

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 581.143.6:575.113.2:633.111.1:[633.11 + 633.14]

ЛАГУНОВСКАЯ
Елена Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* И ОТБОРА
СЕЛЕКЦИОННО ЦЕННЫХ ЛИНИЙ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ
ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) И ТРИТИКАЛЕ
(× *TRITICOSECALE* WITTM.)**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика

Минск, 2024

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Лемеш Валентина Александровна**
кандидат биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией прикладной геномики
Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Официальные
оппоненты: **Падутов Владимир Евгеньевич**
доктор биологических наук, профессор, член-
корреспондент НАН Беларуси, заведующий
научно-исследовательским отделом генетики,
селекции и биотехнологии Института леса НАН
Беларуси

Кабашникова Людмила Федоровна
доктор биологических наук, доцент, член-
корреспондент НАН Беларуси, заведующий
лабораторией прикладной биофизики и биохимии
Института биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси

Оппонирующая
организация: Государственное научное учреждение
«Центральный ботанический сад
НАН Беларуси»

Защита состоится 13 февраля 2025 г. в 10³⁰ часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

Тел.: (+375 17) 305-34-10, факс (+375 17) 378-19-17, e-mail:
O.Orlovskaya@igc.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Автореферат разослан « 10 » января 2025 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат биологических наук, доцент



О.А. Орловская

ВВЕДЕНИЕ

Использование методов культивирования клеток и тканей является перспективным подходом в селекции сельскохозяйственных растений. Создание линий удвоенных гаплоидов (ДН-линий) пшеницы и тритикале в культуре пыльников *in vitro* дает возможность получить новый селекционный материал и ускорить выведение сортов. Однако широкому применению культуры *in vitro* препятствует низкий выход растений-регенерантов и высокий процент хлорофилл-дефектных растений, не способных существовать вне культуральных сред [Weigt et al., 2019]. Основным фактором, определяющим способность к индуцированному андрогенезу в культуре пыльников *in vitro*, является генотип растения [Nielsen et al., 2015; Круглова, 2019]. Идентификация молекулярных маркеров, ассоциированных с эффективностью андрогенеза *in vitro* у пшеницы и тритикале, позволяет выделять способные к андрогенезу генотипы до введения их в культуру пыльников, что повышает эффективность метода и уменьшает трудозатраты на получение ДН-линий. В качестве высокоинформативных молекулярных маркеров могут быть использованы микросателлитные повторы, широко распространенные в растительных геномах [Merritt et al., 2015]. При создании удвоенных гаплоидов методом индуцированного андрогенеза *in vitro* особое внимание уделяется гомозиготности полученных линий, установить которую можно с использованием ISSR-анализа [Grozeva et al., 2021]. Применение ISSR-маркеров, равномерно распределенных по геному, позволяет одновременно определить изменчивость по большому количеству локусов и оценить гомозиготность исследуемых генотипов. Поиск и определение генетических маркеров, эффективно контролируемых хозяйственно ценные признаки, в традиционной селекции зерновых культур проводится путем отбора по фенотипу и требует значительных затрат времени и труда, а также большого количества семенного материала и не может быть выполнено на ранних стадиях селекционного процесса. Применение современных методов отбора, основанных на генотипировании ДН-линий по генам, контролирующим хозяйственно ценные признаки, с помощью технологии конкурентной аллель-специфичной ПЦР (KASP) [Khalid et al., 2019], позволяет быстро и надежно отбирать генотипы, несущие благоприятные аллели генов и, как следствие, перспективные для внедрения в селекционный процесс на ранних этапах селекции. Использование комплексного подхода, сочетающего применение биотехнологических и молекулярно-генетических методов, значительно ускорит получение нового селекционного материала для

выведения высокоурожайных, с улучшенным качеством зерна сортов пшеницы и тритикале.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа выполнялась в рамках исследований ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», подпрограмма «Геномика»: задание 2.04 «Идентификация генов и генетических систем, ассоциированных с высоким эмбрионным потенциалом пшеницы в культуре *in vitro*» (2011-2013 гг., № госрегистрации 20113484), задание 2.38 «Молекулярно-генетические и биотехнологические аспекты создания удвоенных гаплоидов тритикале и рапса» (2014-2015 гг., № госрегистрации 20141777); ГП «Научные технологии и техника» на 2016-2020 годы, подпрограмма «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 5 «Разработать биотехнологию гомозиготизации генома тритикале на основе андрогенеза *in vitro* и ДНК-маркирования и создать высокопродуктивный сорт» (2017-2019 гг., № госрегистрации 20171993); ГП «Научные технологии и техника» на 2021-2025 годы, подпрограмма «Инновационные биотехнологии», мероприятие 5 «Разработать методику генотипирования KASP и применить в селекции мягкой яровой пшеницы при создании нового сорта» (2021-2023 гг., № госрегистрации 20213643).

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг., отраженным в пункте 3.6 «Идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных» постановления Совета Министров Республики Беларусь № 585 от 19 апреля 2010 г.; приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг., отраженным в пункте 3 «Биологические системы и технологии» постановления Совета Министров Республики Беларусь № 190 от 12 марта 2015 г.; приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности Республики Беларусь на 2021-2025 гг., отраженным в пункте 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», утвержденных указом Президента Республики Беларусь № 156 от 7 мая 2020 г.

Цель исследования – выявление генетических локусов, ассоциированных с эффективностью андрогенеза *in vitro* у пшеницы и тритикале и молекулярно-генетический анализ полученных линий удвоенных гаплоидов по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести скрининг форм пшеницы и тритикале по способности к андрогенезу *in vitro* и выделить контрастные генотипы. Провести скрещивания отобранных контрастных родительских генотипов, создать расщепляющиеся по значениям параметров андрогенеза *in vitro* популяции F₂.

2. Изучить генетический полиморфизм микросателлитных локусов (SSR), локализованных на тех хромосомах, для которых показана связь со способностью к андрогенезу *in vitro*, у родительских генотипов. Выделить полиморфные локусы.

3. Проанализировать расщепление в поколении F₂ по значениям параметров андрогенеза *in vitro* и аллельному составу полиморфных SSR-локусов. Выявить локусы, ассоциированные с эффективностью андрогенеза *in vitro* у пшеницы и тритикале.

4. Выделить из полученных в культуре пыльников *in vitro* линий пшеницы и тритикале гомозиготные линии удвоенных гаплоидов с использованием ISSR-маркеров.

