

УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛЮБЧЕНКО ІННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 631.528-043.83:[633.85-026.564

ДИСЕРТАЦІЯ

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

06.01.05 – селекція і насінництво

20 Аграрні науки та продовольство

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ І. О. Любченко

Науковий керівник – Рябовол Людмила Олегівна,
доктор сільськогосподарських наук, професор

Умань – 2020

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.

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 різноманітних біотехнологічних методів і прийомів, що використовуються в різноманітних схемах, але потребують конкретизації залежно від 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 отримання адаптивних, високопродуктивних, технологічних сортів є актуальним завданням селекції.

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 на стійкість до хлоридного засолення; проаналізувати морфогенні властивості солестійких клітинних ліній 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 в умовах *ex vitro*.

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

Вперше підібрано умови стерилізації експлантів рижію ярого за введення в культуру та встановлено, що найефективнішим методом стерилізації є використання 1,0 % розчину перманганату калію за експозиції 10 хвилин.

Розроблено спосіб індукування калусної тканини для ведення клітинної селекції рижію ярого, підбрано живильне середовище для індукування та культивування калусної 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 калусних 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, отримано високий коефіцієнт мікроклонального розмноження рижію ярого 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 калусну тканину рижію ярого та підбрано оптимальну концентрацію стресових чинників для ведення 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 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 вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до засолення та осмотичного стресу за використання

біотехнологічних методів, що дозволяє істотно скоротити тривалість селекційного процесу створення соматоклональних ліній культури.

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

Практичне значення роботи. 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.

Методами 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 тютюнництва Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН України» (2019 р.) та пройшли виробничу перевірку в ФГ «Поляна Лісова» Уманського району (2019 р.).

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

ANNOTATION

Liubchenko I. O. Creation of source material of camelina sativa resistant to stress factors using biotechnological methods. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of agricultural sciences on a specialty 06.01.05 – selection and seed production (20 Agrarian sciences and food). – Uman National 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.

Negative environmental factors, causing physiological and biochemical changes in the plant body, are the main limiting factors that reduce crop productivity. Growing crops in regions with unfavorable soil and climatic conditions requires adaptive varieties and hybrids. Stress-resistant genotypes maximize the inherent genetic potential, efficiently use the natural resources of the environment and require lower material costs for growing products.

In Ukraine, drought and salinization of soils is one of the main abiotic factors that cause significant damage to agricultural production. They have a similar physiological effect on the plant, causing similar defense mechanisms.

Biotechnological methods are used in the selection process to create a source material resistant to abiotic and biotic stresses. Currently, a number of different biotechnological methods and techniques have been developed, which are used in various schemes, but need to be specified depending on the species and the ultimate goal of the work.

A significant contribution to the development of *camelina sativa* breeding in Ukraine has been made by A. I. Yemets, Yu. N. Boychuk, E. N. Shisha, D. B. Rakhmetov, Ya. B. Blium, V. O. Lyakh, I. B. Komarova, V. V. Rozhkovan, V. M. Moroz and others. However, there are a small number of varieties resistant to abiotic factors, including salinity and drought, in production, which hinders the widespread introduction of the crop.

Creation of the source material of *camelina sativa* resistant to salinity and osmotic stress for involvement in selection process of reception of adaptive, highly productive, technological grades is an actual task of selection.

The aim of the work was to improve the selection process of creating the source material of *camelina sativa* resistant to abiotic factors for use in the technological scheme of cell selection.

To achieve this goal, the following tasks were set: to determine the conditions for sterilization of *camelina sativa* explants for in vitro culture; select a nutrient medium for induction, cultivation and morphogenesis of callus tissue and microclonal propagation of plant material; to investigate the effect of sodium chloride and mannitol on the culture of callus tissues of *camelina sativa*; to select cell lines for resistance to chloride salinity; to analyze the morphogenic properties of salt-resistant cell lines and to obtain regenerating plants; to analyze the created material for resistance to the selective factor during the transition from the cellular level to the level of the intact plant; to evaluate the created somaclonal lines of *camelina sativa* on a complex of biological and economically valuable traits in ex vitro conditions.

The scientific novelty of the obtained results is to improve the selection process of creating the source material of *camelina sativa* resistant to salinity and osmotic stress for use in the technological scheme of cell selection.

For the first time, the conditions for sterilization of *camelina sativa* explants for introduction into culture were selected and it was found that the most effective method of sterilization is the use of 1.0 % potassium permanganate solution at 10 minutes of exposure.

A method of induction of callus tissue for cell selection of *camelina sativa* has been developed, a nutrient medium for induction and cultivation of callus tissue has been selected, the composition of which is a modification of the medium according to Murashige-Skuga according to 0.1 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l 6-BAP (patent №136523).

It is proved that the highest activity of morphogenesis of callus tissues of *camelina sativa* can be obtained on the modified 1.0 mg/l 6-BAP nutrient medium Murashige-Skuga, which allows to induce up to seven shoots from one microcallus.

