

НУБІП України  
МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – М. 1730 «С». 2021.10.13. 07 ПЗ

НУБІП України  
МАНДРИКИ ВІКТОРІЇ РОСТИСЛАВІВНИ

НУБІП України  
2022

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**  
**Факультет (ННІ) Захисту рослин, біотехнології та екології**

УДК 631.52:57.085.2:633.85

**ПОГОТЖЕНО** **ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
**Декан факультету (Директор ННІ)** **Завідувач кафедри**  
Захисту рослин, біотехнології та екології (назва кафедри)  
(назва факультету (ННІ))

Коломієць Ю.В.  
(підпис) (ПІБ)

Кваско О.Ю.  
(підпис) (ПІБ)

“ ” 20 р. “ ” 20 р.  
**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Оцінка генетичного різноманіття ріпаку (*Brassica napus* L.) та створення посухостійких форм за допомогою клітинної селекції *in vitro*»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія  
(код і назва)  
 Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика  
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

**Гарант освітньої програми**  
Проф., д. с.-г. наук Лісовий М.М.  
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

**Керівник магістерської кваліфікаційної роботи**  
Проф., д. с.-г. наук Кляченко О.Л.  
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

**Виконала** Мандрика В.Р.  
(підпис) (ПІБ студента)

КИЇВ – 2022

НУБІП України

Національний університет біоресурсів  
і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

НУБІП України

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри

«    »    2022 р.

НУБІП України

ЗАВДАННЯ

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

НУБІП України

Мандрики Вікторії Рослиславівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Оцінка генетичного різноманіття ріпаку (*Brassica napus* L.) та створення посухостійких форм за допомогою клітинної селекції *in vitro*»

керівник роботи

Кляченко О.Л. Проф., д. с.-г. наук

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «13» жовтня 2021 р. № 1730 «С»

2. Строк подання студентом роботи 14 листопада 2022 р.

3. Вихідні дані до роботи рослини ріпаку озимого та ярого

НУБІП України

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) 1. Отримати стерильні проростки ріпаку озимого та ярого;

2. Оцінити генетичне різноманіття сортів ріпаку за допомогою SSR-маркерів;

3. Створити посухостійкі форми ріпаку за допомогою клітинної селекції *in vitro*.

НУБІП України

НУБІП України

## 5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата завдання видав	завдання прийняв
1	Кляченко О.Л. Проф., д. с.-г. наук		
2	Кляченко О.Л. Проф., д. с.-г. наук		
3	Кляченко О.Л. Проф., д. с.-г. наук		

6. Дата видачі завдання 01.08.2021

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної магістерської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Написання огляду літератури	До 01.11.2021	
2.	Підбір методики виконання магістерської роботи	До 01.12.2021	
3.	Отримання стерильних проростків ріпаку	До 01.03.2022	
4.	Отримання результатів кластерного аналізу	До 01.08.2022	
5.	Отримати результати селекції ріпаку на посухостійкість	До 01.10.2022	

Студент

ОМандрика В.Р.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

Кляченко О.Л.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

## Реферат

Дипломна робота на тему «Оцінка генетичного різноманіття ріпаку (*Brassica napus* L.) та створення посухостійких форм за допомогою клітинної селекції *in vitro*» виконана на 70-ти сторінках друкованого тексту, містить 7 інформаційних таблиць та 10 рисунків.

Складається із таких розділів: короткий огляд наукової літератури; умови, вихідний матеріал та методика дослідження; експериментальна частина; висновки; список використаної літератури; додатки

Дослідження проводились в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБІП та в лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин..

Метою роботи було оцінити генетичне різноманіття ріпаку (*Brassica napus* L.) за допомогою SSR-маркерів та створити посухостійкі форми за допомогою клітинної селекції *in vitro*.

Об'єктом досліджень були стерильні проростки ріпака озимого та ярого (*Brassica napus* L.) для проведення кластерного аналізу та отримання посухостійких форм.

Для отримання стерильних проростків ріпака озимого та ярого нами використано метод культури *in vitro*. Використовували модифіковане середовище Мурасіге-Скуга з додаванням різних концентрацій і співвідношень цитокінів і ауксинів. На основі проведених досліджень отримано стерильні проростки ріпака озимого та ярого проведено кластерний аналіз сортів ріпака та отримано посухостійкі форми ріпака..

У результаті досліджень було проведено оцінку генетичного різноманіття ріпаку та створено посухостійкі форми ріпака за допомогою клітинної селекції *in vitro*.

НУБІП України

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	7
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. КОРОТКИЙ ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Ботанічна характеристика та біологічні особливості ріпака озимого та ярого	10
1.2. Селекція ріпака на стійкість до абіотичних чинників довкілля	19
Методи розмноження самозапилюваних рослин	19
Вирощування перехресно запилюваних рослин	20
Методи розведення перехресно запилюваних рослин	21
Методи селекції ріпака	22
Селекція на зимостійкість для ріпака озимого	25
Клітинна селекція	25
1.3 Генетичне різноманіття	34
Важливість генетичного різноманіття	35
Приклади генетичного різноманіття	37
Фактори генетичного різноманіття	38
Збереження генетичного різноманіття	41
1.4 Використання молекулярно-генетичних маркерів в селекції ріпака	42
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, ВИХІДНИЙ МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1. Місце проведення досліджень та обладнання лабораторії	48
2.2. Вихідний матеріал	52
2.3. Визначення генетичного різноманіття сортів ріпаку	54
2.4. Отримання посухостійких ліній ріпаку в культурі <i>in vitro</i>	55
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	56
3.1. Оцінка генетичного різноманіття сортів ріпаку	56
3.2. Селекція ріпаку <i>in vitro</i> на посухостійкість	60
ВИСНОВКИ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	66
ДОДАТКИ	74
СКРИНІНГ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ РІПАКА ( <i>BRASSICA NAPUS L.</i> ) НА СТІЙКІСТЬ ДО ПОСУХИ	74
КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ <i>IN VITRO</i> НА СТІЙКІСТЬ РІПАКА ОЗИМОГО ТА ЯРОГО ( <i>BRASSICA NAPUS L.</i> ) ДО ПОСУХИ	76
СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ФОРМ РІПАКА ( <i>BRASSICA NAPUS L.</i> ) ЗА ДОПОМОГОЮ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ <i>IN VITRO</i>	78

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,  
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

НУБІП України

PEF - поліетиленгліколь

ДНК - Дезоксирибонуклеїнова кислота

NP<sub>0.5</sub> - Найменша істотна різниця

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВСТУП

**Актуальність.** Ріпак (*Brassica napus* L.) є однією із провідних олійних та кормових культур в Україні та світі. Селекційні програми озимого та ярого ріпаку спрямовані на створення високоврожайних сортів та гібридів різних типів за вмістом і складом олії, широкою пластичністю до метеорологічних й агроекологічних чинників [1-3]. Ефективність селекції значною мірою визначається гетерогенністю вихідного матеріалу рослин, що вимагає пошуку і впровадження нових підходів для збільшення генетичної гетерогенності селекційного матеріалу [4]. Відомо, що одним з ефективних методів визначення відмінності сортів в процесі їх реєстрації є опис маркерних морфологічних ознак, який застосовується як в Україні так у європейських країнах [5]. Проте на сьогодні одним із швидких та ефективних методів оцінки поліморфізму сільськогосподарських культур є використання SSR маркерів. В наших попередніх дослідженнях проведена оцінка генетичного різноманіття сортів ріпаку різного походження та показана ефективність маркерної системи для визначення відмінності сортів [6]. Вченими описано застосування клітинної селекції *in vitro* для отримання форм сільськогосподарських культур, стійких до біотичних та абіотичних стресорів [7]. Стрес від посухи значно обмежує ріст рослин та врожайність. Проте, у деяких сільськогосподарських культур з високою адаптивною здатністю, таких як ріпак, морфологічні і метаболічні зміни відбуваються у відповідь на посуху, що сприяє пристосуванню до таких екологічних обмежень [8]. Значно підвищує ефективність клітинної селекції індукований мутагенез за дії іонізуючих (рентгеновські і  $\gamma$ -промені) і ультрафіолетових випромінювань при яких спостерігається найбільш широкий спектр мутацій [9].

**Мета.** Оцінити генетичне різноманіття ріпаку (*Brassica napus* L.) за допомогою SSR-маркерів та створити посухостійкі форми за допомогою клітинної селекції *in vitro*.



# НУБІП України

## Завдання:

1. Отримати стерильні проростки ріпаку озимого та ярого;
2. Оцінити генетичне різноманіття сортів ріпаку за допомогою SSR-маркерів;

# НУБІП України

3. Створити посухостійкі форми ріпака за допомогою клітинної селекції *in vitro*.

# НУБІП України

# НУБІП України

# НУБІП України

# НУБІП України

# НУБІП України

## РОЗДІЛ 1. КОРОТКИЙ ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Ботанічна характеристика та біологічні особливості ріпака озимого та ярого

Ріпак (лат. *Brassica napus* L.) - вид трав'янистих рослин роду Капуста сімейства Капустяні або Хрестоцвіті (*Brassicaceae*). Важлива олійна культура; економічне значення ріпака до кінця XX століття сильно виросло в зв'язку з тим, що з нього почав отримуватися біодизель [10]. Канадські сорти ріпака з пониженим вмістом ерукової кислоти і глюкозинолатів мають назву «канола». Рослинна олія з цих сортів має підвищені споживчі властивості (зокрема, відсутні неприємний присмак і зеленуватий відтінок) [11].

До 1970-х років насіння ріпака навряд чи можна було використовувати як їжу чи корм, оскільки воно містило значну кількість мононенасиченої ерукової кислоти та глюкозинолатів. Ерукова кислота спричиняє пошкодження органів і серцеві проблеми у людей і ссавців. Через вміст глюкозинолатів лише невеликі кількості залишків ріпакового пресу дозволено використовувати в кормах для тварин. Через інтенсивний запах капусти тварини їли менше, а глюкозинолати також змінюють роботу щитовидної залози. Крім того, в осадках пресування вироблялися гірчичні масла, які викликали розлад травлення у тварини, а курячі яйця набували рибного смаку.

Починаючи з 1960-х років генотипи ріпака, які практично не містять ерукової кислоти (менше 2 % в олії), і тому придатні для харчування людини, були розроблені під назвою нульовий ріпак (0-ріпак), насіння якого містить більшу частку містить олеїнову та ліноленову кислоти, які краще переносяться. Проривом у цьому відношенні став дослідницький проект з ярим ріпаком в Університеті Манітоби під керівництвом Кіта Дауні, який розпочався в 1962 році. Їх результати продавалися під торговою маркою Canola (канадська олія з низьким вмістом кислоти). Зараз канола широко використовується в значній частині Америки та Австралії.

Однак нульове насіння ріпаку все ще містило глюкозинолати, через що його важко використовувати як корм для тварин. Тому були зроблені спроби вивести олійний ріпак із меншим вмістом глюкозинолатів, так званий подвійний нульовий ріпак (олійний ріпак 00). У 1981 році сорт озимого ріпаку

Лібрадор був внесений як перший сорт подвійного ріпаку до списку сортів. У 1982 році з'явився сорт Liglandor, а в 1983 році до списку сортів були додані сорти Lindora, Ligora та Elena. З кожним новим записом сорту розрив у врожайності між сортами 0 і сортами 00 зменшується. Склад жирних кислот ріпакової олії 00 дуже схожий на склад оливкової олії. Частка незамінних

жирних кислот, зокрема  $\alpha$ -ліноленової кислоти, у багато разів перевищує їх частку в оливковій олії.

Ріпак є однорічною або дворічною травою і досягає висоти від 30 до 150 сантиметрів. Може утворюватися м'ясистий стрижневий корінь. Пряме стебло у верхній частині розгалужене.

Прикореневе листя, що стоїть у нижній частині стебла, складається з черешка довжиною до 15 сантиметрів і листової пластинки довжиною від 5 до 25 (рідше до 40) сантиметрів і шириною від 2 до 7 (рідше до 10), по контуру

яйцевидне, подовжено-округле, перисто-лопатево або ліроподібне, іноді нерозділене. Кінцева частина яйцеподібна і зазубрена по краю, хвиляста або цілigna. На кожній стороні середньої жилки є від однієї до шести бічних часток листя, значно менших за кінцеву, іноді відсутні та також зубчасте на краю,

хвилясте або ціле. Листя на верхівці стебла сидять з листовою пластинкою ланцетної, яйцевидної або довгастої форми, довжиною до 8 см і шириною до 3,5 см, її вухоподібна основа пластини охоплює стебло і лист. Край гладкий або хвилястий.

Залежно від погоди період цвітіння екземпляра становить близько трьох-п'яти тижнів, але одна квітка зів'яне вже через один-два дні. Від 20 до 60 квіток у верхньому, гронавидному суцвітті.

Квітки чотирискладові. Чотири висхідних або майже прямих чашолистка довгасті, довжиною від 5 до 10 міліметрів і шириною від 1,5 до 2,5

міліметрів. Чотири пелюстки яскраво-блідо-жовтого кольору мають довжину переважно від 1 до 1,6 сантиметрів і ширину зазвичай від 6 до 9 міліметрів, широкі обернено яйцеподібні із заокругленим верхнім кінцем і нігтикком від 5 до 9 міліметрів. Є шість тичинок, рідше п'ять. Тичинки здебільшого мають довжину від 7 до 10 міліметрів, а пильовики довжиною 1,5-2,5 міліметра довгасті. Відбувається як самозапилення всередині квітки, так і перехресне запилення бджолами.

Пряма плодоніжка зазвичай має довжину від 1,2 до 2,3 сантиметрів.

Сидячий стручок лінійний, довжиною від 5 до 9,5 сантиметрів і діаметром від 3,5 до 5 міліметрів, циліндричної або злегка квадратної форми і містить від дванадцяти до двадцяти насінин. Кругле насіння від темно-коричневого до чорного кольору має форму кулі діаметром 1,5-2,5 міліметра з дрібносітчастою поверхнею. Маса 1000 насінин 2,5-5 г у ріпака ярого і 4-7 г у озимого. Насіння зберігає схожість 5-6 років [12].

Потреби ріпаку в ґрунті можна порівняти з вимогами пшениці. Ріпак олійний вимагає глибокого ґрунту, що дозволяє безперешкодно розвиватися кореням нижче горизонту вирощування. Для вирощування особливо підходять глибокі глинисті ґрунти зі значеннями рН близько 6,5. Непридатними місцями для розміщення ріпаку є дуже глинисті ґрунти з сильною схильністю до перезволоження через обмеження обробітку ґрунту, а також надзвичайно легкі або неглибокі ґрунти, де посушливі періоди знижують безпеку врожаю. У разі болотних ґрунтів з ризиком пізніх заморозків вирощування озимого ріпаку може пошкодитися квітка, лопнути стебла рослини або вимерзнути насадження з повною втратою.

Ріпак олійний не є самосумісним, а значить, ріпак не слід вирощувати протягом як мінімум трьох-чотирьох років після вирощування, щоб уникнути підвищеного виникнення конкретних хвороб і шкідників рослин. Таким чином, ріпак олійний може займати максимальну частку від 25 до 33% у сівозміні, щоб уникнути зниження врожайності або збільшення використання пестицидів. Перерви в вирощуванні необхідні і перед вирощуванням споріднених культур

після ріпаку, наприклад у випадку з буряком через бурякових нематод і у випадку з гірчицею або стернею буряка через капустяної крижі.

Ріпак олійний важливий в сівозміні зі злаками, оскільки, як листова культура, він не може передавати хвороби і навряд чи шкідників соломинок.

Крім того, ріпак олійний сприяє структурі і біологічній активності ґрунту і служить для утворення гумусу, коли його частини рослин (коріння, солома) залишаються в полі. Літній ріпак зокрема забезпечує хорошу аерацію ґрунту з хорошим укоріненням. Осимий ріпак ще може засвоювати азот, що виділяється

попередніми культурами восени. Якщо ріпак залишається в ґрунті, він все ще проростає навіть через тривалий час (до десяти років) і може турбувати післяфрукти при переростанні в зарощенні.

У Центральній Європі в основному вирощують осимий ріпак. Посів відбувається восени, збір врожаю на наступному початку літа. В Канаді, найбільшому в світі виробнику ріпаку, переважає ярий ріпак.

В Німеччині, наприклад, термін сівби у другій половині серпня призначений для осимого ріпаку. Можливий посів до першого тижня вересня. Мета полягає в тому, щоб рослини в зиму пішли в міцну розеткову стадію, але ще не утворили витягнуту вісь пагонів.

Ріпак олійний вимагає оптимального насінневого ложа зі злегка затверділим горизонтом закладки насіння (глибина залягання ґрунту, на якій відкладається посівний матеріал) і рівною пухкої поверхнею. На квадратний метр висівають 35-70 зерен осимого ріпаку з глибиною закладки два-три сантиметри. У гібридів норма посіву трохи нижче, ніж у рядкових сортів. Поширена ширина міжрядь приблизно від 13 до 26 см. Використовується як буровий посів, так і більш точний, але більш складний однозерновий посів.