5. Генотипировать гомозиготные ДН-линии пшеницы и тритикале с помощью технологии KASP по генам, контролирующим хозяйственно ценные признаки (масса 1000 зерен, качественные характеристики зерна). Выделить генотипы, несущие максимальное число благоприятных аллелей исследуемых генов.

Объектом исследования служили линии удвоенных гаплоидов, созданные методом культуры пыльников *in vitro*, а также сорта и гибриды пшеницы и тритикале.

Предметом исследования являлся полиморфизм SSR- и ISSR-локусов, а также аллельный состав генов, ассоциированных с массой 1000 зерен и качественными характеристиками зерна у пшеницы и тритикале.

Научная новизна заключается в выявлении ДНК-маркеров, позволяющих прогнозировать эмбриогенный потенциал в культуре пыльников *in vitro*, а также хозяйственно ценные признаки у пшеницы и тритикале. Впервые осуществлен поиск молекулярных маркеров генов, детерминирующих высокую эффективность андрогенеза *in vitro*, с

использованием в качестве объектов скрещиваний гомозиготных ДН-линий пшеницы и тритикале, контрастных по признакам, характеризующим андрогенез *in vitro*. Идентифицированные ДНК-маркеры высокого эмбриогенного потенциала в культуре *in vitro* в популяциях гибридов F₂ дают возможность выявлять формы с высокой способностью к андрогенезу на ранних стадиях развития растений, до введения их в культуру пыльников. Дополнение метода андрогенеза *in vitro* эффективными приемами обнаружения и оценки желательных для селекционера генотипов с хозяйственно ценными признаками (продуктивность и качество зерна) с применением технологии KASP позволяет шире использовать его в селекции для создания нового исходного материала. Получение и введение в селекционный процесс ДН-линий, несущих набор благоприятных аллелей генов, ассоциированных с увеличением массы 1000 зерен, сниженной активностью ферментов, ухудшающих качество муки, и повышенным содержанием желтого пигмента в зерне, дает возможность сократить сроки получения новых высокоурожайных, с повышенным качеством зерна сортов пшеницы и тритикале.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наличие статистически значимой ассоциативной связи между эффективностью андрогенеза *in vitro* и аллельным составом микросателлитных локусов пшеницы *Xgwm371*, *Xgwm595* и тритикале *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540* свидетельствует о возможности использования данных локусов в качестве эффективных маркеров для выявления генотипов с высокой способностью к андрогенезу.

2. Использование 13 ISSR-маркеров для анализа однородности генетического материала линий пшеницы и тритикале, созданных методом индуцированного андрогенеза *in vitro*, дало возможность выявить 14 гомозиготных ДН-линий пшеницы (77,8%) и 24 ДН-линии тритикале (45,3%), что, с одной стороны, демонстрирует необходимость генетического контроля линий удвоенных гаплоидов, а с другой – позволяет выявлять исходный материал для ускорения селекционного процесса.

3. Применение разработанной методики KASP-генотипирования для скрининга гомозиготных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале по 10 генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, позволило выделить шесть ДН-линий пшеницы (ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(O)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12) и три ДН-линии тритикале (ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13) с максимальным количеством (пять) благоприятных аллелей генов, контролирующих массу 1000 зерен и качество зерна. Указанные генотипы являются новым селекционным

материалом для целенаправленного получения высокопродуктивных сортов пшеницы и тритикале с улучшенным качеством зерна.

Личный вклад соискателя ученой степени. Соискателем лично проведен поиск, анализ и систематизация научной литературы по теме диссертации, получены экспериментальные данные, выполнена их статистическая обработка. Соавторы указаны в публикациях. Интерпретация результатов и анализ данных проведены соискателем самостоятельно при консультации научного руководителя к.б.н., доцента В.А. Лемеш.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н., доценту Лемеш В.А., коллективу лаборатории прикладной геномики за поддержку при подготовке диссертационной работы, сотрудникам отдела зерновых колосовых культур РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» – академику Грибу С.И., заведующему отделом зерновых колосовых культур к.с.-х.н., доценту Буштевичу В.Н. за предоставленный селекционный материал и сотрудничество.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертации представлены на всероссийской молодежной научной школе «Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии» в рамках фестиваля науки (Уфа, 2012); международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Экологическая стабилизация аграрного производства. Научные аспекты решения проблемы» (Саратов, 2015); XIV Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Киев, 2019); научно-практической конференции «Стратегия и приоритеты развития земледелия и селекции в Беларуси. Достижения науки – производству» (Жодино, 2021); V Международной научно-практической конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития» (Пинск, 2021); V Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2022), Международной научной конференции «Настоящее и будущее биотехнологии растений» (Минск, 2023).

Образцы ДНК созданных ДН-линий пшеницы и тритикале, несущие благоприятные аллели генов, ассоциированных с признаком «масса 1000 зерен» и качественными характеристиками зерна, переданы в Республиканский Банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов (акты передачи от 16.12.2022; 23.12.2022; 14.12.2023). Линии пшеницы и тритикале, несущие комплекс благоприятных аллелей указанных генов, переданы в РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» для

испытания и использования в селекции (акты передачи от 11.12.2017; 11.03.2024). Данные по аллельному составу генов, ассоциированных с массой 1000 зерен и качеством зерна, включены в Государственный регистр информационных ресурсов (свидетельство № 1342336786 от 11.12.2023). Методика KASP-генотипирования по генам, контролирующим хозяйственно ценные признаки пшеницы, издана в виде методических рекомендаций и использована при создании сорта мягкой яровой пшеницы Инновация (выписка из протокола № 32 заседания Ученого совета РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» от 08.12.2023). Сорт передан в Государственное сортоиспытание Республики Беларусь (акт передачи от 12.12.2023).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ: 5 статей, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (4,0 авторских листа), 5 статей в сборниках научных трудов и материалов научных конференций, 3 тезисов докладов и 1 методические рекомендации (2,6 авторских листа).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 5 глав, заключения, списка использованных источников и 2 приложений. Общий объем диссертации составляет 161 страницу, содержит 16 рисунков, 30 таблиц. Библиографический список включает 281 источник, в том числе 229 на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

