

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

**ЛЮБЧЕНКО ІННА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 631.528-043.83:[633.85-026.564

**СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ РИЖІЮ ЯРОГО  
СТІЙКОГО ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ  
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ**

**06.01.05 – селекція і насінництво  
20 – Аграрні науки та продовольство**

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата сільськогосподарських наук**

Умань – 2020

Дисертацією є рукопис

Кваліфікаційну наукову працю виконано в Уманському національному університеті садівництва Міністерства освіти і науки України впродовж 2014–2020 рр.

**Науковий керівник** доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Рябовол Людмила Олегівна,**  
Уманський національний університет садівництва  
МОН України, завідувач кафедри генетики, селекції  
рослин та біотехнології.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Січкач В'ячеслав Іванович,**  
Одеська державна сільськогосподарська дослідна  
станція НААН України, завідувач науково-  
технологічного відділу розробки та впровадження  
інноваційних технологій для інтенсифікації  
виробництва сільськогосподарської продукції;

доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Доронін Володимир Аркадійович,**  
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків  
НААН України, завідувач лабораторії насінництва та  
насіннезнавства буряків і біоенергетичних культур.

Захист відбудеться 10 грудня 2020 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 74.844.04 в Уманському національному університеті садівництва Міністерства освіти і науки України за адресою: 20300, Україна, Черкаська область, м. Умань, вул. Інститутська, 1, навчальний корпус № 1, аудиторія № 54.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Уманського національного університету садівництва Міністерства освіти і науки України за адресою: 20300, Україна, Черкаська область, м. Умань, вул. Інститутська, 1.

Автореферат розіслано 10 листопада 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

кандидат сільськогосподарських наук Н. В. Воробйова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Негативні чинники навколишнього середовища, викликаючи фізіологічні та біохімічні зміни в рослинному організмі, є основними лімітуючими факторами, що знижують продуктивність сільськогосподарських культур. Вирощування культур у регіонах з несприятливими ґрунтово-кліматичними умовами потребує адаптивних сортів і гібридів. Стійкі до стресорів генотипи максимально реалізують закладений генетичний потенціал, ефективно використовують природні ресурси середовища та потребують менших матеріальних витрат на вирощування продукції.

В Україні посуха і засолення ґрунтів є одними з основних абіотичних чинників, що завдають істотних збитків сільськогосподарському виробництву. Вони мають схожий фізіологічний вплив на рослину, викликаючи подібні механізми захисту.

Для створення вихідного матеріалу стійкого до абіотичних і біотичних стресів у селекційному процесі використовують біотехнологічні методи. Нині розроблено низку біотехнологічних способів і прийомів, що використовуються в різноманітних схемах селекційного процесу, але потребують конкретизації відповідно біовиду та кінцевої мети роботи.

Значний внесок у розвиток селекції рижію ярого в Україні зробили А. І. Ємець, Ю. Н. Бойчук, Е. Н. Шиша, Д. Б. Рахметов, Я. Б. Блюм, В. О. Лях, І. Б. Комарова, В. В. Рожкован, В. М. Мороз та інші. Проте, у виробництві знаходиться незначна кількість резистентних до абіотичних чинників, зокрема засолення та посухи, сортів, що перешкоджає широкому впровадженню культури.

Створення стійкого до засолення й осмотичного стресу вихідного матеріалу рижію ярого для залучення в селекційний процес з метою отримання адаптивних, високопродуктивних, технологічних сортів є актуальним завданням селекції.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження за темою дисертаційної роботи проводили впродовж 2014–2020 рр. в Уманському національному університеті садівництва. Тема роботи є складовою частиною наукових досліджень кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології за підпрограмою «Розробка генетичних та біотехнологічних методів у селекції сільськогосподарських культур», програми «Оптимізація використання природного і ресурсного потенціалу агроєкосистеми Правобережного Лісостепу України» (№ державної реєстрації 0101U004495, 016U003207).

**Мета і завдання досліджень.** Метою роботи було вдосконалення селекційного процесу створення вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до абіотичних чинників за використання в технологічній схемі клітинної селекції.

Для досягнення мети було поставлено на вирішення наступні завдання:

- визначити умови стерилізації експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*;
- підібрати живильне середовище для індукування, культивування і морфогенезу калюсної тканини та мікроклонального розмноження рослинного матеріалу;
- дослідити вплив хлориду натрію та маніту на культуру калюсних тканин рижію ярого;
- провести добір клітинних ліній рижію ярого на стійкість до хлоридного засолення;
- проаналізувати морфогенні властивості солестійких клітинних ліній рижію ярого та отримати рослини-регенеранти;
- провести аналіз створеного матеріалу за стійкістю до селективного чинника за переходу з клітинного рівня на рівень інтактної рослини;
- провести оцінювання створених соматоклональних ліній рижію ярого за комплексом біологічних і господарсько-цінних ознак за умов *ex vitro*.

**Методи дослідження.** Загальнонаукові – робоча гіпотеза, експеримент, спостереження, аналіз; спеціальні – генетичний, польовий, лабораторний, біотехнологічний, метод морфологічного аналізу; математико-статистичні – кореляційний, варіаційний, регресійний і дисперсійний аналізи.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає в удосконаленні селекційного процесу створення вихідного матеріалу рижію ярого, стійкого до засолення та осмотичного стресу, за використання у технологічній схемі клітинної селекції.

*Уперше* підбрано умови стерилізації експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro* та встановлено, що найефективнішим методом стерилізації є використання 1,0 % розчину перманганату калію за експозиції 10 хвилин.

Розроблено спосіб індукування калюсної тканини для ведення клітинної селекції рижію ярого. Підбрано живильне середовище для індукування та культивування калюсної тканини, склад якого є модифікацією середовища за прописом Мурасіге-Скуга за введення 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП (патент №136523).

Доведено, що найвищу активність морфогенезу калюсних тканин рижію можна отримати на модифікованому 1,0 мг/л 6-БАП живильному середовищі Мурасіге-Скуга, що дає змогу з одного мікрокалюса індукувати до семи пагонів.

Підбрано живильний субстрат для клонування рослин рижію ярого за отримання високого коефіцієнту мікроклонального розмноження та з'ясовано, що середовище Мурасіге-Скуга за модифікації 1,0 мг/л ІОК і 6-БАП в середньому за один пасаж забезпечує отримання до дев'яти пагонів.

Проаналізовано вплив хлориду натрію і маніту на калюсну тканину рижію ярого та підбрано оптимальну концентрацію стресових чинників для ведення селекційного добору *in vitro*. Виявлено паралельну стійкість солестійких рослинних ліній до осмотичного стресу.

Обґрунтовано багатоступеневу схему добору клітинних ліній стійких до хлоридного засолення, що дозволяє отримати резистентний до 1,5 % засолення вихідний матеріал рижію ярого.

Встановлено можливість збереження ознаки стійкості біоматеріалу за переходу з клітинного рівня на рівень цілісної рослини і доведено спадковість стійкості до стресового чинника у нащадків, що підтверджує генетичну природу змін, які відбуваються за проведення добору *in vitro*.

Створено колекцію зразків рижію ярого з комплексною стійкістю до хлоридного й осмотичного стресу для використання в селекційному процесі отримання високопродуктивних сортів культури.

Удосконалено технологію отримання стійкого до засолення та осмотичного стресу вихідного матеріалу рижію ярого за використання біотехнологічних методів, що дозволяє істотно скоротити тривалість селекційного процесу за створення соматоклональних ліній культури.

Набули подальшого розвитку наукові положення щодо вдосконалення й апробації селекційних схем отримання стійкого до абіотичних чинників навколишнього середовища вихідного матеріалу рижію ярого.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено технологічну схему селекційного процесу за використання багатоступеневого добору *in vitro* для створення стійкого до стресових чинників вихідного матеріалу рижію ярого.

Розроблено спосіб індукування калюсної тканини рижію ярого для ведення клітинної селекції культури (патент №136523).

Підібрано живильне середовище для індукування, пасажування, морфогенезу та регенерації рослин за створення вихідного матеріалу в селекції рижію ярого.

Метами клітинної селекції отримано нові вихідні зразки (селекційні номери С-87-7, С-121-2, П-46-5 і П-646-3), що характеризуються комплексною стійкістю до засолення й осмотичного стресу та вирізняються низкою господарсько-цінних ознак.

