

І. І. МОЦНИЙ, К. І. ЛОБАНОВА, Г. О. ЧЕБОТАР, С. В. ЧЕБОТАР, І. С. ЗАМБРІБОРЩ
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насіннезнавства та сортовивчення

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІНІЙ – ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ РІЗНИХ ПОКОЛІНЬ ЗА КІЛЬКІСНИМИ ОЗНАКАМИ

Досліджені показники агрономічних ознак дигаплоїдів трьох короткостеблових аналогів сортів м'якої пшениці та сорту Одеська 51, порівняно з вихідними формами, у яких ідентифіковані за допомогою ПЛР алелі генів короткостебловості. Встановлені достовірні відмінності між батьківськими формами та дигаплоїдами за висотою рослин, темпом розвитку та елементами структури врожаю. Виявлено, що метод одержання андрогенних дигаплоїдів неоднозначно змінює прояв ознак озимої пшениці в залежності від специфічності ліній, Rht-генотипу, умов року і кількості генерацій ex vitro. Для генотипів Rht8c Rht-B1e і особливо Rht8c Rht-B1b показано значиме зниження показників ліній-подвоєних гаплоїдів в обидва роки, але найбільш суттєво – в першу генерацію за ознаками довжина соломини і головного колоса, число колосків в колосі. У генотипів Rht8c Rht-B1a спостерігалось як послаблення, так і посилення ознак. У просторі вивчених ознак найкраще розрізнялися вихідна і дигаплоїдна лінії з генотипом Rht8c Rht-B1b. Варіація МТЗ не мала відношення до наслідків андрогенезу, а залежала від особливостей лінії або умов року. В результаті проведення матеріалу через культуру ізольованих пиляків in vitro отримані форми, які представляють інтерес для подальшого дослідження.

Ключові слова: м'яка пшениця, дигаплоїди, гени короткостебловості, кількісні ознаки

Вступ. Характерною особливістю селекції пшениці останніх десятиріч є застосування методів біотехнології, в тому числі культури ізольованих пиляків *in vitro*. Регенерація гаплоїдних рослин і опрацьована на її основі техніка створення подвоєних гаплоїдів дають можливість перевести в гомозиготний стан весь спектр мінливості гібридів і отримати константні лінії значно швидше, ніж традиційними методами [1]. Включення дигаплоїдів в селекційний процес прискорює пошук і оцінку рекомбінантних генотипів, утворених внаслідок схрещування, підвищує надійність добору бажаних форм при менших обсягах популяції. Наразі залучення андрогенних подвоєних гаплоїдів дедалі ширше входить також і в практику прикладної генетики пшениці [2]. Швидке одержання стабільних ліній із популяції мікроспор F₂ значно полегшує ідентифікацію генотипів, що рідко зустрічаються, підвищує ефективність пошуку потрібних гомозигот, особливо у полігібридних схрещуваннях, та допомагає прояснити питання неалельної взаємодії [1].

Проте безпосередній вплив умов *in vitro* на окремі агрономічно цінні ознаки пшениці неоднозначний і далеко не завжди позитивний, що може суттєво знизити

оцінку селекційного матеріалу і призвести до елімінації цінних комбінацій генів при бракуванні матеріалу на ранніх етапах селекційного процесу. До того ж означений вплив істотно залежить від специфічності сорту чи лінії, зокрема генотипу за генами карликовості. Для аналізу наслідків проведення генотипів через культуру *in vitro* стосовно кількісних ознак, які мають полігенну детермінацію, високу екологічну дисперсію і сильно корелюють між собою, доцільно застосовувати методи багатовимірною статистичного аналізу, зокрема дисперсійний та дискримінантний аналізи [3].

Вивчення цього питання представляє як теоретичний, так і практичний інтерес, тому **метою** даного дослідження було визначити подвоєні гаплоїди озимої м'якої пшениці з різними комбінаціями генів системи *Rht* та виявити вплив андрогенезу *in vitro* на польові характеристики одержаних рослин.

Матеріал і методика. Матеріалом для досліджень слугували лінія сорту Одеська 51 (Од.51) і короткостеблові аналоги двох відомих сортів озимої пшениці селекції СГІ–НЦНС: Кооператорка К-90 (КК90), Кооператорка К-70 (КК70), Одеська 3 К-75 (Од.3К75) [4]. Слід зазначити, що вихідні форми були представлені чистими лініями, створеними оригіноматеріалом В.В. Хангільдіним. Ідентифікація алелів генів короткостебловості була виконана Г.О. Чеботар методом ПЛР [5].

Для одержання андрогенних подвоєних гаплоїдів добирали колосся рослин-донорів з пиляками, коли більша частина мікроспор у пиляках знаходиться на фазі вакуолізації. Попередню обробку і стерилізацію матеріалу проводили за загальноприйнятою методикою [6]. Ізольовані пиляки висаджували на середовище для індукції новоутворень – 190-2 в модифікації [7] і культивували у темряві протягом 3 діб при температурі + 30°, далі при + 24°C до появи новоутворень. Сформовані макроструктури в подальшому культивували на модифікованому середовищі MS [6] при 16-годинному фотоперіоді. Зелені регенеранти пересаджували на безгормональне середовище MS, яровизували і дорощували в умовах штучного клімату до одержання зерен. Насіння з кожного фертильного пагона збирали окремо. Потомство кожного регенеранту вважалося самостійною лінією і вивчалось індивідуально.

Одержані в результаті спонтанного подвоєння хромосом зерна висівали восени 2009 р. в полі (покоління D_1) стандартним широкорядним методом ручними саджалками у рядках завдовжки 1 м, відстань між рядками 27 см. Рослини покоління D_2 вирощували протягом 2010/11 сільськогосподарського року із одержаних в польових умовах зерен подвоєних гаплоїдів попереднього (2010) року репродукції (D_1). Слід зазначити, що вихідні форми (P), з яких були отримані подвоєні гаплоїди, в обох варіантах дослідження (P_1 , P_2) вирощувались з насіння, одержаного в польових умовах. Тому на відміну від послідовних генерацій подвоєних гаплоїдів – D_1 і D_2 , P_1 і P_2 являють собою лише множини рослин різних років (умов) вирощування. Протягом вегетаційного періоду вели фенологічні спостереження. У фазу воскової стиглості зерна провели генетико-селекційну оцінку матеріалу, при цьому виявляли схожість і

відмінність морфологічних ознак подвоєних гаплоїдів і вихідних форм, однорідність ліній за висотою, фазою розвитку і загальним габітусом рослини.

