

СЕЛЕКЦІЯ ТА НАСІННИЦТВО

УДК 575.113:575.015.3:633.11

М. А. ЛИТВИНЕНКО, д. с.-г. наук, акад. НААН, зав. від.
СГІ– НЦНС, Одеса
e-mail: dr_litvin@ukr.net

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ У СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

Обговорено стан, проблеми і напрями застосування біотехнологічних молекулярно-генетичних методів у селекції сільськогосподарських культур в Україні. Включення цих методів у селекційний процес може підвищити ефективність селекційної роботи.

Ключові слова: селекція, с.-г. культури, молекулярні маркери, новий етап в селекції.

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

При внутрішньовидовій і віддаленій гібридизації найбільш складними обмежувальними факторами в селекції є: передача бажаних генів водночас з небажаними; введення одного цінного гена супроводжується втраченою іншого; зчеплення генів ускладнює можливості відокремлення позитивних ознак від шкідливих. Тому основним завданням, яке стоїть перед селекціонером, є поєднання в одному генотипі якомога більшої кількості цінних ознак і властивостей.

У пошуку сортоутворюючих рекомбінантів селекціонер вивчає матеріал у великих обсягах (десятки тисяч номерів), досягаючи гомозиготності (однорідності) багаторазовим пересівом гібридів, створюючи відповідні фони добору. Керування спадковістю та добір за генотипом здійснюються у вузькообмежених рамках, а індукція нових генів з застосуванням фізичних та хімічних мутагенних факторів взагалі є некерованим процесом. Більшість експериментальних мутацій є наслідком складних хромосомних перебудов, які викликають зниження життєздатності рослин і їхньої генетичної стабільності. Надзвичайно рідко виникають

позитивні мутації. Як правило вони супроводжуються плейотропними ефектами негативних спадкових змін. Розірвати цей зв'язок надзвичайно складно.

Але за допомогою сучасної біотехнології багато з цих питань вже вирішуються. Сучасна біотехнологія базується на методах генної (генетичної) інженерії, які дозволяють передавати один або кілька генів від одного генотипу до іншого, причому донор і реципієнт не обов'язково мають бути одного виду чи токсона. Це різко збільшує різноманіття за певними ознаками, прискорює процес отримання рослин із бажаними, програмованими властивостями, а також, що особливо важливо, забезпечує можливість відслідковувати генетичні зміни і їхні наслідки.

У міжнародному плані біотехнологічні молекулярно-генетичні дослідження відносяться до пріоритетних областей біологічної і сільськогосподарської науки. У розвинутих країнах та провідних фірмах для ведення цих досліджень створені спеціалізовані біотехнологічні центри, на роботу яких виділяють величезні кошти, що й забезпечує уже значні результати. В Україні біотехнологічні і молекулярно-генетичні дослідження ведуться в інститутах біологічного профілю, переважно на рівні розробки теоретичних завдань, тобто без суттєвого практичного впровадження їх у селекцію сільськогосподарських культур. І лише з 1968 року, із створенням у Селекційно-генетичному інституті першої на теренах колишнього Радянського Союзу спеціалізованої лабораторії генної інженерії, сталися значні зміни. Організатором і керівником нової лабораторії став молодий вчений (після однорічного стажування в США) Юрій Михайлович Сиволап. Більше 40 років ця Людина, Вчений з великої літери, віддав розвитку молекулярної генетики в Україні. Він особисто і його колектив з величезним ентузіазмом і наполегливістю проводили глибокі дослідження геномів сільськогосподарських культур на молекулярному рівні, створивши основу для використання молекулярно-генетичних методів у селекції [1]. Як фундатор цього напрямку науки, академік НААН Ю. М. Сиволап зробив величезний внесок у становлення системи молекулярно-генетичних досліджень у наукових установах НААН.