Наукові розробки дисертаційної роботи використовуються у фундаментальних і прикладних дослідженнях кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва (2019 р.), Дослідної станції тютюництва Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН України» (2019 р.) та пройшли виробничу перевірку в ФГ «Поляна Лісова» Уманського району (2019 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною науковою працею. Здобувачка брала участь у розробці програми досліджень і виконала низку запрограмованих експериментів. Дисертанткою проаналізовано наукові джерела літератури вітчизняних та закордонних вчених, проведено статистичний аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки та рекомендації селекційній практиці. Особисто й у співавторстві підготовлено до публікації наукові праці, частка участі в яких складає 40–80 %, а також впроваджено результати досліджень у виробництво.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні положення дисертації оприлюднено й обговорено на Міжнародній науковій конференції «Гетерозис: досягнення та проблеми», присвяченій 110-річчю від дня народження Ю. П. Мірюти (Умань, 2015), III Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної аграрної науки» (Умань, 2015), Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта» (Умань, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні агротехнології: теорія та практика», присвяченій 95-річчю Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (Київ, 2017), V Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної аграрної науки» (Умань, 2017), Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта», присвяченій 150-річчю факультету агрономії Уманського національного університету садівництва (Умань, 2018), Всеукраїнській науковій конференції молодих учених, присвяченій 170-й річниці від дня заснування Уманського національного університету садівництва (Умань, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інноваційні шляхи розвитку сучасного овочівництва», присвяченій 140-річчю від дня народження професора С. М. Вуколова та 135-річчю від дня народження академіка В. І. Едельштейна (Умань, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі» (Умань, 2018), VI Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної аграрної науки», присвяченій 150-річчю заснування факультету агрономії Уманського НУС (Умань, 2018), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Селекція сільськогосподарських рослин у XXI столітті: теорія і практика, реалії та перспективи», присвяченій 130-річчю народження академіка М. І. Вавілова і 78-річчю його перебування на дослідних полях у Дублянах (Дубляни, 2018), VII Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Екологія – шляхи гармонізації відносин природи та суспільства», присвяченій 10-річчю створення кафедри екології та безпеки життєдіяльності (Умань, 2018), Всеукраїнській науковій конференції молодих учених і науково-педагогічних працівників «Підсумки наукової роботи за 2014–2019 рр.», приуроченій 175-річчю заснування Уманського НУС (Умань, 2019).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 23 наукові праці, зокрема, сім статей – у наукових фахових виданнях України, одна – у міжнародному науковому періодичному зарубіжному виданні, одна – у науковому виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Web of Science, 13 – матеріалів наукових конференцій та отримано один патент на корисну модель.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційну роботу викладено на 197 сторінках комп'ютерного набору, зокрема, 184 сторінках основного тексту. Робота містить анотацію, вступ, п'ять розділів, висновки, рекомендації селекційній практиці, список використаних літературних джерел, що нараховує 277 найменувань, з яких 81 латиницею, дев'ять додатків. Роботу ілюстровано 18 рисунками і 42 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ СТІЙКОГО ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ (огляд літератури)

На основі аналізу джерел наукової літератури вітчизняних і зарубіжних вчених зроблено висновки щодо доцільності використання біотехнологічних методів для ведення селекції сільськогосподарських культур на стійкість до несприятливих чинників навколишнього середовища, зокрема, засолення та осмотичного стресу. Обґрунтовано необхідність проведення досліджень у цьому напрямі з рижієм ярим.

### УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконано у лабораторії біотехнології і на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва впродовж 2014–2020 років.

У дослідженнях зі створення вихідного матеріалу рижію ярого *in vitro*, стійкого до стресових чинників, використовували рослинні матеріали сортів Степовий 1 (Інститут олійних культур НААН України), Клондайк (ННЦ «Інститут землеробства НААН України»), Перемога та Євро 12 (Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України).

Для проведення біотехнологічних досліджень використовували загальні принципи та методи розроблені Р. Г. Бутенко (1989 р.).

За введення в культуру *in vitro* рослинні матеріали (насіння та проростки) стерилізували етанолом ( $C_2H_5OH$ ), гіпохлоридом натрію (комерційний препарат «Білизна»), перекисом водню ( $H_2O_2$ ), перманганатом калію ( $KMnO_4$ ). Стерилізацію проводили за різної експозиції та концентрації стерилізуючих агентів. Ефективність стерилізації визначали на восьму добу культивування за виходом життєздатних стерильних експлантів, морфологічними показниками та приростом біомаси.

Біоматеріал вирощували в культуральних кімнатах за 16-годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 4 кЛк, температурним режимом – 20–24 °С, відносній вологості повітря – 75 %. Тривалість міжпасажного періоду – 30–35 діб.

Для індукції калюсогенезу базові середовища за прописами Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шенка-Хильдебранта модифікували регуляторами росту ауксинової (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) та цитокінінової (6-бензиламінопурин) природи за різної концентрації (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л).

Ефективність живильного середовища оцінювали за відсотком експлантів, на яких спостерігали наростання калюсної тканини, відносним приростом біомаси, морфогенними характеристиками та напрямками розвитку

трансплантів. Відносний приріст біомаси визначали за формулою Кепліна (1948 р.).

Для вегетативного розмноження *in vitro* з метою отримання генетичного ідентичного матеріалу базові живильні середовища модифікували ІОК та 6-БАП в концентраціях 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мг/л. Оцінку варіантів досліду проводили за коефіцієнтом розмноження, біометричними показниками рослин-регенерантів, інтенсивністю ризогенезу.

Цитологічний аналіз отриманого біоматеріалу рижію ярого проводили за методикою З. П. Паушевої (1988 р.).

Селективний субстрат *in vitro*, для добору соле- та посухостійких соматоклональних клітинних ліній рижію ярого, створювали шляхом додавання до живильного середовища хлориду натрію або маніту.

Для визначення оптимальних концентрацій селективного чинника, мікрокалюс із високими морфогенними характеристиками висаджували на середовища зі стресовими речовинами у різних концентраціях: для NaCl – 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 %; для маніту – 2; 4; 6; 8; 10; 12 %.

Біоматеріали, отримані на субстратах з низьким вмістом селективного чинника, в наступних пасажах переносили на середовища з вищими концентраціями солі, збільшуючи тиск стресового агента.

Основним показником стійкості калюсних ліній до стресових чинників є різниця між наростанням біомаси на селективних середовищах у порівнянні з контролем і збереження ними морфогенних властивостей.

Після проведення ступеневої селекції, індукували морфогенез відібраних клітинних ліній. Отримання рослин-регенерантів проводили в селективних і контрольних умовах. Для визначення збереження ознаки стійкості генотипів за переходу з клітинного рівня на рівень цілісної рослини, проводили ретестування регенерантів рижію ярого на живильних середовищах з максимально допустимою концентрацією селективного чинника. Під час ретестування визначали відсоток виживання мікророслин в умовах стресу.

Стійкі рослинні лінії після мікроклонального розмноження, укорінення й адаптації переносили у відкритий ґрунт для отримання насіннєвого матеріалу.

Оцінку стійкості інтактних рослин до селективних чинників проводили шляхом пророщування насіння досліджуваних генотипів у розчинах осмотично активних речовин. За селективний фон використовували 1,3 % розчин NaCl та 4,0 % розчин маніту. Отримані результати порівнювали з показниками посівних якостей у контрольному варіанті (пророщування в дистильованій воді).

Оцінювання рослин-регенерантів рижію ярого за біологічними та господарсько-цінними ознаками в умовах *ex vitro* проводили на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології. Вирощування рослин і проведення обліків виконували згідно Методики проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (2016 р.) і Методики проведення кваліфікаційної (технічної) експертизи сортів рослин з визначення показників придатності до поширення в Україні (2016 р.).

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили за методами дисперсійного, кореляційного і варіаційного аналізів згідно рекомендацій В. О. Єщенко та ін. (2014 р.) та Е. Р. Ермантраута та ін. (2008 р.).



## ІНДУКЦІЯ МОРФОГЕННОЇ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ РИЖІЮ ЯРОГО

**Стерилізація експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*.** Однією з основних умов отримання культури ізольованих тканин та органів *in vitro* є ефективна стерилізація рослинних експлантів. Найнижчу ефективність стерилізації експлантів спостерігали за використання 70 % етилового спирту та перекису водню – вихід стерильних життєздатних експлантів не перевищував відповідно 60,3 та 73,0 %.

Комерційний препарат «Білизна» у високих концентраціях (розведення з дистильованою водою у співвідношенні 1:1) характеризувався високим токсичним впливом, викликаючи істотну частку некрозу експлантів. Нижча концентрація гіпохлориду натрію (1:2), здійснюючи менший токсичний вплив на експланти, забезпечувала високий показник знищення небажаної мікрофлори.

Підвищені концентрації  $\text{KMnO}_4$  (1,0 %) спричиняли токсичну дію як на експланти рижію ярого, так і на патогенну мікрофлору. За обробки насіння ефективність стерилізації за різних експозицій істотно не різнилась і становила 90,6–94,3 %. Для проростків найвищий вихід стерильних життєздатних експлантів (82,7 %) відмічено за використання перманганату калію в концентрації 1,0 % за експозиції 10 хвилин. Подовження стерилізації спричиняло некроз майже половини експлантів, знижуючи ефективність стерилізації до 49,4 %.