У всіх рослин визначали комплекс ознак, традиційний в селекційній практиці [8]: довжина соломини (ДС), число пагонів в першому (ПК₁) і в другому ярусі (ПК₂), продуктивна куцистість (ПК); довжина головного колоса (ДГК), число колосків в колосі (ЧКК), число фертильних колосків (ЧФК), число стерильних колосків (ЧСК) і число зерен (ЧЗК) в головному колосі, число зерен в колоскові (ЧЗк), маса зерна головного колоса (МЗК); число зерен з підгонів (ЧЗП), маса зерна з підгонів (МЗП); число зерен з рослини (ЧЗР), маса зерна з рослини (МЗР). За вимірами розраховували масу 1000 зерен (МТЗ) головного колоса і рослини та його щільність (ЩК).

При відсутності вірогідних відмінностей за комплексом ознак між подвоєними гаплоїдними лініями-потомками однієї лінії-донора дані були підсумовані. Для визначення залишкового впливу андрогенезу на розвиток окремої кількісної ознаки в залежності від *Rht*-генотипу та кількості генерацій лінії після культури *in vitro* застосовували дисперсійний аналіз [9]. Для оцінки наслідків факторів, що впливають під час культивування експлантів в умовах *in vitro* на комплекс ознак, і визначення інформативності кожної з них, виконували покрокову процедуру лінійного дискримінантного аналізу із включенням (Forward stepwise) [10].

Результати й обговорення. В результаті андрогенезу в культурі ізолюваних пиляків *in vitro* було одержано 3 фертильні регенеранти з лінії Од.51 (418-1, 418-2 і 418-3), 5 – з лінії КК90 (313-1, 313-2, 313-3, 313-4 і 313-5), 3 – з лінії КК70 (314-1, 314-2 і 314-3) та 1 – з лінії Од.3К75 (311-1) [11]. Вони стали засновниками ліній - подвоєних гаплоїдів з відповідними назвами. Польова оцінка виявила (табл. 1 і табл. 2), що потомство однієї рослини-регенеранта (313-1) КАСС КК90 дало лінію низькорослих подвоєних гаплоїдів 313-1, яка можливо утворилась в процесі регенерації. Показана статистично вірогідна відмінність виділеної лінії від середньорослих подвоєних гаплоїдів (лінії 313-2, 313-3, 313-4 і 313-5) і вихідної лінії КК90 за всіма параметрами, що свідчило про її генетичну відмінність.

Таблиця 1

Характеристика за агрономічними ознаками головного колоса вихідних ліній (*P*) і подвоєних гаплоїдів (*D*) в першу (*D*₁) і другу (*D*₂) генерацію після культури *in vitro* ($M \pm t_{0,05} SE$)

	Лінія	ДС*	ДГК	ЧФК	ЧЗК	МЗК	ЧЗк	ЧСК	ЩК
Од.51	<i>P</i> ₁	80,0 _{±1,9}	8,8 _{±0,4}	20,5 _{±0,7}	55,0 _{±3,3}	2,44 _{±0,18}	2,68 _{±0,13}	0,72 _{±0,25}	23,1 _{±0,5}
	<i>D</i> ₁	73,7 _{±2,2}	8,2 _{±0,6}	18,4 _{±1,0}	48,6 _{±5,7}	2,22 _{±0,27}	2,63 _{±0,22}	0,86 _{±0,64}	22,4 _{±0,8}
	<i>P</i> ₂	73,6 _{±3,5}	8,3 _{±0,4}	20,6 _{±0,7}	51,1 _{±5,8}	1,78 _{±0,31}	2,45 _{±0,22}	0,68 _{±0,30}	24,7 _{±0,8}
	418-1 <i>D</i> ₂	81,4 _{±3,3}	8,9 _{±0,5}	21,2 _{±0,8}	59,3 _{±3,2}	2,14 _{±0,24}	2,80 _{±0,14}	0,27 _{±0,33}	23,2 _{±0,9}
	418-2 <i>D</i> ₂	80,3 _{±2,8}	8,0 _{±0,3}	19,8 _{±0,7}	48,3 _{±4,1}	1,60 _{±0,18}	2,42 _{±0,15}	0,93 _{±0,29}	24,8 _{±0,6}
КК90	<i>P</i> ₁	79,9 _{±2,9}	9,0 _{±0,2}	19,5 _{±0,5}	52,7 _{±2,9}	2,21 _{±0,16}	2,68 _{±0,10}	0,49 _{±0,27}	21,1 _{±0,4}
	313-1 <i>D</i> ₁ [#]	71,8 _{±2,4}	9,0 _{±0,3}	20,2 _{±0,5}	60,5 _{±3,4}	2,13 _{±0,18}	2,99 _{±0,12}	0,29 _{±0,21}	21,8 _{±0,4}
	313-2 <i>D</i> ₁	80,9	9,2	19,0	54,0	2,15	2,84	0,00	19,7

