. Отримання насіння подвоєних гаплоїдів		
Один технологічний цикл:	26 - 32 тижнів	9 - 11 тижнів
Ефективність методу	Мах до 2 - 3% рослин дигаплоїдів від висаджених пиляків	Мах до 20 - 30% рослин дигаплоїдів від запилених квіток

Отже, удосконалена схема передбачає отримання однорідного/гомогенного матеріалу, чистолінійного сорту протягом 7-9 років, а за традиційною схемою селекційного процесу – від 10 до 12 років в залежності від генерації гібридів, з яких добирали рослини і скільки разів це повторювалося за схемою Педірі.

Така модифікація селекційного процесу із застосуванням технологій подвоєних гаплоїдів і додатковим генетичним маркуванням дозволяє скоротити селекційний процес на 4-6 років і підвищити його ефективність на 20-30%. Але при цьому використання біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів є доповненням до традиційної схеми селекційного процесу і не може замінити існуючі методи прямого контролю, оцінки і добору генотипів за окремими чи комплексом господарсько і біологічно цінних ознак та властивостей.

З частковим або повним застосуванням удосконаленої і апробованої схеми селекційного процесу створені сорти пшениці м'якої озимої:

Житниця одеська – № заявки 13012009 від 27 квітня 2013 року.

Сорт пшениці м'якої озимої універсального типу, є унікальним за комплексною стійкістю до захворювань: трьох видів іржі, твердої сажки, борошнистої роси, корневих гнилей, септоріозу листя і фузаріозу колосся. Ці ознаки у поєднанні з високим генетичним потенціалом продуктивності (120 ц/га), стійкістю до вилягання, витривалістю до посухи та зимових стресів дозволяють рекомендувати сорт для вирощування за інтенсивною технологією з обмеженим використанням фунгіцидів. Придатний для вирощування в умовах зрошення.

За результатами двох років (2014-2015) апробації Житниця одеська в державному сортовипробуванні підтвердила свою високу урожайність – в середньому 68,4-104,2 ц/га, що вище національних стандартів на 8,9-21,5 ц/га (11,3-25,2%). Найвищий урожай – 118 ц/га. Має значні переваги над іншими сортами за комплексною стійкістю до 7 основних хвороб. Вирізняється також високою стійкістю до посухи, низьких температур у період зимівлі. Наявність у генотипі сорту пшенично-житньої транслокації 1AL/1RS забезпечує високий загальний фон стійкості до комплексу біотичних та абіотичних стресових факторів. При апробації на різних агротехнічних фонах Житниця одеська краще від інших сортів переносить надранні і надпізні строки сівби, вирізняється високою позитивною реакцією на внесення високих доз азотних добрив.

Октава одеська – № заявки 14012009 від 12 квітня 2014 року.

Сорт пшениці м'якої озимої універсального типу вирізняється високим генетичним потенціалом продуктивності – 118 ц/га. У своєму генотипі містить пшенично-житню транслокацію 1AL/1RS, що забезпечує високий загальний рівень адаптивності. Негативний вплив транслокації на хлібопекарські якості нейтралізується алелями з позитивним впливом на ці показники, тому за якістю зерна відноситься до сильної пшениці.

Дані першого року (2015) державного сортовипробування підтверджують характеристики, які отримані при створенні сорту. Зокрема, середній рівень урожайності складає 68,3 ц/га, з перевищенням національних стандартів на 5,9-22,4 ц/га (7,6-24,7%). Максимальна урожайність 101,4 ц/га. Виділився також за стійкістю до хвороб (на рівні 6-8 балів) та унікально високою посухо-жаростійкістю. Рівень морозо-зимостійкості визначено 7-8 балами. Сорт проходив апробацію в агротехнічних дослідах, де проявив високий рівень стабільності на різних агрофонах.

Ліга одеська – № заявки 14012006 від 12 квітня 2014 року.

Сорт пшениці м'якої озимої універсального типу, відноситься до сортів з вираженими властивостями стійкості до екстремальних умов щодо змін клімату. Особливо виділяється винятково високою посухостійкістю на всіх етапах розвитку рослин. Наявність у генотипі пшенично-житньої транслокації 1AL/1RS забезпечує високий загальний рівень

адаптивності та максимальну реалізацію високого генетичного потенціалу врожайності (98-104 ц/га). Якість зерна сорту відповідає рівню цінної пшениці.

У перший рік державного сорто випробування (2015) виділився за врожайністю (65,4 ц/га), з перевищенням національних стандартів на 4,3-18,0 ц/га (5,6-21,7%). Особливо суттєві прирости отримані в південних областях України, де в 2015 р. мала місце сильна посуха практично впродовж всієї вегетації пшениці. Ліга одеська показала високий рівень стійкості до хвороб (бура іржа 7-8 балів, борошниста роса 8-9 балів). Морозозимостійкість визначена на рівні 7-8 балів. Якість зерна відповідає рівню цінної пшениці.