Перманганат калію, у порівнянні з гіпохлоридом натрію, здійснював на культуру експлантів рижію ярого менший стресовий вплив. Відносний приріст культури, отриманої з насіння, в середньому складав 14,7 пункти. Для культури проростків цей показник становив 9,1 пункти.

**Індукування калюсогенезу рижію ярого.** Основним типом рослинного біоматеріалу, що використовується за ведення клітинної технології, є калюсна тканина. Процес калюсогенезу залежить від низки внутрішніх і зовнішніх чинників, що підбираються експериментально для кожного біовиду.

У результаті проведених досліджень встановлено вплив живильного середовища на проліферацію калюсної маси рижію ярого (табл. 1).

На безгормональних середовищах (контроль) не відмічено індукції формування калюсних тканин. Найінтенсивніше калюсогенез рижію ярого проходив за введення до живильного субстрату 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП.

На середовищі Мурасіге-Скуга частка експлантів з дедиференціацією та проліферацією калюсних тканин становила 76,6 %. За використання середовищ за прописом Шенка-Хильдебранта і Гамборга цей показник відповідно складав 55,9 і 52,1 %. За вказаного співвідношення регуляторів росту формувалась калюсна тканина з високими морфогенними характеристиками.

Підвищення концентрації 2,4-Д викликало пригнічення тканин експлантів і суттєво знижувало інтенсивність калюсогенезу. Проте, у варіанті за концентрації у культуральному субстраті 1,0 мг/л ауксинів і 1,0 мг/л цитокінінів зафіксовано підвищення інтенсивності калюсогенезу до 31,8–46,7 %. Високі концентрації ауксинів знижували морфогенні показники отриманих структур.

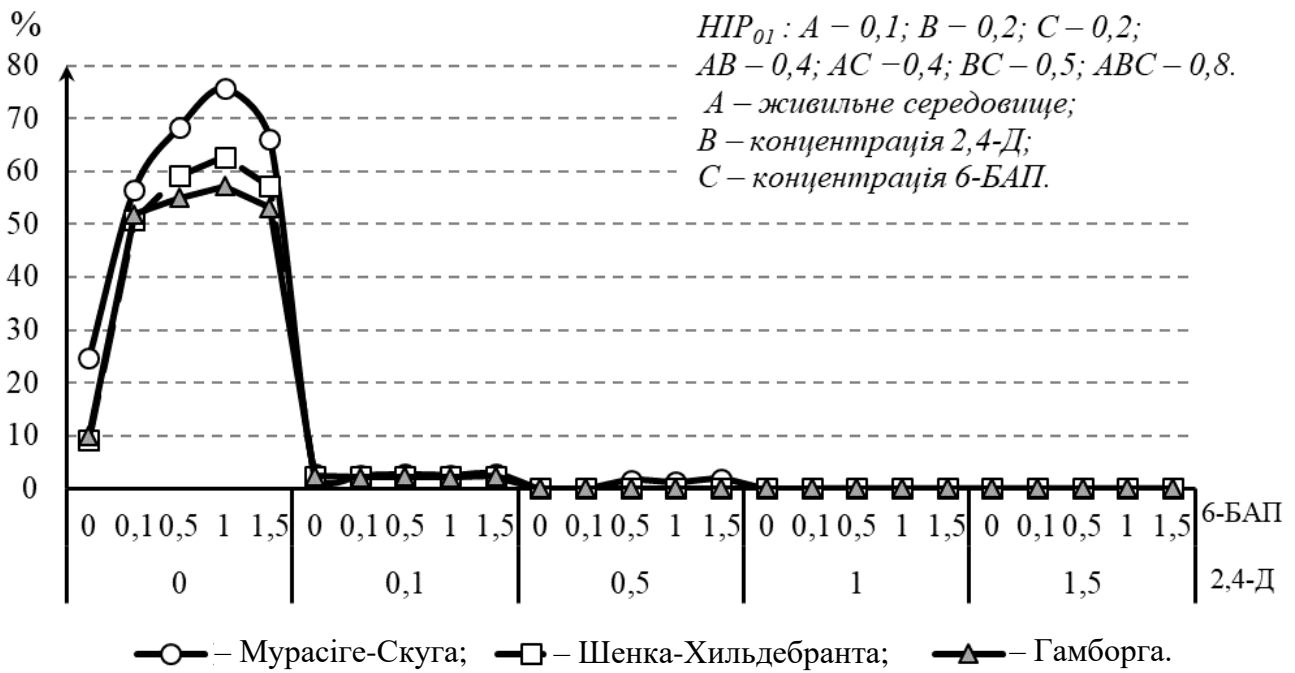
Таблиця 1 – Вплив модифікації живильного середовища на інтенсивність калюсогенезу рижію ярого, %

Концентрація регулятора росту, мг/л		Базове живильне середовище (А)					
2,4-Д (В)	6-БАП (С)	Мурасіге-Скуга		Шенка-Хильдебранта		Гамборга	
		калюс	морфогенний калюс	калюс	морфогенний калюс	калюс	морфогенний калюс
0,1	0,0	23,4±4,1	21,2±3,2	17,1±1,8	14,2±1,7	15,9±2,0	12,8±0,4
	0,1	53,3±7,4	51,8±9,4	38,9±4,4	24,3±3,4	36,2±3,8	20,2±3,1
	0,5	60,7±8,0	59,2±5,5	44,3±2,9	32,4±2,9	41,3±5,0	30,4±3,9
	1,0	76,6±2,2	73,4±8,9	55,9±4,2	46,2±5,5	52,1±4,4	42,4±1,4
	1,5	60,2±5,5	58,7±5,9	43,9±3,9	30,3±2,7	40,9±4,4	30,1±2,6
0,5	0,0	33,3±3,2	17,2±2,3	24,3±4,4	13,3±1,5	22,6±2,4	10,2±2,2
	0,1	27,3±4,5	20,4±4,1	19,9±2,2	15,2±1,1	18,6±1,3	13,4±1,5
	0,5	23,3±3,3	18,4±2,9	17,0±0,5	12,3±0,9	15,8±3,2	12,3±2,2
	1,0	26,8±4,0	20,3±4,1	19,6±0,5	13,4±0,9	18,2±1,0	11,3±1,0
	1,5	26,7±3,2	21,8±4,7	19,5±1,3	14,2±1,7	18,2±2,8	12,6±1,3
1,0	0,0	13,3±1,4	8,2±1,2	9,7±0,7	3,2±0,3	9,0±0,2	2,4±0,2
	0,1	23,3±3,0	8,6±1,3	17,0±2,2	5,8±0,6	15,8±2,6	3,8±0,5
	0,5	33,3±3,3	8,4±0,8	24,3±3,2	5,6±0,5	22,6±0,8	3,4±0,2
	1,0	46,7±7,1	8,9±1,6	34,1±3,7	5,3±0,4	31,8±3,9	3,8±0,2
	1,5	30,0±3,8	8,7±1,2	21,9±2,8	4,8±0,4	20,4±1,7	3,8±0,5
1,5	0,0	13,3±2,0	2,3±0,3	14,3±0,6	1,8±0,2	12,6±5,0	1,5±0,2
	0,1	14,2±2,8	2,5±0,2	10,4±1,2	1,8±0,2	9,7±0,9	1,5±0,3
	0,5	15,8±2,4	2,4±0,2	11,5±1,1	2,2±0,2	10,7±0,0	2,0±0,2
	1,0	10,8±0,3	2,8±0,3	7,9±0,8	2,5±0,3	7,3±0,6	2,1±0,3
	1,5	10,9±2,0	2,1±0,2	8,0±0,5	1,9±0,2	7,4±0,3	1,8±0,0

*НІР<sub>01</sub>: А – 0,5; В – 0,4; С – 0,6; АВ – 1,1; АС – 1,0; ВС – 1,4; АВС – 2,4*

**Морфогенез калюсних тканин рижію ярого.** Внаслідок проведених дослідів встановлено залежність регенераційної здатності калюсної тканини рижію ярого від концентрації у живильному середовищі регуляторів росту (рис. 1).

На безгормональних живильних середовищах частка мікрокалюсів на яких відмічено морфогенез, залежно від базового пропису субстрату, змінювалась від 9,1 до 24,6 %. У цьому варіанті стимулювання реалізації морфогенного потенціалу біоматеріалу відбувалось за рахунок активації внутрішніх чинників.



**Рис. 1 Морфогенез калюсної тканини рижію ярого залежно від модифікації живильних середовищ регуляторами росту, %**

Активному проходженню процесу морфогенезу сприяли повна відсутність у живильному середовищі 2,4-Д і підвищені концентрації 6-БАП. Найінтенсивніше морфогенез відбувався за концентрації в субстраті 1,0 мг/л 6-БАП. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга інтенсивність морфогенезу за вказаної концентрації цитокініну становила 75,8 %, на середовищах за прописом Шенка-Хильдебранта та Гамборга цей показник відповідно становив 62,7 та 57,2 %.