Nutrient substrate for cloning of camelina sativa plants was selected, a high coefficient of microclonal reproduction of camelina sativa was obtained and it was found that Murashige-Skuga medium with modification of 1.0 mg/l IAA and 6-BAP provides up to nine on average for one passage. shoots.

The influence of sodium chloride and mannitol on the callus tissue of camelina sativa was analyzed and the optimal concentration of stress factors for in vitro selection was selected, parallel resistance of salt-resistant plant lines to osmotic stress was revealed.

The multistage scheme of selection of cell lines resistant to chloride salinity is substantiated, which allows to obtain resistant to 1.5 % salinity source material of camelina sativa.

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

A collection of samples of camelina sativa with complex resistance to chloride and osmotic stress was created for use in the selection process of obtaining high-yielding cultivars.

The technology of obtaining the source material of camelina sativa resistant to salinity and osmotic stress using biotechnological methods has been improved, which allows to significantly reduce the duration of the selection process of creating somaclonal culture lines.

Scientific provisions on improvement and approbation of selection schemes for obtaining the source material of camelina sativa resistant to abiotic environmental factors have been further developed.

The practical significance of the work. The technological scheme of the selection process using multistage selection in vitro to create a stress-resistant source material of camelina sativa has been developed.

A method for inducing callus tissue of camelina sativa for cell culture selection has been developed (patent №136523).

The nutrient medium for induction, passage, morphogenesis and regeneration of plants in the creation of the source material in the selection of *camelina sativa* was selected.

New initial samples (selection numbers C-87-7, C-121-2, П-46-5 and П-646-3) were obtained by cell selection methods, which are characterized by complex resistance to salinity and osmotic stress and are distinguished by a number of economically valuable signs.

Scientific developments of the dissertation are used in basic and applied research of the Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology of Uman National University of Horticulture and the Experimental Station of Tobacco of the National Research Center «Institute of Agriculture of NAAS of Ukraine». and passed a production inspection in farm «Polyana Lisova» of Uman district. Key words: *camelina sativa*, *source material*, *salinity*, *osmotic stress*, *cell selection*, *callus*, *morphogenesis*, *sodium chloride*, *mannitol*, *regenerating plant*.

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: Агрономія*. 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., Cherny 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 И. А.**, Любченко А. И., 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 від дня 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 калусної 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА АБРЕВІАТУР.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ СТІЙКОГО ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ (огляд літератури).....	24
1.1. Перспективи використання біотехнології в генетично- селекційних дослідженнях рослин.....	24
1.2. Культура калюсних тканин – основний тип вихідного матеріалу в клітинній селекції.....	25
1.3. Вплив стресових чинників на рослинний організм і механізми адаптації.....	30
1.4. Використання культури <i>in vitro</i> в адаптивній селекції рослин..	40
1.5. Використання біотехнологічних методів у селекції рижію ярого.....	44
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	69
2.1. Матеріали досліджень <i>in vitro</i>	69
2.2. Умови проведення досліджень	71
2.3. Вирощування <i>ex vitro</i> рослинного матеріалу рижію ярого.....	71
2.4. Методика проведення досліджень.....	75
РОЗДІЛ 3. ІНДУКЦІЯ МОРФОГЕННОЇ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ РИЖІЮ ЯРОГО.....	84
3.1. Стерилізація експлантів рижію ярого за введення в культуру <i>in vitro</i>	84
3.2. Індукування калюсогенезу рижію ярого.....	89
3.3. Морфогенез калюсних тканин рижію ярого.....	94
3.4. Мікроклональне розмноження рослин рижію ярого.....	100

3.5. Цитологічний аналіз отриманого біоматеріалу рижію ярого....	106
РОЗДІЛ 4. КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ РИЖІЮ ЯРОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ.....	116
4.1. Добір <i>in vitro</i> стійких до хлориду натрію клітинних ліній рижію ярого.....	116
4.2. Індукування морфогенезу солестійких клітинних ліній рижію ярого.....	134
4.3. Ретестування рослин-регенерантів рижію ярого на стійкість до хлориду натрію.....	138
4.4. Вплив маніту на культуру тканин рижію ярого.....	143
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА СТОРЕНИХ СОМАКЛОНАЛЬНИХ ЛІНІЙ РИЖІЮ ЯРОГО В УМОВАХ <i>EX VITRO</i>	151
5.1. Реакція насінневого матеріалу соматоклональних ліній рижію ярого на стресові чинники.....	151
5.2. Біологічна стійкість соматоклональних ліній рижію ярого.....	160
5.3. Аналіз періоду вегетації створених соматоклональних ліній рижію ярого.....	164
5.4. Морфологічні особливості та продуктивність соматоклональних ліній рижію ярого.....	169
ВИСНОВКИ.....	182
РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ.....	184
ДОДАТКИ	185