Ріпак олійний має лише обмежену морозостійкість приблизно до  $-15^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  з безсніжним ґрунтом. Якщо структура ґрунту змінюється через заморозки (промерзання), коріння теж можуть обірватися. Теплі полуденні температури, коли рослини починають дихати ближче до кінця зими, можуть

привести до пересихання, так як коріння не можуть вбирати достатню кількість води, коли земля ще промерзла.

Ріпак – однорічна рослина, холодостійка, вимоглива родючості ґрунту та до вологи, добре росте в помірній зоні. При вкороченні світлового дня насіннева продуктивність знижується, а вегетативна маса збільшується. У ріпака розрізняють ярі та озимі форми. Ріпак розмножується насінням. Насіння ріпака ярого проростає при температурі 1-3 °С, (озимого - 0,1 °С), сходи переносять заморозки до -5 °С (доросла рослина до -8 °С), оптимальна температура для проростання 14-17 °С. Ріст і розвиток рослин до фази стеблуння відбуваються повільно. У цей час утворюється потужна коренева система і розеткові листя. Діаметр розетки у ріпака озимого повинен бути 30-60 см; недостатньо розвинені рослини гинуть взимку [13].

Ріпак озимий сильно пошкоджується крижаною кіркою, страждає від випирання, вимокання, бактеріозу коренів. Навесні через 2 тижні після відростання починаються фази стеблуння і бутонізації. Період бутонізації-цвітіння триває 20-25 днів, цвітіння - 25-30 днів. Від кінця цвітіння до дозрівання насіння проходить 25-35 днів. Вегетаційний період у ріпака озимого становить 290-320 днів, у ярого - 80-120 днів. Сорти ріпака озимого ділять на пізньостиглі - понад 310 днів, середньостиглі - 280-310, ранньостиглі - до 280 днів; ярого: пізньостиглі - понад 110 днів, середньостиглі - 90-110, ранньостиглі - менше 80 днів [14].

Сходи з'являються на четвертий - шостий день після посіву, цвітіння починається на сороковий - п'ятдесятій день після появи сходів. Сума активних температур, необхідна для формування врожаю насіння, 1800-2100 °С, зеленої маси - 780-800 °С. За період вегетації ріпак споживає в 1,5-2 рази більше води, ніж зернові культури. Тому в посушливі роки його врожайність сильно знижується, хороші врожаї ріпак дає на помірно засолених ґрунтах з кислотністю, близькою до оптимальної (рН 6,5-6,8). Ріпак не переносить сирих ґрунтів з близьким заляганням ґрунтових вод, заболочені і важкі глинисті

ділянки. Він пред'являє високі вимоги до родючості ґрунту, тому чутливий на внесення мінеральних добрив.

Найбільш небезпечні шкідники ріпака - хрестоцвітні блішки, ріпаковий пильщик, ріпаковий квіткоїд, капустана попелиця. До найбільш поширених хвороб ріпака відносяться альтернаріоз, борошніста роса, несправжня борошніста роса, чорна ніжка, кореневі гнилі [15].

За способом запилення ріпак - факультативний самозапилювач. Перехресне запилення в різних умовах вирощування досягає 30%. Пилок переноситься в основному комахами. Апоміксис зустрічається у всіх сортів і

нерідко. Часто в квітці раніше дозріває яйцеклітина. Пилок в цей час знаходиться в фазі гаметогенезу. У ріпака зрілий пилок двоядерний, складається з вегетативного і генеративного ядер. При проростанні пилкового зерна відбувається розподіл генеративного ядра і утворення двох спермій.

Пилкова трубка досягає зародкового мішка за 20-30 хвилин, злиття гамет триває 2-3 години.

Цвітіння починається рано вранці з нижньої частини суцвіття і триває весь день, особливо при вологій погоді. Яйцеклітина зберігає здатність до запліднення протягом чотирьох - семи діб з моменту розкриття квітки. У пилку життєздатність висока, в стерильних умовах і при низькій температурі вона зберігається протягом одного року. При стресових умовах (посуха, підвищена температура, заморозки) життєздатність її падає, що веде до появи апоміксів.

При розкритті квітки першим з'являється рильце маточки, потім чашолистки; пелюстки подовжуються, і маточка знову опиняється всередині квітки - нижче або на рівні пильків. У багатьох сортів ріпака зустрічається селективне запліднення, обумовлене різною швидкістю росту пилкових трубок.

При перезапиленні необхідно звертати увагу на одночасність цвітіння сортів, оскільки відмінності за цією ознакою можуть бути істотними [16]. З ріпака, в

тому числі, виготовляється олія. Вона використовується для виготовлення маргарину, в текстильній, металургійній, миловарній, і шкіряній промисловості. Макуха після видалення шкідливих глікозидів являється цінним

кормом для худоби і містить безазотистих екстрактивних речовин 30%, жиру 9%, білка около 32%. Для преміксів і комбикормів використовується шрот з ріпака, як харчова основа. Виробництво біодизелю на основі рослинних олій (ріпакової також) стає все більш привабливим так як з кожним роком ціни на викопне паливо невинно зростають.

Медонос. Медопродуктивність - до 50 кг з гектара посівів. Мед білуватий, іноді жовтий. Ріпаковий мед є одним з найменш цінних сортів меду. З цієї причини, а також у зв'язку з тим, що ріпаковий мед непридатний для зимівлі бджіл, широке поширення цієї сільськогосподарської культури за останні роки

призводить до масової загибелі диких і культурних бджіл. Проблема не обмежується лише невдоволенням бджолярів; в перспективі ситуація може носити загрозливий гуманітарний характер через зниження запилюваності безлічі сільськогосподарських культур у зв'язку із загальним скороченням популяції бджіл. Європейське агентство з безпеки продуктів харчування в звіті від січня 2013 року вказує: «Був виявлений гострий ризик медоносним бджолам від обприскування для обробки насіння маїсу, ріпака та інших зернових культур. Також високий ризик був виявлений у впливі через нектар і / або пилок» [17].

Посівна площа ріпака в світі постійно збільшується; його обробляють в Індії, Китаї, Канаді та інших країнах. Основні райони обробітку озимого ріпака в СНД - лісостепова зона України, ярого ріпака - північна частина лісостепової зони України. Для кормових цілей озимий ріпак можна вирощувати майже у всіх районах степу, лісостепу і лісолуговій зоні Росії та країн СНД. За даними продовольчої і сільськогосподарської організації ООН в сезоні 2003-2004 років було зібрано 36 млн т насіння ріпака, а в 2004-2005 роках - 46 млн т. У 2005 році під ріпак було відведено 264 тис. кв. км, що становить близько 2% світової площі ріллі. Постійно зростаюча рентабельність паливного застосування таких культур, як цукровий очерет, ріпак, соняшник та ін., змушує сільгоспвиробників скорочувати площі під продовольчими сільськогосподарськими культурами з продовольчими цілями. За даними Он



World, світове виробництво ріпака в 2008-2009 сільськогосподарському році складало 58 млн т. При цьому на ЄС довелося 19 млн т, Канаду - 12,6 млн т, Китай - 11,5 млн т. Середня врожайність ріпака в світі 15 ц / га (1,5 т / га або 150 т / км).

Максимальна врожайність досягнута білоруським підприємством ВАТ «Агрокомбінат Південний» Гомельського району і склала 64 ц / га (6,4 т / га або

640 т / км). [18] Сумарне виробництво ріпака в світі в 2014 році склало 73,8 млн т, в 2016 році - 68,9 млн т. З 1965 року (5,2 млн т) виробництво зросло в 14 разів, а з 1995 року (34,2 млн т) більше ніж в два рази. З 1990-х років ріпак є світовою

олійною культурою з другою за величиною часткою світового ринку після сої.

У 2007 році на ріпак припадало 12,9% світового виробництва олійних культур.

У 2008/09 році у світі було вироблено близько 54,1 млн т ріпаку, що більш ніж у чотири рази перевищує річне виробництво на початку 1980-х років (12,7 млн

т в середньому між 1980-1982 рр.). Виробництво ріпакової олії також різко

зростає, при цьому оціночна частка загального виробництва рослинних олій за

2008/09 маркетинговий рік становить 14,5 відсотка.

Порівно з 2018 р, в 2019 році зібрали на 22% більше ріпака, що є рекордним урожаєм, тоді як на 1,3 га зросли площі, виділені під ріпак. Це на третину більше

від результату в 2018 році і являється рекордним показником з 2010 року.

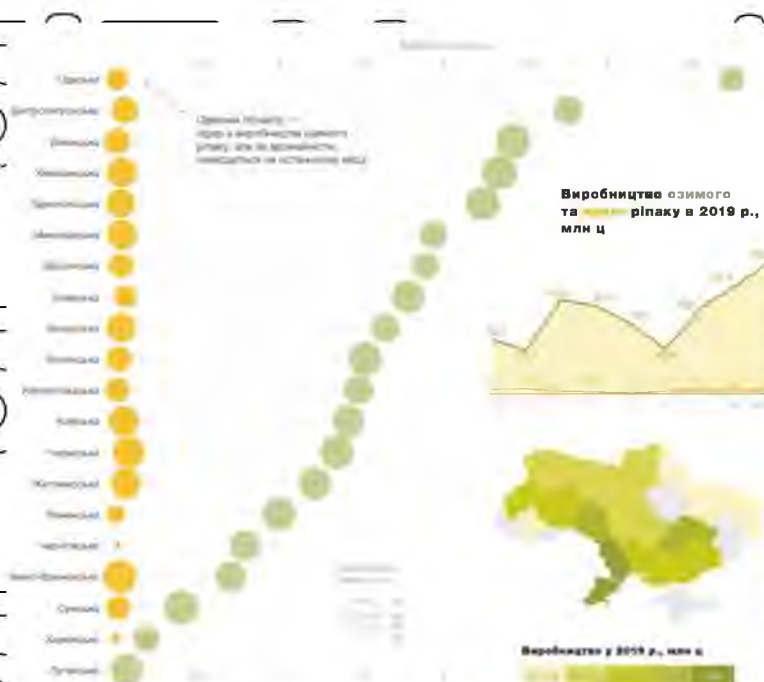
В 2020 році у світі зібрано 72 375 819 тонн ріпаку. 10 найбільших країн-виробників разом зібрали близько 84,9% світового врожаю. За даними ФАО, у 2014 році у світі було вироблено 25,9 млн т ріпакової олії.

В табл. 1.1 представлено представлено країни, які в 2020 рр. виробили найбільше ріпака.

Таблиця 1.1 Найбільші виробники ріпаку в 2020 році [19]

Країна	Кількість ріпаку (в тонах)
1. Канада	19.484.700
2. Китайська Народна Республіка	14.000.000
3. Індія	9.124.000
4. Німеччина	8.527.300
5. Франція	3.297.120
6. Польща	2.987.460
7. Росія	2.572.492
8. Україна	2.557.200
9. Австралія	2.298.529
10. США	1.576.170
Загальна десятка кращих	61.424.976
Всього інші країни	10.950.848

На рис. 1.1 представлено графік виробництва ярого та озимого ріпаку в 2019 році [20].



**Рис 1.1.** Графік виробництва ріпака ярого та озимого по областях України в 2019 році (млн ц) [20]

## 1.2. Селекція ріпака на стійкість до абіотичних чинників довкілля

Для більшості сільськогосподарських наук характерне прагнення збільшити врожайність шляхом зміни та створення оптимальних умов навколишнього середовища для даної рослини, тоді як селекція рослин, крім подібних цілей, також прагне змінити саму рослину так, щоб, відповідно до потреб виробника, найкраще пристосувати до існуючих умов навколишнього середовища, таким чином, щоб вона дала максимально можливий та якісний урожай.

Метод виконання селекційної роботи, що веде до отримання рівної лінії, а отже, і нового сорту, є способом селекції. Новий сорт повинен бути відмінним (принаймні чимось відрізнятися від іншого загальновідомого сорту), рівномірним (рівномірним за своїми властивостями) та стійким (властивості не змінюються після його розмноження) [21].

У початковий період одомашнювання рослин селекція була єдиним методом їх вдосконалення. В даний час це рідко трапляється поодинокі через те, що сорти дуже однорідні, а ефективність відбору залежить від генетичного різноманіття популяції. Для того, щоб розширити сферу генетичних варіацій, переважно використовується схрещування. Для отримання нового сорту необхідна велика кількість схрещувань. Процес розведення, що включає схрещування, дає рівномірні гомозиготні лінії (еквівалентно родичу у чужорідних рослин). Сорти самозацільних рослин - лінійні сорти [22].

### Методи розмноження самозацільних рослин

**Родовідний метод** - після схрещування гомозиготних батьківських рослин отримують гетерозиготну генерацію F1. У поколінні F2 проводиться відбір. Насіння (покоління F3) висівають довгими рядами. Кожен ряд походить від

насіння однієї рослини F<sub>2</sub>, демонструючи все ще значну неоднорідність та гетерозиготність - це так звана сім'я. Однорідність рослин усередині родини зазвичай досягається у поколіннях F<sub>5</sub> або F<sub>6</sub>, водночас видно більші відмінності між рядками. Найкращі лінії - кандидати на різноманітність. Недоліком методу є його трудомісткість [23].

**Метод Рамзеса** - цей метод полягає у множенні гібридного матеріалу (від покоління F<sub>1</sub> до F<sub>6</sub>-F<sub>8</sub>) без відбору. Селекція в раних поколіннях гібридних самоплідних рослин є неефективною через гетерозиготність, а отже і виникнення небажаних розщеплень у нащадків. Кожне наступне покоління зменшує частку гетерозигот вдвічі. Потім застосовується індивідуальний відбір. Недоліком цього методу є те, що вирощування сорту займає більше часу.

**Метод одиночного насіння** - у цьому методі збирається одне насіння з покоління F<sub>2</sub>, аналогічно і в наступних поколіннях, поки не буде досягнутий високий рівень гомозиготності. Потім рослини висівають точково і відбирають. Гомозиготні рослини зберігають діапазон мінливості покоління F<sub>2</sub>, оскільки вони є потомством усіх сегрегантів цього покоління.

**Витіснення** - це багаторазове схрещування потомства з одним із батьків (зворотнє схрещування) і дозволяє ввести одну цінну ознаку дикого або примітивного сорту в існуючий цінний сорт без погіршення його економічної цінності. Новий сорт отримують після шести - восьми схрещувань, які витісняють несприятливі характеристики донора та можливе самозапилення гібриду з метою його отримання в гомозиготній формі. Таким чином, ви можете ввести, наприклад, особливості імунітету [24].

#### **Вирощування перехресно запилювальних рослин**

При розведенні перехресно запилювальних рослин важливий не стільки генотип однієї рослини, скільки генетичний склад всієї популяції рослин та можливість його зміни. У природних умовах вони характеризуються випадковим

запиленням всередині популяції. Ізоляція рослин має важливе значення у селекції. Розрізняють просторову (наприклад, природні перешкоди, екранні рослини), тимчасову (поперемінне цвітіння дворічних рослин) та технічну (наприклад, пергаментні мішки, розміщені на квітах або суцвіттях) ізоляцію [25].

### Методи розведення перехресно запилювальних рослин

**Метод масового відбору** - простий, малоробочий фенотиповий відбір. Оцінки нащадків не проводиться, і тому вплив навколишнього середовища неможливо усунути. Найефективніший він у випадку моногенного успадкування і коли бажана ознака зумовлена рецесивним геном, а вилучена з популяції - домінантним геном.

**Індивідуально-племінний метод** - рослини відбирають фенотиповим відбором, але отримані насіння висівають окремо. Це дає можливість оцінити успадкування сприятливих ознак, ігноруючи вплив середовища на фенотип. Процедура подібна до племінного методу у самозапилювальних рослин, але рослини запилюються пилковою сумішшю всіх рослин у полі. Будинки, отримані з дуелей, можна помножити, використовуючи ізоляцію екрану між ними. Найкращі сім'ї після певної кількості поколінь об'єднуються для відтворення гетерозиготності. Індивідуальний племінний метод найбільш ефективний, коли селекцію можна зробити перед цвітінням, перш ніж несприятливі поєдинки дадуть пилок. Тому його в основному використовують при розведенні дворічних рослин.

**Резервний метод** - при цьому методі насіння, зібрані в перший рік із поєдинків, діляться на дві частини. Одну частину висівають для оцінки потомства, а іншу залишають у запасі. У наступному році висіваються лише найкращі бої на сховищах. Таким чином до пилу допускаються лише ті форми, які дають найкраще потомство. Цей вибір можна повторити в наступних циклах. Незважаючи на дворічний селекційний цикл, прогрес у розведенні відбувається швидше, ніж за племінним методом.

**Схрещування зсуву** - метод подібний до методу самозайнильних рослин. Для підтримки гетерозиготності необхідно схрещувати з великою кількістю рослин, що вдосконалюються [26].

Стратегія сучасної селекції спрямована на створення сортів і гібридів польових культур, що поєднують високу продуктивність і якість насіння з підвищеною адаптивністю до несприятливих умов вирощування. Успіх селекційної роботи багато в чому залежить, перш за все, від наявності вихідного матеріалу для селекції, а також ефективних методів оцінки селекційного матеріалу і знання фізіолого-біохімічних механізмів формування показників, що визначають якість і стійкість до стресових факторів різної природи. Встановлено, що рівень стійкості рослин до фітозахворювань і абіотичних стресів забезпечується багатьма фізіолого-біохімічними показниками, що відповідають за збереження життєздатності і перебудову метаболізму рослин в стресових умовах [27].