Навіть незначна наявність у живильному середовищі 2,4-Д різко сповільнювала регенераційні процеси і за концентрації ауксину 0,1 мг/л частка мікрокалюсів, на яких спостерігали диференціацію, не перевищувала 2,8 %.

У середньому на модифікованих живильних середовищах з одного мікрокалюсу рижію ярого масою 30–40 мг було регеновано 3,3 мікропагона.

Найвищий вихід рослин-регенерантів з одного мікрокалюса відмічено за 1,0 мг/л 6-БАП і повної відсутності в живильному середовищі 2,4-Д. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга інтенсивність регенераційних процесів становила 6,3 мікропагона на одному калюсі, на живильних середовищах Шенка-Хильдебранта і Гамборга – відповідно 4,4 і 4,0 мікропагонів.

**Мікроклональне розмноження рослин рижію ярого.** За результатами проведених досліджень встановлено, що для рижію ярого за мікроклонального розмноження характерний горизонтальний тип черенкування. Розмноження біоматеріалу відбувається за рахунок формування бічних адвентивних бруньок.

Найвищий коефіцієнт розмноження отримано на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга. У середньому з одного висадженого експланту за 20 діб культивування утворювалось чотири адвентивні бруньки. За використання культуральних субстратів за прописами Шенка-Хильдебранта і

Гамборга коефіцієнт розмноження в середньому відповідно становив 3,4 і 2,9, що було на 15–28 % менше порівняно з середовищем Мурасіге-Скуга. Для інтенсивного розмноження *in vitro* рослинного матеріалу необхідною умовою є наявність в живильному середовищі регуляторів росту. На безгормональних субстратах морфогенні програми розвитку експлантів не реалізовувались.

Найвищий коефіцієнт розмноження (9,3 мікропагони) відмічено на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації ІОК та 6-БАП в концентраціях 1,0 мг/л, підвищення вмісту цитокініну до 1,5 мг/л неістотно змінювало показники мікророзмноження. На середовищах Гамборга та Шенка-Хильдебранта за вказаного співвідношення регуляторів росту інтенсивність розмноження *in vitro* була на 20–31 % нижчою, а коефіцієнт розмноження відповідно становив 6,4 та 7,4.

Важливим показником ефективності мікроклонального розмноження є морфологічні характеристики отриманих рослинних матеріалів. Інтенсивність наростання рослин-регенерантів ріжню ярого істотно залежить від складу модифікованого живильного середовища (табл. 2).

**Таблиця 2 – Вплив модифікації живильних середовищ на біометричні показники рослин за мікроклонування**

Морфологічний показник	Концентрація ІОК, мг/л (B)								
	0,5			1,0			1,5		
	Концентрація 6-БАП, мг/л (C)								
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
<b>Гамборга (A)</b>									
Висота рослин, мм	52	30	27	53	49	50	39	38	23
Приріст біомаси, мг	342	410	250	353	650	608	172	123	252
Маса мікропагона, мг	80	63	50	98	102	97	96	53	74
<b>Мурасіге-Скуга (A)</b>									
Висота рослин, мм	55	26	24	48	44	42	35	33	21
Приріст біомаси, мг	462	554	338	477	878	821	232	166	340
Маса мікропагона, мг	75	68	46	92	94	101	89	50	69
<b>Шенка-Хильдебранта (A)</b>									
Висота рослин, мм	48	23	21	46	38	40	32	28	25
Приріст біомаси, мг	314	378	230	325	598	559	142	113	232
Маса мікропагона, мг	64	50	40	79	81	78	68	43	59
<i>НІР<sub>01</sub> (висота рослин): A – 4; B – 5; C – 5; AB – 8; AC – 6; BC – 6; ABC – 14;</i>									
<i>НІР<sub>01</sub> (приріст біомаси): A – 8; B – 10; C – 6; AB – 13; AC – 11; BC – 15; ABC – 24;</i>									
<i>НІР<sub>01</sub> (маса мікропагона): A – 2; B – 4; C – 2; AB – 3; AC – 5; BC – 4; ABC – 5.</i>									

Істотно вищу висоту клонів зафіксовано на живильному середовищі за прописом Гамборга. Середня висота одного мікропагона у кінці пасажу становила 40 мм. За використання живильних середовищ Мурасіге-Скуга та

Шенка-Хильдебранта цей показник відповідно становив 36 та 33 мм. Доповнення культурального субстрату ІОК концентрацією 0,5–1,0 мг/л і 0,5 мг/л 6-БАП індукувало формування клонів висотою 52–53 мм на середовищі Гамборга, 48–55 мм – на середовищі Мурасіге-Скуга і 46–48 мм – на середовищі Шенка-Хильдебранта.

За мікроклонального розмноження рижію ярого впродовж одного субкультивування утворювались рослинні конгломерати масою від 113 до 878 мг. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга за додавання 1,0 мг/л ІОК і 6-БАП зафіксовано найвищий приріст біомаси. Це дозволило отримати високий коефіцієнт розмноження та формування розвинених регенерантів. За використання культуральних субстратів Шенка-Хильдебранта та Гамборга показники приросту рослинних конгломератів були істотно на 26–31 % нижчими.

За відсутності 6-БАП та підвищених концентрацій ІОК відбувалось пригнічення утворення бічних пагонів, індукування ризогенезу і цвітіння.

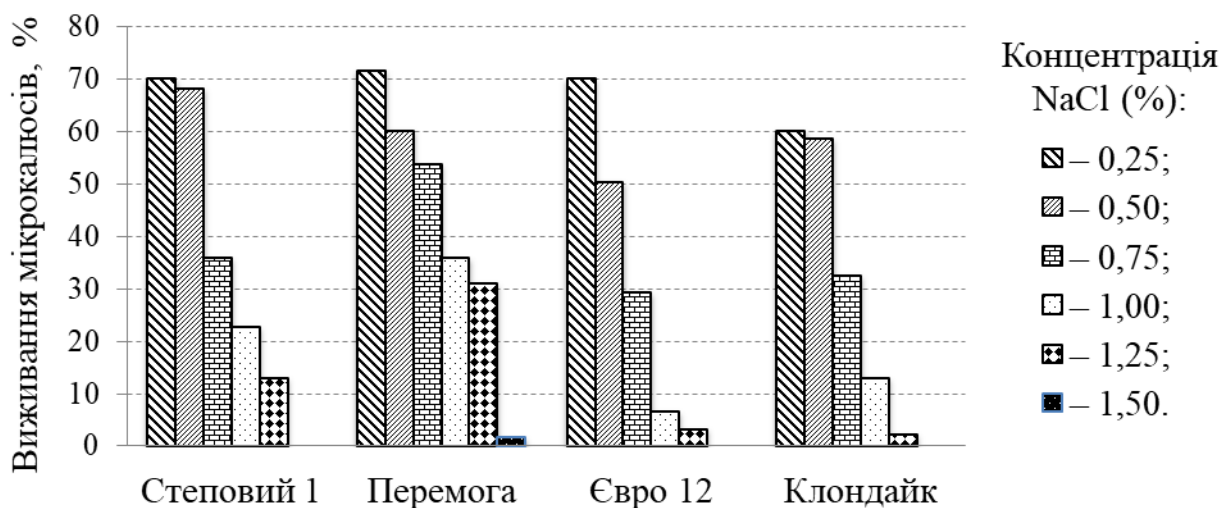
**Цитологічний аналіз отриманого біоматеріалу рижію ярого.** Цитологічний аналіз дав змогу ідентифікувати геномні мутації біоматеріалу рижію ярого в культурі *in vitro*. Калюсна тканина рижію ярого характеризувалась високою генетичною гетерогенністю. Збалансований диплоїдний набір хромосом мали 49,1 % калюсних клітин. Отримані рослини вирізнялись істотною часткою матеріалів зі збалансованим каріотипом. Диплоїдний набір хромосом мали 79,2 % соматичних ембріодів та 76,0 % рослин-регенерантів, отриманих шляхом органогенезу.

Отже, підібрано умови отримання стерильної культури рижію ярого. Модифіковано живильні середовища для індукування та пасажування калюсної тканини, отримання рослин-регенерантів та мікроклонального розмноження рослин. Проведений цитологічний аналіз біоструктур дав змогу виділити диплоїдний матеріал культури для ведення клітинної селекції на стійкість до стресових чинників.

## **КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ РИЖІЮ ЯРОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ**

**Добір *in vitro* стійких до хлориду натрію клітинних ліній рижію ярого.** Для добору солестійких клітинних ліній рижію ярого калюсну тканину з високими морфогенними показниками, отриману з експлантів сортів Степовий 1, Перемога, Євро 12 і Клондайк, було висаджено на живильне середовище з різною концентрацією (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 %) хлориду натрію.