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА АБРЕВІАТУР

Скорочення, аббревіатури	Розшифровка (повна назва)
2,4-Д	2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
6-БАП	6-бензиламінопурин
B ₅	живильне середовище за прописом Гамборга
C ₂ H ₅ OH	етанол
H ₂ O ₂	перекис водню
KMnO ₄	перманганат калію
MS	живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга
NaCl	хлорид натрію
R ₁	рослина-регенерант першого покоління
SH	живильне середовище за прописом Шенка-Хильдебранта
АБК	абсцисова кислота
ВОС-тест	кваліфікаційна експертиза сортів рослин на відмінність, однорідність і стабільність
ГК	гіберелінова кислота
ІМК	β-індолілмасляна кислота
ІОК	індоліл-3-оцтова кислота
ПЕГ	поліетиленгліколь
C ₆ H ₁₄ O ₆	маніт

ВСТУП

Рижій ярий – цінна сільськогосподарська культура, що характеризується невибагливістю до умов вирощування, стійкістю до хвороб і шкідників, високим вмістом цінної олії в насінні. Рижієву олію використовують у харчовій промисловості, медицині, косметології, технічних цілях і як джерело альтернативного виду палива. Біологічні особливості рижію ярого дають можливість його вирощування в різних ґрунтово-кліматичних умовах з високими показниками економічної ефективності, отримувати екологічно чисту продукцію та повністю природній потенціал зони.

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 агроecosистеми 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 калусної тканини та мікроклонального розмноження рослинного матеріалу;
- дослідити вплив хлориду натрію та маніту на культуру калусних 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 підібрано 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. Підібрано 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.

Підібрано 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 підібрано 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.

Методами 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.

РОЗДІЛ 1.
ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ
СТВОРЕННЯ СТІЙКОГО ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ
НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ
(огляд літератури)

1.1. Перспективи використання біотехнології в генетично-селекційних дослідженнях рослин

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, поліпшення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин. Фактично, це вирощування і маніпуляція з клітинами, тканинами і органами поза організмом на штучних живильних середовищах у контрольованих умовах вирощування [1].

У сучасній біотехнології рослин можна виділити три напрямки:

- технології, що ґрунтуються на використанні культур клітин, тканин та органів рослин;
- ДНК-технології (молекулярно-генетичні методи аналізу рослин);
- отримання трансгенних рослин [2].

Застосування культури *in vitro* забезпечує контроль параметрів вирощування біоматеріалу, дає можливість маніпулювати з об'єктами на клітинному та молекулярному рівнях, моделювати стресові фони для добору стійких генотипів, швидко отримувати нові форми рослин з бажаними ознаками. Цього важко досягти за роботи з інтактними рослинами [3].

У селекційно-генетичних дослідженнях і насінницькій практиці біотехнологічні методи найчастіше використовують для: швидкого масового розмноження цінних генотипів у великих кількостях; отримання безвірусного матеріалу; створення банку генетичних ресурсів; вивчення процесів клітинних диференціацій, росту і розвитку рослинного організму, метаболізму та його регуляцію у клітинах і тканинах цілої рослини; створення нових генотипів

сільськогосподарських культур з бажаними господарсько-цінними ознаками [3, 4].

Отже, використання біотехнологічних методів у селекційному процесі дає можливість суттєво інтенсифікувати процес створення нових сортів і гібридів сільськогосподарських культур та підняти його на новий технологічний рівень.

1.2. Культура калюсних тканин – основний тип вихідного матеріалу в клітинній селекції

Селекційний процес сільськогосподарських культур розпочинається зі створення вихідного матеріалу, тобто об'єкту для проведення добору. За проведення біотехнологічних досліджень, залежно від умов і методів виконання та кінцевої мети роботи використовують різні типи вихідного матеріалу: калюсну тканину, суспензійну культуру, культуру ізольованих протопластів, незрілі зародки, поодинокі клітини, незапліднені насіннєві зачатки, пиляки та пилкові зерна тощо [5].

Одним з основних типів рослинного біоматеріалу, що застосовують у дослідженнях *in vitro*, є калюсна тканина. Калюс використовують безпосередньо в роботі або як вихідний матеріал для створення інших об'єктів [2, 3].

Калюс – це неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих клітин, що в подальшому набувають спеціалізації і стають диференційованими [6]. Калюс є аморфною тканиною білуватого або жовтуватого, дуже рідко зеленого кольору, що складається з паренхімних клітин із великими ядрами і відносно товстими клітинними стінками різних розмірів, розміщених хаотично [2, 3].

Калюсна тканина на первинних експлантах утворюється в результаті ділення меристематичних клітин або за рахунок переходу до поділу вакуолізованих клітин паренхіми. Калюсна тканина в природних умовах

утворюється на місці поранення та сприяє загоюванню ран у рослин [7].