	313-3 D_1	83,4 \pm 3,6	9,3 \pm 0,7	19,3 \pm 1,5	51,0 \pm 6,4	2,11 \pm 0,35	2,63 \pm 0,16	1,50 \pm 0,51	21,3 \pm 0,6
	313-4 D_1	85,9 \pm 2,8	9,3 \pm 0,3	20,6 \pm 0,5	54,9 \pm 3,7	2,15 \pm 0,23	2,65 \pm 0,13	0,89 \pm 0,28	22,1 \pm 0,6
	P_2	81,6 \pm 2,6	8,9 \pm 0,2	20,4 \pm 0,4	54,2 \pm 2,3	1,68 \pm 0,14	2,65 \pm 0,08	0,76 \pm 0,23	22,7 \pm 0,4
	313-1 D_2 [#]	70,0 \pm 3,1	7,8 \pm 0,3	20,7 \pm 0,5	55,2 \pm 4,5	1,74 \pm 0,15	2,66 \pm 0,18	0,52 \pm 0,34	25,9 \pm 0,7
	313-2 D_2	84,4 \pm 7,0	8,6 \pm 0,4	20,1 \pm 0,6	49,1 \pm 4,3	1,63 \pm 0,20	2,45 \pm 0,24	0,50 \pm 0,38	22,9 \pm 0,9
	313-3 D_2	82,8 \pm 6,8	9,4 \pm 0,6	20,8 \pm 1,5	52,8 \pm 9,9	1,79 \pm 0,53	2,53 \pm 0,44	0,67 \pm 0,86	22,0 \pm 0,8
	313-4 D_2	86,1 \pm 3,6	9,1 \pm 0,3	20,3 \pm 0,5	52,6 \pm 3,5	1,94 \pm 0,22	2,58 \pm 0,13	1,04 \pm 0,32	22,6 \pm 0,7
КК70	P_1	56,9 \pm 1,2	8,8 \pm 0,3	21,1 \pm 0,5	59,4 \pm 4,0	2,00 \pm 0,20	2,80 \pm 0,15	0,53 \pm 0,26	23,5 \pm 0,5
	314-1 D_1	52,7 \pm 3,3	8,1 \pm 0,4	20,0 \pm 0,7	57,3 \pm 5,5	1,92 \pm 0,28	2,85 \pm 0,18	0,25 \pm 0,29	23,9 \pm 0,8
	314-2 D_1	52,1 \pm 2,1	8,9 \pm 0,6	21,5 \pm 1,1	64,5 \pm 5,9	2,11 \pm 0,41	3,00 \pm 0,16	0,17 \pm 0,43	23,2 \pm 1,1
	314-3 D_1	49,5	7,5	21,0	56,0	1,84	2,67	0,00	26,4
	P_2	55,6 \pm 1,6	8,5 \pm 0,2	21,3 \pm 0,4	53,8 \pm 3,6	1,44 \pm 0,18	2,52 \pm 0,15	0,85 \pm 0,27	25,1 \pm 0,5
	314-1 D_2	59,0 \pm 2,5	8,3 \pm 0,3	21,1 \pm 0,7	52,1 \pm 4,7	1,34 \pm 0,26	2,47 \pm 0,18	0,87 \pm 0,41	25,3 \pm 0,6
	314-2 D_2	55,1 \pm 2,0	8,2 \pm 0,2	20,7 \pm 0,5	46,6 \pm 3,1	1,21 \pm 0,15	2,24 \pm 0,13	1,17 \pm 0,30	25,5 \pm 0,6
314-3 D_2	50,0 \pm 3,4	7,9 \pm 0,6	19,9 \pm 0,9	37,1 \pm 4,5	0,81 \pm 0,20	1,87 \pm 0,23	1,60 \pm 0,55	26,5 \pm 1,7	
Од.3К75	P_1	67,8 \pm 1,9	8,5 \pm 0,3	21,0 \pm 0,8	59,3 \pm 3,6	2,10 \pm 0,13	2,83 \pm 0,12	0,38 \pm 0,23	24,1 \pm 0,4
	311-1 D_1	62,0 \pm 4,3	6,8 \pm 0,2	16,6 \pm 0,7	45,8 \pm 9,9	1,51 \pm 0,32	2,75 \pm 0,55	0,00 \pm 0,00	23,1 \pm 1,4
	P_2	70,5 \pm 2,4	8,2 \pm 0,2	21,5 \pm 0,4	58,0 \pm 4,2	1,65 \pm 0,25	2,69 \pm 0,19	0,13 \pm 0,16	25,3 \pm 0,6
	311-1 D_2	59,8 \pm 2,1	6,1 \pm 0,2	16,6 \pm 0,4	38,8 \pm 3,1	1,12 \pm 0,15	2,33 \pm 0,16	0,29 \pm 0,20	26,4 \pm 0,8

Примітки:

[#] 313-1 D – короткостеблова лінія подвоєних гаплоїдів, одержана з Кооператорки К-90.

* **ДС** – довжина соломини, **ДГК** – довжина, **ЧФК** – число фертильних колосків, **ЧЗК** – число зерен, **МЗК** – маса зерна, **ЧЗк** – число зерен в колоскові, **ЧСК** – число стерильних колосків, **ЩК** – щільність

Таблиця 2

Характеристика за агрономічними ознаками рослини вихідних ліній (P) і подвоєних гаплоїдів (D) в першу (D_1) і другу (D_2) генерацію після культури *in vitro* ($M \pm t_{0,05} SE$)