Хлоридне засолення створює сильний стресовий тиск на культуру калюсних тканин рижію ярого, спричиняючи пригнічення ростових показників і регенераційної здатності біоматеріалів. Після чотирьох–п'яти діб культивування матеріалу в умовах засолення відмічено зниження інтенсивності проліферації, потемніння калюсної біомаси, втрату структури та утворення некротичних зон. Надалі фіксували загибель несолестійких тканин (рис. 2).



*НІР<sub>01</sub>: А – 1,0; В – 1,2; АВ – 2,3. А – концентрація у живильному середовищі NaCl; В – сорт-донор експлантів.*

**Рис. 2 Життєздатність калюсу рижію ярого залежно від концентрації хлориду натрію та генотипу вихідного матеріалу**

У середньому за генотипами присутність у живильному середовищі хлориду натрію в концентрації 0,25 % спричинило загибель 28,3–39,7 % мікрокалюсів. За збільшення концентрації селективного агента до 0,5 % виживання біоматеріалів *in vitro* коливалося від 50,5 до 68,3 %. Засолення культурального субстрату на рівні 0,75 % знижувало виживання калюсної тканини до 29,3–53,8 %.

Підвищення концентрації NaCl понад 1,0 % дає змогу провести ранжування генотипів за рівнем солестійкості – збереження життєздатності калюсної тканини, отриманої з експлантів сортів Перемога і Степовий 1, відповідно склав 35,9 і 22,8 %, а сортів Євро 12 і Клондайк – 6,5 і 13,0 %.

Межею солестійкості калюсних тканин сортів Клондайк, Євро 12 і Степовий 1 є 1,25 % рівень засолення, відповідно показники виживання експлантів становили 2,3, 3,3 і 13,0 %. Найсолестійкішим виявився калюс індукований з сорту Перемога. За 1,25 % концентрації солі в живильному середовищі 31,0 % калюсів зберігали життєздатність, а за 1,5 % – лише 1,6 %.

На рівень стійкості генотипів до стресового чинника вказує різниця між приростом біомаси в селективних та оптимальних умовах вирощування. Досліджувані калюси сортів рижію ярого відрізнялись за показниками проліферації калюсної тканини як у контрольному варіанті, так і в стресових умовах культивування (табл. 3).

За мінімального рівня засолення живильного середовища (0,25 %) залежно від вихідного генотипу показники інтенсивності калюсогенезу знижувались на 5,0–17,1 %. Більшість мікрокалюсів характеризувались високими морфогенними показниками.

Підвищення вмісту селективного агента в живильному середовищі до 0,5–0,75 % викликало зниження інтенсивності наростання біомаси на 55,2–85,9 % і зниження регенераційної здатності калюсу.

**Таблиця 3 – Інтенсивність проліферації калюсної тканини рижію ярого залежно від концентрації в живильному середовищі хлориду натрію**

Концентрація NaCl, % (A)	Калюс, отриманий із експлантів сортів (B)							
	Степовий 1		Перемога		Євро 12		Клондайк	
	$\Delta W$	%	$\Delta W$	%	$\Delta W$	%	$\Delta W$	%
0,0	9,2±1,8	100	8,6±1,4	100	3,5±1,2	100	4,0±1,6	100
0,25	8,7±1,4	94,5	7,2±1,3	83,7	2,9±1,1	82,9	3,8±1,1	95,0
0,5	2,7±0,8	29,3	3,1±1,2	38,8	1,7±0,8	48,6	2,9±1,2	72,5
0,75	1,3±0,4	14,1	1,6±0,5	18,6	1,3±0,6	44,8	1,5±0,9	37,5
1,0	1,2±0,1	13,0	1,3±0,3	15,1	0,6±0,4	17,1	0,6±0,3	15,0
1,25	0,7±0,1	7,6	0,9±0,3	10,5	0,2±0,1	6,9	0,2±0,1	5,0
1,5	0,0	0,0	0,3±0,2	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>НІР<sub>01</sub>: A – 0,2; B – 0,2; AB; – 0,5</i>								

*Примітка.*  $\Delta W$  – відносний приріст калюсної тканини

За присутності хлориду натрію в живильному середовищі у концентрації 1,0 % приріст калюсної тканини рижію ярого сортів Степовий 1 і Перемога відповідно становив 1,2 і 1,3 (13,0 і 15,1 % до контролю), а морфогенний потенціал зберігався на задовільному рівні. За такого рівня засолення приріст калюсної біомаси сортів Євро 12 і Клондайк не перевищував 0,6 пункти. Калюс мав низьку регенераційну здатність.

Хлоридне засолення концентрацією 1,25 % викликало істотне пригнічення проліферації (на 89,5–95,0 %) і морфогенних властивостей калюсної тканини рижію ярого. Незначна кількість мікрокалюсів сорту Перемога, хоча і зберігала здатність до проліферації (відносний приріст – 0,3 пункти) за 1,5 % концентрації NaCl, але мали низькі морфогенні показники.

**Індукування морфогенезу солестійких клітинних ліній рижію ярого.** Досліджувані генотипи відрізнялись як за рівнем солестійкості, так і за збереженням здатності до регенерації та морфогенної активності калюсних ліній. У середньому за генотипами в неселективних умовах з одного мікрокалюса формувалось 1,9 рослин-регенерантів. Наявність у живильному середовищі NaCl (1,5 %) знижувало регенераційну активність калюсу рижію ярого на 31,6 %. Найменше зниження відмічено у калюсних ліній сорту Перемога (на 15,8 %), найбільше – у сорту Клондайк (на 43,7 %).

Максимальну кількість рослинних структур отримано з клітинних ліній сорту Перемога (табл. 4). Загалом було індуковано 206 регенерантів, з них 120 рослин на контрольних регенераційних середовищах. Присутність хлориду натрію знижувала отримання рослин на 58,3 % (на селективних регенераційних середовищах отримано 86 мікропагонів). Високі показники індукції рослин-регенерантів з калюсних ліній сорту Перемога пов'язано зі значною кількістю створених солестійких клітинних матеріалів.

Таблиця 4 – Індукція регенерантів з солестійких клітинних ліній рижію ярого

Сорт-донор експланту	Умови проведення регенерації				Всього
	без сольового стресу (контроль)		селективні умови (1,5 % NaCl)		
	шт.	%	шт.	%	шт.
Степовий 1	89	62,7	53	37,3	142
Перемога	120	58,3	86	41,7	206
Євро 12	8	50,0	8	50,0	16
Клондайк	12	70,6	5	29,4	17
Всього	229	60,1	152	39,9	381

Загалом з калюсних ліній рижію ярого, що характеризувалися найвищим рівнем солестійкості (1,5 % концентрація NaCl), отримано 381 регенерант. Присутність у регенераційних середовищах хлориду натрію знижувала частку отримання рослин у середньому за генотипами на 45,4 %.

**Ретестування рослин-регенерантів рижію ярого на стійкість до хлориду натрію.** За проведення добору *in vitro* стійкість до стресу на клітинному рівні не завжди зберігається на рівні цілісної рослини. Тому обов'язковим етапом клітинної селекції є повторне ретестування рослин-регенерантів за максимально допустимої концентрації селективного чинника для виділення резистентних генотипів (табл. 5).

Таблиця 5 – Результати ретестування рослинного матеріалу рижію ярого

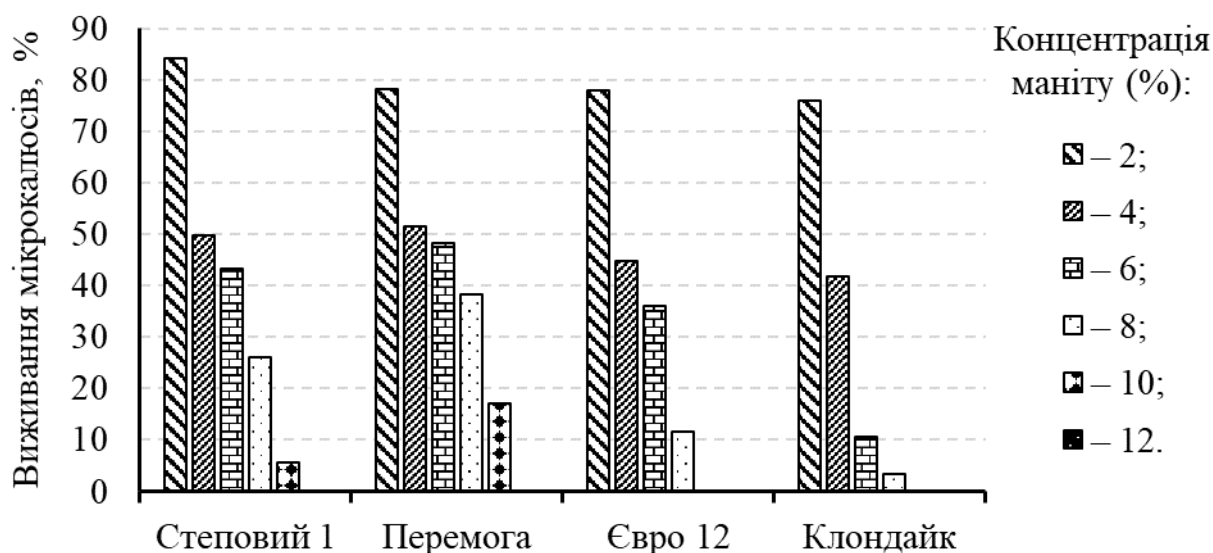
Сорт	Лінії, отримані в контрольних умовах		Лінії, отримані в умовах стресу		Всього ліній	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	34	38,2	47	99,1	81	57,0
Перемога	52	43,3	71	82,6	123	59,7
Євро 12	3	37,5	6	75,0	9	56,3
Клондайк	6	50,0	5	100,0	11	64,7
<i>HIP<sub>01</sub></i>	–	2,4	–	5,0	–	3,3