Згідно результатів проведених біотехнологічних досліджень вченими встановлено [8–13], що на реалізацію морфогенетичного потенціалу культивованих клітин і тканин впливає низка чинників. Їх можна поділити на дві групи:

- внутрішні – генотипова характеристика виду та сорту рослини-донора, її вік, фізіологічний стан експланту, його тип, розмір і сезонність ізоляції;
- зовнішні – хімічний і гормональний баланс живильного середовища, фізичні умови культивування.

Однією з визначальних умов індукування калусогенезу в стерильних умовах є вміст і співвідношення в живильному середовищі регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи. Ауксини викликають процес дедиференціації клітин, підготовлюючи їх до поділу, а цитокініни – проліферацію дедиференційованих клітин. Концентрація регуляторів росту залежить від видової належності та типу експланту [14, 15].

Вчені у своїх публікаціях вказали [8, 16], що навіть за культивування різних соматичних тканин ізольованих із однієї й тієї ж рослини, в окремих випадках щоразу необхідно корегувати склад живильного середовища. Також відмічено залежність наростання калусної тканини від інтенсивності, тривалості та типу освітлення, температури, газового складу й умов аерації, осмотичного тиску, кислотності живильного середовища та його хімічного складу тощо.

Зокрема, оптимум освітленості для отримання калусних структур у більшості трав'янистих рослин лежить у межах 1000 люкс, тривалість фотоперіоду складає 16 годин. Зміна цих параметрів впливає на ріст і розвиток культури тканин [17, 18].

За визначення оптимального температурного режиму вирощування клітин і тканин *in vitro* необхідно враховувати температурні вимоги, характерні для культивованого виду рослин *in vivo* [19]. Для більшості видів рослин зони помірного клімату температура підтримується в межах 20–25 °С,

а для росту субтропічних культур її оптимум на рівні 29–30 °С [20].

У процесі дедиференціації клітин виникає соматклональна мінливість, що є джерелом генетичного різноманіття калюсних тканин та отриманих з них рослин-регенерантів. При цьому спостерігають зміну кількості та морфології хромосом, точкові мутації, транспозиції генетичних елементів, ампліфікацію генів, зміну експресії в мультигенних локусах та перегрупування цитоплазматичних геномів, соматичний кросинговер тощо. Природа виникнення соматклональної мінливості пояснюється двома основними причинами: генетична гетерогенність соматичних клітин експланта вихідної рослини, генетична й епігенетична мінливість, що індукується умовами культивування [2, 6–10, 21-24].

У роботі Є. Д. Нікітіної, Л. П. Хлебової, Р. Д. Проніної [25] представлено результати оцінки кількісних і якісних ознак соматклонів першого покоління (SC_1), отриманих з культури незрілих зародків від 11 сортів пшениці м'якої ярої різного еколого-географічного походження. Встановлено фенотипові відхилення від батьківських форм у 28,7 % рослин-регенерантів. Серед яких понад 46 % матеріалу формували стерильні колосся або нежиттєздатне зерно, 17 % соматклонів відрізнялися підвищеною кущистістю – утворювалась велика кількість (8–17 пагонів) продуктивних стебел. Зміною забарвлення колоса вирізнялась десята частина отриманих рослин. У рівних частках (6–8 %) зустрічалися регенеранти-карлики, безості форми і рослини з укороченим колосом, що містить скорочені колоски. З мінімальною частотою (3 %) виділено фенотипи із зігнутих стеблом, зміненим забарвленням стебла і скверхедною формою колоса. Частота змінених форм і спектр мінливості були специфічними для регенерантів кожного сорту. Відзначено, що на прояв ознак впливає не лише генотип, але й зміни, що відбуваються на клітинному рівні в процесі культивування *in vitro*. Встановлено суттєві відмінності серед соматклонів, отриманих з одного калюса.

За культивування соматичних тканин в умовах *in vitro* є можливість отримати рослини-сомаклони, що відрізняються певними фенотиповими та генетичними ознаками від батьківських форм. У соматоклональних варіантах спостерігаються зміни моногенних і полігенних ознак [20].

Внаслідок мінливості *in vitro* в рослинах виникають морфологічні, фізіологічні та біохімічні зміни, що можуть мати позитивні та негативні наслідки. У багатьох сільськогосподарських культур виділено соматоклональні варіації, що характеризуються високою продуктивністю, якістю продукції та стійкістю до несприятливих чинників навколишнього середовища тощо [3, 24].

Із калюсної тканини, внаслідок диференціації, в основі якої лежить тотипотентність, може виникнути будь-яка інша тканина, орган рослини або цілісна рослина [20].

У культуральних умовах розрізняють такі типи морфогенезу: органогенез – утворення органів (бруньок, пагонів); гістогенез – утворення калюсними клітинами елементів тканин; ембріодогенез – утворення біполярних (подібних до зародка) соматичних утворень, що містять зачатки головних органів [2].

Здатність вегетативних диференційованих клітин відновлювати цілий організм або його частину залежить від багатьох умов. На регенераційну здатність істотно впливає генотип біоматеріалу. У пшениці виявлено окремі локуси хромосом, у інших видів рослин – гени, що відповідають за виявлення морфогенних властивостей. Цитоплазматичні генні фактори також мають істотний вплив на прояв цих ознак [26].