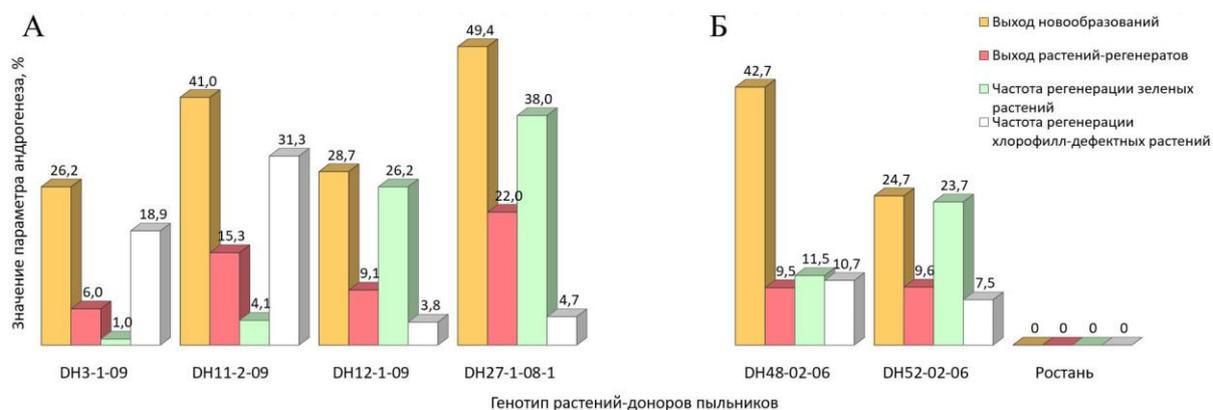
Материалом для исследований в культуре пыльников *in vitro* служили 18 генотипов пшеницы и 48 генотипов тритикале. Для оптимизации условий культивирования использовали питательные среды С-17 и MS с различными комбинациями фитогормонов: MSбн (6-БАП – 0,5 мг/л, НУК – 2,0 мг/л), С-17д (2,4-Д – 2,0 мг/л, кинетин – 0,5 мг/л), С-17и (ИУК – 2,0 мг/л, кинетин – 0,5 мг/л). Эффективность андрогенеза *in vitro* оценивали по параметрам «способность к эмбриогенезу», «способность к регенерации», «выход новообразований» (эмбриоидов и каллусов) и «выход растений-регенерантов» – процент от числа инокулированных пыльников; «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» – процент от числа полученных новообразований. Для обеих культур низким выходом новообразований считали значения 0-10,0%, высоким – более 10,0%; низким выходом растений-регенерантов – 0-2,0%,

высокими – более 2,0%; низкой частотой регенерации зеленых растений – 0-2,0%, высокой – более 2,0%. Низкой частотой регенерации хлорофилл-дефектных растений для пшеницы считали значения 0-5%, высокой – более 5%; для тритикале – 0-10,0% и более 10%, соответственно. Для выявления полиморфных SSR-локусов у генотипов пшеницы и тритикале использовали праймеры к 35 SSR-локусам, расположенным на хромосомах 2А, 2В, 5А, 5В. Гомозиготность полученных ДН-линий определяли с помощью 13 праймеров к ISSR-локусам. Оценку аллельного состояния генов, ассоциированных с признаком «масса 1000 зерен» и качеством зерна, выполняли с помощью технологии KASP с использованием 10 KASP-праймеров. Статистическую оценку проводили с использованием программ Microsoft Excel, GenAIEx v.6.5 и SPSS v.20.0.

Подбор контрастных по эффективности андрогенеза *in vitro* генотипов тритикале и пшеницы для создания расщепляющихся популяций F₂

В результате анализа влияния условий выращивания растений-доноров пыльников, типа индукционной питательной среды и типа фитогормонов показано, что наиболее эффективным является выращивание растений-доноров пыльников в полевых условиях и использование культуральной среды С-17, дополненной 2,4-Д (2,0 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л).

Для подбора родительских пар для скрещивания 23 генотипа тритикале и 14 генотипов пшеницы были введены в культуру пыльников *in vitro*, оценен их эмбриогенный потенциал и отобраны генотипы, в наибольшей степени различающиеся по значениям параметров андрогенеза *in vitro*: четыре ДН-линии тритикале (ДН3-1-09, ДН11-2-09, ДН12-1-09, ДН27-1-08-1 и две ДН-линии (ДН48-02-06, ДН52-02-06) и 1 сорт (Ростань) пшеницы (рисунок 1).



А – гексаплоидное тритикале; Б – мягкая пшеница

Рисунок 1 – Генотипы, контрастные по показателям эффективности андрогенеза *in vitro*

В результате скрещиваний родительских генотипов создано по 4 популяции F₂ тритикале (ДН3-1-09 × ДН27-1-08-1, ДН27-1-08-1 × ДН3-1-09,

DH11-2-09 × DH12-1-09, DH12-1-09 × DH11-2-09) и пшеницы (DH48-02-06 × Ростань, DH52-02-06 × Ростань, Ростань × DH48-02-06, Ростань × DH52-02-06).

Идентификация SSR-локусов, ассоциированных с высоким эмбриогенным потенциалом у пшеницы и тритикале в культуре пыльников *in vitro*

Для выявления SSR-локусов и аллелей, ассоциированных со способностью к андрогенезу *in vitro*, у родительских генотипов пшеницы и тритикале, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, проанализирован полиморфизм 20 SSR-локусов (для пшеницы) и 35 SSR-локусов (для тритикале), расположенных на хромосомах 2A, 2B, 5A, 5B, для которых показана ассоциативная связь с процессами андрогенеза *in vitro*. Установлен полиморфизм по 3 SSR-локусам пшеницы и 5 SSR-локусам тритикале (таблица 1).

Таблица 1 – Полиморфизм по SSR-локусам у родительских генотипов пшеницы и тритикале, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*

Генотип	Культура	Полиморфизм микросателлитных локусов, п.н.						
		<i>Xgwm291</i>	<i>Xgwm371</i>	<i>Xgwm595</i>	<i>Xgwm312</i>	<i>Xbarc318</i>	<i>Xgwm156</i>	<i>Xgwm540</i>
Ростань	пшеница	168	185	182	–	–	–	–
DH48-02-06	пшеница	140	169	182;146	–	–	–	–
DH52-02-06	пшеница	140	169	182; 140	–	–	–	–
DH3-1-09	тритикале	146	–	–	195	290	290	121
DH11-2-09	тритикале	170	–	–	195	290	287	132
DH12-1-09	тритикале	170	–	–	195	260	287	121
DH27-1-08-1	тритикале	146	–	–	195, 219	290	310	121

Полиморфные микросателлитные локусы использовали для поиска взаимосвязи между аллельным составом SSR-локусов и способностью к андрогенезу *in vitro* у индивидуальных растений F₂.