### Методи селекції ріпака

**Відбір з місцевих і зарубіжних зразків і популяцій.** Як метод широко застосовувався в нашій країні на початкових етапах роботи з ріпаком. Найбільш простий і доступний вид відбору - масовий відбір рослин до цвітіння за фенотипом і потім спільний посів насіння відібраних рослин. Метод дає можливість працювати з великими популяціями при невеликих витратах праці, однак він не дозволяє контролювати гени, що селектуються.

**Внутрішньовидова гібридизація.** Цей метод переважає в селекції ріпака, так як сорти і форми його легко схрещуються один з одним. Застосовують просту гібридизацію, беккросування, перезапилення трьох сортів і більш, а також ступінчасті схрещування. Використовують також метод одноразового насичення гібридів F<sub>1</sub> сортами інтенсивного типу.

**Віддалена гібридизація.** Цей метод використовують в тому випадку, коли вичерпано резерв мінливості і немає джерел або донорів будь-яких господарсько цінних ознак в межах виду. Міжвидова гібридизація в поєднанні з відбором є ефективним методом створення вихідного матеріалу для селекції ріпака на якість масла і насінневу продуктивність. Без додаткових зусиль, в тому числі без колхичинування, можна отримати великий резерв мінливості для селекційної роботи. Цей метод широко застосовують за кордоном - в Швеції, Канаді, Німеччині. Ріпак схрещують з капостою, сурпицею, гірчицею чорною і сарептською і іншими видами роду *Brassica*.

**Ресинтез і синтез нових форм ріпака.** У віддаленій гібридизації як відособлений напрям виділяють ресинтез видів, тобто штучне відновлення вже існуючих видів на основі комбінації геномів при віддаленій гібридизації. Так, гібридизацією різних видів капусти з сурпицею і подальшим подвоєнням числа хромосом були отримані цінні форми і сорти ріпака, що перевершують по олійності, стійкості до хвороб та зимостійкості сорти, отримані традиційним способом. Крім гібридизації при віддалених схрещуваннях застосовують метод злиття протопластів і подальшого вирощування гібридів на штучних середовищах. Ресинтез ріпака проводиться в Японії, Швеції та інших країнах.

**Гаплоїдія.** У ріпака поява гаплоїдів - досить часте явище. Вони відрізняються дрібними квітками і відсутністю пиляків. Гаплоїди утворюються шляхом апоміксису. До методів отримання гаплоїдів відносяться культура пиляків, пилку і мікроспорія. У культурі пиляків спонтанне збільшення числа хромосом відбувається лише в 20% випадків. В основному цього досягають за допомогою колхичину.

В даний час гаплоїдна біотехнологія використовується в ІББР (Казахстан) для отримання перспективних гомозиготних ліній ярого ріпака.

**Біотехнологія.** Безсумнівна перевага біотехнологічних методів можливість передавати в рослинний організм гени не тільки представників

інших сімейств рослинного світу а й вірусів, бактерій, грибів і навіть тварин. Для даного методу не існує бар'єрів несумісності. Так, наприклад, французькі дослідники з метою закріплення чоловічої стерильності у ріпака перенесли хлоропласти *Raphanus* в ріпак. Безпосередній етап отримання та перевірки трансгенних рослин займає близько двох років, проте цьому передують трудомісткий і тривалий період пошуку і клонування цільового гена. Недолік методу - його висока собівартість. Стимує застосування нових технологій в селекції і побоювання споживачів щодо безпеки генетично модифікованих продуктів.

Виявлення в кінці 60-х - початку 70-х років минулого століття у ріпака та інших хрестоцвітих джерел цитоплазматичної чоловічої стерильності стимулювало роботи щодо практичного застосування ефекту гетерозиса - створення гетерозисних гібридів з використанням ЦМС і комбінаційної несумісності.

**Методика і техніка селекції.** Її ведуть за схемою, прийнятою для перехресно запліднених рослин. Зазвичай в селекційному процесі застосовують метод половинок, при якому одну частину насіння висівають для випробування, а іншу для розмноження на ізольованих майданчиках. Також окремо висівають для випробувань низькоерукових і низькоглікозинолатних сортів і сортів з високим вмістом цих речовин. В іншому випадку в результаті перезапилення рослин вміст цих речовин в насінні буде різним. Так, в Швеції перспективні популяції, отримані при гібридизації про відібрані в F2 або F3, вирощують методом пересіву чотири - п'ять років, потім відбирають індивідуально сімейним або обмежено-масовим відбором елітних рослин. Селекція на зниження вмісту ерукової кислоти і глікозинолатів неможлива без постійного вдосконалення методів біохімічної оцінки селекційного матеріалу. При цьому широко використовуються газохроматографічні і фотоколориметричні методи визначення жирних кислот, застосовуються також методи паперової хроматографії і ядерного магнітного резонансу.



**Техніка схрещування.** Перед кастрацією у рослин видаляють всі бруньки в пазухах листків і бічні пагони, в центральній китці - нижні квітки, що розкрилися і верхні недорозвинені. Бутони обережно розкривають пінцетом і видаляють пиляки залишаючи в квітці тільки один пиляк. Після цього на рослини обов'язково одягають ізолятор. Через два - три дні проводять запилення шляхом нанесення пилку на пиляк і знову поміщаючи рослину під ізолятор. Надалі видаляють всі пагони, які знову утворюються [28].

### Селекція на зимостійкість для ріпака озимого

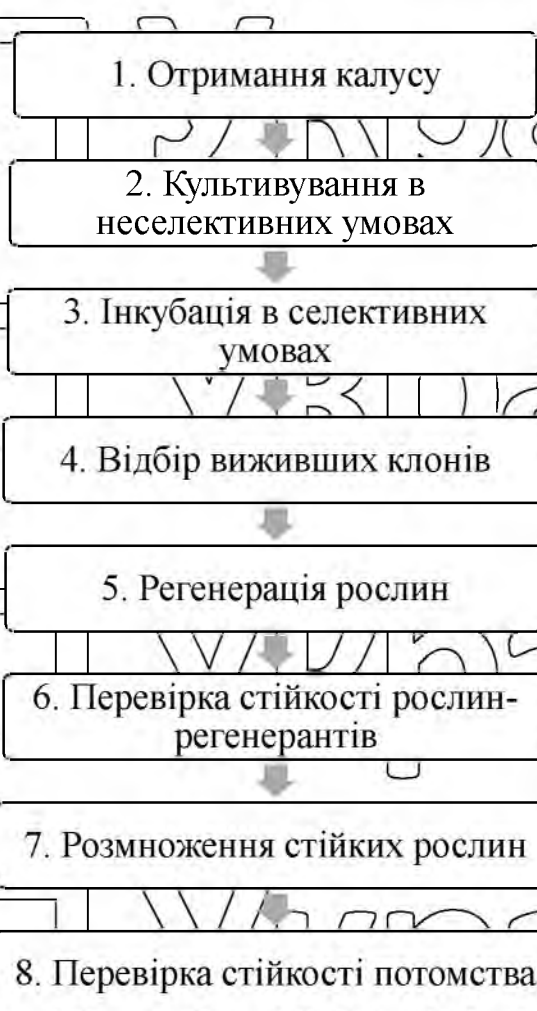
Поняття «зимостійкість» дуже широке, воно включає в себе здатність рослини протистояти комплексу різних несприятливих впливів зовнішнього середовища на протязі осінньо-зимового та ранньовесняного періодів (дія низьких негативних температур, зимових відлиг і весняного відтавання з різким переходом до морозів, вимокання та випрівання, весняної фізіологічної посухи в холодному ґрунті або в тому, що не відтанув). Оцінку і відбір на зимостійкість проводять за такими ознаками, як висота точки зростання, форма і потужність осінньої розетки, темпи осіннього і весняного зростання, продуктивність сухої речовини рослин перед відходом в зиму. Відбір рослин ріпака озимого, рано припиняють осінній приріст, сприяє виділенню більш зимостійких генотипів [29].

### Клітинна селекція

Клітинною селекцією називається відбір у культурі *in vitro* клітин із заданими властивостями. Перевагою відбору *in vitro*, порівняно з традиційною селекцією, є можливість маніпулювати мільйонами генотипів у малому обсязі. Якщо висадити в поле рослини, які за кількістю відповідають кількості клітин в одній колбі (а це приблизно 100 мільйонів), вони займуть десятки гектарів. Витрати на обробку такого поля та проведення селекційних заходів будуть значно більшими, ніж у разі застосування клітинної селекції. Крім того, роботи

в лабораторних умовах не залежать від сезону та погоди. При використанні клітинної селекції час, необхідний створення нового сорту, скорочується на 2-4 роки. [30]

Усі операції, пов'язані з проведенням клітинної селекції, можна поділити на кілька етапів. (рис. 1.2):



**Рис. 1.2** Схема клітинної селекції

#### 1. Отримання калусної чи суспензійної культури

Якщо передбачається, що в результаті клітинної селекції будуть отримані рослини з новими властивостями, необхідно одержати культуру клітин, здатних до морфогенезу. Слід використовувати типи експлантів та умови культивування, що сприяють утворенню морфогенних тканин.

2. Субкультивування протягом 2-3 місяців для збільшення кількості клітин та підвищення генетичного розмаїття.

У процесі субкультивування відбираються клітини, здатні до регенерації рослин. Іноді для підвищення частоти мутацій клітини обробляють хімічними чи фізичними мутагенами.

3. Вибір виду та концентрації селективного фактора

Вид селективного чинника залежить від поставленої мети. Щоб вибрати концентрацію селективного фактора або визначити ступінь жорсткості селективних умов, визначають реакцію рослин і клітин, що культивуються, на стресор у певному діапазоні його концентрації. Селективним вибирають такий вплив, при якому виживає і зберігає здатність до морфогенезу 20-30% клітин.

4. Інкубація культивованих тканин у селективних умовах, відбір клонів, що вижили.

Селективні агенти додають у середовище для культивування клітин. Клітини, що вижили, знову пересаджують на селективне живильне середовище. Такий відбір повторюють кілька разів.

5. Стабільно стійкі клони переносять на середовище для регенерації рослин.

6. Перевірка стійкості рослин-регенерантів.

Рослини, отримані із стійких клонів, поміщають у селективні умови. При цьому вибирається така концентрація стресора, яка значною мірою або повністю пригнічує ріст вихідних рослин.

7. Розмноження рослин, що вижили.

8. Перевірка стійкості потомства рослин-регенерантів.

Сьомий та восьмий етапи проводяться вже не в лабораторних, а в польових умовах. На цьому закінчується робота біотехнолога. Вразки, які

продемонстрували стабільний і успадкований прояв покращених ознак, передають селекціонерам та включають до селекційного процесу. Таким чином, методи біотехнології не замінюють традиційну селекцію, а служать для підвищення її ефективності і прискорення селекційного процесу. [31]

### Одержання рослин, толерантних до несприятливих природних умов

На рівні окремих клітин важко вести відбір за такими багатоконпонентними ознаками як урожайність, тривалість вегетаційного періоду, фотоперіодичність та ін, що визначається переважно на рівні цілого організму. Разом з тим тканини, що культивуються, успішно використовуються для поліпшення якості та кількості рослинного білка, збільшення продукції ряду сполук вторинного метаболізму. Для відбору рослин зі збільшеним вмістом незамінних амінокислот використовують селекцію на середовищах, що містять їх токсичні аналоги. Підвищений вміст триптофану був відзначений у рослинах, регенованих з клонів, резистентних до 5-метилтриптофана. На середовищах з інгібуючими концентраціями лізину та треоніну були виділені лінії та регеновані рослини із зміненою активністю ферменту аспартаткинази. Внаслідок мутації зменшилася чутливість аспартаткинази до інгібування лізином. Отримані рослини характеризувалися підвищенням у кілька разів вмістом амінокислот, синтез яких іде аспартатним шляхом: лізину, треоніну, ізодейцину і метіоніну.

Однак найчастіше клітинна селекція застосовується для відбору форм, толерантних до різних біотичних та абіотичних стресів.

Дуже важливим є питання відповідності реакції на стрес цілих рослин та ізольованих клітин, яке досліджено поки що недостатньо повно, і наявні дані досить суперечливі. Так, показано позитивну кореляцію між реакціями калусних тканин і рослин при дослідженні впливу підвищеної кислотності ґрунту та токсичного рівня алюмінію, а також дії високих та низьких температур. А ось чутливість до засолення *in vivo* та *in vitro* збігається не завжди. Описані випадки,

коли кашосні тканини, отримані від солетолерантних сортів, були більш стійкими до NaCl, ніж тканини, виділені із солечусливих форм. Але є й протилежні приклади: втрата якості солестійкості у культурі *in vitro* описана для

типового галофіта солероса. Суперечливість опублікованих даних, ймовірно, пов'язана з різноманіттям захисних реакцій, серед яких частина координується

на організмовому рівні (наприклад, наявність спеціальних заходів для виведення солі з організму) рослини, відкладення солей у покривних тканинах та ін.), частина регулюється на клітинному рівні. З урахуванням наведених даних слід з

великою обережністю використовувати ізольовані клітини для тестування

стійкості тих чи інших сортів культурних рослин. Разом з тим, накопичено вже

багато даних про важливу роль молекулярних механізмів у забезпеченні стійкості рослин до біотичних та абіотичних стресів. Тому висока ймовірність

підвищення толерантності рослин, регенованих з відібраних *in vitro* резистентних клітинних ліній. [32]

Для селекції толерантних до несприятливих умов довкілля клітин найчастіше використовують безпосередньо стресовий фактор, NaCl або Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для відбору солестійких варіантів, гербіциди, солі важких металів тощо. (Табл.

1.2). Шляхом клітинної селекції на середовищах із хлоридом натрію отримані

солестійкі рослини тютюну, люцерни, пшениці та інших видів. У селективних системах з Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> відібрано рослини ячменю, тютюну та ін, толерантні до сульфатного засолення. Ряд холодостійких форм отриманий із клітин, виділених

*in vitro* за здатністю переживати інкубацію при низьких позитивних температурах.

# НУБІП УКРАЇНИ

**Таблиця 1.2** Приклади відбору толерантних до несприятливих природних умов рослин з використанням різних стресових факторів

Селективний фактор	Ознака	Вид рослини
NaCl	Стійкість до хлоридного засолення	Пшениця, кукуруза, табак, люцерна
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Стійкість до сульфатного засолення	Ячмінь, табак
Низкі позитивні температури	Холодостійкість	Рис, хризантема
Кислий рН і солі алюмінію	Стійкість до солей алюмінію, можливість рости на кислих ґрунтах	Ячмінь, рис, сорго
Аноксія	Стійкість до кореневого затоплення	Пшениця, цукрова тростина

Шляхом відбору клітин, стійких до низьких значень рН та солей алюмінію, отримані рослини ячменю, рису та сорго, толерантні до цього металу та які успішно ростуть на кислих ґрунтах. За допомогою методу клітинної селекції були отримані рослини кукурудзи, стійкі до гербіцидів амідазолінону та етоксидиму. В результаті відбору клітин на середовищах з концентраціями гербіцидів, що поступово підвищуються, були виділені клітинні лінії, рослини з яких витримували дози гербіцидів у 3-10 разів вищі, ніж вихідні форми.

Іноді застосовують спеціальні селективні системи, вибір яких ґрунтується на використанні специфічних механізмів стійкості (табл. 1.3) [33]

**Таблиця 1.3** Приклади відбору стійких рослин за допомогою спеціальних селективних систем

Селективний фактор	Ознака	Вид рослини
1-азетидин-2-карбонова кислота	Солестійкість	Рис, соя, табак
Тіазолідинкарбонова кислота	Солестійкість	Люцерна, манго

Продовження таблиці 1.3 Приклади відбору стійких рослин за допомогою спеціальних селективних систем

Оксипролін	Солестійкість	Рис
Оксипролін	Морозостійкість	Пшениця, ячмінь
Поліетиленгліколь	Посухостійкість	Рис, кукурудза
Селективний фактор	Ознака	Вид рослини
Манніт	Посухостійкість	Пшениця, табак
Етионін	Солестійкість	Табак
Морська вода	Солестійкість	Пшениця, табак

Наприклад, встановлена позитивна кореляція між накопиченням у клітинах проліну та підвищенням стійкості рослин до зневоднення, викликаного засоленням, посухою або низькими температурами. Активність ферментів, що каталізують біосинтез проліну, пригнічується надлишком продукту, що не дає

можливості суттєво підвищити в тканинах рівень цієї амінокислоти. Для підвищення ендogenous рівня проліну проводять селекцію на середовищах, що містять їх токсичні аналоги. У цих умовах виживають ті клітини, у яких ферменти біосинтезу проліну нечутливі до інгібування за типом зворотний зв'язок, і концентрація проліну збільшена. Шляхом відбору клітин у присутності

1-азетидин-2-карбонової кислоти отримані толерантні клітини до лінії сої, тютюну та рису. На середовищах з іншим аналогом проліну - тiazолідинкарбоновою кислотою вдалося виділити стійкі клітини люцерни та манго. Толерантні до

оксипроліну клітинні культури та рослини отримані у рису, ячменю та пшениці.