Загалом 58,8 % отриманих ліній зберігали стійкість до селективного чинника. У матеріалів індуктованих на регенераційних середовищах без стресового агента відсоток збереженості становив 37,5–50,0 %, а отриманих у присутності NaCl – підвищувався до 75,0–100,0 %.

**Вплив маніту на культуру тканин рижію ярого.** Для визначення впливу маніту на калюсну тканину рижію ярого її висаджували на живильне середовище з селективним чинником у концентрації 2, 4, 6, 8, 10 і 12 %.

Присутність у культуральному субстраті маніту в концентрації 2 % залежно від генотипу викликала некроз калюсу на рівні 24,0–15,8 % (рис. 3).





*НІР<sub>01</sub>: А – 1,0; В – 1,2; АВ – 2,3; А – концентрація у живильному середовищі маніту, В – сорт-донор експлантів*

**Рис. 3 Життєздатність калусної тканини рижію ярого залежно від концентрації маніту та генотипу вихідного матеріалу**

Найвищий показник виживання калюсу відмічено у біоматеріалі, отриманого з сорту Степовий 1 (84,2 %). Підвищення вмісту селективного чинника до 4 % спричиняло зниження виживання калусної маси отриманої із сорту Степовий 1 до 49,7 %, Перемога – до 51,6 %, Євро 12 – до 44,8 %, Клондайк – до 41,8 %.

За 6 % концентрації маніту спостерігали суттєві відмінності стійкості генотипів до осмотичного стресу. Найменш стійким був калюс, отриманий з експлантів сорту Клондайк, у якого збереглося 10,5 % тканини. Для інших генотипів виживання біоматеріалів варіювало від 36,0 до 48,2 %. Для класифікації клітинних структур рижію ярого за рівнем стійкості до осмотичного стресу оптимальною концентрацією маніту в живильному середовищі є 8 %. Найвищий показник виживання біоматеріалу відмічено у калюсу сорту Перемога (38,3 %). Для калусної маси сортів Степовий 1, Євро 12 і Клондайк частка матеріалів, що зберігали життєздатність відповідно становила 26,0, 11,6 і 3,4 %.

За 10 % концентрації маніту життєздатність зберігали лише калусні тканини, індуковані з експлантів сортів Степовий 1 і Перемога, у яких частка стійких калусних ліній відповідно становила 5,6 та 17,0 %. Подальше збільшення концентрації селективного чинника виявилось летальним для калюсу всіх генотипів.

Отже, досліджено вплив хлориду натрію та маніту на культуру тканин рижію ярого, проведено ранжування досліджуваних генотипів за рівнем стійкості до стресових чинників та підбрано оптимальні концентрації селективних агентів (1,5 % для хлориду натрію та 8–10 % для маніту) за проведення добору *in vitro*. У ході багатоступеневої клітинної селекції відібрано матеріали з високою солестійкістю на рівні цілісної рослини.

## ОЦІНКА СТВОРЕНИХ СОМАКЛОНАЛЬНИХ ЛІНІЙ РИЖІЮ ЯРОГО В УМОВАХ *EX VITRO*

**Реакція насіннєвого матеріалу соматоклональних ліній рижію ярого на стресові чинники.** Отримані соматоклональні рослинні лінії рижію ярого після мікроклонального розмноження, укорінення й адаптації, перенесли у відкритий ґрунт на дослідні ділянки для отримання насіння. Внаслідок довготривалого культивування біоматеріалу в стресових умовах *in vitro*, значна частина зразків мала низьку життєздатність. Рослини мали нетипову форму та були стерильними. Загалом насіння вдалось отримати з 68 соматоклональних ліній рижію ярого, що становило 30,3 % від загальної кількості біоматеріалу.

Одним із найефективніших способів оцінки генотипів сільськогосподарських культур на стійкість до несприятливих чинників навколишнього середовища є лабораторне тестування насіння і проростків у присутності стресового чинника. Отримані результати дали можливість виділити 24 генотипи (10 ліній отриманих з сорту Степовий 1, дев'ять – з сорту Перемога, два – з сорту Євро 12 та три – з сорту Клондайк) з високою комплексною стійкістю до сольового та осмотичного стресів, які було використано в подальших дослідженнях.

**Біологічна стійкість соматоклональних ліній рижію ярого в умовах *ex vitro*.** За роки досліджень збереженість рослин впродовж вегетації досліджуваних селекційних номерів рижію ярого становила 89,2 %. Найвищу біологічну стійкість (94–96 %) відмічено у соматоклональних ліній С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, П-646-3, П-46-5.

**Аналіз періоду вегетації створених соматоклональних ліній рижію ярого.** Період вегетації створених зразків рижію ярого у 2017 році в середньому складав 91 добу, у 2018 – 80, а у 2019 році – 89 діб.

Згідно Методики проведення експертизи сортів рижію ярого на відмінність, однорідність, стабільність проведено ранжування створених соматоклональних ліній за тривалістю періоду вегетації на: середньостиглі – С-234-8, С-326-9, С-402-6, С-419-6, С-586-7, П-46-2, П-46-5, П-202-6, П-202-7, П-248-8, П-485-4, П-618-6, П-646-3, П-658-8, Є-405-5, Є-405-8, К-478-2, К-480-2, К-480-4; пізньостиглі – С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, С-384-4.

**Морфологічні особливості та продуктивність стійких соматоклональних ліній рижію ярого.** Відібрані під час клітинної селекції соматоклональні рослинні лінії характеризувались індивідуальними морфологічними та біологічними особливостями. Зокрема, висота рослин варіювала від 40 до 72 см, інтенсивність гілкування стебла – 4,9–13,0 гілок, кількість стручків на рослині – 73,3–166,7 шт., кількість насінин в стручку – 8,2–14,2 шт., маса 1000 насінин – 0,8–1,4 г.

Відмічено залежність продуктивності створених соматоклональних рослинних ліній рижію ярого від генетичних особливостей і погодних умов у роки проведення досліджень. Середня врожайність селекційних номерів у 2017 та 2019 була на рівні 2,16 та 2,13 т/га, відповідно (табл. 6).

Таблиця 6 – Урожайність створених соматоклональних ліній рижію ярого, т/га

Лінія	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
С-87-4	1,93	1,80	1,94	1,89
С-87-7	3,07	2,79	3,48	3,11
С-121-2	3,11	3,04	3,35	3,17
С-121-11	3,13	2,25	2,64	2,67
С-234-8	2,86	1,57	2,23	2,22
С-326-9	1,40	1,09	1,52	1,34
С-384-4	1,04	0,89	1,18	1,03
С-402-6	2,23	2,11	2,51	2,28
С-419-6	1,50	1,09	1,32	1,30
С-586-7	1,55	1,33	1,56	1,48
П-46-2	2,03	1,48	1,72	1,74
П-46-5	3,39	3,11	3,50	3,34
П-202-6	1,96	2,19	1,80	1,98
П-202-7	2,04	1,66	1,88	1,86
П-248-8	2,88	2,79	2,85	2,84
П-485-4	2,66	2,39	2,62	2,56
П-618-6	1,63	1,30	1,79	1,58
П-646-3	3,09	2,88	3,31	3,09
П-658-8	1,35	1,30	1,27	1,31
Є-405-5	2,11	1,87	2,20	2,06
Є-405-8	1,98	1,76	2,14	1,96
К-478-2	1,49	1,35	1,63	1,49
К-480-2	2,24	1,33	2,13	1,90
К-480-4	2,35	1,83	2,33	2,17
<i>НІР<sub>05</sub></i>	<i>0,13</i>	<i>0,10</i>	<i>0,12</i>	–

Менш сприятливі погодні умови 2018 року спричинили істотне зниження врожайності в середньому за генотипами на 16,8 %. Урожайність насіння соматоклональних ліній залежно від генотипу варіювала від 0,89 до 3,48 т/га. Найнижчу врожайність відмічено у номера С-384-4, а найвищу – П-46-5. Завдяки високій адаптаційній здатності та індивідуальній насінневій продуктивності стабільно високу врожайність відмічено у генотипів П-46-5 (3,34 т/га), С-121-2 (3,17 т/га), С-87-7 (3,11 т/га) та П-646-3 (3,09 т/га).