Для оценки эмбриогенного потенциала получали культуру пыльников на основе растений F₂ из восьми полученных популяций. Проанализировано 95 растений пшеницы и 192 растения тритикале. Все гибридные популяции проявили способность к эмбриогенезу и регенерации растений *in vitro*, при этом в каждой популяции присутствовали как способные, так и неспособные к андрогенезу *in vitro* индивидуальные растения. Значение параметра «выход новообразований» варьировало от 0% до 84,62% у пшеницы и от 0% до 93,82% у тритикале; параметра «выход растений-регенерантов» – от 0 до 23,81% у пшеницы и от 0% до 12,50% у тритикале; параметра «частота регенерации зеленых растений» – от 0% до 83,33% у пшеницы и от 0 до 37,50% у тритикале; параметра «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» – от 0 до 42,86% у пшеницы и от 0% до 38,46% у тритикале.

Эффективность андрогенеза *in vitro* зависит от трех основных этапов: частоты образования эмбриоидов, способности эмбриоидов к регенерации и

частоты образования зеленых растений-регенерантов. С помощью анализа молекулярной дисперсии выявлены SSR-локусы пшеницы и тритикале, ассоциированные со способностью к андрогенезу *in vitro*: SSR-локусы пшеницы *Xgwm371* ($p=0,030$) и *Xgwm595* ($p=0,024$) вносят статистически значимый вклад в изменчивость параметра «способность к эмбриогенезу», а также параметра «выход новообразований» (локус *Xgwm371*; $p=0,026$). SSR-локусы тритикале *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540* (значения уровня значимости p варьировали от 0,001 до 0,007) вносят значимый вклад в изменчивость параметра андрогенеза «частота регенерации зеленых растений».

Для установления связи между комбинациями аллелей SSR-локусов и способностью к андрогенезу *in vitro* у пшеницы и тритикале строили таблицы сопряженности и анализировали модели распределения аллелей, показывающие, с какой частотой определенные комбинации аллелей встречаются у генотипов в группах с низким или высоким значением определенного параметра андрогенеза и рассчитывали χ^2 Пирсона. Сравнивали три основные модели распределения аллелей. Модель 1: гомозигота 1 или гомозигота 2 или гетерозигота. Модель 2: гомозигота 1 или гомозигота 2 + гетерозигота. Модель 3: гомозигота 1 + гетерозигота или гомозигота 2. При отсутствии гетерозигот (локус *Xgwm291* тритикале), рассматривали модель с двумя гомозиготами. Если локус имел более двух аллелей (локус *Xgwm156* тритикале), рассматривали дополнительные варианты комбинаций аллелей.

У индивидуальных растений F_2 пшеницы выявлены статистически значимые различия по частоте встречаемости определенных аллельных комбинаций локуса *Xgwm371* между группами генотипов с низким и высоким выходом новообразований. Аллель 169 п.н. локуса *Xgwm371* в гомозиготном состоянии ассоциирован с высоким (>10,0%) выходом новообразований. Присутствие аллеля 185 п.н. приводит к уменьшению количества растений с высоким выходом новообразований на 26,9% ($\chi^2=5,889$; $p=0,025$).

Для индивидуальных растений F_2 тритикале выявлена значимая связь между аллельным состоянием SSR-локусов *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540* и параметром андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» (таблица 2). Установлено, что аллель 219 п.н. локуса *Xgwm312* тритикале ассоциирован с высокой частотой формирования зеленых растений в культуре пыльников *in vitro*: при наличии данного аллеля в гомозиготном состоянии количество растений в группе с высокой частотой регенерации зеленых растений, увеличивалось с 2,3% до 13,1%.

Для остальных исследованных локусов также определены аллели, статистически значимо ассоциированные с высокой частотой регенерации зеленых растений: 290 п.н. (*Xbarc318*), 146 п.н. (*Xgwm291*), 310 п.н. (*Xgwm156*) и 121 п.н. (*Xgwm540*). Аллели 260 п.н. (*Xbarc318*), 170 п.н. (*Xgwm291*), 287 п.н. (*Xgwm156*), 132 п.н. (*Xgwm540*) выявлены только у генотипов тритикале с низкой частотой формирования зеленых растений.

Локусы, ассоциированные с частотой регенерации зеленых растений у тритикале, также были ассоциированы с частотой регенерации хлорофилл-дефектных растений. Это может быть обусловлено тем, что на формирование хлорофилл-дефектных растений, помимо генотипа, значительное влияние оказывают внешние факторы: длительность холодной предобработки, размер и возраст пересаживаемых эмбриогенных структур и т.д.

Таблица 2 – Оценка связи между аллельным составом SSR-локусов и частотой регенерации зеленых растений тритикале в культуре пыльников

Комбинация аллелей	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	p
	низкая частота регенерации зеленых растений (0-2,0%)	высокая частота регенерации зеленых растений (>2,0%)		
<i>Xgwm312</i>				
195/195	97,7	2,3	9,029	0,018
195/219+219/219	86,9	13,1		
<i>Xbarc318</i>				
260/260+260/290	100,0	0	6,546	0,008
290/290	91,1	8,9		
<i>Xgwm291</i>				
146/146	88,5	11,5	11,669	0,001
170/170	100,0	0		
<i>Xgwm156</i>				
310	88,9	11,1	10,857	0,024
287	100,0	0		
<i>Xgwm540</i>				
121/121	89,9	10,1	8,885	0,003
121/132+132/132	100,0	0		

Таким образом, выявлены SSR-локусы, ассоциированные с высокой андрогенетической способностью, которые могут быть рекомендованы в качестве маркеров для отбора генотипов пшеницы и тритикале перед введением в культуру пыльников *in vitro*. Маркерами высокой эффективности андрогенеза *in vitro* для пшеницы являются аллели 169 п.н. (*Xgwm371*) и 146 п.н. (*Xgwm 595*); для тритикале – аллели 219 п.н. (*Xgwm312*), 290 п.н. (*Xbarc318*), 146 п.н. (*Xgwm291*), 310 п.н. (*Xgwm156*) 121 п.н. (*Xgwm540*). Также выявлены аллели, ассоциированные со снижением эффективности андрогенеза *in vitro*: аллели 185 п.н. (*Xgwm371*), 182 п.н. (*Xgwm595*) пшеницы ассоциированы со снижением способности к эмбриогенезу; аллели 195 п.н. (*Xgwm312*), 260 п.н. (*Xbarc318*), 170 п.н.

(Xgwm291), 287 п.н. (Xgwm156), 132 п.н. (Xgwm540) тритикале – со снижением частоты регенерации зеленых растений.