Стійкі до аналогів амінокислоти варіанти характеризувалися підвищеним вмістом проліну і, як правило, були більш стійкими до NaCl, ніж вихідні форми.

Рослини пшениці та ячменю, отримані шляхом клітинної селекції на середовищі з оксипроліном, мали підвищену морозостійкість. Для відбору толерантних до

холоду рослин селекція на середовищах з проліном виявилася ефективнішою,

ніж прямий відбір при зниженій температурі. [34]

Засолення та низька температура викликають зневоднення рослинних тканин, тому збільшення здатності клітин утримувати воду сприяє підвищенню стійкості до цих стресових факторів. Для відбору клонів, толерантних до зневоднення, використовують середовища з осмотиками: поліетиленгліколем, манітом, сорбітом. У селективній системі з ПЕГ були отримані солестійкі клітинні лінії та рослини рису, а з використанням маніту – солестійкі рослини тютюну та пшениці.

Надлишок солі порушує метаболізм сірки в рослинах, викликає зменшення пулу сірковмісних амінокислот цистеїну та метіоніну. Нестача цих амінокислот створює несприятливі умови для перебігу пов'язаних з метаболізмом сірки шляхів біосинтезу азотистих сполук, вуглеводів та ліпідів. Суперпродукція метіоніну здатна заповнити дефіцит сірки, що виникає в умовах засолення. Для відбору клітин із підвищеною активністю біосинтезу метіоніну рекомендовані середовища з його токсичним аналогом етіоніном.

Ще одним селективним фактором, що імітує сульфатно-хлоридне засолення, є морська вода, додана до живильного середовища в інгібуючих рідких дозах. Отримані з селективних середовищ калюси рослини тютюну і пшениці були толерантні до токсичних для рослин дикого типу концентрацій солей і характеризувалися в стресових умовах підвищеним вмістом протіну.

Кожна з перерахованих систем відбору солестійких клітин має переваги. У разі використання спеціальних селективних систем спрямовано відбираються варіанти, солестійкість яких обумовлена певним механізмом. При проведенні селекції на середовищах з хлоридом або сульфатом натрію різноманітність механізмів стійкості відселектованих форм буде значно більшою, хоча без спеціального дослідження не можна буде сказати, яка конкретна причина толерантності. Використання як селективного фактору морської води має практичну спрямованість на одержання рослин, для поливу яких можна застосовувати солону воду. [35]



**Одержання рослин, стійких до хвороб.** Великою різноманітністю характеризуються селективні системи, що використовуються для одержання рослин, стійких до патогенів. У тих випадках, коли вражаючим фактором є токсичні продукти життєдіяльності патогенних грибів або бактерій, для відбору стійких клітин до живильного середовища додають фільтрат культуральної рідини збудника або очищений токсин. Шляхом селекції на середовищах з культуральним фільтратом *Fusarium* або фузарієвою кислотою отримані рослини люцерни, томатів, картоплі та пшениці з підвищеною стійкістю до фузаріозу. Відбір на середовищах із продуктами життєдіяльності різних видів *Helminthosporium* дозволив виділити форми пшениці, кукурудзи, ячменю та рису, несприйнятливі до гелмінтоспору. Аналогічно отримані рослини тютюну, стійкі до *Pseudomonas syringae*, рослини картоплі, стійкі до кільцевої гнилі та інші несприйнятливі форми різних видів культурних рослин.

Однак токсини, що виділяються патогенами, не завжди є єдиним або головним вражаючим фактором. Тому стійкість до токсинів може не корелювати зі стійкістю до збудників хвороб. І тут для відбору толерантних рослин рекомендовані інші системи клітинної селекції. Одним із способів є інокуляція клітин калюсних культур спорами збудника хвороби. Після розвитку інфекції відбирають неуразнені сектори та регенерують з них клітин рослини. У такий спосіб були виділені рослини рису, стійкі до пірикуляріозу.

У зв'язку з високою швидкістю мутування патогенів, що призводить до виникнення нових рас, специфічна стійкість рослин за принципом ген на ген не може надовго їх захистити. Тому великий інтерес становлять різні види неспецифічної стійкості, зумовлені характером взаємодії паразита та господаря. Наприклад, для активного росту та спороношення гриби родів *Phytophthora* та *Pythium* потребують певних рослинних стеринів. На рослинах з нестандартним складом стеринів дані гриби не здатні паразитувати. Для відбору таких рослин тканини картоплі, що культивуються, піддавали дії поліенових антибіотиків, у присутності яких виживали тільки клітини зі зміненим співвідношенням

стероїдних сполук. З резистентних до антибіотиків клітин були регенеровані рослини, серед яких вдалося відібрати зразки, стійкі до фітофтору. Дана селективна система виявилася корисною і для створення рослин, стійких до комах-шкідників, які також потребують стероїдних сполук рослинного походження для здійснення линяння, метаморфозу личинок та формування репродуктивної системи.

Інший підхід підвищення стійкості рослини пов'язані з обмеженням проникнення у них патогенів. Одним із перших етапів зараження є руйнування клітинних стінок рослин гідролітичними ферментами, що продукуються збудником. Було висловлено припущення, що зниження чутливості до пектинази та целюлази підвищить стійкість до патогенів. Принаймні щодо пектинази це припущення виявилось вірним. Серед рослин картоплі, регенерованих з калюсів на середовищі з пектиназою в сублетальній концентрації, були форми з підвищеною стійкістю до фітофторозу, чорної ніжки та кільцевої гнилі. При цьому до 15% регенерантів характеризувалися несирийчатливістю одночасно до кількох патогенів.

Одним із механізмів захисту від патогенних грибів є виділення рослиною різних інгібіторів. Більшість інгібіторів є фенольними сполуками або їх окисленими формами. Накопичення фенольних сполук і активація ферментів, що їх окислюють, корелює зі стійкістю до патогену. Попередниками біосинтезу фенольних сполук є фенілаланін і триптофан, тому збагачення клітин цими амінокислотами може призвести до підвищеної продукції фенольних сполук. Використання токсичних аналогів амінокислот 5-метил-триптофану та парафторфенілаланіну дійсно дозволило виділити клони з суперпродукцією основної амінокислоти. У виділених клонів активність захисних реакцій була набагато більшою за рівень у контрольних клонах. [36]

### 1.3 Генетичне різноманіття

Кожен вид складається з особин зі своїм набором генів. Ген — це одиниця спадковості, за якою покоління можуть успадковувати риси своїх батьків. Це

стосується послідовності нуклеотидів у ланцюгах ДНК, упакованих у хромосоми. Ці гени відповідають за вираження їхніх відмінних особливостей, оскільки ці гени контролюють відмінні та подібні характеристики між різними організмами. Популяція матиме різні гени, які відповідають за варіації серед її членів. Наприклад, популяція людей складається з особин з різними фізичними рисами, що відображає їхню генетичну різноманітність. Генетична різноманітність також може спостерігатися між видами. Наприклад, популяція собак може складатися з різних порід собак. [37]

Багато дослідників визначають генетичне різноманіття як кількість і ступінь генетичної мінливості серед популяцій, тоді як біорізноманіття відноситься до різноманітності всіх організмів у даній екосистемі в певний час.

Крім генетичного різноманіття, іншим джерелом різноманітності всередині видів або всередині популяції є навколишнє середовище. Взаємодія навколишнього середовища та генів відповідає за ступінь різноманітності особин у популяції.

Популяція може складатися з невеликої чи великої кількості особин. Деякі з цих особин можуть спаровуватися і давати потомство. Ступінь генетичної варіації серед індивідів є змінною. Генетична різноманітність присутня в популяції, оскільки особини мають різні гени через невеликі відмінності в їхніх послідовностях ДНК. Зміни в послідовності ДНК через мутації можуть призвести до появи різних алелей. Варіація алелей впливає на адаптивність організму, його фізіологічний розвиток, здатність виживати й розмножуватися в різних умовах навколишнього середовища.

### **Важливість генетичного різноманіття**

Генетичне різноманіття є важливим, оскільки воно може гарантувати, що певні групи особин, види чи популяції зможуть адаптуватися до певних факторів середовища. Окрім того, що їм доводиться мати справу з умовами навколишнього середовища, генетичне різноманіття надає їм здатність протистояти хворобам та епідеміям, що виникають. Навпаки, низька генетична

різноманітність може збільшити сприйнятливість виду до біотичних і абіотичних стресів, таких як хвороби та посуха, і, отже, зіткнутися з вищим ризиком вимирання в довгостроковій перспективі. [38]

Генетична різноманітність породжена генетичними варіаціями. Генетична варіація є важливою для виду, зокрема, тому що вона дозволяє їм адаптуватися до різних умов середовища. Як наслідок, цей вид має меншу ймовірність вимирання, а тому виживає тривалий час. Таким чином, генетичні варіації допомагають виду з точки зору його адаптації, виживання та його еволюції.

Різноманітність генофонду дозволяє виду виживати, оскільки чим різноманітнішими є гени в популяції, тим різноманітнішими будуть алелі. Серед цих алелів можуть бути певні алелі, які дозволять певним індивідуумам стати краще адаптованими і, отже, вижити під певним набором стресорів навколишнього середовища. Таким чином, наступні покоління матимуть перевагу, оскільки вони зможуть успадкувати такі алелі, які дозволять їм переносити певні умови. Ось як це може допомогти зберегти виживання їх виду.

Здатність видів пристосовуватися до зміни умов середовища визначає їх тривале виживання. Це довгострокове виживання залежить від генетичної різноманітності видів. Наприклад, переносимість одного і того ж стресору різними індивідами однієї популяції різна. Деякі особини, що несуть певні гени, можуть жити в умовах високого навантаження забруднюючих речовин у своєму середовищі, а інші — ні. Особи, що вижили, можуть передати своїм нащадкам гени, відповідальні за стійкість до забруднюючих речовин, сприяючи майбутній здатності популяції адаптуватися до умов навколишнього середовища.

Більше різноманіття видів призводить до більшої різноманітності середовищ існування. Видова різноманітність підтримує функції та структуру екосистем. Різноманітність екосистем дозволяє екосистемам відновлюватися від наслідків будь-яких змін, що відбуваються внаслідок стихійних лих або раптових змін.

Генетичне різноманіття дає інформацію про еволюційний процес. Його вважають сировиною та ключем до еволюції, а також пристосування видів до зміни світу. Деякі види можуть зрештою не вижити, якщо їм не вдасться еволюціонувати та, відповідно, адаптуватися до змін середовища.

Генетичне різноманіття в невеликих популяціях є важливим, оскільки вони можуть легко втратити своє генетичне різноманіття з часом через вплив генетичного дрейфу. Фіксація та дрейф певного алеля може призвести до втрати іншого, що з часом призведе до втрати генетичного різноманіття. Коли дві особини спаровуються в невеликій популяції, вони, швидше за все, матимуть той самий алель, який передасться через покоління, що зрештою призводить до фіксації алеля, що зменшує генетичну різноманітність серед цієї популяції. Навпаки, великі популяції підтримують генетичне різноманіття, зберігаючи свій генетичний матеріал. Тому генетичне різноманіття великих ссавців важливіше, ніж дрібних, оскільки вони дають відносно невелику кількість нащадків.

Генетика збереження — важливий момент для зрятування генетичного різноманіття видів, які піддаються зникненню. [39]

Зникнення певного виду є нижчим, якщо серед популяції присутнє високе генетичне різноманіття, оскільки низькі показники генетичного різноманіття знижують придатність популяції. Цей спад є одним із факторів, що підвищує ризик вимирання.

Нарешті, генетичне різноманіття відповідає за морфологічні, фізіологічні та поведінкові варіації між видами, популяціями та особинами, що, як наслідок, впливає на екологічні функції. Таким чином, зменшення генетичного різноманіття серед популяцій видів може вплинути як і на добробут людей.

### Приклади генетичного різноманіття

Організми, що розмножуються нестатевим шляхом, мають меншу ймовірність високого генетичного різноманіття. Це тому, що він буде обмежений наявним генотипом, який у цьому випадку базуватиметься лише на одному з батьків. Наприклад, при облігатному партеногенезі мати дає початок нащадкам,

які є клонами. Під клоном це означає, що нащадки будуть нести ті самі гени, що й гени їх матері. Це пояснюється тим, що мати може народити потомство за відсутності партнера-чоловіка. Таким чином, у клонів можна очікувати будь-яку сприйнятливість до захворювань або генетичних розладів, оскільки генофонд обмежений геномом їхньої матері. Навпаки, генетичне різноманіття видів, що розмножуються статевим шляхом, вище. У статевому розмноженні спарювання забезпечує різноманітність генів, оскільки процес включає не лише геном матері, але й батька.

Генетичне різноманіття є значним у людей. По суті, люди мають різний колір очей, колір волосся, колір шкіри, зріст тощо. Різноманітність людських популяцій є ключем до таких методів ідентифікації, як використання відбитків пальців. Генетичне різноманіття людей значно виявляється серед віддалених популяцій, де різноманітність серед людських популяцій невелика порівняно із загальною варіативністю людини. [40]

### **Фактори генетичного різноманіття**

На генетичне різноманіття впливають чотири події, що контролюють еволюцію: мутація, генетичний дрейф, потік генів і природний відбір. Однак тільки мутації можуть породжувати абсолютно нові алелі.

**Мутації** — це зміни послідовності нуклеотидів ДНК. Виникнення мутацій в основному пов'язано з заміною або зміною генів і хромосом. Мутації можуть утворювати нові алелі, що призводить до зміни генетичної структури популяції.

Спонтанні мутації зустрічаються рідко. Вони не мають великого впливу на зміну генетичної структури популяції, а в короткі періоди вони мають незначний ефект. Ось чому мутації не керують еволюцією. Однак мутації разом з іншими механізмами адаптації, які впливають на еволюцію, можуть бути чудовим джерелом генетичного різноманіття в популяції.

У багатоклітинних організмах мутації можуть відбуватися як в соматичній, так і в гаметофітній клітині (гаметах). Мутації в соматичних клітинах можуть порушити мітоз і це може призвести до утворення пухлин. Ці мутації, однак, не

передаються наступним поколінням. І навпаки, мутації гамет — це спадкові мутації, які можуть передаватися нащадкам. Ці мутації впливають на генетичне різноманіття в довгостроковій перспективі.

**Генетичний дрейф** — це випадкова зміна частоти певного алеля в популяції від одного покоління до іншого внаслідок випадкових подій вибірки, яка менш виражена у великих популяціях. Генетичний дрейф відбувається через випадковий вибір деяких алелів, які успадковуються нащадками. Він впливає на генетичне різноманіття, фіксуючи певні алелі та втрачаючи інші, оскільки зміна частоти алелів може спричинити більш значні відмінності між різними популяціями. Генетичний дрейф більше впливає на малі популяції, ніж на великі, тому що ймовірність появи ефекту фіксованих або втрачених алелів вище в порівнянні з малими популяціями. Він не селективний до корисних генів, навпаки, шкідливі або летальні гени можуть бути виправлені, тоді як корисні гени можуть бути втрачені.

Генетичний дрейф сприяє генетичному різноманіттю популяцій, оскільки можуть фіксуватися нові рецесивні алелі. Він впливає на популяції, які постраждали від подій, що призвели до швидкого зменшення чисельності популяції, таких як стихійні лиха, які зменшують генетичне різноманіття серед популяцій.

**Потік генів** також відомий як міграція генів, визначається як передача алелів через популяції. Потік генів означає, що нові покоління народжуватимуться з певним алелем, який був переданий від донорської популяції до реципієнтної. Обидва мають різні частоти цього алеля. Наприклад, пилок може поширюватися у віддалені місця вітром, переносячи алелі від популяції з високою частотою алелів до іншої популяції з низькою частотою алелів. Однак найбільшою одиницею, в межах якої може відбуватися потік генів,

є вид.

Потік генів є дуже важливим механізмом, який підтримує генетичне різноманіття серед популяцій і сприяє еволюційному процесу шляхом міграції генів між двома популяціями, що мають різні частоти алелів. Цей фактор може створювати нові алелі або перегруповання хромосом, якщо новий алель раніше не був знайдений у популяції-реципієнті. Наслідки потоку генів включають збільшення генетичної різноманітності та впровадження нових алелів серед популяцій.

**Природний відбір** — це процес зміни генофонду популяції внаслідок відтворення особин, здатних протистояти змінам середовища. Це важливий спосіб адаптації популяції до умов навколишнього середовища в процесі еволюції. Індивіди можуть короткостроково протистояти факторам зовнішнього середовища за допомогою фізіологічних методів. Однак довготривала стійкість вимагає зміни генетичного складу популяції, щоб вижити.