Відмічено міжвидові та міжсортіві відмінності за ступенем виявлення цієї властивості. Низькою регенераційною здатністю характеризуються бобові та злакові культури [27–31].

Згідно результатів наукових досліджень [1, 20, 32], залежно від походження й умов вирощування, калюсні тканини *in vitro* можуть мати наступні морфогенні характеристики – розпушені, сильно обводнені, що легко

розділяються на окремі дрібні агрегатні клітини. Цей тип калюсу відрізняється своїм швидким ростом і здатністю до тривалого підтримання в культурі *in vitro* за умови регулярного субкультивування. Середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками. Компактні, в яких диференціюють елементи камбію і провідної системи. Калюс цього типу наростає дуже повільно, швидко переходить до регенерації і не здатний до тривалого субкультивування.

До переваг використання калюсної тканини, як об'єкта біотехнологічних досліджень, можна віднести відносну простоту отримання та культивування, можливість одержати рослинні організми з поліпшеними якісними ознаками, стійкими до біотичних та абіотичних стресових чинників навколишнього середовища, з інтенсивним синтезом біологічно-активних речовин [33, 34].

Проте, Є. А. Калашнікова [35], досліджуючи калюсні тканини, відмітила їхні суттєві недоліки – повільний ріст тканини, нерівномірна для всіх клітин дія токсичного селективного чинника, втрата регенераційної здатності калюсних клітин у процесі довготривалого культивування.

Незважаючи на перспективність клітинних технологій, головною проблемою, що виникає за практичного використання культури ізольованих тканин і органів у селекційному процесі, є розробка ефективних прийомів надійного отримання рослин-регенерантів із експлантів різного походження. Способи індукції морфогенезу рослин універсальні лише для загальних закономірностей, тому добре розроблена система регенерації для конкретного генотипу не завжди підходить для інших матеріалів цього і представників інших споріднених видів [20].

Отже, калюсна тканина – один із основних типів вихідного матеріалу для клітинної селекції. Процес калюсогенезу, культивування та морфогенезу калюсної тканини залежить від низки зовнішніх та внутрішніх чинників, оптимальний підбір яких визначає успіх подальшого проведення досліджень.

1.3. Вплив стресових чинників на рослинний організм і механізми адаптації

Абіотичні та біотичні стреси впливають на ріст і розвиток рослинного організму протягом онтогенезу спричиняючи до зворотних і незворотних змін у процесах метаболізму, що спрямовані на набуття стійкості до несприятливих чинників навколишнього природного середовища [36].

Термін «стрес» (від англ. *stress* – напруга) увів Г. Сел'є для опису реакції організму на будь-який сильний несприятливий вплив [37]. Стрес – це сукупність усіх неспецифічних змін, що відбуваються в організмі внаслідок впливу на нього окремих чинників [38]. У відповідь на зовнішні подразники в організмі спостерігають не лише специфічні, а й неспецифічні реакції [37, 39]. Цю реакцію Г. Сел'є [37] назвав «загальним адаптаційним синдромом». Згідно з його вченням відповідні реакції на стресовий вплив у організмів мають вигляд кривої, що включає три фази («тріада Сел'є») – тривоги, адаптації (резистентності) та виснаження.

Вчені [40, 41], доповнюючи оригінальну концепцією Г. Сел'є, виділяють наступні фази реакції рослинного організму на стрес:

- фаза відповіді – реакція тривоги. Характеризується відхиленнями від функціональної норми, зниженням життєздатності й активацією катаболічних процесів у порівнянні з анаболічними;
- фаза відновлення – стадія опору. Безперервна дія стресу, сприяє процесам репарації та адаптації, а також реактивації (розвитку стійкості);
- кінцева фаза – стадія виснаження. Тривала дія стресового тиску під час якого відбувається перевищення адаптаційного порогу, спричиняє хронічне пригнічення або загибель організму;
- регенерація – частково або повністю відновлюються фізіологічні функції рослинного організму після припинення дії на нього стресових чинників.

П. Генкель [42] увів термін «фітострес», як реакцію виключно рослинного організму на несприятливі умови навколишнього середовища.

Розпочинається фітострес з фази реакції, під час якої відбувається гідролітичний розпад речовин. Якщо сила стресу незначна і не досягає граничних значень, можуть відбуватися зворотні процеси, а також формується стійкість до стресу – проходить фаза адаптації. Після припинення дії негативного чинника спостерігається фаза відновлення – повернення початкових функцій організму. Посилення сили стресового чинника до летальної дози спричиняє початок фази пошкодження та відмирання [43].