Молекулярно-генетический анализ линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале

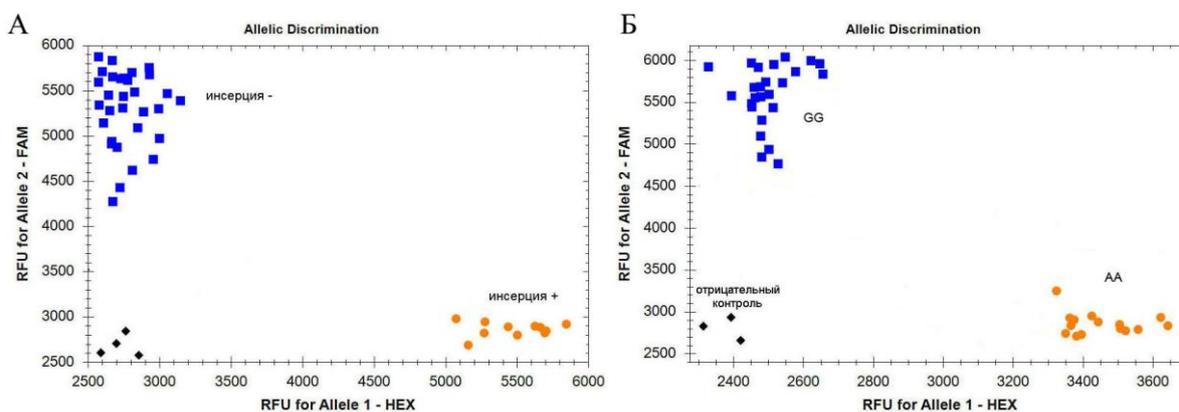
Зеленые растения-регенеранты пшеницы и тритикале, получаемые в культуре пыльников *in vitro*, развиваются из микроспор с гаплоидным набором хромосом с последующим спонтанным удвоением хромосомного набора. Однако, в отдельных случаях, растения-регенеранты могут развиваться не из микроспор, а из диплоидных гетерозиготных тканей пыльника. Для выделения удвоенных гаплоидов из полученных нами *in vitro* линий пшеницы и тритикале была проведена оценка гомозиготности 18 линий пшеницы и 53 линий тритикале. Гомозиготными по всем 13 ISSR локусам являлись 77,8% линий пшеницы и 45,3% линий тритикале. Данные ДН-линии являются генетически однородным материалом, представляющим высокую ценность для селекционных программ и генетических исследований.

Для выяснения целесообразности включения отобранных гомозиготных ДН-линий в селекционный процесс проведено их KASP-генотипирование, а также сортов-стандартов Любава (пшеница) и Узор (тритикале), по 10 генам, контролирующим хозяйственно ценные признаки – масса 1000 зерен (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*) и качественные характеристики зерна (*Gpc-B1*, *Ppo-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*). Образцы тритикале не анализировали по генам *TaGs3-D1* *TaCKX6-D1*, расположенным в D-геноме.

По гену *TaTGW6-A1* все линии пшеницы и тритикале несли благоприятный аллель *TaTGW6-A1a* (генотип G/G), связанный с увеличением массы 1000 зерен. По гену *TaGASR7-A1* благоприятный гаплотип *H1c* (инсерция +) выявлен у 1 генотипа пшеницы и у 9 генотипов тритикале (рисунок 2А). По гену *TaCKX6-D1* все образцы пшеницы несли неблагоприятный аллель *TaCKX6-D1b* (делеция -). По гену *TaGs3-D1* благоприятный аллель *TaGs3-D1a* (генотип G/G) несли 4 образца пшеницы.

По гену *Gpc-B1* все исследованные генотипы несли неблагоприятный аллель *Gpc-B1a* (делеция -, пониженное содержание белка). По гену *TaPod-A1*, благоприятный аллель *TaPod-A1a* (генотип A/A, низкая пероксидазная активность), несли 15 образцов: 5 генотипов пшеницы и 10 генотипов тритикале (рисунок 2Б). По гену *Zds-A1* большинство образцов несли аллель *Zds-A1b* (генотип G/G, высокое содержание желтого пигмента) кроме трех образцов пшеницы и одного образца тритикале. По гену *TaLox-B1* продукт амплификации был получен только у образцов пшеницы, на ДНК тритикале

данный праймер не отжигался. Все 15 исследованных генотипов пшеницы несли благоприятный аллель *TaLox-B1a* (генотип С/С, низкая активность липоксигеназы). По гену *Psy1-A1* все генотипы несли аллель *Psy-A1b* (инсерция +, низкое содержание желтого пигмента). По гену *Ppo-A1* большинство генотипов несли благоприятный аллель *Ppo-A1b* (генотип Т/Т, низкая активность полифенолоксидазы), кроме 5 образцов тритикале, несущих аллель *Ppo-A1a* (генотип А/А).



А – ген *TaGASR7-A1*; Б – ген *TaPod-A1*

Рисунок 2 – Результаты KASP-генотипирования в виде 2D-графика аллельной дискриминации

Таким образом, получены данные о суммарном количестве благоприятных аллелей по исследованным генам для каждого генотипа. У пшеницы наибольшее количество благоприятных аллелей (пять) обнаружено у семи образцов (сорт Любава, ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(О)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12). Эти же генотипы являются наиболее сбалансированными по количеству благоприятных аллелей генов, ассоциированных с массой 1000 зерен и качеством зерна. Остальные ДН-линии пшеницы несли по четыре благоприятных аллеля, с преобладанием аллелей генов, контролирующих качество зерна. У тритикале по 5 благоприятных аллелей выявлено у линий ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13, по 4 аллеля – у линий ДН1-41-52-15, ДН2-50-16-15, ДН81-5-13, ДН82-3-13, ДН82-4-13, ДН84-1-13, ДН97-2-1-15, ДН99-6-2-15. Данные ДН-линий, кроме трех (ДН84-1-13, ДН97-2-1-15, ДН99-6-2-15), также являются сбалансированными по количеству благоприятных аллелей разных групп генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками. Выделены 6 ДН-линий пшеницы (ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(О)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12) и 3 ДН-линий тритикале (ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13), несущие комплекс из 5 благоприятных аллелей генов, ассоциированных с массой 1000 зерен и качеством зерна.