Природний відбір — це передача корисних алелів наступному поколінню, що веде до покращення адаптивності. Він підтримує більш пристосовані організми, знищуючи менш пристосовані особини. Тому зміни генетичного матеріалу разом із природним відбором є основою еволюції видів. Усунення менш адаптованих алелей у популяції усуває більш чутливі організми, які не можуть переносити зміни середовища. Отже, природний відбір впливає на частоту алелів у популяції, впливаючи на внесок особин у наступні покоління, змінюючи частоти генів. [41]

Статевий відбір є наслідком або прямої конкуренції за запліднення між самцями чи сперматозоїдами (одностатевими членами), або тяжіння представників різних статей одна до одної. Статевий відбір впливає на рівні генетичної різноманітності і, відповідно, впливає на генетичну еволюцію.

Генетичне різноманіття, яке існує між поколіннями, залежить від генів, які передаються від чоловіків і жінок через покоління, щоб зберегти генетичне різноманіття.



### Збереження генетичного різноманіття

Генетичне різноманіття стикається з багатьма загрозами. Тому міжнародне співтовариство прагне підтримувати всі рівні біорізноманіття, включаючи генетичне різноманіття видів. Охоронна генетика прагне підтримувати генетичне різноманіття на різних рівнях, а також оцінювати та контролювати план збереження популяції. В основному це збереження різних елементів, що впливають на генетичне різноманіття, таких як моделі генетичної варіації, види, популяції та генотипи. Збереження генетичного різноманіття підтримує репродуктивну здатність у короткостроковій перспективі, водночас зберігаючи здатність видів до адаптації та еволюції в довгостроковій перспективі.

Однією з головних цілей природоохоронної генетики є збереження генетичної варіації серед зникаючих і рідкісних видів. Процес збереження генетичного різноманіття опосередковується трьома компонентами:

- 1) визначенням мети збереження,
- 2) знанням генетичного різноманіття популяції і
- 3) застосуванням методів збереження.

Найзручніша стратегія збереження генів для виду залежить від місцевих ознак, генетичної структури популяції та розміру географічного ареалу. Наприклад, генетичне різноманіття лісових дерев підтримується такими методами: шляхом вирощування популяцій у їх первісному середовищі існування, шляхом зберігання зародкової плазми в холодному середовищі або шляхом посадки дерев у різних місцях за межами їх походження.

Збереження генетичної різноманітності є однаковим для всіх живих організмів; однак застосовуються різні методи залежно від мети збереження, поширення об'єкта збереження та біологічної природи. Тому знання варіацій між популяціями та всередині них є важливими для отримання інформації для управління збереженням різних популяцій. [42]

#### 1.4 Використання молекулярно-генетичних маркерів в селекції

Генетичний маркер - характеристика організму, що використовується для визначення його генотипу. Зазвичай це наявність або відсутність гена або білка, або наявність певної його форми. Генетичні маркери також використовуються для ідентифікації людей або особин тварин або рослин, для ідентифікації видів та штамів мікроорганізмів, а також для визначення відносного положення окремих генів у геномі організму (картографування геному).

Морфологічні маркери, такі як форма листя та карликовість, були першими, які широко використовувались для генетичного аналізу. Однак вони не знайшли багатьох застосувань через їх численні недоліки, такі як: обмежена кількість, залежність від модифікуючого впливу навколишнього середовища, складний генетичний фон та труднощі у розрізненні гомозигот від гетерозигот [43].

Окрім морфологічних маркерів, використовувались маркери структурних білків (резервні білки) та функціональних білків (ізоферменти). Ізоферменти були розроблені в 1950-х роках і були першими маркерами для вивчення генетичної структури популяції, для оцінки ступеня поліморфізму та гетерозиготності, а також для вивчення генетичної подібності та генетичної чистоти. В даний час ізоферменти мають менше значення в генетичному аналізі, але все ще залишаються корисними в процесах розведення рослин. На ці маркери не впливає навколишнє середовище, вони успадковуються як прості менделівські одиниці і є кодомінантними. Завдяки ізоферментам було виявлено багатогенезне сімейство, що кодує  $\alpha$ -амілазу, фермент, відповідальний за гідроліз крохмалю під час пророщування зернових культур. Це дозволило розрізнити групу генів  $\alpha$ -Amy1, розташованих на хромосомах шостої групи у *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, групу  $\alpha$ -Amy2 на сьомій хромосомі та  $\alpha$ -Amy3 на хромосомах п'ятої групи. Вони також використовувались у дослідженнях щодо впровадження маркера Rex-1 до

вирощування томатів у поєднанні з стійкістю до нематод, а також при розробці локусного аналізу Pgt-2 для характеристики матеріалів для розведення капусти. Однак ізоферментні маркери зазнали невдачі при вивченні загальної характеристики рослинних геномів та при побудові генетичних карт. Це пов'язано з низьким поліморфізмом ферментних білків та необхідністю розробити методологію поділу, фарбування або екстракції для кожного ферменту [44].

Однак за останні двадцять років найбільшого значення набули молекулярні маркери на основі нуклеїнових кислот. Основним проривом у молекулярній діагностиці став розвиток маркерів RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), заснований на аналізі довжини рестрикційних фрагментів ДНК. Він полягає у формуванні певного спектру фрагментів ДНК, найчастіше створених в результаті перетравлення ферментами рестрикції, які розпізнають специфічні ділянки та специфічно перетравлюють ДНК. Потім ці фрагменти відокремлюють електрофорезом в агарозному гелі і переносять у мембрани. Ідентифікація поліморфізму проводиться з використанням мічених зондів, доповнюючих гомологічні фрагменти на мембранах. Поліморфізм RFLP в основному обумовлений мутаціями, що включають сайти рестрикції або дублювання, видалення або вставки поблизу місць рестрикції, які змінюють відстань між ділянками травлення.

Методи з використанням RFLP корисні головним чином для спостереження за рослинами, які перебувають на карантині або розмножуються *in vitro*, оскільки вони дозволяють виявляти чужорідну ДНК у рослинній тканині, наприклад, від патогена. Вони також використовуються для аналізу поліморфізму мітохондріальної та хлоропластної ДНК, у філогенетичних та таксономічних дослідженнях, а також для виявлення різних форм чоловічої стерильності [45].

Іншою групою молекулярних маркерів є маркери, отримані методом ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції). До них належать, серед іншого, маркери STS (Sequence Tagged Site), тобто місця, позначені послідовно. Маркери STS

використовуються для ущільнення генетичних карт та пошуку зв'язків з функціональними ознаками. Класичний маркер STS (Sequence Tagged Site) - це фрагмент довжиною 200-300 п.о., отриманий методом ПДР із використанням конкретних праймерів, розроблених на основі знань про послідовність всього фрагмента. Вони забезпечують високу специфічність ампліфікації, що підтверджується однорядним зображенням поділу продуктів ПДР на гелі, в якому в якості матриці була геномна ДНК. Наявність маркера STS у двох клоніях геномної бібліотеки означає, що вони містять послідовності, що перекриваються.

Отже, маркери STS можуть бути використані для упорядкування клонів бібліотеки ДНК у цілі послідовностей, що перекриваються. Особливим типом маркерів STS є специфічні маркери експресії (EST). Вони представляють відому, унікальну послідовність клону кДНК, ампліфіковану ретельно підібраними послідовностями праймерів. Використання праймерів EST забезпечує ідентифікацію кодуючої послідовності одного гена. Для того, щоб маркер EST виконував цю функцію на матриці геномної ДНК, сайти зв'язування праймерів повинні знаходитися в межах екзона. Класичний маркер STS характеризується низьким поліморфізмом, який не дозволяє виявити аельні форми, оскільки вони не відрізняються довжиною ампліфікованих фрагментів [46].

Молекулярні маркери також розроблені на основі простих повторюваних послідовностей. Це маркери SSR (Simple Sequence Repeats), тобто посилені мікросупутникові послідовності. Мікросателіти зустрічаються на всіх хромосомах і характеризуються сильним поліморфізмом через їх довжину та різну кількість повторень основної послідовності. Вважається, що вони зустрічаються частіше в області еухроматину, ніж у гетерохроматині, і їх агрегати були виявлені як в центромерах, так і в теломерах. Через високу геномну специфічність ці маркери розробляються індивідуально для кожного виду. Вони успішно використовуються для картографування та відбору бажаних генотипів. Крім того, вони є дуже важливим інструментом для вивчення структури популяції, генетичного різноманіття та відбитків пальців ДНК. Мікросателітні маркери також використовували для перевірки стійкості пшениці

до різних типів збудників, таких як попелиця *Diuraphis noxia* або вірус жовтої мозаїки пшениці [47].

Знання хромосомного розташування цих маркерів робить їх корисним інструментом для оцінки генетичного різноманіття сортів озимого тритикале. На

додаток до маркерів SSR, в останні роки також були розроблені маркери SCAR

(Sequence-Characterized Amplified Region), тобто поліморфізм продуктів, що дублюються в секвенованій області, і в основному характеризується варіантом

гена. Маркери SCAR використовували для оцінки генетичних змін між сортами тритикале та лініями. Було проаналізовано 22 маркери SCAR, п'ять з яких не

виявляли поліморфізму в обстежених формах. Решта 17 маркерів

диференціювали всі досліджувані генотипи. Усі маркери, що використовувались авторами, були специфічними для геному R, похідного від *Secale cereale*, тому

поліморфізм, який спостерігається, відображає різноманітність, що зустрічається лише в частині жита генотипів тритикале [48].

Найпростіша методика виявлення різноманітності ДНК – це метод RAPD (довільно ампліфікована поліморфна ДНК) із використанням випадково ампліфікованої поліморфної ДНК. Реакцію ампліфікації проводять із

застосуванням одного десятинуклеотидного праймера з довільною (вільно

обраною) послідовністю, що дозволяє отримати від декількох до десятка продуктів. Фрагменти розділяють на агарозному гелі і фарбують бромідом етидію. Метод RAPD додатково спрощується на стадії екстракції ДНК, яка може

полягати в нагріванні буфера з зануреною ділянкою листа до 95 ° C протягом 15 хв або розміщенні невеликого фрагмента тканини безпосередньо в суміші ПЛР.

Завдяки практично нескінченній кількості різних послідовностей праймерів з десятим нуклеотидом, метод RAPD став особливо придатним для пошуку маркерів важливих ознак продуктивності, при побудові генетичних карт та для

оцінки генетичної подібності таксонів рослин. З точки зору ідентифікації

генотипів, цікава модифікація методу RAPD з використанням послідовності інтерфейсів інтрон-екзон. Недоліком обговорюваного методу є генерація домінуючих маркерів та необхідність попереднього вибору праймерів, які дають

стабільні та чіткі електрофореграми. Виявлено високу чутливість реакції ампліфікації маркера RAPD до змін концентрації та джерела Taq-полімерази, коливань кількості екстракту рослинної тканини та вмісту катіонів магнію та калію. Все це доводить необхідність забезпечення однакових умов ампліфікації та використання праймерів, що генерують стабільні профілі смуг RAPD.

Поліморфізм RAPD є результатом мутацій у послідовностях, доповнюючих 3' кінець праймера, та видалення або вставки на деякій відстані від місця зв'язування праймера. Цей метод широко застосовувався при пошуку маркерів багатьох функціональних ознак, побудові генетичних карт та оцінці генетичної подібності між видами. Це простий і швидкий метод, але, на жаль, дуже чутливий до всяких змін в умовах реакції ампліфікації [49].

Паралельно методу RAPD було розроблено подібну методику з використанням довільного короткого посилення праймера. Відбитки пальців методом ампліфікації ДНК (DAF) полягають у ампліфікації ДНК із застосуванням 8-10-нуклеотидних праймерів та розділенні отриманих продуктів у денатуруючому поліакриламідному гелі. Завдяки найпростішому впровадженню, найменшим витратам і швидкості, метод RAPD найчастіше використовується в дослідницькій практиці [50].

Інший прийом - AFLP (поліпсований поліморфізм довжини фрагмента). Його перевага полягає у можливості ідентифікувати велику кількість маркерів за відносно короткий час та високу повторюваність. Цей метод вимагає невеликої кількості вихідного матеріалу і передбачає тестування на наявність або відсутність ампліфікації конкретних фрагментів рестрикції. Це в певному сенсі поєднання переваг PLIP та RFLP. У цій техніці використовуються два ферменти рестрикції, один з вищою, а інший з меншою частотою розщеплення. Адаптери, що складаються з послідовності ядра та послідовності, специфічної для місця рестрикції, прикріплені до фрагментів рестрикції. На другій стадії фрагменти рестрикції ампліфікують і розділяють на поліакриламідному гелі.

Метод AFLP може бути використаний для ідентифікації сортів для селекції, а також при вивченні генетичних варіацій, мінливості, що виникає

внаслідок відмінностей у структурі метилювання ДНК в межах одного організму, його клонів, а також для вивчення експресії генів. Поліморфізм ампліфікованої довжини фрагмента (AFLP) - це метод відбитків пальців ДНК, який поєднує переваги ПЛР та RFLP. Першим кроком у AFLP є перетравлення

очищеної ДНК двома рестрикційними ферментами. Один із шестинуклеотидних ферментів розпізнавання послідовностей (наприклад, EcoRI) розщеплює дволанцюгову ДНК набагато рідше, ніж інший фермент (наприклад, MseI), специфічний для чотиринуклеотидних послідовностей. Короткі перехідники кріпляться по обидва боки до одержуваних таким чином фрагментів обмеження.

Два праймери для попередньої ампліфікації мають послідовність, що доповнює адаптерну частину і сайт рестрикції, і один нуклеотид, що селектується, на 3' кінці. Метою відбору нуклеотидів є обмеження кількості ампліфікованих фрагментів. Після початкової ампліфікації в реакційній суміші присутні

численні фрагменти ДНК, які при розведенні утворюють матеріал-шаблон для правильної селективної ампліфікації. Це проводиться за допомогою праймерів, які відрізняються від першої фази наявністю двох додаткових нуклеотидів відбору на 3' кінцях. Грунтовка, яка зв'язується з сайтом EcoRI, маркується

ізотопом  $^{32}\text{P}$ . Ампліфіковані фрагменти розділяють на послідовному денатураційному поліакриламідному гелі. Авторадіограма, отримана приблизно через 1 день експозиції, зазвичай складається з приблизно 50-100 смуг, утворених міченими одноланцюговими фрагментами EcoRI / MseI. Через

високу концентрацію смуг, комп'ютерний аналіз зображення значно полегшує читання авторадіографа [51].

Методи, згадані вище, є найбільш широко використовуваними молекулярними методами за останні роки. Крім них, існує безліч інших маркерів, але вони являються не настільки ефективними, тому використовуються рідше.

## РОЗДІЛ 2. УМОВИ, ВИХІДНИЙ МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Місце проведення досліджень та обладнання лабораторії

Дослідження проводились в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБІП та в лабораторії молекулярно – генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин. Договір про співпрацю заключено в 2019 році

Біотехнологічна лабораторія складається з наступних приміщень:

1. **Кімната для миття посуду.** Вона оснащена кількома раковинами, які виготовлені з матеріалу, стійкого до кислот, з проведенням гарячою та холодною водою. Також в приміщенні повинен міститися стелаж для сушіння лабораторного посуду. Якщо є можливість, для економії праці і часу встановлюється миєчна машина.

2. **Приміщення для приготування живильних середовищ,** яка обладнана вагами різного механізму, такими як аналітичні, торзійні та ін., окремим місцем для розміщення реактивів, шафою для зберігання посуду, лабораторними столами, тощо.

3. **Кімната для стерилізації** використовується для стерилізації посуду, матеріалів та живильних середовищ. Приміщення обладнане автоклавами, сушильними шафами, дистиллятором (рис. 2.1.) і шафами для зберігання чистого посуду.



Рис.2.1. А) Дистиллятор та Б) сухожарова шафа



4. Асептична кімната оснащена ламінарними боксами (рис. 2.2.) для проведення стерильних робіт, тому основною вимогою, яка ставиться до неї - можливість легко забезпечити асептичні умови.



Рис. 2.2. Ламінарний бокс в асептичній кімнаті

5. Світлова культуральна кімната (рис. 2.3.). В ній повинна постійно регулюватися температура, підтримуватися на постійному рівні вологість і освітленість. Також важливу роль грає кондиційоване повітря. Рослини-регенеранти і ізольовані тканини рослин потрібно зберігати, тому кімната повинна бути оснащена стелажми, які можуть зручно розміщуватися ярусами. Джерела світла повинні відповідати всім вимогам для оптимального розвитку рослин в кімнаті. Освітлення може бути верхнім або, як варіант, боковим. Регулювання режиму повинно проводитися за допомогою реле часу.



**Рис. 2.3.** Світлова культуральна кімната

6. **Центрифужна.** Дана кімната повинна бути оснащена центрифугами різної дії для виділення білків і нуклеїнових кислот.

7. **Темнова культуральна кімната.** В ній вирощуються клітинні суспензії та калюсні культури, тому вона не потребує світла. Головними складовими є кондиціоноване повітря, стала температура та регульована вологість повітря.

8. **Лабораторне приміщення.** Воно може бути оснащено обладнанням, необхідним для досліджень різного типу, відповідно до напрямку розвитку даної лабораторії.