Такий послідовний прояв усіх етапів адаптаційного синдрому відбувається за тривалого сильного впливу стресових чинників. Якщо ж дія короткочасна та неінтенсивна – можливий дещо позитивніший результат. І навіть навпаки, фізіологічно слабкі стресори можуть індукувати посилення відновних процесів, що спричиняють тривалу неспецифічну стійкість. Фізіологічний стрес спричиняє надлишкову активацію метаболітичних процесів, збільшуючи загальні адаптаційні механізми рослини, і сприяє її адаптації до інших можливих стресових впливів [44 – 46].

Під адаптивною пластичністю вищих рослин розуміють їхню здатність до виживання, розмноження і саморозвитку в мінливих умовах навколишнього середовища за рахунок взаємопов'язаного функціонування генетичних програм адаптації онтогенетичної і філогенетичної систем. Адаптація відображає всі типи впливу з навколишнього середовища на рослину. Критерієм оцінки адаптивної пластичності рослин є їхня стійкість до несприятливих чинників середовища. Пристосування рослин до нових умов відбувається за рахунок модифікаційної та генотипової мінливості, шляхом переробки комплексу фізіолого-біохімічних і морфологічних властивостей організму в онтогенезі з утворенням нових норм реакції в філогенезі [47, 48].

І. В. Косаківська та І. В. Голов'янюк [49] відмітили, що адаптація реалізується на молекулярному, клітинному, органельному, органному, організмовому та популяційному рівнях. Адаптивні зміни проходять впродовж усього еволюційного процесу.

Залежно від тривалості адаптивного процесу можна виділити кілька типів адаптації до зовнішніх умов:

- еволюційна адаптація – найтриваліший процес пристосування до умов навколишнього середовища. Вона реалізується упродовж існування багатьох генерацій і базується на утворенні нової генетичної інформації, що визначає нові адаптивні фенотипові ознаки;
- акліматизація та акламація – процеси пристосування відбуваються впродовж усього життєвого циклу організму і тривають від кількох годин до кількох місяців. Адаптаційні зміни, що спостерігаються в лабораторних умовах у відповідь на експериментальне зменшення або ж збільшення окремих параметрів навколишнього середовища, мають назву акламація, а ті, що відбуваються у природних умовах – акліматизація;
- миттєва адаптація – це пристосувальні процеси у відповідь на зміни навколишнього середовища, що відбуваються практично відразу після дії подразника. На біохімічному рівні миттєва адаптація є проявом особливостей метаболізму;
- компенсаторна адаптація – формування зворотних змін, спрямованих на відновлення до контрольного рівня функціональних можливостей організму;
- експлуатативна адаптація – окремі адаптаційні зміни створюють принципово нові можливості для використання організмом власного природного середовища або ж навіть для експансії в нове. На відміну від компенсаторної, що супроводжується відновленням пристосувальних процесів, експлуатативна адаптація не завжди є необхідною [49].

Рослинні організми в природних і штучних умовах зазнають впливу різноманітних мінливих чинників середовища. До них належать: фізичні – температура, гідратація, світло, радіація, магнітне поле; хімічні – солі, важкі метали, кислотність середовища, газоподібні токсиканти, гербіциди тощо;

біотичні – збудники хвороб, шкідники тощо; механічні – вітер, тиск, пошкодження [50].

Значної шкоди аграрному виробництву завдає дефіцит опадів. Понад 60 % території України знаходиться в умовах нестійкого та недостатнього зволоження [51].

Посуха є одним із найпоширеніших несприятливих абіотичних чинників середовища, з якими рослини стикаються впродовж усього періоду онтогенезу. Території з посушливим кліматом за різними оцінками займають від 35 до 45 % суходолу [52].

Посуха – це тривалий період часу з перевищенням випаровування над опадами, що спричиняє виснаження запасів вологи з ґрунту. Це викликає підвищення осмотичного потенціалу ґрунтового розчину й ускладнює поглинання води рослинами [53].

Посуха негативно впливає на проходження фотосинтезу, транспорт асимілянтів рослиною та гормональний баланс. Спостерігається пошкодження мембран клітини внаслідок зміни ліпідного комплексу, денатурації і агрегації білків, посилюється інтенсивність дихання, зі зниженням його енергетичної ефективності, збільшується концентрація інгібуючих фітогормонів, пригнічується поділ і ріст клітин [54, 55].

Згідно з результатами досліджень механізмів детектування дефіциту вологи в ґрунті та формування адаптивної реакції рослин, саме корені реагують на зміну вмісту води в ґрунті адже детектори водного дефіциту локалізовані в зоні розтягнення кореня [56–63].

У відповідь на дефіцит вологи корені індукують хімічний і гідравлічний сигнали, який транспортується по судинах ксилеми. Регуляцію водного потоку забезпечує градієнт водного потенціалу у системі «ґрунт–корінь–стебло–атмосфера», який є рушійною силою магістральних потоків води у рослинах [64].

М. М. Мусієнко та І. В. Жук [55, 65] встановили, що у формуванні інтегральної відповіді рослини на осмотичний стрес задіяні універсальні

сигнальні системи, зокрема оксид азоту, дія якого тісно пов'язана з активними формами кисню та процесами диференціації і морфогенезу рослин.