Основна частина. Найбільш перспективним напрямом, який бурливо розвивається у багатьох відомих наукових установах і фірмах світу, — це розробка біотехнологій з отримання генетично модифікованих рослин (ГМ-рослин). Доступна інформація свідчить, що ці технології дозволяють створювати сорти і гібриди сільськогосподарських культур із принципово новими спадковими ознаками, які кардинально змінюють господарсько-біологічний потенціал с.-г. культур. У поєднанні з спеціально розробленими технологіями вирощування це забезпечує значне підвищення продуктивності, якості продукції та стійкості до факторів довкілля. На сьогодні у світі створені і доведені до випробувань у польових умовах ГМ-форми с.-г. рослин, які відносяться до більш як 50 видів. Так,

отримані трансгенні форми томатів (понад 260), сої (>200), бавовнику (>150), гарбузових (>80), тютюну (>80), а також пшениці, рису, соняшнику, огірків, салату, яблунь та інших фруктових дерев (>70). Крупномасштабне промислове виробництво ГМ-рослин розпочалося у 1996 році, на той час у світі трансгенними культурами було засіяно 1,7 млн га. За період з 1996 по 2014 рік площі, зайняті трансгенами, зросли у 75 разів і досягли 130 млн га [1].

Країни і фірми, які успішно реалізують програми біотехнологічних досліджень з отримання ГМ-сортів (гібридів) с.-г. культур, стають лідерами у виробництві окремих видів с.-г. продукції, зокрема — кукурудзи, сої, бавовнику, картоплі. В числі восьми країн, де під посівами одержаних біотехнологічними методами культур були найбільші площі, знаходяться: США (49,8 млн га), Аргентина (17,1 млн га), Бразилія (9,4 млн га), Канада (5,8 млн га), Китай (3,3 млн га), Парагвай (1,8 млн га), Індія (1,3 млн га), Південно-Африканська республіка (0,5 млн га). У відомих наукових виданнях та на міжнародних симпозиумах у переважній більшості робіт біологічного напрямку подається інформація з молекулярної біології та біотехнології. Абсолютно очевидно, що країни, які не займаються розробкою цих напрямів, поступово відставатимуть і врешті-решт залишаться за порогом світового прогресу.

На жаль, в Україні, крім розмов і дискусій стосовно того, займатись чи не займатись дослідженнями з біотехнології і отримання ГМ-рослин діло вперед майже не просувається. Малоімовірно, що будуть успішними також спроби використати ГМ-конструкції зарубіжних фірм, адже вони створюються з певним рівнем адаптації до конкретних умов вирощування. Індукція ГМ-конструкцій із заданими цінними ознаками і введення їх у місцевий генофонд с.-г. культур є винятково актуальним завданням біотехнологічних досліджень. У розвитку цього напрямку найбільш зацікавлені вітчизняні селекціонери. Адже по кожній культурі, з якою не велась би селекційна робота, найважливішою і дедалі гострішою стає проблема створення саме оригінальних генетичних джерел господарсько і біологічно цінних ознак. В той час, коли йдуть розмови про медичні наслідки використання с.-г. продукції з ГМ-сортів та ще й за відсутності законодавчої бази, насіння трансгенних сортів сої, кукурудзи, картоплі нелегально потрапляють на ринок України і безконтрольно впроваджуються у виробництво.

Останніми роками з'являються обнадійливі результати досліджень вітчизняних вчених з створення вихідного матеріалу для селекції ріпаку ярого і озимого, буряку цукрового, кукурудзи і соняшнику шляхом апробації агробактеріальної трансформації *in planta* [2, 3].

Дослідження з розробки біотехнологій отримання ГМ-рослин надто затратні, вони потребують спеціального обладнання і належної підготовки фахівців. Це і є тією основною проблемою, яка стримує розвиток перспективного напрямку. У цьому можна переконатися навіть з побіжного

огляду використання бюджетних коштів країни. При створенні і відповідному законодавчому затвердженні програми досліджень з сільськогосподарської біотехнології можна було б забезпечити хоча б один рослинницький біотехнологічний центр усім необхідним. Проте й цього не спостерігається.