Дума одеська – № заявки 14012007 від 12 квітня 2014 року. Сорт пшениці м'якої озимої універсального типу відноситься до короткостеблових, з високим рівнем стійкості до вилягання (9 балів). Ця особливість дозволяє вирощувати його на високих агротехнічних фонах та при зрошенні. Генетичний потенціал урожайності перевищує 100 ц/га, а доволі високий рівень адаптації дозволяє реалізувати цей потенціал на рівні 50-60% навіть за екстремальних умов вирощування.

За результатами першого року державного сорто випробування (2015) Дума одеська з урожайністю 67,8 ц/га знаходилась в першій десятці сортів з перевищенням національних стандартів на 5,3-23,4 ц/га (7,2-26,4%). Найвищий урожай зафіксований на сорто випробувальних станціях західних областей України (94,3-106,4 ц/га). Сорт виділився високим рівнем стійкості до хвороб та винятково високою стійкістю до вилягання й проростання зерна на пні. Якість зерна – на рівні цінної пшениці.

При створенні зазначених сортів шляхом оптимального поєднання традиційних та біотехнологічних методів і маркерної селекції вдалось поєднати в одному генотипі високу продуктивність, групову стійкість до хвороб та відмінні показники якості зерна.

Наприклад, ефективність оцінки хлібопекарської якості зерна пшениці за маркерами відносно традиційних методик складає близько 1000%, при тому, що в селекційному процесі треба оцінювати понад 500 зразків. Використання маркерів – це єдиний спосіб практично 100%-вої гарантії виявлення генотипів з генами, що забезпечують тривалу горизонтальну стійкість.

Потенційні площі вирощування сортів пшениці з комплексом високих хлібопекарських якостей та стійкості до хвороб складають майже 12,5 млн га. Впровадження сортів зі стійкістю до хвороб дозволить скоротити застосування фунгіцидів майже на 20%. А загалом виробництво зерна з високим рівнем якості та стійкістю до хвороб дозволить збільшити ВВП України на 3-5 мільярдів гривень на рік з відповідним збільшенням надходжень до бюджету країни.

Список використаної літератури

1. Ribaut J. M., Vicente M. C., Delannay X. Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives // *Current Opinion in Plant Biology*. - 2010. - Vol.13. - P. 1-6.
2. Xu Y. Molecular plant breeding // CAB International, UK. - 2010. - P. 734.
3. Усик Л. О. Характеристика відмінних морфологічних ознак пшениці м'якої озимої та їх використання в селекції на Півдні України. Автореферат дис. ... к.с.-г.н. - Одеса, 2009. - 21 с.
4. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры / В. Г. Конарев // М.: Колос, 1983. - 320 с.
5. Созинов А. А. Поллиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. / А. А. Созинов // М.: Наука. - 1985. - С. 4-36.
6. Терновская Т. К., Антонюк М. З. Гены биохимических признаков как маркеры чужеродного генетического материала в геноме пшеницы // *Цитология и генетика*. - 1996. - Т. 30, № 30. - С. 71-85.
7. Моцный И. И. Идентификация и характеристика 1R(1B) замещенных линий мягкой пшеницы / И. И. Моцный, В. И. Файт, Е. М. Благодарова // *Цитология и генетика*. - 2009. - № 3. - С. 26-35.
8. Конарев А. В. Анализ геномного состава амфидиплоидов по белкам зерна. / А. В. Конарев, Н. В. Цикало, Е. Г. Жиров // *Бюллетень ВИР*. - 1985. - Вып. 149. - С.70-77.
9. Усова З. В. Успадкування ознаки маси 1000 зерен та спектра гліадинів при міжвидовій гібридизації за участю пшенично-елімуслих гібридів / З. В. Усова // *Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В. В. Докучаєва. Серія: Рослинництво, селекція і насінництво, плодоовочівництво*. - 2012. - № 2. - С. 37-43.
10. Козуб Н. А., Созинов И. А., Собко Т. А. [та ін.] Идентификация ржаных транслокаций у сортов озимой мягкой пшеницы *Богданка* и *Синтетик* // *Научные ведомости. Серия естественные науки*. - 2010. - №15 (86). - Вып. 12. - С. 47-54.
11. Степаненко А. І. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків / А. І. Степаненко, О. М. Благодарова, Б. В. Моргун, Т. В. Чугункова, О. І. Рибалка // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. - 2014. - Т. 12, № 1. - С. 78-83.
12. Рибалка О. І., Моргун В. В., Благодарова О. М., Починок В. М. Генетичний поліморфізм за складом алелів локусів Gli/Glu сортів озимої пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України // *Физиология и биохимия культурных растений*. - 2012. - Т. 44, №3. - С. 187-193.