О. І. Жук [63] вважає, що в умовах посухи корені індукують хімічний і гідравлічний сигнали.

Хімічний сигнал утворюють фітогормони, рН середовища, неорганічні іони, органічні кислоти, пептиди, низькомолекулярні сполуки. АБК є основним компонентом хімічного сигналу, за зміни умов навколишнього середовища вона індукує замикання продихів і координує ріст рослин. За оптимальних умов вміст АБК у клітинах підтримується на низькому рівні. АБК бере участь у формуванні насіння, регуляції синтезу запасних білків, розвитку ембріона, процесах дозрівання насінини. АБК синтезується в коренях і листках, а за умов посухи її вміст зростає [66, 67]. Абсцизова кислота починає транспортуватись з коренів до пагонів, а далі проходить по ксилемі у формі кон'югатів із глюкозою та іншими цукрами і є стресовим сигналом для рослини [68].

Із зростанням концентрації АБК за дефіциту води змінюється рН ксилемного соку [69]. Сигнальний ефект АБК ослаблюється за лужного середовища й посилюється за кислого [70]. Під час посухи зменшується активність нітратредуктази, накопичуються нітрати, збільшується утворення органічних кислот, особливо малату [71].

Компенсація дефіциту цитокінінів за посухи сприяє стабілізації росту, сповільненню старіння листків і деструкцію пігментного комплексу [54]. У рослині є багато місць синтезу цитокінінів. Вони містяться в ксилемі та флоемі, але їх вважають гормонами кореня, що передають інформацію про стрес до пагона [72]. Цитокініни кореня і пагона відрізняються ізоформами. Різні спектри ізоформ цитокінінів ксилеми і флоєми [73]. Ксилемні цитокініни – це здебільшого зеатини у вигляді транс-зеатинрибозиду, що утворюється в клітинах апекса кореня. Тут ферменти додають до бічного ланцюга ізопентенільних цитокінінів гідроксил у транс-положенні. Рецептор цитокінінів АНК 3 (associated histidine kinase 3) функціонує в клітинах

мезофілу листка і специфічно взаємодіє із зеатинами, що надходять з кореня по ксилемі і реалізують сигнальну функцію цитокинінів [74].

Гідравлічний сигнал формується в умовах посухи, низької вологості повітря, високої інсоляції і температури. Він регулює надходження води та її використання рослиною [75]. Транспорт води і розчинів від кореня до пагона відбувається двома типами первинної ксилеми. У старих коренях дводольних рослин може бути третій тип вторинної ксилеми, який утворюється з камбію, і розвиває провідні судини, що заповнюються водою й розчинами [76]. Аквапоринові водні канали відіграють важливу роль у регуляції водного обміну та гідравлічного опору в кореневій системі. Ними також рухаються малі незаряджені водорозчинні молекули [77–79]. За наявності аквапоринів у мембранах забезпечується висока швидкість потоку води, особливо в критичних за водопостачанням ситуаціях [80].

Загальною реакцією рослин на сигнал кореня про дефіцит води у ґрунті є закривання продихів [60, 81]. S. Wilkinson і W. J. Davies [58] вважають, що рухами продихів керує хімічний сигнал із коренів, адже їх щілина закривається чи звужується раніше, ніж зміниться водний статус листкової пластинки. За зменшення провідності продихів обмежується фотосинтетичний процес [82, 83]. Закривання продихів в умовах посухи погіршує мінеральне живлення рослин через зменшення ксилемної провідності й інтенсивності транспірації [84].

Реакція рослин на дефіцит вологи відбувається за допомогою кількох типів адаптивних стратегій, що регулюють водний статус і фізіологічні функції рослин за допомогою зменшення провідності продихів, листкової поверхні, збільшенням співвідношення «корінь–пагін» [85, 86].

За умов дефіциту води рослини синтезують білки, що підвищують водозатримувальну здатність цитоплазми і підтримують тургорний потенціал клітин [87].

Встановлено [88], що рослини, відчуючи умови жорсткий водний стрес, розпочинають синтез білків з функцією шаперонів, гідрофільних

низькомолекулярних поліпептидів, які підтримують нативність макромолекул і клітинних компартментів.

Отже, можна стверджувати, що адаптивну відповідь рослин на дефіцит вологи стимулюють стресові сигнали, які надходять з кореня ксилемою, формуючи специфічні й неспецифічні системи реакцій, що функціонують на всіх рівнях організації рослинного організму.

У процесі еволюції різні види рослин виробили специфічні пристосування до водного режиму за рахунок анатомічних, морфологічних та фізіолого-біохімічних особливостей. За відношенням до вологозабезпечення рослини поділяють на гідатофіти, гідрофіти, гігрофіти, мезофіти та ксерофіти. Ксерофіти найкраще здатні регулювати водний обмін, тому під час тривалої посухи перебувають в активному стані [89].