Не можна не погодитись з пропозицією, яка інколи висловлюється в порядку дискусії, про перерозподіл незначних бюджетних коштів, які виділяються на селекцію сільськогосподарських культур, і спрямувати частину з них на біотехнологічні дослідження. На жаль, при відсутності чітких механізмів реалізації вітчизняного законодавства з охорони прав на сорти рослин, на даному етапі селекція сільськогосподарських культур в Україні не може розвиватись на самофінансуванні. Отож згортання бюджетного фінансування селекційних досліджень призведе до їх призупинення, а в ряді випадків — й до повної руйнації. Недопустима втрата країною провідних світових позицій в селекції озимої пшениці, озимого і ярого ячменю та інших культур. Результат неважко передбачити — експансія на нашу територію зарубіжних сортів. Та і наймовірно, що вивільнені описаним вище чином кошти будуть достатніми для ефективних біотехнологічних досліджень. А поки що країна втрачає підготовлених молодих фахівців, які могли б займатись біотехнологічними дослідженнями — вони виїждять за кордон і успішно працюють у провідних наукових установах США, Канади, Франції, Англії та інших країн.

Із того фінансування, яке виділяється в системі НААН на біотехнологічні дослідження в рослинництві, сьогодні є доступними і найбільш ефективними роботи з використання молекулярних маркерів у селекції. Адже, якщо поглянути на сучасні світові селекційно-генетичні дослідження, то основу їх складають пошуки молекулярних маркерів цінних ознак [1]. Відділ загальної і молекулярної генетики

СГІ–НЦНС за рівнем забезпечення устаткуванням, освоєнням сучасних методик, підготовкою фахівців може ефективно виконувати такого напрямку дослідження. У цьому відділі спільно із науковцями СГІ здійснено ряд досліджень з маркування генів типу розвитку — *Vrn*, потреби в яровизації — *Vrd*, фотоперіодичної чутливості — *Rpd*, стійкості до хвороб та інших важливих генетичних систем у озимої м'якої і твердої пшениці, ячменю, кукурудзи та інших культур.

Для проведення таких досліджень треба перш за все чітко визначитись із вибором тих ознак, які селекціонер не в змозі контролювати традиційними і відносно дешевими методами. Крім того, для розробки молекулярних маркерів цих ознак повинні передувати великі багаторічні генетичні дослідження традиційними методами гібридологічного чи цитологічного аналізу та створення спеціального матеріалу ізогенних, абсолютно гомозиготних дигапloidів чи гібридно-інбредних ліній, що відрізняються за певними ознаками. Слід також мати на увазі, що молекулярні маркери працюють тільки на окремих генетичних пулах.

Але при їх відпрацюванні відкривається можливість селекціонеру науково обґрунтовано підбирати батьківські форми для гібридизації, комбінувати цінні ознаки і властивості з позитивним генетичним ефектом збільшення їх експресії, вести ефективно добір бажаних генотипів, зменшуючи до певного розрахункового оптимального об'єму опрацювання селекційного матеріалу, цілеспрямовано збагачувати цінними генами гібридні популяції і т. д. Тобто, ця робота має комплексний характер і може виконуватись за участі селекціонерів, класичних генетиків та спеціалістів з молекулярної генетики.

Прикладом такого комплексного дослідження може бути робота, яка виконується у відділі селекції і насінництва пшениці СГ–НЦНС з вивчення селекційної цінності пшенично-житніх транслокацій 1AL/1RS, 1BL/1RS та інших чужорідних включень у геном пшениці [4].