	Лінія	ДК*	ДЦ	ПК	ЧЗП	МЗП	ЧЗР	МЗР	МТЗ
Од.51	P_1	15,5 \pm 0,6	19,1 \pm 0,7	8,2 \pm 1,1	281 \pm 60	10,6 \pm 2,3	336 \pm 62	13,1 \pm 2,4	38,9 \pm 1,3
	D_1	16,4 \pm 0,5	20,1 \pm 1,0	6,0 \pm 2,4	179 \pm 95	6,5 \pm 3,6	228 \pm 96	8,7 \pm 3,6	38,5 \pm 2,2
	P_2	20,9 \pm 0,7	24,0 \pm 0,5	8,0 \pm 1,3	223 \pm 59	6,6 \pm 2,0	275 \pm 62	8,4 \pm 2,2	29,4 \pm 2,4
	418-1 D_2	21,3 \pm 1,1	24,1 \pm 0,9	7,3 \pm 1,7	252 \pm 79	8,6 \pm 3,0	312 \pm 80	10,7 \pm 3,0	34,4 \pm 3,0
	418-2 D_2	21,2 \pm 0,7	24,1 \pm 0,5	7,3 \pm 1,6	214 \pm 59	6,4 \pm 2,1	262 \pm 62	8,0 \pm 2,2	30,5 \pm 2,5
КК90	P_1	13,5 \pm 0,4	17,5 \pm 0,3	7,0 \pm 0,8	238 \pm 41	8,8 \pm 1,5	291 \pm 43	11,0 \pm 1,6	38,0 \pm 1,5
	313-1 D_1 [#]	13,3 \pm 0,4	18,3 \pm 0,5	6,5 \pm 1,1	212 \pm 41	6,0 \pm 1,2	272 \pm 43	8,1 \pm 1,3	30,1 \pm 1,7
	313-2 D_1	16,0	19,5	8,5	232	7,8	286	9,9	34,7
	313-3 D_1	15,9 \pm 1,1	21,0 \pm 1,0	4,7 \pm 1,4	140 \pm 55	5,4 \pm 2,2	191 \pm 58	7,5 \pm 2,4	38,6 \pm 2,4
	313-4 D_1	17,3 \pm 0,9	21,3 \pm 0,8	7,2 \pm 1,1	214 \pm 37	6,8 \pm 1,1	268 \pm 37	9,0 \pm 1,2	34,2 \pm 2,6
	P_2	19,0 \pm 0,3	23,1 \pm 0,2	8,7 \pm 1,2	280 \pm 49	7,7 \pm 1,6	334 \pm 49	9,4 \pm 1,7	27,9 \pm 2,4
	313-1 D_2 [#]	19,5 \pm 0,6	22,9 \pm 0,5	8,7 \pm 1,5	239 \pm 62	5,8 \pm 1,6	294 \pm 64	7,4 \pm 1,8	25,1 \pm 2,5
	313-2 D_2	19,9 \pm 0,7	23,3 \pm 0,7	8,3 \pm 2,8	230 \pm 93	7,1 \pm 3,1	279 \pm 92	8,7 \pm 3,0	31,8 \pm 3,0
	313-3 D_2	19,6 \pm 1,4	23,2 \pm 0,6	8,7 \pm 5,0	241 \pm 99	6,0 \pm 5,0	293 \pm 200	7,8 \pm 5,1	27,9 \pm 4,0
313-4 D_2	18,2 \pm 0,9	22,1 \pm 0,9	7,9 \pm 1,2	231 \pm 43	7,1 \pm 1,3	283 \pm 44	9,1 \pm 1,4	32,4 \pm 3,0	
КК70	P_1	13,2 \pm 0,4	18,8 \pm 0,6	8,4 \pm 1,3	295 \pm 68	8,0 \pm 1,8	354 \pm 69	10,0 \pm 1,9	28,6 \pm 1,6
	314-1 D_1	14,1 \pm 0,5	19,8 \pm 1,0	4,4 \pm 1,3	120 \pm 67	3,2 \pm 1,9	177 \pm 70	5,1 \pm 2,1	28,2 \pm 2,5
	314-2 D_1	14,0 \pm 0,9	19,7 \pm 1,7	5,5 \pm 2,2	143 \pm 67	3,4 \pm 1,9	207 \pm 67	5,5 \pm 2,2	26,3 \pm 4,2
	314-3 D_1	14,0	19,0	8,0	203	6,3	259	8,1	31,3

	P_2	19,0 \pm 0,5	23,2 \pm 0,2	10,2 \pm 1,3	314 \pm 64	6,8 \pm 1,5	367 \pm 65	8,2 \pm 1,6	22,0 \pm 2,1
	314-1 D_2	18,7 \pm 0,8	23,5 \pm 0,6	8,3 \pm 2,2	223 \pm 83	5,0 \pm 2,4	275 \pm 86	6,3 \pm 2,6	22,6 \pm 4,3
	314-2 D_2	18,8 \pm 0,7	23,5 \pm 0,6	7,8 \pm 2,3	212 \pm 87	5,4 \pm 2,4	263 \pm 89	6,9 \pm 2,5	26,2 \pm 2,2
	314-3 D_2	19,5 \pm 1,0	24,6 \pm 0,8	6,5 \pm 2,0	138 \pm 60	2,6 \pm 1,3	175 \pm 63	3,4 \pm 1,4	18,9 \pm 3,3
Од.3К75	P_1	13,6 \pm 0,4	18,2 \pm 0,6	7,1 \pm 1,1	248 \pm 50	7,7 \pm 1,5	307 \pm 52	9,8 \pm 1,5	32,6 \pm 1,8
	311-1 D_1	14,4 \pm 0,7	19,2 \pm 0,6	4,6 \pm 3,6	76 \pm 61	2,1 \pm 1,6	122 \pm 66	3,6 \pm 1,7	30,7 \pm 5,7
	P_2	19,1 \pm 0,4	23,0 \pm 0,3	9,6 \pm 0,9	323 \pm 51	7,9 \pm 1,7	381 \pm 54	9,5 \pm 1,9	23,9 \pm 2,7
	311-1 D_2	20,9 \pm 0,8	24,4 \pm 0,7	6,6 \pm 1,1	143 \pm 31	3,7 \pm 0,9	182 \pm 32	4,8 \pm 1,0	25,3 \pm 2,1

Примітки: # 313-1 D – короткостеблова лінія подвоєних гаплоїдів, одержана з Кооператорки К-90. * **ДК** – дата колосіння (травень), **ДЦ** – дата цвітіння (травень), **ПК** – продуктивне куціння, **ЧЗП** – число зерен з підгонів, **МЗП** – маса зерна з підгонів, **ЧЗР** – число зерен з рослини, **МЗР** – маса зерна з рослини, **МТЗ** – маса 1000 зерен

В подальшому вона була виключена з аналізу впливу наслідків культури *in vitro* на експресію кількісних ознак *ex vitro* статистичними методами. Деяка неоднорідність за комплексом ознак спостерігалась і у відношенні інших подвоєних гаплоїдних ліній, одержаних з КК90. В D_1 (2010 р.) вона була виявлена за допомогою мультиваріантного тесту Уїлкса – однофакторного багатовходового дисперсійного аналізу ($W=0,0003$; $F=2,40$ при $p \leq 0,05$) і вірогідно підтверджена багатомірним дискримінантним аналізом ($\lambda=0,16$; $F=4,29$ при $p \leq 0,001$). Зокрема, лінія 313-3 зацвіла на 1,5-2,7 дня пізніше інших (табл. 2) і мала на 1,2-1,5 більше стерильних колосків (табл. 1).