Лабораторія завжди обладнана приладами, які необхідні при роботі з мікроорганізмами з урахуванням їх особливостей, а також для дослідів з різними матеріалами, і виконання аналізів.

В лабораторії завжди повинні знаходитися декілька наборів стерильного посуду, такого як чашки Петрі, колби, мірні пляшечки, піпетки і т.д.), штативи для пробірок

Лабораторія в Національному університеті біоресурсів і природокористування України обладнана трьома сучасними стерильними біологічними боксами для проведення наукових досліджень співробітниками, аспірантами, магістрами і бакалаврами. Також в ній знаходяться різноманітні біотехнологічні прилади, такі як: дистильатор води, автоклав, холодильник для зберігання реактивів та біологічних об'єктів, сухожарова шафа і декілька автоклавів, окремо обладнано місце для зберігання живильного середовища, світлова кімната для рослин, а також відокремлена шафа для зберігання лабораторного посуду, такого як чашки Петрі, пробірки різного діаметру та довжини та ін.

Також в лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин знаходиться ампліфікатор BioRad IQ5, на якому проводилися дослідження (рис. 2.4.).



Рис. 2.4. Ампліфікатор BioRad IQ5

## 2.2. Вихідний матеріал

Матеріалом для дослідження слугували наступні сорти ріпака озимого та ярого: Aliot, NK Petrol, NK Technik, Чорний велетень, Дангал, Октан, Антарія, Жовтун, NPZ 9800, які за своїми характеристиками є перспективними для отримання посухостійких ліній.

Досліджувані сорти були внесені в Державний реєстр сортів придатних до поширення в Україні протягом 2001-2011 рр. (таблиця 2.1.).

Таблиця 2.1. Сорти ріпака озимого та ярого

Назва сорту	Рік реєстрації	Заявник
NK Petrol	2011	Syngenta Seeds S.A.S.
NK Technik	2011	Syngenta Seeds S.A.S.
Чорний велетень	2002	Інститут кормів та сільського господарства Поділля Національної академії аграрних наук України
Дангал	2001	Івано-Франківський інститут агропромислового виробництва Української академії аграрних наук
Октан	2011	Syngenta Seeds S.A.S.
Антарія	2006	Національний університет біоресурсів і природокористування України
Жовтун	2012	Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка Національної академії наук України

### Коротка характеристика сортів ріпака озимого та ярого

**Антарія.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2006 року (**національний стандарт**). Створений в результаті індивідуального відбору з гібридної популяції від схрещування дигапloidів, одержаних методом культури пилку *in vitro*. Сорт ранньостиглий (300-305 днів) з однорідним досяганням насіння. Вміст олії – 45,8%, ерукової кислоти – 0,0-0,2%, глікозиролатів – 0,4%, білку – 22%, маса 1000 насінин 4,5-5,5 г. Висота рослин 160 см. Стійкість до

вильгання – 8,6 бала, до обсипання – 7,3 бала, посухи – 8,6 бала, зимостійкість – 8,8 бала. Ураженість бактеріозом – 0,0%, пероноспорозом – 7,8%, альтернаріозом – 7,2%, ушкодження ріпаковим квіткоюдом – 11%. Середній урожай насіння за роки випробувань склав 49,8 ц/га, урожай зеленої маси – 450 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт №06113 [52].

**Дангал.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2001 року. Сорт ранньостиглий (300-308 днів). Вміст ерукової кислоти в насінні 0,7%, глюкозинолатів 0,8%, олії – 44,8%, білку – 21,8%. Стійкість до вильгання – 4,9 бала, до обсипання 3,8 бала, до засухи – 4,5 бала, зимостійкість 3,8-4,0 бала. Маса 1000 насінин – 4,5-4,6 гр. Урожайність за роки випробувань склала 25,7 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт №97016013.

**Жовтун.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2012 року. Сорт ранньостиглий (300-305 днів). Вміст ерукової кислоти в насінні 0,0%, глюкозинолатів 0,7%, олії – 44,7%, білку – 25,5%. Стійкість до вильгання – 8 бала, до обсипання 6 бала, до засухи – 7 бала, зимостійкість 7 бала. Маса 1000 насінин – 5,5-6,5 гр. Урожайність за роки випробувань склала 54,8 ц/га.

**Октан.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2011 року. Сорт ранньостиглий (300-307 днів). Вміст ерукової кислоти в насінні 0,0%, глюкозинолатів 0,8%, олії – 48,9%, білку – 24,2%. Стійкість до вильгання – 8 бала, до обсипання 7 бала, до засухи – 8 бала, зимостійкість 6 бала. Маса 1000 насінин – 5,5-6,0 гр. Урожайність за роки випробувань склала 60,5 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт № 07016005.

**Чорний велетень.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2002 року (**національний стандарт**). Створений методом відбору з гібридної комбінації F<sub>2</sub> Тамара x Діана. Сорт інтенсивного типу, середньостиглий (292-323 дні), менш вибагливий до обробітку ґрунту, рано відростає весною. Вміст олії – 47,5%, ерукової кислоти – 0,5%, глюкозинолатів – 0,4%, білка – 20%, маса 1000 насінин 5,5-6,0 гр. Висота рослин 165-170 см. Стійкість до вильгання – 8,4 бала, до обсипання – 7,0 бала, посухи – 8,5 бала, зимостійкість – 8,5 бала. Ураженість бактеріозом – 0,0%, пероноспорозом – 6,0%, альтернаріозом – 10%, ушкодження

рідковим квіткою – 13%. Середній урожай насіння за роки випробувань склав 49,4 ц/га, урожай зеленої маси – 484 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт №1211 [53].

**NK Petrol.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2011 року. Сорт ранньостиглий (300-306 днів). Вміст ерукової кислоти в насінні 0,0%, глюкозинолатів 0,8%, олії – 44,8%, білку – 21,8%. Стійкість до вилягання – 6 бала, до обсипання 8 бала, до засухи – 8 бала, зимостійкість 8 бала. Маса 1000 насінин – 5,5-6,0 гр. Урожайність за роки випробувань склала 55,9 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт №07016002.

**NK Technik.** Занесений до Реєстру сортів рослин України з 2011 року. Сорт ранньостиглий (300-305 днів). Вміст ерукової кислоти в насінні 0,0%, глюкозинолатів 0,5%, олії – 45,2%, білку – 23,2%. Стійкість до вилягання – 8 бала, до обсипання 5 бала, до засухи – 6 бала, зимостійкість 8 бала. Маса 1000 насінин – 4,5-5,5 гр. Урожайність за роки випробувань склала 74,5 ц/га. Авторське свідоцтво на сорт № 07016004.

### 2.3 Визначення генетичного різноманіття сортів ріпаку

Опис морфологічних ознак сортів ріпаку здійснено за 22 маркерними ознаками в процесі кваліфікаційної експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність. Ступінь виявлення ознак позначено цифровими значеннями від 1 до 9.

Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів ріпаку визначали за чотирма SSR маркерами: Ra3-H09, Na12-A02, FITO-063, Na10-B07. Відповідно до отриманих алелів визначали кількість поліморфних алелів та рівень поліморфізму.

Оцінку генетичних дистанцій між сортами ріпаку проводили з використанням кластерного аналізу застосовуючи незважений метод середніх зв'язків за SSR маркерами та одиничних зв'язків за морфологічними ознаками з обрахунком відстані [54]. Кореляційні зв'язки між досліджуваними SSR

маркерами та ступенем прояву морфологічних ознак визначали за генетичними дистанціями за допомогою Mantel test з використанням комп'ютерної програми XLSTAT 2018 (Trial version) [55].

#### 2.4 Отримання посухостійких ліній ріпаку в культурі *in vitro*

Насіння ріпаку (по 100 насінин кожного сорту) стерилізували 0.9% NaCl в експозиції 15 хв. з подальшим триразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Калюсну тканину отримували із стебел асептичних проростків, культивуючи їх в термостаті за регульованої температури 25-26°C, відносної вологості повітря 70-80%, без освітлення з подальшим перепасируванням утвореного первинного калюсу на середовище такого самого складу через кожну 21 добу. Для досягнення мутагенного ефекту іонізуючого опромінення калюсні тканини обробляли  $\gamma$ -променями в дозі 40 Гр. Суспензійну культуру для визначення сублетальної концентрації селективних агентів отримували за методикою Сидорова.

Ступінчасту клітинну селекцію *in vitro* ріпаку на стійкість до посухи проводили за схемою: пророщування насіння в розчинах з селективним агентом → 3 пасажі на селективному середовищі → 3 пасажі без селективного фактора → 3 пасажі на селективному середовищі → регенерація рослин.

Як стресові чинники було застосовано 15-20% манітол і 5-25% високомолекулярний ПЕГ 6000 та калюсогенне середовище МС (МС+0.5 мг/л БАП, 0.5 мг/л НОК, 0.05 мг/л ГКЗ) на якому культивували калюсні тканини. Для вивчення впливу концентрації селективних агентів в процесі селекції визначали показник приросту калюсної маси [56]. Для отримання рослин-регенерантів калюси висаджували на середовище МС, доповнене 6-БАП в концентрації 0,05 мг/л і культивували в світловій культуральній кімнаті за температури 25°C, освітлення 3000–4000 лк і 16-годинному фотоперіоді. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 12.0 (Trial version).

## РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

## 3.1 Оцінка генетичного різноманіття сортів ріпаку

Для вивчення поліморфізму досліджуваних сортів ріпаку проводили кластерний аналіз з оцінкою генетичних дистанцій між об'єктами. На рисунку 1 представлено результати ієрархічної кластеризації сортів ріпаку за морфологічними маркерами у вигляді філогенетичного дерева.

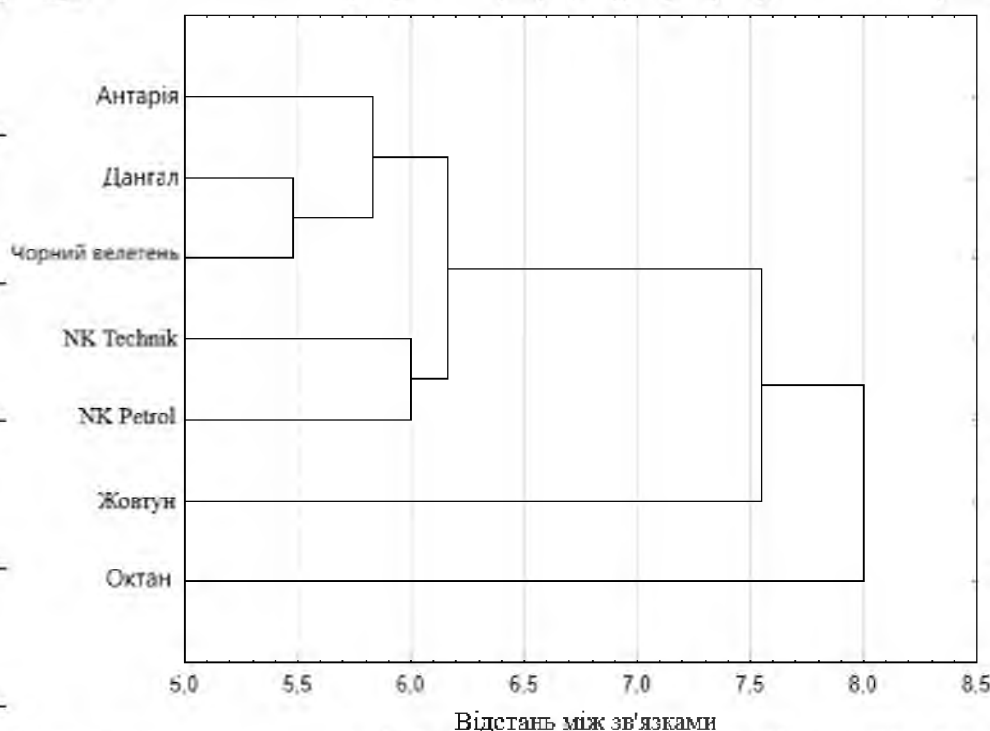


Рис.3.1 Розподіл сортів ріпаку за ступенем спорідненості на основі морфологічних ознак

У результаті аналізу отримано два кластери, які сформовані сортами Дангал та Чорний велетень, NK Technik та NK Petrol, тоді як інші сорти знаходились у прилеглих до сформованих кластерів положеннях. Визначено, що найменше значення генетичних дистанцій відмічалось між сортами Дангал та Чорний велетень та сортами NK Technik і NK Petrol і становили 5.48 та 6.00 відповідно. Необхідно відмітити, що найбільш віддаленими сортами за

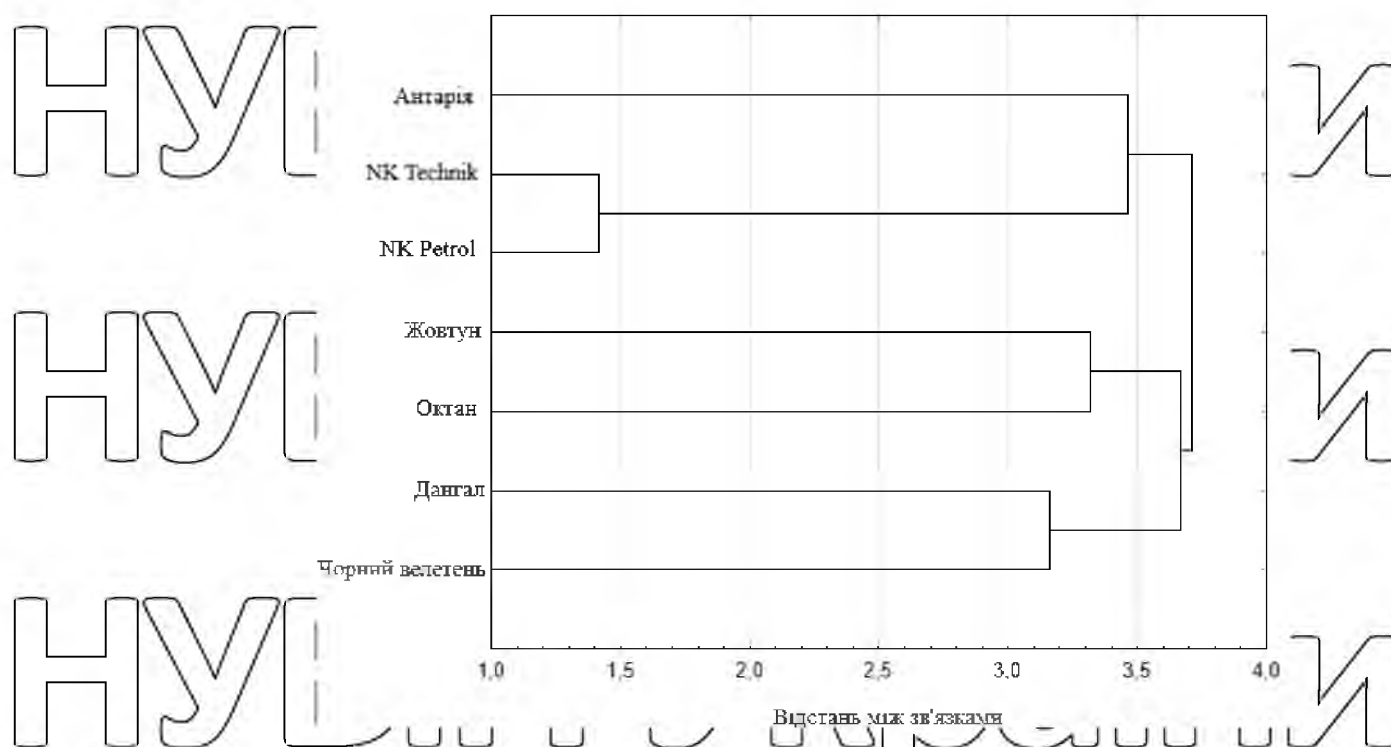


морфологічними маркерами виявились Октан та Жовтун, зі значенням генетичних дистанцій – 12.1. При цьому, визначено, що сорт Антарія знаходиться на значній відстані від інших досліджуваних сортів (11.3). Генетичні дистанції між іншими досліджуваними сортами варіюють від 5.80 до 11.1.

Зауважимо, що сорти Дангал та Чорний велетень, які виявились найбільш подібними за морфологічними ознаками мають різний тип розвитку, проте відповідно до офіційного опису сортів вони відрізняються за сімома ознаками [57]. Опис морфологічних ознак здійснюється за однаковими характеристиками як для озимого, так і для ярого ріпаку. Таким чином, отримані результати відображають ступінь подібності за проявом визначених характеристик та не пов'язаний із типом розвитку сортів, якщо на це не вказують ознаки, за якими ці сорти відрізняються, а саме тенденція формування суцвіть в рік весняної та пізньо-літньої сівби.

У результаті аналізу сортів ріпаку за SSR маркерами було виявлено 36 алелів, у середньому 9 алелів на маркер. Встановлено, що найбільший рівень поліморфізму визначено за маркером Na12-A02 (83%), найменш поліморфним виявився маркер F1TO-063, при цьому рівень поліморфізму складав 40%. За маркерами Ra3-H09 та Na10-B07 рівень поліморфізму становить 60 та 44% відповідно. Представлені результати підтверджуються попередніми дослідженнями, які проведені нами раніше для більшої кількості сортів ріпаку, а також узгоджуються із результатами, отриманими за цими маркерами іншими вченими [58].