Разработана методика генотипирования KASP по генам, ассоциированным с массой 1000 зерен и качеством зерна пшеницы, которая

использована в рамках совместного научного проекта с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» при создании сорта мягкой яровой пшеницы Инновация (процент авторства – 5%, выписка из протокола № 32 заседания Ученого совета РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» от 08.12.2023).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Показано, что для культивирования пыльников пшеницы и тритикале оптимальным является использование индукционной питательной среды С-17, дополненной 2,4-Д (2,0 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л), и выращивание растений-доноров пыльников в полевых условиях. Выделены генотипы пшеницы (линии ДН48-02-06, ДН52-02-06, сорт Ростань) и тритикале (линии ДН3-1-09, ДН11-2-09, ДН12-1-09, ДН27-1-08-1), контрастные по значениям параметров андрогенеза *in vitro*. На основе контрастных форм получено по 4 расщепляющиеся по отзывчивости к культивированию *in vitro* популяции F₂ для каждой культуры с целью получения растений для молекулярно-генетического анализа по выявлению микросателлитных локусов, ассоциированных с эмбриогенным потенциалом в культуре пыльников *in vitro* [2-А; 3-А; 7-А; 11-А; 13-А].

2. Установлены 3 полиморфных SSR-локуса у контрастных по параметрам андрогенеза родительских генотипов пшеницы, предположительно связанные со способностью к андрогенезу *in vitro*: *Xgwm291*, *Xgwm595* (хромосома 5А), *Xgwm371* (хромосома 5В) и 5 SSR-локусов у родительских генотипов тритикале: *Xgwm312* (хромосома 2А), *Xbarc318* (хромосома 2В), *Xgwm156*, *Xgwm291* (хромосома 5А), *Xgwm540*, (хромосома 5В) [1-А; 3-А; 5-А; 6-А; 7-А; 8-А].

3. Для пшеницы установлена связь между наличием аллелей 169 п.н. локуса *Xgwm371*, 146 п.н. локуса *Xgwm595* и способностью к эмбриогенезу, а также высокими значениями параметра «выход новообразований» (аллель 169 п.н. локуса *Xgwm371*). Для тритикале установлена связь между наличием аллелей 219 п.н. (*Xgwm312*), 290 п.н. (*Xbarc318*), 146 п.н. (*Xgwm291*), 310 п.н. (*Xgwm156*), 121 п.н. (*Xgwm540*) и высокой частотой регенерации зеленых растений. Выявлены также аллели, ассоциированные со снижением отзывчивости в культуре пыльников *in vitro*: аллели пшеницы 185 п.н. (*Xgwm371*) и 182 п.н. (*Xgwm595*), связанные со снижением способности к эмбриогенезу; аллели тритикале 195 п.н. (*Xgwm312*), 260 п.н. (*Xbarc318*), 170 п.н. (*Xgwm291*), 287 п.н. (*Xgwm156*), 132 п.н. (*Xgwm540*), ассоциированные со снижением частоты регенерации зеленых растений [3-А; 5-А; 9-А; 10-А].

4. Оценка гомозиготности 71 линии пшеницы и тритикале, полученных в культуре пыльников *in vitro*, с использованием 13 ISSR-маркеров, показала, что для генотипов пшеницы наибольший внутрилинейный полиморфизм наблюдался при использовании праймеров к локусам *ISSR 17*, *UBC 807* и *UBC 856* (77,8% линий были гомозиготными по каждому локусу). Для тритикале наибольший полиморфизм наблюдался при использовании праймера к локусу *ISSR 17* (77,4% линий). При помощи анализа внутрилинейного полиморфизма исследуемых ISSR-локусов у индивидуальных растений полученных линий пшеницы и тритикале выявлено 14 гомозиготных ДН-линий пшеницы и 24 ДН-линии тритикале [4-А].

5. Разработана методика генотипирования KASP по генам, ассоциированным с массой 1000 зерен и качеством зерна пшеницы, с помощью которой выполнено генотипирование 38 гомозиготных линий пшеницы и тритикале по 10 генам, ассоциированным с массой 1000 зерен (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*) и качественными характеристиками зерна (*Gpc-B1*, *Ppo-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*). Выделено 6 линий пшеницы (ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(О)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12) и 3 линии тритикале (ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13), несущие комплекс из 5 благоприятных аллелей исследованных генов и не уступающие контрольным сортам по изученным признакам. Методика KASP-генотипирования успешно применена при создании совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» сорта мягкой яровой пшеницы Инновация, который передан в Государственное сортоиспытание Республики Беларусь (акт передачи от 12.12.2023) [4-А; 12-А; 14-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Линии удвоенных гаплоидов, несущие комплекс благоприятных аллелей генов хозяйственно ценных признаков, переданы в РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» (акты передачи от 11.12.2017; от 11.03.2024) и рекомендуются для использования в селекции при создании новых высокоурожайных, с улучшенным качеством зерна сортов мягкой пшеницы и гексаплоидного тритикале.

2. Разработанная методика генотипирования KASP, использованная при создании сорта мягкой яровой пшеницы Инновация, предлагается к применению в селекционных научно-исследовательских учреждениях для отбора генотипов, несущих благоприятные аллели генов, ассоциированных с продуктивностью и качеством зерна, а также в качестве учебного пособия для преподавателей, аспирантов, магистрантов и студентов ВУЗов биологического и аграрного профиля.

3. Сорт мягкой яровой пшеницы Инновация, созданный совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» и переданный в Государственное сортоиспытание Республики Беларусь (акт передачи от 12.12.2023) рекомендуется для продовольственного использования. Средняя за 3 года урожайность зерна в конкурсном сортоиспытании составила 58,0 ц/га, что на 12,3 ц/га выше контроля.

4. Сведения об аллелях SSR-локусов, ассоциированных с эмбрионным потенциалом в культуре пыльников *in vitro*, рекомендуется использовать при скрининге генотипов для целенаправленного получения линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Публикации, соответствующие пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь

1-А. Сравнительный анализ полиморфизма локусов хромосомы 5А у пшеницы и тритикале с использованием SSR-маркеров / **Е. В. Антоненко (Е. В. Лагуновская)**, В. А. Лемеш Е. М. Кременевская, Н. М. Ермишина, О. И. Зайцева // Сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2013. – Т. 15 : Молекулярная и прикладная генетика. – С. 54–63.

2-А. **Лагуновская, Е. В.** Эффективность использования различных типов индукционных питательных сред при культивировании пыльников гексаплоидного тритикале / **Е. В. Лагуновская**, О. И. Зайцева, В. А. Лемеш // Сб. науч. тр. / НАН Украины, Институт молекулярной биологии и генетики, Украинское общество генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова. – Киев, 2019. – Т. 25 : Факторы экспериментальной эволюции организмов. – С. 260–265.