Означена гетерогенність була невиразна (очевидно внаслідок генетичної близькості подвоєних гаплоїдних ліній) і не підтвердилась в D_2 (2011 р.) стосовно жодної ознаки, обрахованої окремо. Проте за комплексом ознак лінії вірогідно диференціювались дискримінантним аналізом ($\lambda=0,49$; $F=3,31$ при $p \leq 0,01$). При цьому лінії 313-4 і 313-5 не розрізнялись жодного року ні дисперсійним, ні дискримінантним аналізом, що дозволило нам підсумувати дані по них і вважати їх однією лінією – 313-4. Дві лінії (418-2 і 418-3), одержані з сорту Од.51, не різнилися між собою ні в перший рік дослідження (D_1), ні в другий (D_2). Дані по них були підсумовані, а лінії об'єднані в одну – 418-2. В той же час в множині D_2 лінія 418-1 була виокремлена через відмінність. Вона характеризувалась дещо більшими розмірами органів рослини, вищими показниками елементів продуктивності і МТЗ. І хоча зазначені відмінності були невірогідні стосовно жодної ознаки окремо, за сукупністю ознак лінія напевно дискримінувалась. Всі три подвоєні гаплоїдні лінії, одержані з лінії КК70, вірогідно різнилися між собою хоча б в один із років дослідження. Зокрема, лінія 314-3 відрізнялась меншими розмірами органів рослини (ДС, ДГК, ЧФК, ПК), затримкою темпів розвитку, низькою продуктивністю і щуплозерністю (табл. 1, 2).

Шляхом порівняння за допомогою 95% довірчого інтервалу середніх величин досліджених ознак у вихідних ліній і одержаних з них подвоєних гаплоїдів показано (табл. 1 і табл. 2), що подвоєні гаплоїди обох ліній-дигенних карликів – КК70 (*Rht8c Rht-B1e*) і Од.3К75 (*Rht8c Rht-B1b*) в першу генерацію після андрогенезу (D_1) в

більшості характеризуються вірогідно коротшою соломиною (ДС), меншими розмірами органів рослини (ДГК, ЧКК, ПК), меншою кількістю стерильних колосків в колосі (ЧСК) і більш низькими показниками окремих елементів продуктивності (ЧФК, ЧЗП, МЗП, ЧЗР, МЗР), ніж вихідні лінії. Проявляють виражену тенденцію щодо затримки темпів розвитку (ДК і ДЦ) і зменшення абсолютних показників переважної більшості інших ознак. В D_2 ці лінії вели себе дещо по-різному. Лінії, одержані з КК70, поступались вихідній лінії за ознаками елементів продуктивності: ЧЗК, ПК, ЧЗП, МЗП, ЧЗР і МЗР, а стосовно решти ознак вони проявляли лише означену тенденцію (розрізнення невірогідні). В той же час подвоєна гаплоїдна лінія з Од.3К75 (311-1) зберігала вірогідність відмінностей в обидва роки дослідження (D_1 і D_2). Для ліній, в генотипі яких знаходиться лише один ген короткостебловості (*Rht8c*): КК90 і Од. 51, в D_1 також спостерігались затримка темпів розвитку (ДК і ДЦ) і послаблення експресії більшості ознак продуктивності рослини після культури *in vitro* (у випадку Од.51 – відмінності невірогідні), але не виявлено вірогідного (при $P \geq 95\%$) зменшення їх середніх значень в D_2 (табл. 2). Більш того, за поодинокими ознаками головного пагона (ДС) і, відповідно, колоса (ДГК, ЧФК – лише для ліній, одержаних з КК90) подвоєні гаплоїди навіть перевищували вихідні лінії в один із років, а то й в обидва (табл. 1).

Для визначення впливу віддалених наслідків методу одержання андрогенних дигаплоїдів на низку агрономічних ознак при розрідженому посіві (табл. 1, 2) виконували дисперсійний та дискримінантний аналізи даних спостережень за рослинами урожаю D_1 і D_2 . При цьому дані по подвоєних гаплоїдах, отриманих з однієї вихідної форми, були об'єднані. Дисперсійний аналіз показав, що статистично вірогідним на переважну більшість ознак є самостійний вплив умов року (фактор В) і наслідків андрогенезу *in vitro* (фактор С), а також їх взаємодії з особливостями ліній (фактор А) та між собою (табл. 3). Слід зазначити, що фактор В, значною мірою, віддзеркалює вплив умов року. А у взаємодії з фактором С (ВС або АВС), коли значення дисперсій вихідних ліній і подвоєних гаплоїдів розмежовуються, він виступає як номер генерації *ex vitro*. Отже, взаємодія ВС відображає послаблення переважно негативних наслідків андрогенезу та культивування регенерантів *in vitro* в залежності від кількості генерацій після культури і її внесок у загальну дисперсію – найбільш важливий з практичної точки зору.

Означений внесок слабовірогідний і стосується меншості ознак, але значно посилюється у випадку взаємодії з фактором «Лінія» (АВС). Взаємодія чинників «Лінія» (А) і «Наслідки андрогенезу *in vitro*» (С) входила в дисперсію майже всіх ознак головного колоса, за виключенням ЧЗк і ЩК. На МТЗ істотно впливали два фактори – «Лінія» (А) і «Умови року» (В), при цьому не виявлено жодного достовірного випадку їх взаємодії (табл. 3). ДС безпосередньо підлягає впливу *Rht*-генів, а саме за їх алелями головним чином розрізняються лінії. Тому однозначний вплив чинника «Лінія» (А) на цю ознаку виявився високовірогідним, незважаючи на наявність

взаємодій. Стосовно ЩК, ДК, МЗП, МЗР і МТЗ можна припустити, що в даному матеріалі ці ознаки найбільшою мірою залежать від опосередкованих ефектів генів карликовості.

Таким чином, незважаючи на особливості ліній, умов року і кількість генерацій після культури *in vitro*, процедура одержання дигаплоїдів шляхом андрогенезу однозначно негативно впливає на прояв переважної більшості елементів продуктивності озимої пшениці. Цей вплив значно суттєвіший в перший рік безпосередньо після культури (D_1) і стає більш слабким або зовсім зникає в наступний рік (D_2). Негативні наслідки проведення матеріалу через культуру *in vitro* щодо варіації кількісних ознак головного колоса: ДС, ЧЗк і ЩК істотно модифікуються особливостями лінії (проявляються лише у дигенних карликів – стосовно ДС) чи умовами репродукції насіння подвоєних гаплоїдів (проявляються лише в один із років дослідження – стосовно ЧЗк і ЩК). В той же час варіація МТЗ не має ніякого відношення до наслідків андрогенезу, а залежить виключно від генотипу лінії, головним чином, за генами *Rht* або умов року.