Результатами кластерного аналізу сортів ріпаку за чотирма SSR маркерами встановлено наявність трьох генетично віддалених груп генотипів, які сформовано сортами, відповідно до генетичної близькості між членами кластеру (рис. 3.2).



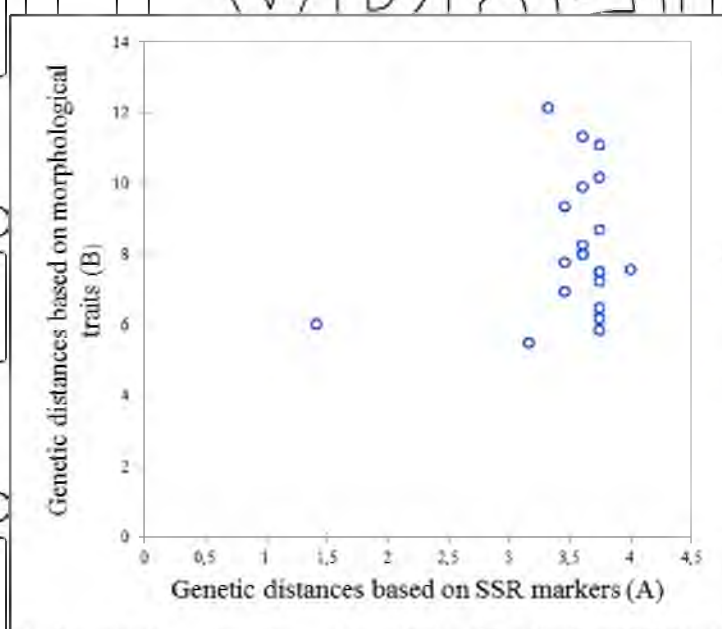
**Рис. 3.2** Розподіл сортів ріпаку за ступенем спорідненості на основі SSR

маркерів

Визначено, що сорти NK Technik та NK Petrol, Октан та Жовтун, Дангал та Чорний велетень сформували по одному кластеру. Найбільш подібними за маркерами Ra3-H09, Na12-A02, FITO-063, Na10-B07 виявились сорти NK Technik та NK Petrol, значення генетичних дистанцій яких становить 1.41, а найбільш відмінними Октан та Жовтун (4.00), сорти, що увійшли в один кластер. Варто відмітити, що результати, отримані на основі розподілу за SSR маркерами частково співпадають із розподілом сортів за морфологічними характеристиками. Так, незважаючи на те, що за SSR маркерами отримано більше кластерів, їх структура є подібною до аналізу за морфологічними ознаками: один кластер сформований сортами NK Technik та NK Petrol, які є генетично близькими за SSR маркерами вони. Сорти Октан та Жовтун характеризуються найбільшими значеннями генетичних дистанцій як за морфологічними ознаками так і за SSR маркерами. Привертає увагу, що сорт Антарія не увійшов до жодного кластеру за обома маркерними системами. Таким

чином, для об'єктивної оцінки генетичного різноманіття сортів ріпаку для створення посухостійкого матеріалу доцільно провести визначення кореляційних зв'язків між маркерними системами.

Оцінку кореляційних зв'язків між генетичними дистанціями отриманими за SSR маркерами та морфологічними ознаками проводили із застосуванням Mantel test (лінійна кореляція за Pearson). В результаті аналізу були отримані показники розрахункового significance level p-value та коефіцієнт кореляції r(A,B) для теоретичного significance level  $\alpha=0,05$ . Відповідно до інтерпретації результатів тесту порівняння цих показників дає змогу прийняти одну із висунутих гіпотез про наявність ( $H_a$ ) або відсутність кореляції ( $H_0$ ) (рис. 3.3).



**Рис. 3.3** Взаємозв'язок між генетичними дистанціями сортів ріпаку за морфологічними ознаками та SSR маркерами

На основі отриманих результатів досліджень встановлено, що обчислене значення p-value 0.345 виявилось вище рівня значущості  $\alpha=0,05$ . Отже, слід прийняти гіпотезу  $H_0$  про відсутність кореляції, умовою якої є  $r < \alpha$  [59]. Низкою вчених представлені результати про відсутність та наявність кореляції між генетичними дистанціями [60]. За результатами тесту Mantel відмічено

відсутність кореляції між досліджуваними маркерами та морфологічними ознаками. Слід відзначити, що зважаючи на достатньо велику кількість SSR маркерів, автори описували тільки п'ять морфологічних ознак. Точність визначення генетичної подібності або дистанцій на основі ДНК маркерів залежить від багатьох факторів, таких як кількість використаних маркерів, їх поширення по геному і ступінь точності, з якою вони аналізуються. На додаток до цього зазначено, що молекулярні маркери не можуть використовуватися з метою отримання висновків про міжклетельні взаємодії, які призводять до експресії окремих генів [61].

Отже, отриманий нами розподіл за генетичними дистанціями дозволив виявити відмінність між досліджуваними сортами ріпаку із застосуванням SSR маркерів та морфологічних ознак. Встановлено, що поряд із відсутністю кореляції між двома маркерними системами, розподіл досліджуваних сортів за кластерами не мав суттєвих відмінностей та показав генетичну близькість сортів, які увійшли в один кластер як за морфологічними, так і за SSR маркерами.

### **3.2 Селекція ріпаку *in vitro* на посухостійкість**

Для отримання посухостійких ліній на основі досліджуваних сортів використовували сорти ріпаку озимого Чорний велетень та Октан. Відомо, що озимі культури за всіх інших рівних умов є більш уразливими за рахунок більш повного використання осінньо-зимових запасів вологи. Внаслідок поступової зміни клімату та підвищення середньорічної температури повітря в регіонах вирощування ріпаку все частіше відмічаються недостатня кількість опадів у зимовий період, що в свою чергу впливає на запас вологи в ґрунті [62]. Дефіцит води в ґрунті пригнічує в рослинному організмі ростові процеси, змінює інтенсивність і спрямованість процесів фотосинтезу, дихання, перебігу вуглеводного, азотного й нуклеїнового обміну, активність ферментів тощо [63].

Відповідно до характеристики, яка надана селекціонерами, вказані сорти відрізняються середньою та вище за середню здатністю протистояти умовам посухи, а також належать до різних груп стиглості: Октан – ранньостиглий,

Чорний велетень середньоранній. Встановлено, що виділення сортів і ліній різних географічних груп і залучення їх в схрещування дозволить використовувати весь накопичений за період наукової селекції генетичний потенціал ріпаку [64]. Слід зауважити, що сорти Чорний велетень та Октан виявились достатньо відмінними як за морфологічними, так і ДНК маркерами.

Значення генетичних дистанцій між ними становило 8.00 та 3.61 відповідно.

Згідно літературних джерел для створення в умовах *in vitro* стресового ефекту посухи використовують агаризовані живильні середовища, доповнені осмотично активними речовинами, які знижують зовнішній водний потенціал

квітин [65]. Для визначення концентрацій ПЕГ 6000 та манітолу, які можуть бути застосовувані як селективні агенти в процесі ступінчастої селекції *in vitro*, визначали приріст калюсу за різних концентрацій осмотично активних речовин (табл. 3.1).

**Таблиця 3.1** Приріст калюсу сортів ріпаку озимого за різної концентрації ПЕГ 6000 та манітолу

Сорт	Контроль	Приріст калюсу, %					
		ПЕГ 6000, %			Манітол, %		
		5	12	20	15	17	20
Чорний велетень	92,2	90,3	55,3	5,7	61,8	48,6	4,0
Октан	91,8	79,0	43,9	4,0	62,3	39,8	3,8
НР <sub>0.5</sub>	4,5	3,4	1,4	0,2	2,6	1,8	0,6

При вивченні ефектів різних доз встановлено, що за дії 12% концентрації ПЕГ 6000 та 17% манітолу виявлено істотні відмінності між дослідженими сортами ріпаку озимого за зменшенням приросту маси калюсної тканини, яка залежно від генотипу знижувалась приблизно на 50%.

На основі аналізу отриманих даних, визначено, що ПЕГ 6000 та манітол в концентраціях 12 та 17% відповідно можуть бути застосовані як селективні агенти в роботі з досліджуваними нами генотипами ріпаку озимого.

В наших дослідженнях у подальшій схемі клітинної селекції використовували ПЕГ 6000, оскільки він не проникаючи в клітину імітує водний стрес і діє як осмотичний [66]. Оброблені  $\gamma$ -опроміненням мікрокалуси висаджували на середовище з сублетальною концентрацією ПЕГ 6000.

Сублетальну концентрації ПЕГ 6000 встановлювали шляхом висівання суспензійної культури на живильні середовища з різною концентрацією (10%; 20%; 30%; 40%). В результаті визначено сублетальну концентрацію ПЕГ 6000 (20%), за якої спостерігалось значне зменшення приросту маси калусної тканини, яку в подальшому використовували для проведення ступінчастої клітинної селекції *in vitro*.

Для цього в кінці першого пасажу виділяли лише світлі ділянки калусних тканин і переносили на свіжоприготовлене середовище з селективним агентом.

Проводили перевірку колоній, які росли в селективних і неселективних умовах.

Встановлено, що до сьомого пасажу кількість виділених спочатку колоній зменшувалась на порядок (табл. 3.2).

**Таблиця 3.2.** Динаміка елімінації адаптивних варіантів у генотипів ріпаку озимого

Сорт	Число мікроколоній оброблених $\gamma$ -променями	Число живих колоній по пасажах, % від числа оброблених $\gamma$ -опроміненням						
		1	2	3	4	5	6	7
Октан	275	45.7±2	34.8±1	28.3±1	28.3±1	28.3±1	12.8±0	4.7±0
Чорний велетенський	310	54.8±2	32.1±1	20.4±1	20.4±1	20.4±1	15.4±0	4.8±0

Примітка:  $p < 0.05$

За представленими даними в таблиці 3.2 можна побачити, що в результаті обробки  $\gamma$ -опроміненням кількість життєздатних колоній у першому пасажі

зменшилась до 35-50%. Причому елімінація колоній по пасажжах, в кількісному вираженні, була майже однаковою для досліджених сортів ріпаку. Після трьох селективних пасажів, число живих колоній складало 15-25.

Після проведення двох пасажів на середовищі без селективного агента та перевірки росту мікроколоній в селективних умовах вдалось виділити близько 4% резистентних клонів ріпаку, що стабільно зберігали ознаку посухостійкості.

Калюси всіх клонів були подібні за морфотипом, утворювали щільну, глобулярну структуру зеленуватого забарвлення і відзначались дуже повільним ростом. Отримані посухостійкі калюсні лінії ріпаку використовували для регенерації рослин, додаючи до живильного середовища екзогенні гормони в різних концентраціях (рис. 3.1).



Рис. 3.1 Морфогенний посухостійкий калюс ріпаку

Так, для індукції соматичного ембріогенезу в калюсній тканині ріпаку озимого змінювали концентрацію регуляторів росту в середовищі відповідно до методики та через 3-5 тижнів культивування проводили облік пагоноутворення (табл. 3/3).

Таблиця 3.3 Морфогенез та регенерація пагонів в калюсній культурі ріпаку озимого

Сорт	Кількість калюсів, шт	Морфогенні калюси, %	Регенерація, %
Оуган	30	57	38
Чорний велетень	30	59	40
НІР <sub>0.5</sub>	-	2,8	1,8

Відповідно до представлених даних, відсоток регенерації становив 38 та 40% для досліджуваних сортів ріпаку. Отримані рослини-регенеранти посухостійких ліній ріпаку озимого після вкорінення та адаптації були передані для використання в селекційних програмах.

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна



## ВИСНОВКИ

НУБІП України

1. У результаті досліджень отримано стерильні проростки ріпака озимого та ярого 9 сортів

НУБІП України

2. В результаті проведених досліджень визначено поліморфізм сортів ріпаку озимого та ярого за морфологічними та SSR маркерами, та отримано толерантні до посухи лінії ріпаку. Встановлено, що сорти Дангал та Чорний велетень є найбільш подібними за морфологічними ознаками, значення генетичних дистанцій становить 5.48. Визначено, що досліджувані сорти ріпаку мають відмінності щонайменше за сімома ознаками. Встановлено, що розподіл сортів за SSR маркерами є подібний до отриманого розподілу за морфологічними маркерними ознаками. Кластерний аналіз сортів показав, що найбільш подібними виявились сорти із значенням генетичних дистанцій 1.41 NK Technik та NK Petrol. За результатами Mantel тесту відмічено відсутність кореляції між досліджуваними маркерними системами за генетичними дистанціями між сортами. Проте, слід зауважити, що застосування комплексної оцінки генетичного різноманіття сортів є перспективним для використання в процесі селекції та експертизи нових сортів.

НУБІП України

3. На основі отриманих даних визначено, що в процесі клітинної селекції *in vitro* для отримання посухостійких ліній ріпаку доцільно застосовувати ПЕГ 6000 в концентрації 12%. Встановлено ефективність ступінчастої селекції *in vitro* з використанням  $\gamma$ -опромінення в якості мутагенного агента. Відповідно до запропонованої схеми отримано близько 4% клонів ріпаку озимого толерантних до посухи, які стабільно зберігали ознаку.

НУБІП України

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sytnik, I., Klyachenko, O. (2010). Screening of outgoing material rape for resistance to abiotic environmental factors *Biological resources and nature management*, 2(1-2), 39-48.

2. Klyachenko, O. I. (2016). Biotechnological and physiological bases of increase of breeding efficiency of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and rape (*Brassica napus* L.). (Extended abstract of Dr. Biol. Sci. Diss.). NUDES, Kyiv, Ukraine.

3. Clapp, J., Newell, P., & Brent, Z. W. (2018). The global political economy of climate change, agriculture and food systems. *The Journal of Peasant Studies*, 45(1), 80-88. <https://doi.org/10.1080/03066150.2017.1381602>

4. Jamali, S. H., Sadeghi, L., & Najafian, M. A Multiplex PCR assay for Discriminating Charlock from Rapeseed: Implications for Seed Testing. In *Biol. Forum Int. J.*, 9(2), 87-91.

5. Ana, M. J., Ankica, K. S., Dejana, S. P., Radovan, M., & Nikola, H. (2009). Phenotypic and molecular evaluation of genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *African journal of biotechnology*, 8(49).

6. Klyachenko, O. I., Prysiashniuk, L. M., Shofolova, N. V., & Piskova, O. V. (2018). Polymorphism in spring and winter rapeseed varieties (*Brassica napus* L.) identified by SSR markers. *Plant varieties studying and protection*, 14(4), 366-374. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151898>

7. Liu, L. H., Shi, S. W., Wu, J. S., Chen, Y. X., & Zhou, Y. M. (2003). In vitro screening stem rot resistant (tolerant) materials in *Brassica napus* L. *Chinese journal of oil crop sciences*, 25(1), 5-8.

8. Rad, A. H. S., & Abbasian, A. (2011). Evaluation of drought tolerance in winter rapeseed cultivars based on tolerance and sensitivity indices. *Žemdirbystė (Agriculture)*, 98(1), 41-48.

9. MacDonald, M. V., Ahmad, I., Menten, J. O. M., & Ingram, D. S. (1991). Haploid culture and in-vitro mutagenesis (UV light, X-rays and gamma rays) of rapid cycling *Brassica napus* for improved resistance to disease. In Plant mutation breeding for crop improvement. V. 2. <https://doi:10.1007/s10681-006-9241-1>

10. Словник українських наукових і народних назв рослин. – К.: Наук. думка, 2004. – 800 с. – (Словники України). ISBN 966-00-0355-2

11. Інноваційні ресурсозберігаючі технології вирощування ріпаку / Д. І. Мазоренко [та ін.] ; ред. Д. І. Мазоренко, Г. Є. Мазнев. - Х. : Майдан, 2008. - 143 с.: табл. - ISBN 978-966-372-192-7

12. Озимий та ярий ріпак / І. Д. Ситнік [та ін.] ; ред. І. Д. Ситнік ; Національний аграрний ун-т. - К. : Знання України, 2005. - 83 с., 16 арк. рис.: рис., табл. - ISBN 966-316-058-6

13. Ріпак - перспективна кормова й олійна культура на півдні України: [монографія] / М. Г. Гусев, С. В. Коковіхін, І. Я. Целех ; за наук. ред. проф. М. Г. Гусева ; НААН України, Ін-т земл-ва півд. регіону. - Вінниця : Роганська І. О., 2011. - 206 с. : рис., табл. - ISBN 978-966-2585-13-1

14. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin (англ.) // EFSA Journal : journal. — 2013. — Vol. 11, no. 1. — P. 3066.

15. БИКИ, 23.07.2009, На мировом рынке рапса.

16. Технологія вирощування ріпака ярого в Лісостепу України / В. О. Єщенко, Г. І. Каричковська, А. В. Новак [та ін.] ; за ред. В. О. Єщенка. - Умань (Черкас. обл.) : Сочінський, 2010. — 275 с. : іл., табл. — ISBN 978-966-1604-38-3

11. *Brassica Napus* // Ботанический словарь / сост. Н. И. Анненков. — СПб.: Тип. Имп. АН, 1878. — XXI + 645 с.