3-А. **Лагуновская, Е. В.** Идентификация микросателлитных локусов, ассоциированных с эмбрионным потенциалом у генотипов пшеницы в культуре пыльников *in vitro* / **Е. В. Лагуновская** // Сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2021. – Т. 31 : Молекулярная и прикладная генетика. – С. 102–113.

4-А. **Лагуновская, Е. В.** Оценка гомозиготности и аллельного состава генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, у линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале / **Е. В. Лагуновская** // Сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2023. – Т. 34 : Молекулярная и прикладная генетика. – С. 28–40.

5-А. **Лагуновская, Е. В.** Микросателлитные маркеры, ассоциированные с параметрами андрогенеза *in vitro*, у тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) и пшеницы (*Triticum aestivum*) / **Е. В. Лагуновская** // Сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2024. – Т. 36 : Молекулярная и прикладная генетика. – С. 52–64.

Статьи в сборниках научных трудов и материалах конференций

6-А. **Антоненко, Е. В. (Лагуновская, Е. В.)** SSR анализ локусов 5А хромосомы мягкой пшеницы у генотипов, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников / **Е. В. Антоненко (Е. В. Лагуновская)** // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии в рамках фестиваля науки : материалы всероссийской молодежной конф. в рамках Федеральной целевой

программы «Науч. и научн.-пед. кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., Уфа, 24-28 сент. 2012 г. / Башкирский гос. агр. ун-т ; редкол.: Ю. А. Янбаев [и др.]. – Уфа, 2012. – С. 3–9.

7-А. **Антоненко, Е. В. (Лагуновская, Е. В.)** Влияние различных условий культивирования донорных растений на эффективность пыльцевого эмбриогенеза у мягкой пшеницы / **Е. В. Антоненко (Е. В. Лагуновская)**, В.А. Лемеш // Земледелие, растениеводство, селекция: настоящее и будущее : материалы междунар. науч.-практ. конф., Жодино, 15-16 нояб. 2012 г. : в 2 т. / РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». – Минск, 2012. – Т 2. – С. 9–11.

8-А. **Лагуновская, Е. В.** Анализ полиморфизма микросателлитных локусов хромосом 2А и 2В у удвоенных гаплоидов тритикале / **Е. В. Лагуновская, О. И. Зайцева** // Экологическая стабилизация аграрного производства. Научные аспекты решения проблемы : сб. докл. междунар. науч.-практ. конф. молодых уч. и спец., Саратов, 18-19 марта 2015 г. / ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока» ; под общ. ред.: А. И. Прянишникова. – Саратов, 2015. – С. 68–72.

9-А. Оценка андрогенетического потенциала у гибридов F_2 гексаплоидного тритикале / **Е. В. Лагуновская, В. А. Лемеш, В. Н. Буштевич, С. И. Гриб** // Стратегия и приоритеты развития земледелия и селекции в Беларуси. Достижения науки – производству : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 15-летию Научно-практ. центра НАН Беларуси по земледелию, Жодино, 8-9 июля 2021 г. / РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» ; редкол.: Ф. И. Привалов [и др.] – Минск, 2021. – С. 197–199.

10-А. **Лагуновская, Е. В.** Влияние аллелей SSR локусов на отзывчивость в культуре пыльников *in vitro* у генотипов тритикале / **Е. В. Лагуновская** // Биотехнология: достижения и перспективы развития : сб. материалов V междунар. науч.–практ. конф., Пинск, 25–26 нояб. 2021 г. / Министерство образования Республики Беларусь, Полесский гос. ун-т ; редкол.: В. И. Дунай [и др.]. – Пинск, 2021. – С. 32–36.

Тезисы докладов

11-А. **Антоненко, Е. В. (Лагуновская, Е. В.)** Наследование параметров пыльцевого эмбриогенеза у *Triticum aestivum* / **Е. В. Антоненко (Е. В. Лагуновская)**, Н. Л. Трухановец // Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях : 2-я междунар. школа-конф. молод. уч., Звенигород, 5-10 декабря 2011 г. : тез.

докл. / УРАН «Институт общей генетики им. Вавилова РАН» – Москва, 2011. – С. 16.

12-А. Определение аллельного состава генов, контролирующих качество зерна у пшеницы и тритикале, с использованием технологии KASP / **Е. В. Лагуновская**, А. А. Булойчик, В.И. Сакович, В. Н. Буштевич, С. И. Гриб // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : V междунар. науч. конф., Минск, 21–25 нояб. 2022 г. : сб. материалов / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2022. – С. 51.

13-А. **Лагуновская, Е. В.** Эффективность индукции андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале / **Е. В. Лагуновская** // Настоящее и будущее биотехнологии растений : междунар. науч. конф., Минск, 24–26 мая 2023 г. : сб. материалов / НАН Беларуси, Отдел биол. наук НАН Беларуси, Центр бот. сад, Совет бот. садов стран СНГ при МААН ; редкол.: В. Н. Решетников [и др.]. – Минск, 2023. – С. 130.

Методические рекомендации

14-А. Методика генотипирования KASP в селекции мягкой яровой пшеницы : метод. рекомендации / В. А. Лемеш, С. И. Гриб, **Е. В. Лагуновская**, В. Н. Кипень, А. А. Булойчик, В. Н. Буштевич – Минск : Право и экономика, 2023. – 18 с.

РЭЗІЮМЭ

Лагуноўская Алена Уладзіміраўна

Малекулярна-генэтычныя падыходы для павышэння эфектыўнасці андрагенезу *in vitro* і адбору селекцыйна каштоўных ліній падвоеных гаплоідаў пшаніцы (*Triticum aestivum* L.) і трыцікале (× *Triticosecale* Wittm.)

Ключавыя словы: пшаніца, трыцікале, культура пыльнікаў *in vitro*, лініі падвоеных гаплоідаў, SSR-локусы, маса 1000 зернят, якасць зерня, KASP-генатыпаванне.

Мэта працы: выяўленне генэтычных локусаў, асацыяваных з эфектыўнасцю андрагенезу *in vitro* у пшаніцы і трыцікале, і малекулярна-генэтычны аналіз атрыманых ліній падвоеных гаплоідаў па генах, асацыяваных з каштоўнымі для гаспадаркі адзнакамі.

Метады даследавання: метады культуры пыльнікаў *in vitro*, ПЛР-аналіз, SSR-аналіз, KASP-генатыпаванне, статыстычныя метады даследавання.