Таблиця 3

Результати трифакторного дисперсійного аналізу впливу особливостей лінії¹ (А), (умов року) кількості генерацій після культури *in vitro* (В) та наслідків андрогенезу (С) на варіацію ознак, mS

Ознака	А	В	С	АВ	АС	ВС	АВС	Похибка
df	3	1	1	3	3	1	3	465
ДС ²	18320** ³	51	208*	11	553***	196*	259***	45
ДГК	41,5	10,9***	27,4***	0,6	15,8***	0,2	2,3**	0,5
ЧКК	75,5	33,3***	179,6***	1,1	92,4***	1,6	8,0**	1,5
ЧЗК	288	1238***	2617***	400**	881***	205	240	101
МЗК	4,76	25,21***	2,31**	0,18	1,58***	0,01	0,17	0,27
ЧЗк	0,1	5,5***	0,5	0,7*	0,2	0,7*	0,3	0,2
ЩК	189,9***	288,9***	0,0	1,1	3,1	12,9*	2,9	2,5
ДК	70,3***	2298,4***	59,6***	4,8	3,0	3,6	4,8	2,0
ДЦ	16,9	1646,8***	71,1***	1,6	1,7	10,7*	9,3***	1,7
ПК	9,0	291,3***	360,2***	15,5	28,4	16,0	4,7	11,6
ЧЗП	17038	143820***	929065***	22060	77953**	41234	7899	19808
МЗП	122,0***	5,3	733,6***	18,6	41,9	133,3**	8,2	19,9
ЧЗР	20998	118657*	1030981***	21732	91357**	35487	10215	21161
МЗР	175,2***	53,2	819,4***	19,6	57,6	131,2*	9,9	22,4
МТЗ	2094,4***	4759,7***	26,6	75,0	22,6	98,1	4,7	33,5

Примітки:

1. Лінія 313-1 виключена з дисперсійного комплексу.
2. Аббревіатура ознак, що і в табл. 1, 2.
3. * Вірогідно при $p \leq 0,05$; ** вірогідно при $p \leq 0,01$; *** вірогідно при $p \leq 0,001$

Завдяки високій взаємній корельованості ознак для ефективного розрізнення груп вихідних ліній і одержаних з них подвоєних гаплоїдів, в обидва роки дослідження виявилось достатньо однієї дискримінантної функції. Найбільш інформативні ознаки, за якими подвоєні гаплоїди відрізняються від вихідних форм – ДС, ДГК, ЧКК; менш інформативні – МЗК, ЧСК, продуктивна куцистість і її складова (ПК₁), а також ЧЗК, ЧЗП, МЗП (табл. 4). За озерненістю колоска і числом пагонів у другому ярусі лінії практично не дискримінувалися. До того ж інформативність ознак мінялась в залежності від лінії і покоління подвоєних гаплоїдів. Однак, якщо в лінії Од.3К75 (алельний склад за системою генів *Rht* – *Rht8c Rht-B1b*) вихідні форми і подвоєні гаплоїди чітко розрізняються (рис., а, табл. 5), то в лініях КК70 (*Rht8c Rht-B1e*), КК90 (*Rht8c Rht-B1a*) і Од.51 (*Rht8c Rht-B1a*) в даному просторі ознак повністю відокремити вихідні форми від подвоєних гаплоїдів не вдається. При значній внутрішньокласовій дисперсії відстань між класами занадто мала, хоч і статистично значима (рис. б, табл. 5).

Таблиця 4

Інформативність ознак для класифікації ліній на вихідні форми і подвоєні гаплоїди, $F_{\text{факт}}$.

Ознака	D_1 (2010 р.)				D_2 (2011 р.)			
	Од.51	КК90	КК70	Од.3К75	Од.51	КК90	КК70	Од.3К75
ПК ₁	0,0	0,0	0,9	3,0	2,6	1,5	0,0	0,1
ПК ₂	0,6	2,8	0,2	0,2	0,3	0,1	0,0	0,7
ПК	0,1	0,6	0,0	0,0	6,6*	5,8*	0,2	0,5
ДС	1,9	6,0*	10,8**	10,6**	28,2***	6,5*	7,7**	11,3**
ДГК	2,4	17,1***	5,9*	27,8*	0,2	0,1	0,3	16,2***
ЧКК	5,4*	0,8	0,8	5,1*	2,5	0,0	0,0	27,7***
ЧСК	0,0	6,0*	22,3***	1,5	0,5	0,2	0,0	0,1
ЧЗК	0,9	0,5	0,1	6,5*	0,6	0,3	5,3*	0,0
ЧЗк	0,9	0,8	0,5	0,1	2,6	2,3	0,0	0,0
МЗК	0,0	1,6	0,1	5,3*	9,1**	0,8	0,0	8,4**
ЧЗП	0,0	0,0	0,6	0,0	3,0	8,1**	8,5**	0,2
МЗП	0,1	4,9*	9,1**	0,1	0,1	1,0	0,5	0,1

Примітки:

1. Рівень статистичної значимості: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.
2. Жирним шрифтом позначені значення ознак, що ввійшли в модель

Сказане підтверджує і аналіз класифікаційної матриці за постеріорними ймовірностями. Як видно (табл. 5), застосована модель добре класифікує рослини генотипу *Rht8c Rht-B1b* (Од.3К75). Однак інформації, наданої в даному наборі ознак, які традиційно вивчаються в селекційній практиці, виявилось недостатньо для надійного розрізнення рослин вихідних форм і одержаних з них подвоєних гаплоїдів з алелями *Rht8c Rht-B1a* і *Rht8c Rht-B1e* (табл. 5, рис., б), особливо в другу генерацію (D_2). Можливо, для успішного вивчення подвоєних гаплоїдів доцільно було б