17. Michael A. Ruggiero inni, A Higher Level Classification of All Living Organisms, „PLOS ONE”, 10 (4), 2015, e0119248, DOI: 10.1371/journal.pone.0119248, PMID: 25923521, PMCID: PMC4418965.

18. газета Беларуская Нiва (15.05.2021)

19. UN Food & Agriculture Organisation (15.05.2021)

20. Ріпак в Україні та світі RWS SAAT SE & CO. KGaA [Електронний ресурс]. –

Режим доступу : [Ріпак в Україні та світі - KWS SAAT SE & Co. KGaA](#) (15.05.21)

21. Barbara Michalik. Hodowla roślin z elementami genetyki i biotechnologii. Poznań: Polskie Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, 2009

22. Marek Jassem: Hodowla roślin. Bydgoszcz: Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-rolniczej, 1999.

23. NCBI (2013). "Brassica napus subsp. rapifera". NCBI taxonomy database

24. Curry, Helen Anne. Evolution Made to Order: Plant Breeding and Technological Innovation in Twentieth-Century America (U of Chicago Press, 2016). x, 285 pp.

25. Schlegel, Rolf (2007) Concise Encyclopedia of Crop Improvement: Institutions, Persons, Theories, Methods, and Histories, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 423

26. Hartley, Matt (20 March 2008). "Grain Farmer Claims Moral Victory in Seed Battle Against Monsanto"

27. Thiyan-Hollander, Usha; Eskin, Michael; Matthaus, Bertrand (2013). Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition

28. Roché, Kenneth J. (27 November 2015). Canola: A Modern Crop for a Modern Era (PhD). Doctor of Plant Health Program (DPH), University of Nebraska-Lincoln.

29. CFIA (22 December 2017). "The Biology of Brassica napus L. (Canola/Rapeseed)". Plant and Biotechnology Risk Assessment Unit, Plant Health Science Division, Canadian Food Inspection Agency. [Електронний ресурс]. –

Режим доступу : [The Biology of Brassica napus L. \(Canola/Rapeseed\) - Canadian Food Inspection Agency \(canada.ca\)](#)

30. Petrie, H. T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol. Rev.* 189, 8–20 (2002). A good review of thymic anatomy and the dynamics of T-cell production.

31. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative T cell selection. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176 (2003). This is a clear and comprehensive review of positive and negative selection.

32. Sakaguchi, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182, 18–32 (2001).

33. Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K. & Kyewski, B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nature Med.* 6, 56–61 (2000).

34. Anderson, M. S. et al. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395–1401 (2002). This paper describes autoimmune regulator (Aire)-deficient mice, which lack promiscuous gene expression in the thymus and consequently develop autoimmune polyendocrine syndrome.

35. Cho, H. J. et al. Cutting edge. Identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J. Immunol.* 170, 10–13 (2003).

36. Gao, J. X. et al. Perinatal blockade of B7-1 and B7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J. Exp. Med.* 195, 959–971 (2002). This paper clearly shows that perinatal blockade of CD80 and CD86 inhibits negative selection and allows the development of autoreactive T cells. These results are in contrast to those in reference 48, which examines negative selection in CD80 and CD86 double-deficient mice.

37. Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422–433.

38. Manoel Galetti, P. (2018). Conservation Genetics. Reference Module in Biomedical Sciences.

39. Nevo, E. (2001). Encyclopedia of Biodiversity. Genetic Diversity 662-677.

40. Nonić, M., Milovanović, J., & Šijačić-Nikolić, M. (2020). CONSERVATION OF BIODIVERSITY AND FOREST GENETIC RESOURCES IN SERBIA. National parks, 4, 1.

41. Swingland, T. R. (2001). Biodiversity, definition of. Encyclopedia of biodiversity, 1, 377-391.

42. Wein, T., & Dagan, T. (2019). The effect of population bottleneck size and selective regime on genetic diversity and evolvability in bacteria. Genome biology and evolution, 11(11), 3283-3290.

43. Mejnartowicz L. Wstęp do genetyki biochemicznej. W: Sabor J. (red). Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew lesnych. str. 53-62. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych.

44. Avise J.C. 2004. Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. WUW

45. Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол. А.В. Кильчевский (гл. ред. [и др.]). — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2019. — Т. 26. — 180 с. — ISSN 1999-9127.

46. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, et al. Glutathione in plants: an integrated overview. Plant Cell Environ. 2012;35:454-484. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x

47. Pivato M, Fabrega-Prats M, Masi A. Low-molecular-weight thiols in plants. Functional and analytical implications. Arc Biochem Biophys. 2014;560:83-99. doi:10.1016/j.abb.2014.07.018

48. Paran I., Michelmore R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce // *Theor. Appl. Genet.* - 1993. - Vol. 85. - P. 985-993

49. Чесноков Ю.В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров // *Научно-практический журнал «Овощи России»*. 2018. № 3 (41) / С. 11-15.

50. Чекалин Н.М. Генетика устойчивости растений и вирулентности патогенов. Молекулярно-генетические основы устойчивости растений и вирулентности патогенов // *Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам*. 2003. С. 128-136

51. Омашева М.Е., Дубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок // *Биотехнология. Теория и практика*. 2013. № 4. С. 20-28.

52. Ситнік І.Д. Озимий та ярий ріпак // І.Д. Ситнік, О.М. Кляченко, О.П. Канорін. – Київ: Знання України – 2005. – 115 с.

53. Ситнік І.Д. Сорти та гібриди ріпаку. Насінництво. Технологія вирощування / Ситнік І.Д. – К.: Знання України, – 2008. – 60 с.

54. Everitt, B. S., Landau, S., Leese, M., & Stahl, D. (2011). Hierarchical clustering. *Cluster analysis*, 5.

55. Klyachenko, O., & Prysiazhniuk, L. (2018). Polymorphism in sugar beet varieties and hybrids in cell selection for resistance to abiotic factors. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(6), 602. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.6.602-605>

56. Butenko, R. G. (1999). *Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them*. Moscow: FBk Press, 160, 3.

57. Official bulletin. Plant variety rights protection. Catalog of oil and textile crops 2010. Editor-in-chief Khadzhimatov  
<https://sops.gov.ua/uploads/page/5a81ae9fcdel18.pdf>

58. Li, L., Wanapu, C., Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y., & Huang, G. (2011). Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids. *Journal of Agricultural Science*, 3(3), 101-110. <https://doi.org/10.5539/jas.v3n3p101>

59. Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. P. D. C., ... & Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36(4), 475-485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>.

60. Darvishzadeh, R. (2012). Phenotypic and molecular marker distance as a tool for prediction of heterosis and F1 performance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 6(4), 732.

61. Ana, M. J., Ankica, K. S., Dejana, S. P., Radovan, M., & Nikola, H. (2009). Phenotypic and molecular evaluation of genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *African journal of biotechnology*, 8(19).

62. Clapp, J., Newell, P., & Brent, Z. W. (2018). The global political economy of climate change, agriculture and food systems. *The Journal of Peasant Studies*, 45(1), 80-88. <https://doi.org/10.1080/03066150.2017.1381602>

63. Bray, E. A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of botany*, 89(7), 803-811. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf104>

64. Ashadullin, D. F., & Ashadullin, D. F. (2007). Rapeseed breeding in Tatarstan. *The Bulletin of Izhevsk State Agricultural Academy*, (4), 37-39.

65. Masoabi, M., Lloyd, J., Kossmann, J., & van der Vyver, C. (2018). Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis and In Vitro Polyethylene Glycol Selection for



Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar tech*, 20(1), 50-59.

<https://doi.org/10.1007/s12355-017-0524-8>

66. Jan, N., Qazi, H. A., Ramzan, S., & John, R. (2018). Developing Stress-Tolerant Plants Through In Vitro Tissue Culture: Family Brassicaceae. In *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1* (pp. 327-372). Springer, Cham.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

# ДОДАТКИ

## НУБІП України

### СКРИНІНГ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ РІПАКА (*BRASSICA NAPUS L.*) НА СТІЙКІСТЬ ДО ПОСУХИ

Ріпак (*Brassica napus L.*) є одним з найважливіших джерел сировини для харчової промисловості, виробництва біопалива та кормів. В умовах зміни клімату актуальності набувають дослідження направлені на створення гібридів із комплексною стійкістю проти несприятливих абіотичних факторів.

**Матеріали та методи дослідження.** В роботі використано вісім сортів ріпаку озимого (Aliot, NK Petrof, NK Technik, Чорний ведетень, Данхал, Октан, Антарія, NPZ 9800) та один сорт ярого (Жовтух) української та іноземної селекції. Сорти відрізнялись групою стиглості: середньоранні та ранньостиглі, а також різним рівнем стійкості до посухи

. Дослідження проводили на базі лабораторії біотехнології Національного університету біоресурсів та природокористування України та лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин.

Насіння ріпаку (по 100 насінням кожного сорту) стерилізували 0.9% NaCl в експозиції 15 хв. з подальшим триразовим промиванням стерильною дистильованою водою.

Насіння висадили на безгормональне поживне середовище і відправили у термостат. Через деякий час пересадили рослини на середовище з 0,25 кінетину.

**Результати та обговорення.** В ході дослідження було отримано наступні результати, занесені в таблицю 1:

**Таблиця 1.** Ефективність стерилізації через чотирнадцять днів після посадки

Сорт або гібрид	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння		Схожість насіння		Ефективність стерилізації (%)
		штук	%	штук	%	
Дангал	100	0	0	87	87	100
Антарія	100	0	0	76	76	100
Октан	100	3	3	92	92	97
Аліот	100	4	4	97	97	96
Чорний велетенський	100	2	2	79	79	98

Продовження таблиці 1. Ефективність стерилізації через чотирнадцять днів після посадки

NK Technik	100	0	0	81	81	100
Жовтун	100	13	13	68	68	87
NPZ 9800	100	8	8	74	74	92
NK Petrol	100	4	4	94	94	96

Ефективність стерилізації майже у всіх випадках, окрім сорту «Жовтун», в якої вона була 87%, була вищою за 90%. Найкраща схожість насіння була у сортів «Аліот» – 97% та «NK Petrol» – 94%. Найгірша схожість насіння спостерігалася в сорту «Жовтун» - 68%.

**Висновки.** В результаті проведених експериментів було вивчено особливості введення в культуру *in vitro* ріпаку озимого та ярого (*Brassica napus L.*). Найкращі показники схожості насіння спостерігалися у сортів «Аліот» та «NK Petrol». В той час як ефективність стерилізації майже у всіх сортів, окрім «Жовтун», була вищою за 90%

НУБІП України

НУБІП України

## КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* НА СТІЙКІСТЬ РІПАКА ОЗИМОГО ТА ЯРОГО (*BRASSICA NAPUS L.*) ДО ПОСУХИ

Ріпак (*Brassica napus L.*) - один з найважливіших джерел сировини для харчової промисловості, виробництва біопалива та кормів. В умовах зміни клімату актуальності набувають дослідження направлені на створення гібридів із комплексною стійкістю проти несприятливих абіотичних факторів.

Для отримання посухостійких ліній використовували сорти ріпаку озимого Аліот та Антарія. Оцінку посухостійкості проводили з використанням модифікованої нами лабораторної методики для рослин ріпаку, яка базується на здатності насіння проростати у розчинах сахарози з високим осмотичним тиском. Нами використано розчини сахарози в діапазоні 10-18%. Фізіологічним підґрунтям цієї здатності є властивість генотипів по-різному проростати в розчинах сахарози, що до деякої міри моделює рівень водоспоживання насіння за умов нестачі води при підвищеній концентрації ґрунтового розчину. Підвищений відсоток пророслих насінин при цьому відображує здатність генотипу використовувати недостатні запаси вологи у ґрунті уже на перших етапах онтогенезу рослин, що свідчить про його посухостійкість.

Отримані проростки висаджували на живильні середовища з додаванням ПЕГ 6000 та манітолу в різних концентраціях. Встановлено, що за дії 12% концентрації ПЕГ 6000 та 17% манітолу виявлено істотні відмінності між дослідженими сортами ріпаку озимого за зменшенням приросту маси калюсної тканини, яка залежно від генотипу знижувалась приблизно на 50%. В подальшому мікрокалюси обробляли  $\gamma$ -опроміненням в дозі 40 Гр. та висаджували на середовище з сублетальною концентрацією ПЕГ 6000. Її встановлювали шляхом висіву суспензійної культури на живильні середовища з концентрацією ПЕГ 6000 (10%; 20%; 30%; 40%). В результаті нами визначено сублетальну концентрацію ПЕГ 6000 (20%), за якої спостерігалось значне зменшення приросту маси калюсної тканини, яку в подальшому використовували для проведення ступінчастої клітинної селекції *in vitro*.

Для цього в кінці першого пасажу виділяли лише світлі ділянки калюсних тканин і переносили на свіжоприготовлене середовище з селективним агентом. Проводили перевірку колоній, які росли в селективних і неселективних умовах.

Встановлено, що до сьомого пасажу кількість виділених спочатку колоній зменшувалась на порядок.

В результаті обробки  $\gamma$ -опроміненням кількість життєздатних колоній у першому пасажі зменшилась до 35-50%. Після трьох селективних пасажів число живих колоній складало 15-25%.

В наших дослідженнях після проведення двох пасажів на середовищі без селективного агента та перевірки росту мікроколоній в селективних умовах вдалось виділити близько 4% резистентних клонів ріпаку, що стабільно зберігали ознаку посухостійкості.

Калюси всіх клонів були подібні за морфотипом, утворювали щільну, глобулярну структуру зеленуватого забарвлення і відзначались дуже повільним ростом. Отримані посухостійкі калюсні лінії ріпаку використовували для регенерації рослин, додаючи до живильного середовища екзогенні гормони в різних концентраціях.

Отже, на основі отриманих даних визначено, що в процесі клітинної селекції *in vitro* для отримання посухостійких ліній ріпаку доцільно застосовувати ПЕГ 6000 в концентрації 12%. Встановлено ефективність ступінчастої селекції *in vitro* з використанням  $\gamma$ -опромінення в якості мутагенного агента. Відповідно до запропонованої схеми отримано близько 4% клонів ріпаку озимого толерантних до посухи, які стабільно зберігали ознаку.

## СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ФОРМ РІПАКА (*BRASSICA NAPUS L.*) ЗА ДОПОМОГОЮ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ *IN VITRO*

Ріпак (*Brassica napus L.*) є однією із провідних олійних та кормових культур в Україні та світі. Селекційні програми озимого та ярого ріпаку спрямовані на створення високоврожайних сортів та гібридів різних типів за вмістом і складом олії, широкою пластичністю до метеорологічних й агроекологічних чинників. Метою нашої роботи було створення посухостійких форм ріпака (*Brassica napus L.*) за допомогою клітинної селекції *in vitro*.

Матеріалом для дослідження слугували наступні сорти ріпаку озимого та ярого: 'Aliot', 'NK Petrol', 'NK Technik', 'Чорний велетень', 'Данхал', 'Октан', 'Антарія', 'Жовтун', 'NPZ 9800'. Насіння ріпаку (по 100 насінин кожного сорту) стерилізували 0.9% NaCl в експозиції 15 хв. з подальшим триразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Калюсну тканину отримували із стебел асептичних проростків, культивуючи їх в термостаті за регульованої температури 25-26°C, відносної вологості повітря 70-80%, без освітлення з подальшим перепасируванням утвореного первинного калюсу на середовище такого самого складу через кожну 21 добу. Для досягнення мутагенного ефекту іонізуючого опромінення калюсні тканини обробляли  $\gamma$ -променем в дозі 40 Гр. Ступінчасту клітинну селекцію *in vitro* ріпаку на стійкість до посухи проводили за схемою: пророщування насіння в розчинах з селективним агентом → 3 пасажі на селективному середовищі → 3 пасажі без селективного фактора → 3 пасажі на селективному середовищі → регенерація рослин. Як стресові чинники було застосовано 15-20% манітол і 5-25% високомолекулярний ПЕГ-6000 та калюсогенне середовище МС (МС+0.5 мг/л БАПІ, 0.5 мг/л НОК, 0.05 мг/л ГКЗ) на якому культивували калюсні тканини.

Для отримання посухостійких ліній на основі досліджуваних сортів використовували сорти ріпаку озимого 'Октан' та 'Чорний велетень'. В наших дослідженнях після проведення двох пасажів на середовищі без селективного

агента та перевірки росту мікроколоній в селективних умовах вдалось виділити близько 4% резистентних клонів ріпаку, що стабільно зберігали ознаку посухостійкості.

Отже на основі отриманих даних визначено, що в процесі клітинної селекції *in vitro* для отримання посухостійких ліній ріпаку доцільно застосовувати ПЕТ 6000 в концентрації 12%. Встановлено ефективність ступінчастої селекції *in vitro* з використанням  $\gamma$ -опромінення в якості мутагенного агента. Відповідно до запропонованої схеми отримано близько 4% клонів ріпаку озимого толерантних до посухи, які стабільно зберігали ознаку.