Атрыманя вынікі і іх навізна: упершыню праведзена комплекснае даследаванне, заснаванае на пошуку і выкарыстанні ДНК-маркераў, што дазваляюць прагназаваць эмбрыягенны патэнцыял у культуры пыльнікаў *in vitro* і каштоўныя для гаспадаркі адзнакі ў пшаніцы і трыцікале. Усталявана сувязь паміж алельным складам SSR-локусаў мяккай пшаніцы і трыцікале і эфектыўнасцю андрагенезу *in vitro*. Вызначаны алелі, якія могуць быць выкарыстаны ў якасці маркераў пры скрынінгу генатыпаў перад увядзеннем у культуру пыльнікаў *in vitro*, што дазволіць значна скараціць аб'ём прапрацаванага матэрыялу. Праведзена ацэнка гомазіготнасці атрыманых ліній падвоеных гаплоідаў (DH-ліній) з дапамогай ISSR маркераў. Сярод адабраных гомазіготных DH-ліній з выкарыстаннем метаду KASP-генатыпавання вылучаны перспектыўныя з пункту гледжання селекцыі генатыпы пшаніцы і трыцікале, што нясуць комплекс алеляў генаў, асацыяваных з масай 1000 зернят і якасцю зерня.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: алелі SSR-локусаў рэкамендуецца выкарыстоўваць у якасці маркераў высокай і нізкай здольнасці да андрагенезу *in vitro* пры скрынінгу генатыпаў да ўводзін у культуру пыльнікаў для павышэння эфектыўнасці дадзенай метадыкі і павелічэння колькасці атрыманых ліній падвоеных гаплоідаў пшаніцы і трыцікале. Методыку KASP-генатыпавання па генах, асацыяваных з каштоўнымі для гаспадаркі адзнакамі, рэкамендуецца выкарыстоўваць у селекцыі дзеля ранняга адбору генатыпаў, перспектыўных для паскоранага стварэння новых, з павышанай якасцю зерня, высокаўраджайных гатункаў пшаніцы і трыцікале.

Вобласць выкарыстання: біятэхналогія раслін, малекулярная генэтыка, селекцыя пшаніцы і трыцікале, навучальныя ўстановы.

РЕЗЮМЕ

Лагуновская Елена Владимировна

Молекулярно-генетические подходы для повышения эффективности андрогенеза *in vitro* и отбора селекционно ценных линий удвоенных гаплоидов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.)

Ключевые слова: пшеница, тритикале, андрогенез *in vitro*, линии удвоенных гаплоидов, SSR-локусы, масса 1000 зерен, качество зерна, KASP-генотипирование.

Цель работы: выявление генетических локусов, ассоциированных с эффективностью андрогенеза *in vitro* у пшеницы и тритикале и молекулярно-генетический анализ полученных линий удвоенных гаплоидов по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками.

Методы исследования: метод культуры пыльников *in vitro*, ПЦР-анализ, SSR-анализ, KASP-генотипирование, статистические методы исследования.

Полученные результаты и их новизна: впервые проведено комплексное исследование, основанное на поиске и использовании ДНК-маркеров, позволяющих прогнозировать эмбриогенный потенциал в культуре пыльников *in vitro* и хозяйственно ценные признаки у пшеницы и тритикале. Установлена связь между аллельным составом SSR-локусов пшеницы и тритикале и эффективностью андрогенеза *in vitro*. Определены аллели, которые могут быть использованы в качестве маркеров при скрининге генотипов перед введением в культуру пыльников *in vitro*, что позволит значительно сократить объем прорабатываемого материала. Проведена оценка гомозиготности полученных линий удвоенных гаплоидов (DH-линий) с помощью ISSR маркеров. Среди отобранных гомозиготных DH-линий с использованием метода KASP-генотипирования выделены перспективные с точки зрения селекции генотипы пшеницы и тритикале, несущие комплекс аллелей генов, ассоциированных с массой 1000 зерен и качеством зерна.

Рекомендации по использованию: аллели SSR-локусов рекомендуется использовать в качестве маркеров высокой и низкой способности к андрогенезу *in vitro* при скрининге генотипов до введения в культуру пыльников для повышения эффективности данной методики и увеличения количества получаемых DH-линий пшеницы и тритикале. Методику KASP-генотипирования по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, рекомендуется использовать в селекции с целью раннего отбора генотипов, перспективных для ускоренного создания новых, с повышенным качеством зерна, высокоурожайных сортов пшеницы и тритикале.

Область применения: биотехнология растений, молекулярная генетика, селекция пшеницы и тритикале, учебные учреждения.

SUMMARY

Elena Vladimirovna LAGUNOSKAYA

Molecular genetic approaches for improvement in the efficiency of *in vitro* androgenesis and selection of doubled haploids lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (\times *Triticosecale* Wittm.) valuable for breeding

Key words: wheat, triticale, *in vitro* anther culture, doubled haploid lines, SSR loci, 1000 grain weight, grain quality, KASP genotyping.

Aim of the study: Identification of genetic loci associated with *in vitro* androgenesis efficiency in wheat and triticale and molecular genetic analysis of the doubled haploids lines obtained, by the genes associated with economically valuable traits.

Methods of the study: *in vitro* anther culture method, PCR analysis, SSR analysis, KASP genotyping, statistical research methods.

Obtained results and their novelty: For the first time, a comprehensive study was carried out based on the search and use of DNA markers that make it possible to predict embryogenic potential in the *in vitro* anther culture and economically valuable traits in wheat and triticale. A relationship was established between the allelic composition of microsatellite loci in bread wheat and triticale and the *in vitro* androgenesis efficiency. Alleles that can be used as markers in the screening of genotypes before the introduction into the *in vitro* anther culture were identified, which will make it possible to significantly reduce the volume of processed material. The homozygosity of resulting double haploid lines (DH-lines) was assessed using ISSR markers. Among the homozygous DH-lines selected using the KASP genotyping method, promising wheat and triticale genotypes from the point of view of breeding, carrying a complex of gene alleles associated with 1000 grain weight and grain quality, were identified.

Recommendations for application: Microsatellite loci alleles are recommended for use as high and low androgenesis ability markers in the screening of genotypes before the introduction into the *in vitro* anther culture to enhance the efficiency of this technique and increase the number of resulting DH-lines of wheat and triticale. The KASP genotyping method by the genes associated with economically valuable traits is recommended for use in breeding for the purpose of the early selection of genotypes promising for the accelerated development of new wheat and triticale varieties with improved grain quality and high-yielding.

Scope of application: plant biotechnology, molecular genetics, wheat and triticale breeding, educational institutions.