Отже, за мікроклонального розмноження на стресових фонах, виділено соматоклональні лінії з комплексною стійкістю до засолення та осмотичного стресу. Проведено оцінку створених генотипів за біологічними та господарсько-цінними ознаками. Для селекційних досліджень виділено зразки рижію ярого (С-87-7, С-121-2, П-46-5 і П-646-3), що поєднують стійкість до селективних чинників та високу насінневу продуктивність. Після розмноження створений матеріал буде передано до Державної науково-технічної експертизи сортів рослин.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що полягає в розробці селекційної технології створення стійкого до засолення й осмотичного стресу вихідного матеріалу рижію ярого за використання в технологічному процесі клітинної селекції *in vitro*.

1. Доведено, що оптимальною схемою стерилізації експлантів рижію ярого є використання 1,0 % розчину перманганату калію за експозиції 10 хвилин. За стерилізації насіння вихід життєздатних експлантів складає 90,6 %, а відносний приріст біомаси – 15,5 одиниць. Для проростків ці показники відповідно становили 82,7 % і 9,2 пункти.

2. Розроблено живильні субстрати для проліферації калюсної тканини рижію ярого та встановлено, що найінтенсивніше калюсогенез проходить на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП.

3. Підібрано живильне середовище для морфогенезу калюсних тканин рижію ярого. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга за виключення 2,4-Д та додавання 6-БАП в концентрації 1,0 мг/л активність морфогенезу становила 75,8 %, а з одного мікрокалюса в середньому регенеровано 6,3 пагона.

4. З'ясовано, що за мікроклонування рослин найвищий коефіцієнт розмноження (9,3) можна отримати на модифікованому 1,0 мг/л ІОК і 6-БАП живильному середовищі Мурасіге-Скуга.

5. Обґрунтовано багатоступеневу схему селекції *in vitro* рижію ярого на стійкість до хлориду натрію, що дає можливість отримати стійкі до негативної дії засолення клітинні лінії та рослини-регенеранти.

6. Доведено можливість використання хлориду натрію, як селективного агента, у доборі *in vitro* солестійких і посухостійких форм рижію ярого. Встановлено, що 1,5 % концентрація хлориду натрію у живильному середовищі є граничною для ведення клітинної селекції рижію ярого.

7. Підтверджено, що довготривале культивування клітинних ліній рижію в умовах сольового стресу хлориду натрію спричиняє зниження регенераційної здатності культури середньому за генотипами на 45,4 %.

8. Доведено, що за переходу з клітинного рівня на рівень цілісної рослини, у 58,8 % досліджуваних генотипів зберігається стійкість до селективного чинника. У матеріалів, індукованих на регенераційних середовищах контролю, стійкість до селективного чинника становить 41,5 %, а отриманих у присутності хлориду натрію – підвищується до 84,9 %.

9. Встановлено, що для добору *in vitro* посухостійких форм рижію ярого до селективного живильного середовища доцільно додавати маніт у концентрації 8–10 %.

10. Створено колекцію соматоклональних рослинних ліній, що характеризуються індивідуальними морфологічними та біологічними показниками: висота рослин – 40–72 см, інтенсивність гілкування стебла – 4,9–13,0 гілок; кількість стручків на рослині – 73,3–166,7 шт.; кількість насінин

у стручку – 8,2–14,2 шт.; маса 1000 насінин – 0,8–1,4 г; період вегетації – 68–95 діб. Отримані матеріали доцільно використовувати донорами генів стійкості до засолення та посухи в селекції на стійкість до дії абіотичних чинників.

11. Виділено високопродуктивні селекційні зразки рижію ярого С-87-7, С-121-2, П-46-5 і П-646-3 з комплексною стійкістю до засолення й осмотичного стресу з урожайністю насіння на рівні 3,0–3,5 т/га.

## РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ

Для використання в прикладних і теоретичних селекційних програмах рекомендується:

- технологію селекційного процесу зі створення стійкого до сольового й осмотичного стресів вихідного матеріалу рижію ярого за використання клітинної селекції;
- регламенти стерилізації експлантів рижію ярого за введення біоматеріалу в культуру *in vitro*;
- спосіб індукування калюсної тканини рижію ярого (патент №136523);
- розроблені модифіковані живильні середовища для отримання, культивування й індукування морфогенезу калюсної тканини та мікроклонального розмноження рослин рижію ярого;
- високопродуктивний вихідний селекційний матеріал рижію ярого з комплексною стійкістю до засолення й осмотичного стресу С-87-7, С-121-2, П-46-5, П-646-3.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України,  
включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин. *Збірник наукових праць УНУС*. 2016. Вип. 88. С. 126–139. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).
2. Любченко А. І., Любченко І. О. Отримання стерильної культури *Camelina sativa* L. *Збірник наукових праць УНУС*. 2017. Вип. 90. С. 197–205. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).
3. Любченко І. О., Любченко А. І., Рябовол Л. О. Модифікація живильних середовищ для індукування калюсогенезу *in vitro* рижію ярого. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2018. № 1 (71). URL: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/10019-21446-1-SM.pdf>. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).
4. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Любченко І. О. Вплив модифікованого живильного середовища на мікроклонування рослин *in vitro* рижію ярого. *Збірник наукових праць УНУС*. 2018. Вип. 92. С. 133–141. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

5. **Любченко І. О.**, Рябовол Л. О., Любченко А. І. Морфогенез солестійких клітинних ліній рижію ярого. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2019. № 2. С. 29–32. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).
6. Любченко А. І., **Любченко І. О.** Аналіз продуктивності рослин соматоклональних ліній рижію ярого. *Збірник наукових праць УНУС*. 2020. Вип. 96. С. 303–319. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

#### **Статті у наукових фахових виданнях України**

7. Рябовол Л., Любченко А., **Любченко І.** Стан біотехнологічних досліджень рижію ярого. *Вісник Львівського національного аграрного університету: Агронімія*. 2018. № 22 (1). С. 13–20. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

#### **Статті у наукових виданнях,**

#### **включених до міжнародної наукометричної бази Web of Science**

8. Liubchenko A., **Liubchenko I.**, Riabovol L., Riabovol Ia., Serzhuk O., Chernov O., Vyshnevskaya L. Analysis of the duration of the vegetation period and phases of development of somaclonal lines of *Camelina sativa*. *Ukrainian journal of ecology*. 2020. Vol 10. Iss. 3. P. 1–5. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

#### **Статті у наукових періодичних зарубіжних виданнях**

9. **Любченко І. А.**, Любченко А. І., Рябовол Л. О. Влияние солевого стресса на каллусогенез рыжика ярого. *Земледелие и защита растений*. 2018. № 3 (118). С. 23–25. (Проаналізовано джерела літератури, отримано експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

#### **Патент на корисну модель**

10. **Любченко І. О.**, Рябовол Л. О., Рябовол Я. С., Любченко А. І., Діордієва І. П. Патент на корисну модель №136523 від 27.08.2019 р. (Україна). Спосіб індукування калусної тканини рижію ярого; Заявл. 22.02.2019; Опубл. 27.08.2019; Бюл. №16. 3 с.

#### **Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

11. Любченко А. І., Рябовол Л. О., **Любченко І. О.** Отримання *in vitro* морфогенної калусної біомаси рижію ярого. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених, присвяченій 170-й річниці заснування Уманського національного університету садівництва. 11–12 березня 2014 року. Умань, 2014. С. 49–50.
12. Любченко А. І., Рябовол Л. О., **Любченко І. О.** Підбір умов для індукції та культивування калусної тканини рижію ярого. Матеріали Міжнародної наукової конференції *Гетерозис: досягнення та проблеми*, присвяченої 110-річчю від дня народження видатного генетика Ю. П. Мірюти. 18–20 березня 2015 року. Умань, 2015. С. 55–56.