З застосуванням методу культури пиляків для індукції подвоєних гаплоїдів (лабораторія культури тканин) та ідентифікації транслокацій з допомогою молекулярних маркерів (відділ загальної і молекулярної генетики) удосконалено технологію селекційного процесу в напрямі скорочення терміну створення нових сортів на 4–5 років та підвищення ефективності селекційної роботи з генотипами, які несуть чужорідні включення, на 20–30 %. За цією технологією уже створено і передано на державне сортовипробування чотири сорти пшениці м'якої озимої універсального типу: Житниця одеська, Дума одеська, Октава одеська, Ліга одеська — з високим рівнем урожайності (8,6–10,4 т/га), цінні і сильні за якістю зерна і добре вираженими ознаками стійкості до біотичних та абіотичних факторів.

Використання біотехнологічних методів і молекулярних маркерів у селекції сільськогосподарських культур найбільш доцільно в тих випадках, коли виникає необхідність швидкого залучення в генофонд селекційного матеріалу нових генів чи генетичних систем.

Слід застерегти, що застосування молекулярних маркерів ні в якому разі не замінює традиційних методів селекції, а тільки доповнює селекційний процес наукоємними методами контролю генотипів за певними ознаками. Через досить високу вартість молекулярно-генетичні методи неможливо впроваджувати в увесь великий об'єм селекційного матеріалу. Тому не слід допускати некомпетентних заяв, що молекулярні методи здатні в сотні разів скоротити об'єми селекційної роботи і одночасно підвищити її ефективність.

Окремо виникає питання з приводу доцільності паспортизації сортів, ліній, генетичного і селекційного матеріалу методами молекулярної генетики [1]. Кілька років поспіль питання застосування цих методів у системі ідентифікацій сортів обговорювалось у міжнародній Європейській організації з захисту прав на сорти рослин (UPOV). Але й досі позитивного рішення з цього питання не прийнято. Основні аргументи: висока вартість аналізів, не всі члени UPOV їх можуть виконувати, а також наявність

достатньої кількості уже прийнятих морфологічних ознак та біохімічних маркерів для визначення основних принципів захисту прав на селекційні досягнення — однорідність, відмінність, стабільність.

Тому необхідність паспортизації сортів існує на державному рівні під керівництвом Інституту експертизи сортів рослин України. Щоправда, у цьому плані, перш за все, треба досягти такої ситуації, щоб сорти, які заносяться до Державного реєстру, відповідали вимогам однорідності. Оскільки більша частина сортів самозапильованих культур є гетерогенними, тобто складаються вони з двох і більше біотипів, то паспортизація з допомогою молекулярних формул залишається проблематичною [5]. Водночас необхідність її проведення стає дедалі актуальнішою, перш за все потреби дотримання законів про захист прав на сорти, насіння і садивний матеріал. Адже на вітчизняному ринку сортів і насіння виявляється велика кількість порушників цих законів. І у цьому зв'язку найбільш вагомими доказовими аргументами, які можуть належно захистити інтелектуальну власність селекціонерів, мають стати генетичні формули генотипів, визначені методами молекулярної генетики. Отже, паспортизація сортів самозапильованих культур і батьківських ліній гібридів перехреснозапильованих культур — стає надактуальним завданням.

Впровадження паспортизації сортів стримується також невизначеністю фінансування цих досліджень. Вітчизняні приватні селекційні установи, безумовно, виконуватимуть вимоги Інституту експертизи сортів рослин України й оплатять молекулярно-генетичну ідентифікацію сортів (ліній), але невідомо, як поставляться до цього зарубіжні фірми, які керуються в своїй діяльності вимогами UPOV. Паспортизацію сортів державних наукових установ, на наш погляд, доцільно профінансувати за рахунок спеціальних бюджетних коштів.

У вітчизняних селекційних установах паспортизації на рівні ДНК-технологій мають підлягати, крім комерційних сортів, також експериментально створені генотипи з винятково оригінальними ознаками, що мають високу наукову чи комерційну цінність. Результати можуть скласти державну базу даних генофонду сільськогосподарських культур, яку завжди можна використати для вирішення наукових, правових, господарських завдань та проблем судової експертизи.