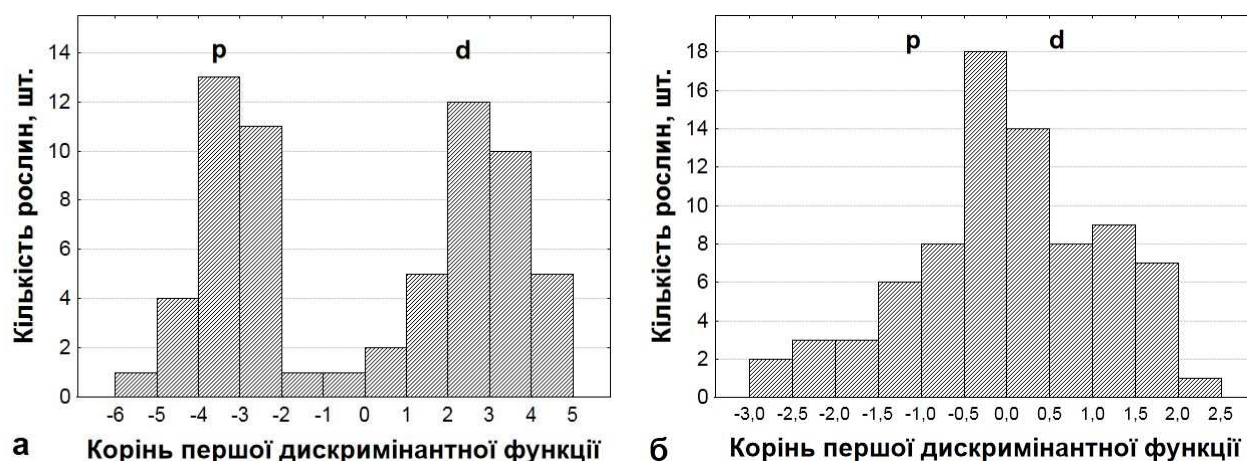


Рис. Розміщення на осі першої дискримінантної функції множини рослин вихідних форм (p) і дигаплоїдів (d):

а) Од.51K75, D_2 ; $Y=25,104+0,832*M3K-0,709*ЧКК-1,043*ДГК-0,081*ДС$;
 б) KK70, D_2 ; $Y=-2,985+0,152*ДС-0,064ЧЗП-0,069ЧЗК$

Таблиця 5

Відстані між центроїдами ліній (вихідні форми - подвоєні гаплоїди) – M^2
 та їх класифікація за постеріорними ймовірностями

Вихідна форма	D_1 (2010 р.)						D_2 (2011 р.)					
	M^2	вивчено рослин	ідентифіковано		%#	M^2	вивчено рослин	ідентифіковано		%#		
			<i>P</i>	<i>D</i>				<i>P</i>	<i>D</i>			
Од.51	4,1*	<i>P</i>	25	23	2	92,0	2,9**	<i>P</i>	26	18	8	69,2
		<i>D</i>	7	2	5	71,4		<i>D</i>	44	6	38	86,4
KK90	2,7**	<i>P</i>	41	32	9	78,0	1,1*	<i>P</i>	42	31	11	73,8
		<i>D</i>	29	7	22	75,9		<i>D</i>	37	12	25	67,6
KK70	4,4**	<i>P</i>	34	30	4	88,2	1,2**	<i>P</i>	33	19	14	57,6
		<i>D</i>	19	5	14	73,7		<i>D</i>	45	8	38	82,6
Од.3K75	26,3**	<i>P</i>	26	26	0	100	36,4**	<i>P</i>	31	31	0	100
		<i>D</i>	5	0	5	100		<i>D</i>	34	0	34	100

Примітки:

- * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$
- P* – вихідні форми, *D* – дигаплоїди;
- # частка правильно класифікованих рослин

залучати до аналізу й інші ознаки, які не мають особливого економічного значення. Іншими словами, застосована в даному дослідженні процедура лінійного дискримінантного аналізу доказала високий рівень значимості наслідків проведення матеріалу через культуру пиляків *in vitro* на комплекс ознак для всіх ліній. За виключенням лінії Од.3K75 означений вплив був сильнішим в D_1 , проте і в D_2 він залишався вірогідним, хоча частину рослин дигаплоїдів (до 42,4 %) уже не можна було відрізнити від рослин вихідної лінії.

На даному, вельми обмеженому матеріалі важко зробити конкретний висновок про джерело варіації комплексу досліджених ознак, яке маскує наслідки подвоєння гаплоїдизації. Одним із таких джерел може бути різноманіття подвоєних гаплоїдів, одержаних з однієї вихідної форми. Іншими – невіривненість фону вірусу жовтої карликовості ячменю, епіфітотії якого буяли в роки проведення досліджень, чи генотип ліній за *Rht* генами, взаємодія якого з наслідками андрогенезу проявляється неоднозначно, в залежності від комбінації цих генів, сили їх ефектів, а також селекційної цінності. Щодо останньої відомо [12], що генотип *Rht8c Rht-B1a Rht-D1a* детектується, переважно, у середньорослих сортів і ліній із задовільною урожайністю в несприятливих умовах. На високих агрофонах він істотно збільшує продуктивність озимої пшениці, так як підвищує щільність і продуктивність колоса, а також стійкість до вилягання [13]. При цьому не спостерігається будь-яких відмінностей від генотипів з іншими алелями гена *Rht8* за ПК, ЧЗК і МТЗ. Наразі доля районованих сортів з генотипом *Rht8c Rht-B1a Rht-D1a* в наборі сортів СГІ–НЦНС невелика [14]. Додавання алеля *Rht-B1b* до *Rht8c Rht-D1a* веде до деякого зменшення ВР і ПК, а також знижує МЗК і МТЗ, але сприяє підвищенню МЗП і МЗР в цілому [13]. Цей генотип характерний для 14,3 % сучасних сортів селекції СГІ [14]. Генотип *Rht8c Rht-B1e Rht-D1a* сильніше скорочує ДС, знижує стійкість до хвороб, показники продуктивності і якості зерна [12]. Він практично не зустрічається в асортименті сучасних сортів СГІ [12, 14].

Практичне застосування андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків обмежене ослабленістю регенерантів при адаптації до умов *ex vitro* та їх нащадків на перших етапах селекційного процесу. Особливо це стосується найбільш селекційно цінних генотипів *Rht8c Rht-B1b*. Причиною погіршення показників подвоєних гаплоїдів можуть бути віддалені наслідки чинників культури *in vitro*, як спадкові (гаметоклональна мінливість, відсутність гетерозигот в жодному локусі), так і епігенетичні (щуплість ендосперму, нестача поживних речовин). До того ж наслідком подвоєння хромосом у гаплоїдів могла бути гомозиготизація негативних рецесивних мутацій, які протягом років підтримання ліній могли накопичуватись і знаходитись в гетерозиготному стані. Отже, вибраківку ліній - подвоєних гаплоїдів доцільно проводити лише після декількох років вирощування і ретельного вивчення в польових умовах.