13. **Любченко І. О.**, Рябовол Л. О., Любченко А. І. Індукція формування морфогенної калюсної тканини рижію ярого. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції *Інноваційні шляхи розвитку сучасного овочівництва*, присвяченої 140-річчю від дня народження професора С. М. Вуколова та 135-річчю від дня народження академіка В. І. Едельштейна. 23 вересня 2015 року. Умань, 2015. С. 31–33.
14. **Любченко І. О.**, Любченко А. І., Рябовол Л. О. Стерилізація експлантів рижію ярого при введенні в культуру *in vitro*. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції *Актуальні питання сучасної аграрної науки*. 20 листопада 2015 року. Умань, 2015. С. 74–75.
15. **Любченко І. О.**, Рябовол Л. О., Любченко А. І. Отримання культури *in vitro* рижію ярого. Матеріали Міжнародної наукової конференції *Селекційно-генетична наука і освіта*. 16–18 березня 2016 року. Умань, 2016. С. 216–218.
16. **Любченко І. О.**, Любченко А. І. Модифікація живильних середовищ для мікроклонального розмноження рижію ярого. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції *Новітні агротехнології: теорія та практика*, присвяченої 95-річчю Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. 11 липня 2017 року. Київ, 2017. С. 210–211.
17. **Любченко І. О.**, Любченко А. І. Індукція морфогенезу калюсної тканини рижію ярого. Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції *Актуальні питання сучасної аграрної науки*. 15 листопада 2017 року. Умань, 2017. С. 70–71.
18. **Любченко І. О.**, Любченко А. І., Сержук О. П. Характеристика соматоклональних ліній рижію ярого отриманих методами клітинної селекції. Матеріали Міжнародної наукової конференції *Селекційно-генетична наука і освіта*, присвяченій 150-річчю факультету агрономії Уманського національного університету садівництва. 19–21 березня 2018 року. Умань, 2018. С. 153–154.
19. Любченко І. О. Сорти та селекція рижію ярого в Україні. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції *Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі*. 26 червня 2018 року. Умань, 2018. С. 94–97.
20. **Любченко І. О.**, Рябовол Л. О., Любченко А. І. Добір *in vitro* клітинних ліній рижію ярого стійких до осмотичного стресу. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції *Актуальні питання сучасної аграрної науки*, присвячену 150-річчю заснування факультету агрономії Уманського НУС. 15 листопада 2018 року. Умань, 2018. С. 101–103.
21. **Любченко І. О.**, Любченко А. І., Сержук О. П. Перспективи використання енергетичною культурою рижію ярого. Матеріали VII Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції *Екологія – шляхи гармонізації відносин природи та суспільства*, присвяченої 10-річчю створення кафедри екології та безпеки життєдіяльності. 20 жовтня 2018 року. Умань, 2019. С. 44–46.
22. Любченко І. О. Збереження ознаки стійкості до NaCl у соматоклонів рижію ярого при переході з клітинного рівня на рівень цілісної рослини. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих учених і науково-

педагогічних працівників *Підсумки наукової роботи за 2014–2019 рр.*, приуроченої 175-річчю Уманського НУС. 14–15 травня 2019 року Умань, 2019. С. 58–60.

23. Любченко І. О. Морфогенна активність *in vitro* солестійких клітинних ліній рижію ярого. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції *Актуальні питання агротехнологій*. 28 березня 2019 року. Умань, 2019. С. 55–56.

## АНОТАЦІЯ

**Любченко І. О. Створення вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до стресових чинників за використання біотехнологічних методів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво (20 Аграрні науки та продовольство). – Уманський національний університет садівництва. Умань, 2020.

Дисертацію присвячено вирішенню завдання удосконалення технології створення стійкого до засолення та осмотичного стресу вихідного матеріалу рижію ярого за використання в технологічній схемі клітинної селекції.

Розроблено технологію отримання стерильної культури рижію ярого: підібрано умови стерилізації експлантів, модифіковано живильне середовище для індукування, пасажування і морфогенезу калюсної тканини та мікроклонального розмноження рослинного матеріалу.

Встановлено стресовий вплив хлориду натрію та маніту на калюсну тканину рижію ярого і підібрано оптимальні концентрації селективних чинників для проведення добору *in vitro*.

Розроблено та проведено багатоступеневу клітинну селекцію на стійкість до хлориду натрію, що дозволило отримати стійкий до 1,5 % засолення вихідний матеріал.

Доведено можливість збереження ознаки стійкості біоматеріалу за переходу з клітинного рівня на рівень інтактної рослини і показано спадковість стійкості до стресового чинника, що підтверджує генетичну природу змін, які відбуваються за проведення добору *in vitro*.

Встановлено комплексну стійкість солестійких рослинних ліній до осмотичного стресу.

Проведено оцінку отриманих методом клітинної селекції стійких соматоклональних ліній в умовах *ex vitro* за комплексом біологічних та господарсько-цінних ознак. Виділено селекційні зразки (С-87-7, С-121-2, П-46-5 та П-646-3) з високою індивідуальною насінневою продуктивністю, що можуть використовуватись вихідним матеріалом для створення високопродуктивних сортів рижію ярого, стійких до несприятливих чинників навколишнього середовища.

**Ключові слова:** *рижій ярий, вихідний матеріал, засолення, осмотичний стрес, клітинна селекція, калюс, морфогенез, хлорид натрію, маніт, рослина-регенерант.*



## АННОТАЦИЯ

**Любченко И. А. Создание исходного материала рыжика ярового устойчивого к стрессовым факторам при использовании биотехнологических методов. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство (20 Аграрные науки и продовольствие). – Уманский национальный университет садоводства. Умань, 2020.

Диссертация посвящена решению задачи усовершенствования технологии создания устойчивого к засолению и осмотическому стрессу исходного материала рыжика ярового с использованием в технологической схеме клеточной селекции.

Разработана технология получения стерильной культуры рыжика ярового: подобраны условия стерилизации эксплантов, модифицирована питательную среду для индукции, пассажирования и морфогенеза каллусных тканей и микроклонального размножения растительного материала.

Установлено стрессовое воздействие хлорида натрия и маннита на каллусную ткань рыжика ярового и подобраны оптимальные концентрации селективных факторов для проведения отбора *in vitro*.

Разработана и проведена многоступенчатая клеточная селекция на устойчивость к хлориду натрия, что позволило получить устойчивый к 1,5 % засолению исходный материал.

Доказана возможность сохранения признаков устойчивости биоматериала при переходе из клеточного уровня на уровень целостного растения и показана наследственность устойчивости к стрессовому фактору, что подтверждает генетическую природу изменений, которые происходят при проведении отбора *in vitro*.

Установлена параллельная устойчивость солеустойчивых растительных линий к осмотическому стрессу.

Проведена оценка полученных методами клеточной селекции устойчивых соматоклональных линий в условиях *ex vitro* за комплексом биологических и хозяйственно-ценных признаков. Выделены селекционные образцы с высокой индивидуальной семенной продуктивностью, которые могут использоваться в качестве исходного материала для создания высокопродуктивных сортов рыжика ярового, устойчивых к негативным факторам окружающей среды.

**Ключевые слова:** *рыжик яровой, исходный материал, засоление, осмотический стресс, клеточная селекция, каллус, морфогенез, хлорид натрия, маннит, растение-регенерант.*

## ANNOTATION

**Liubchenko I. O. Creation of source material of camelina sativa resistant to stress factors with the use of biotechnological methods. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.**

Thesis for the degree of candidate of agricultural sciences in specialty 06.01.05 – breeding and seed production. (20 Agrarian Sciences and Food) – Uman State University of Horticulture. Uman, 2020.

The dissertation is devoted to the decision of a problem of perfection of technology of creation of a source material of *camelina sativa* resistant to salinity and osmotic stress for use in the technological scheme of cellular selection.

The technology of obtaining a sterile culture of *camelina sativa* has been developed: the conditions for sterilization of explants have been selected, the nutrient medium for induction, passage and morphogenesis of callus tissue and microclonal propagation of plant material has been modified.

The stress effect of sodium chloride and mannitol on the callus tissue of *camelina sativa* was established and the optimal concentrations of selective factors for *in vitro* selection were selected.

Multistage cell selection for resistance to sodium chloride was developed and performed, which allowed to obtain a source material of *camelina sativa* resistant to 1.5% salinity.

The possibility of preserving the trait of biomaterial stability during the transition from cellular to intact plant level is proved and the heredity of resistance to stress factor is shown, which confirms the genetic nature of changes that occur during *in vitro* selection.

The complex resistance of salt-resistant plant lines to osmotic stress has been established.

The evaluation of stable somaclonal lines obtained by cell selection methods in *ex vitro* conditions on the complex of biological and economically valuable features is carried out. Selection samples (C-87-7, C-121-2, II-46-5 and II-646-3) with high individual seed productivity, which can be used as a source material to create high-yielding varieties of *camelina sativa* resistant to adverse environmental factors.

**Key words:** *camelina sativa*, source material, salinity, osmotic stress, cell selection, callus, morphogenesis, sodium chloride, mannitol, regenerating plant.