Заслуговує на увагу, з точки зору використання в селекції, ще один напрям біотехнологічних досліджень — отримання генетичних регенерацій у культурі *in vitro* пиляків, клітин, зародків та індукцій гаплоїдів і дигаплоїдів. Світовий досвід досліджень із зерновими культурами викристалізував найбільш ефективні з них: культура зародків переважно при інтрогресивній селекції, для отримання життєздатних гібридів від віддалених схрещувань — отримання первинних тритикале та індукція соматоклональних варіантів; суспензійна культура і створення селективних середовищ для добору на рівні клітин за ознаками стійкості до окремих токсинів — збудників фітозахворювань; гаплопродукція і отримання

дигаплоїдів з метою швидкої гомозиготації та прискорення селекційного процесу [6].

На кожному із цих напрямів уже є певні практичні результати в багатьох наукових установах України і за кордоном. Найбільш вагомі досягнення отримали там, де розроблені біотехнологічні методики теоретичних лабораторій переносяться на потік масового застосування в селекційні підрозділи. Для цього створюються групи фахівців-біотехнологів, які добре володіють методиками, працюють безпосередньо з селекційним матеріалом спільно з керівником програми. Наприклад, в Інституті с.-г. досліджень Угорської Академії наук (м. Мартонвашар) така група спеціалістів у відділі селекції пшениці уже багато років поспіль на працює селекційний матеріал методами індукції андрогенних дигаплоїдів у культурі пиляків у такій же кількості (2,5–3,0 тис. дигаплоїдів щорічно), як і традиційними методами. Результативність селекції з використанням біотехнологічних методів при цьому в 1,5 рази вища, ніж при традиційній селекції, а створення нового сорту в часі скорочується з 8–10 до 5–6 років.

Наш уже давній досвід співпраці ще з лабораторією біотехнології СГІ з використанням тоталітентності мікроспор в культурі пиляків для отримання дигаплоїдів озимої м'якої пшениці дав позитивний результат. Нами (С. О. Ігнатова, М. А. Литвиненко) було ідентифіковано генотипи пшениці з підвищеною здатністю до гаплопродукції, на їхній основі щорічно індукувалось на культурі пиляків із гібридів F_1 250–300 дигаплоїдів. Навіть за цих невеликих об'ємів отримання дигаплоїдів було напрацьовано цінний вихідний матеріал для селекції з адаптованою екзотичною геноплазмою. З використанням ліній дигаплоїдного походження — Еритроспермум 1083 та Еритроспермум 2783 у гібридизації з місцевими сортами створені і вже занесені до Державного реєстру: сорт озимої м'якої пшениці Знахідка одеська з унікальним поєднанням ультраскоростиглості, високої продуктивності та зимостійкості; сорт Сирена одеська, який при генетичному потенціалі врожайності понад 100 ц/га вирізняється витривалістю до низьких агрофонів та особливо дефіциту фосфору в ґрунті (фосфорефективний сорт); сорт Зорянка одеська, який не був занесений до Реєстру, але слугував батьківською формою в гібридизації при створенні сортів Заграва одеська, Заможність одеська. Позитивний практичний результат у селекції ярого ячменю з використанням біотехнологічних методів досягнуто і в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва.

При цьому треба реально оцінювати можливість методів культури *in vitro* і доцільність їх використання як додаткових до традиційних для вирішення певних задач:

1. Для прискорення адаптації нових генів у місцевому генофонді, генів, які контролюють цінні ознаки від віддалених схрещувань, екзотичної геноплазми. Селекційний процес при цьому скорочується завдяки прискореній гомозиготизації матеріалу (майже в 2 рази).

2. Підвищення ефективності добору на селективних середовищах, наприклад, на стійкість до токсинів фузаріозних і гельмінтоспориозних грибів.