Таким чином, в результаті проведення матеріалу через культуру ізольованих пиляків *in vitro*, отримані форми цікаві для подальшого дослідження. Завдяки максимально високому рівню гомозиготності, подвоєні гаплоїди можуть бути використані в генетичних і молекулярно-генетичних дослідженнях в якості чистих ліній. Зокрема, лінія 418-1/К (дигаплоїд Одеської 51) з високим рівнем експресії морфологічних кількісних ознак і елементів продуктивності – в якості рекурентної форми; лінія 313-1/К, яка на відміну від вихідної лінії Кооператорка К-90, очевидно, має два гени карликовості, один з яких *Rht8c*; подвоєна гаплоїдна лінія з Одеської 3

К-75 (311-1), яка припустимо, має генотип, відмінний від генотипу вихідної лінії. Виконане дослідження дає можливість прогнозувати появу бажаних або небажаних фенотипів в популяціях подвоєних гаплоїдів, одержаних із вивчених ліній та гібридів за їх участю, і, таким чином, підвищувати ефективність селекційно-генетичної роботи.

Висновки.

1. Одержання подвоєних гаплоїдів шляхом андрогенезу в культурі *in vitro* неоднозначно змінює прояв більшості кількісних ознак і елементів продуктивності озимої пшениці. В цілому, означений вплив негативний, але залежить від генотипу ліній за генами короткостебловості і більш суттєвий в перший рік після культури. Потомство подвоєних гаплоїдів з двома генами короткостебловості (*Rht8c Rht-B1e* і особливо *Rht8c Rht-B1b*) характеризувалось довшим періодом до колосіння і поступалося вихідним формам за продуктивною кущистістю, довжиною стебла і головного колоса, числом фертильних колосків в колосі та іншими елементами продуктивності в обидва роки польових досліджень, а з одним геном (*Rht8c*) – лише в перший. Не спостерігається впливу наслідків андрогенезу на варіацію МТЗ, яка залежить виключно від генотипу лінії або умов року.

2. Лінії - подвоєні гаплоїди, одержані з однієї вихідної форми, різняться між собою за більшістю вивчених ознак. Як правило, означені відмінності невірогідні стосовно кожної ознаки окремо, але достовірно диференціюють лінії за їх сукупністю. У деяких подвоєних гаплоїдів з одним геном короткостебловості спостерігалось навіть посилення окремих ознак порівняно з вихідними формами.

3. Мінливість ознак у подвоєних гаплоїдів з одним геном короткостебловості (*Rht8c*) характеризується сортоспецифічністю. Напрямки змін ознак, за винятком продуктивної кущистості, довжини і продуктивності головного колоса у подвоєних гаплоїдів, отриманих з сорту Одеська 51, полягають у тенденції перевершувати донорний сорт в другу генерацію; у подвоєних гаплоїдів, отриманих з лінії Кооператорка К-90, навпаки, поступатися їй за ознаками продуктивності підгонів і перевершувати за довжиною і продуктивністю головного колоса в першу генерацію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений. Методические рекомендации. – Одесса: ВСГИ, 1980. – 21 с.
2. Dobrovolskaya O., Pshenichnikova T.A., Arbutova V.S., Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the *Triticeae* // *Euphytica*. – 2007. – Vol. 155. – P. 285-293.

3. Kulbida M., Chebotar G., Motsnyy I., Chebotar S. Evaluation of wheat analogue-lines differing by alleles *Rht8*, *Rht-B1*, *Rht-D1*, *Ppd-D1* by quantitative traits // European Cereals Genetic Cooperative Newsletter. Proceedings of the 15th International EWAC Conference Abstracts (7-8 November, 2011). – 2012. – P. 144-146.
4. Хангильдин В.В. Создание аналогов старых селекционных сортов как метод консервации генов адаптивности для использования в селекции // Мат. II совещания «Изогенные линии и генетические коллекции». – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993. – 194 с.
5. Чеботарь Г.А., Чеботарь С.В., Моцный И.И. и др. Молекулярно-генетический анализ линий-аналогов мягкой пшеницы, различающихся по высоте растений // Вестник ОГУ. – 2009. – Т. 14, вып. 8. – С. 61-71.
6. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Шестопап О.Л. та ін. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації. Півден. біотехнолог. центр в рослинництві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
7. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Ук-раїнського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 52-57.
8. Чеботар Г.О., Моцний І.І., Чеботар С.В., Сиволап Ю.М. Вплив алелів генів короткостебловості та гена *Ppd-D1* на агрономічні ознаки м'якої пшениці // Збірник СГІ–НЦНС. – 2010. – Вип. 16 (56). – С. 148–160.
9. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшейш. школа, 1973. – 319 с.
10. Кульбіда М.П., Моцний І.І., Коваль Т.М. Аналіз розподілу гібридів м'якої пшениці з амфіплоїдами за показниками якості зерна при оптимальному рівні азотного живлення // Зб. наук. праць СГІ–НАЦ НАІС. – 2003. – Вип. 4 (44). – С. 27-41.
11. Замбриборщ І.С., Добрава А.А., Лобанова Е.І., Моцний І.І., Бойко М.С., Чеботарь Г.А. Отзывчивость линий гексаплоидной пшеницы с *Rht* генами к андрогенезу и влияние условий получения удвоенных гаплоидов на полевые характеристики регенерантов // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: междунар. конф., посв. 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, 19-22 июня 2012 г.: материалы. – Минск, 2012. – Часть 2. – С. 303-307.
12. Чеботарь С.В., Борнер А., Сиволап Ю.М. Анализ короткостебельности в генотипах сортов мягкой пшеницы Украины // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, №4. – С. 12-23.
13. Нефедов А.В. Прогресс селекции озимой пшеницы на Юге Украины // Научн.-техн. бюл. СГИ.– Одесса, 1991. – № 1 (78). – С. 13-15.

14. Чеботар Г.О. Алелі генів короткостебловості *Rht8*, *Rht-B1*, *Rht-D1*, нечутливості до фотоперіоду *Ppd-D1* м'якої пшениці та їх ефекти на агрономічні ознаки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15 / Г.О. Чеботар; СГІ–НЦНС. – Одеса, 2012. – 20 с.

Надійшла 16.01.2013 р.