13. Dubcovsky J. Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience // *Crop Sci.* – 2004. – V. 44. – P. 1895–1898.
14. Хавкин Э. Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве. / Э. Е. Хавкин // *С.-х. биология.* – 1997. – №5. – С.3–16.
15. Малышев С. В., Картель Н. А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений // *Молекулярная биология.* – 1997. – Т. 31, №2. – С. 197–208.
16. Tanksley S. D. Molecular markers in plant breeding // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – Vol. 1. – P. 3–8.
17. Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры и селекция // *Цитология и генетика.* – 2013. – 47, № 3. – С. 71–80.
18. Сиволап Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Каледарь // *Одесса: Астроспринт*, 2011. – 336 с.
19. Леск А. Введение в биоинформатику / А. Леск // *М.: Бином*, 2009. – 320 с.
20. Кириченко В. В. Основи селекції польових культур на стійкість до шкідливих організмів / В. В. Кириченко, В. П. Петренко, І. М. Черняєва [та ін.] // *Харків*, 2012. – 319 с.
21. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2013. – Т. 17, №4/2. – С. 1044–1054.
22. Morris M., Dreher K., Ribaut J.M., Khairallah M. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection // *Mol. Breed.* – 2003. – Vol. 11. – P. 235–247.
23. Галаєва М. В. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці / М. В. Галаєва, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // *Цитологія і генетика.* – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 3–11.
24. Галаєва М. В., Файт В. І., Сиволап Ю. М. Генетическое разнообразие генофонда мягкой озимой пшеницы по аллелям связанного с морозоустойчивостью микросателлитного локуса Xgwm182-5D // *Biopolimers and Cell.* – 2013. – Vol. 29, N 6. – P. 487–492.
25. Sitch L. A. Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotype and environmental effect on pollen grain germination, pollen tube growth and frequency of fertilization / L. A. Sitch, J. W. Snape // *Euphytica.* – 1987. – Vol. 36 – P. 483–496.
26. Thomas W. T. B. Doubled haploids in breeding. / W. T. B. Thomas, B. P. Forster, B. Gertsson // *Doubled Haploid Production in Crop Plants.* – 2003. – P. 337–349.

27. Wędzony M. Progress in doubled haploid technology in higher plants. / M. Wędzony, B. P. Forster, I. Żur, E. Golemic et al. // *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Science - BusinessMedia B.V. – 2009. – P. 1–34. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1
28. DePauw R. M. New breeding tools impact Canadian commercial farmer fields / R. M. DePauw, R. E. Knox, D. G. Humphreys et al. // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding.* – Institute of Agricultural Economics and Information for the Czech Academy of Agricultural Sciences. – 2011. – V. 47, Special Issue. – P. S28–S34.
29. Kisana N. S. Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme / N. S. Kisana, K. K. Nkongolo, J. S. Quick, D. L. Johnson // *Plant Breed.* – 1993. – V. 110. – P. 96–102.
30. Marza F. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 x Clark / F. Marza, G. H. Bai, B. F. Carver, W. C. Zhou // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – V. 112. – P. 688–98. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-0172-3>.
31. Zhang L, Luo JT, Hao M, Zhang LQ, Yuan ZW, Yan ZH, Liu YX, Zhang B, Liu BL, Liu CJ, Zhang HG, Zheng YL, and Liu DC. Genetic map of *Triticum turgidum* based on a hexaploid wheat population without genetic recombination for D genome. *BMC Genetics*, 2012. – 13. – P. 69–82.
32. Chu C.G. Identification of novel QTLs for seedling and adult plant leaf rust resistance in a wheat doubled haploid population / C. G. Chu, T. L. Friesen, S. S. Xu, J. D. Faris, J. A. Kolmer // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V. 119. – P. 263–269.
33. Prins R. QTL mapping of stripe, leaf and stem rust resistance genes in a Kariaga x Avocet S doubled haploid wheat population / R. Prins, Z. A. Pretorius, C. M. Bender, A. Lehmensiek // *Mol. Breeding.* – 2011. – V. 27. – P. 259–270.
34. Chu C. G. Whole genome mapping in a wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits / C. G. Chu, S. S. Xu, T. L. Friesen, J. D. Faris // *Mol/ Breed.* – 2008. – V. 22. – P. 251–256.
35. Laurie D. A. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. / D. A. Laurie, M. D. Bennett // *Theor Appl Genet.* – 1988 – V. 76. – P. 393–397. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00265339>.
36. Лукьянюк С. Ф. Метод гаплоидии в селекции зерновых культур / С. Ф. Лукьянюк, С. А. Игнатова // *Сельскохозяйственная биотехнология.* – 1985. – № 5. – С. 8–15.
37. Ігнатова С. О. Біотехнологічні основи одержання гаплоїдів, віддалених гібридів і соматичних регенерантів зернових і бобових культур в різних системах *in vitro*: автореф. дис. ... докт. біол.

- наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / С. О. Ігнатова. – Ялта, 2004. – 46 с.
38. Лобанова Е. И., Игнатова С. А., Шестопал О. Л., Нарган Т. П. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разным периодом «всходы-колошение» // Фактори експериментальної еволюції організмів: IV Міжнар. наук. конф., 22-26 вересня 2008 р.: зб. наук. праць. – Алушта, 2008. – С. 291–297.
 39. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений : учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 270 с.
 40. Davies D. The embryo cultures of interspecific hybrids of *Hordeum* // New. Phytol. – 1960. – Vol. 59, № 2. – P. 9–14.

Формат 60х84/16. Ум. друк. арк. 2,56.
Тираж 100 прим. Зам. № 215.

Надруковано з готового оригінал-макета
у друкарні видавництва «Астропринт»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21
Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855
astro_print@ukr.net

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.