Ці роботи можна було б розвивати в рамках комплексної біотехнологічної програми. Але матеріальні та фінансові можливості, якими володіють на сьогодні селекційні установи НААН, не дозволяють отримувати скільки-небудь раціональний об'єм дигаплоїдів для подальшої селекційної роботи.

Висновки. Дослідження з молекулярної генетики, розробки біотехнологічних методів необхідно розвивати з чіткою спрямованістю на вирішення конкретних наукових і практичних завдань у селекції рослин.

Розроблені в СГІ–НЦНС ефективні методи ДНК-технологій, культури *in vitro* знаходяться на доволі високому рівні, при відповідному фінансовому забезпеченні можуть бути впроваджені в селекційну насінницьку практику, а також застосованими при паспортизації генофонду сільськогосподарських культур.

Як приклад комплексного дослідження з ефективного використання біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів є робота відділу селекції і насінництва пшениці СГІ–НЦНС з вивчення та швидкого включення в генофонд селекційного матеріалу пшенично-житніх транслокацій та інших чужорідних включень.

Організація і забезпечення в Україні досліджень з розробки біотехнологічних методів отримання генетично модифікованих (ГМ) рослин є винятково необхідною умовою запобігання можливій науковій відсталості країни в подальшому генетичному удосконаленні сільськогосподарських культур.

Необхідні кардинальні зміни в плануванні, фінансуванні та проведенні досліджень з розробки новітніх біотехнологій у рослинництві на основі державної законодавчо затвердженої комплексної наукової програми.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сиволап Ю. М. Вариабильность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. — Одесса : Астропринт, 2011. — 336 с.
2. Богульська С. В. Апробація агробактеріальної трансформації форм озимого ріпаку методом *in planta* / С. В. Богульська // Агронія і біологія. — Суми, 2014. — Вип. 3, № 27. — С. 179–181.
3. Богульська С. В. Спосіб агробактеріальної трансформації рослин *in planta* / С. В. Богульська // Матеріали Міжнар. наук. конф. «Збагачення генетичного різноманіття рослин». — Харків, 2014. — С. 26–27.
4. Литвиненко М. А. Вплив трансформації 1AL/1RS на елементи продуктивності у популяціях F_2 та лініях F_4 пшениці м'якої озимої / М. А. Литвиненко, М. М. Топал // Зб. наук. пр. СГІ — НЦНС. — Одеса, 2013. — Вип. 22 (62). — С. 27–37.
5. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці за алельним складом Gli/Dlu-локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісник аграрної науки. — 2008. — С. 54–59.

6. Adien Pratar, Jitendra Kumar. Alien Gene Transfer in crop Plants Volume 1 (Innovations, Methods and Risk Assessment). — Springer. — 2014. — P. 311.

Надійшла 04.06.2015.

UDC 575.113:575.015.3:633.11

Lytvynenko M. A. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

OF BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR METHODS IN BREEDING OF AGRICULTURAL CROP IN UKRAINE

Most perspective approach of using biotechnological methods *in vitro* and molecular marker in breeding of agricultural crops are considered. The results of investigation for bread winter wheat breeding technology improvement by using double haploids method and molecular marker of wheat-rye translocation are represented. On the base of this technology four new universal type varieties of wheat has been created.

УДК 575.113:575.015.3:633.11

Литвиненко Н. А.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В УКРАИНЕ

Рассмотрены наиболее перспективные направления использования биотехнологических методов *in vitro* и молекулярных маркеров в селекции сельскохозяйственных культур. Представлены результаты исследований по усовершенствованию технологии селекционного процесса озимой мягкой пшеницы с использованием методов получения удвоенных гаплоидов и молекулярных маркеров пшенично-ржаных транслокаций. На этой основе создано четыре сорта пшеницы универсального типа — Житница одеська, Дума одеська, Октава одеська, Лига одеська.