Одним із основних чинників деградації ґрунтів є засолення. В Україні засолені ґрунти займають 4,1% від загальної площі земель, з них 1,71 млн га – у сільськогосподарському використанні (рілля – 848,2 тис. га, сіножаті – 325,7, пасовища – 526,1, багаторічні насадження – 10,0 тис. га). Площа слабозасолених ґрунтів становить 1336,6 тис. га, середньозасолених – 224,3, сильнозасолених – 116,3, солончаків – 32,8 тис. га [90, 91].

Засолені ґрунти містять у ґрунтово-вбирному комплексі легкорозчинні солі в кількостях, шкідливих для рослин (понад 0,25 %). Залежно від складу солей у ґрунті розрізняють кілька основних типів засолення: хлоридне – зумовлене надлишковим вмістом у ґрунті хлориду натрію і хлориду магнію (NaCl , MgCl_2); сульфатне – зумовлене нагромадженням сульфату натрію і сульфату магнію (MgSO_4 , CaSO_4 , Na_2SO_4); содове (карбонатне) – пов'язане з наявністю у ґрунті підвищеної кількості гідрокарбонату натрію або інших натрієвих солей (NaHCO_3 , Na_2CO_3) [92].

Шкідливий вплив засолення має комплексний характер зумовлений як порушенням осмотичного балансу клітини, що негативно впливає на водний режим рослин, так і прямим токсичним впливом іонів на фізіологічні та біохімічні процеси в клітині [93, 94].

Внаслідок засолення у рослин збільшується осмотичний потенціал клітинного соку, після чого відбувається накопичення в цитоплазмі гідрофільних осмотичноактивних іонів солей [95]. Зі зміною рівня осмотичного потенціалу в умовах засолення збільшується і проникність протоплазми клітин. Встановлено, що при цьому виділяються кальцій і білки [96]. Одновалентні катіони руйнують зв'язок кальцію із структурними білками клітини, зумовлюючи зміну цитоплазми. За збільшення кальцію в середовищі відновлюється проникність протоплазми клітин [97].

L. Bernstein [98] дав наступну класифікацію стресового впливу солей на рослину:

- токсичний (іонний) стрес – з'являється від надходження в рослину у великих кількостях іонів Na^+ або Cl^- , що безпосередньо впливають на клітинні мембрани і метаболізм у цитозолі, порушуючи поглинання та засвоєння мінеральних елементів;
- осмотичний стрес – зумовлений високими концентраціями солі в ґрунтовому розчині, який порушує здатність клітин коренів поглинати вологу;
- метаболітичний стрес – спричинений заміною іонів K^+ (Ca^{2+} Mg^{2+}) на іони Na^+ або Cl^- .

Первинний фізіологічний вплив сольового стресу спричиняє вторинні зміни в організмі, зокрема, сповільнення розтягування клітин, фотосинтетичної активності, функціонування мембран, пригнічення метаболізму, а також зумовлює розвиток оксидативного стресу [99–101], що в подальшому пригнічує ріст, розвиток і продуктивність рослин [102, 103].

За реакцією на засолення рослини поділяють на групи:

- організми, які не поглинають солі й активно синтезуючі органічні сполуки. Їхня пристосованість забезпечується повільним ростом і підвищенням осмотичного потенціалу клітин;
- організми, які гинуть в умовах засолення внаслідок пригнічення синтезу

органічних сполук;

- організми, які нормально ростуть і розвиваються в умовах надходження солей з ґрунту, завдяки їх компартменталізації у вакуолях, а поглинання солей регулюється на рівні ендодерми, клітини якої добре проникні для води і слабо для іонів Na^+ і Cl^- ;
- організми, які поглинають солі, але не здатні контролювати їх надходження і гинуть [104].

J. Levitt [105] описав три основні механізми адаптації рослин до сольового стресу:

- заборона – рослина не допускає проникнення в тканини стресового чинника;
- толерантність – рослина дає змогу стресору потрапити в клітину, але зменшуючи при цьому його негативний вплив;
- стійкість – стресовий чинник проникає в клітину, впливаючи на неї, але рослинний організм не дає виявити фізичні та хімічні зміни.

За стійкістю до засолення розрізняють такі екологічні групи рослин як галофіти та глікофіти. Галофіти – види, які переносять досить великі концентрації солей, завдяки чому є пануючими за таких умов. Глікофіти – рослини, осмотичний тиск клітинного соку яких зумовлений не солями, а органічними речовинами, зокрема вуглеводами. Це соленепроникні рослини, цитоплазма яких погано проникна для солей. Більшість сільськогосподарських рослин є глікофітами [106].

Стійкість галофітів до соляного стресу забезпечується різними чинниками. Зокрема, здібністю коренів акумулювати або виділяти певні іони [107], контролювати поглинання і транспортування іонів у пагін [108], селективне ксилемне транспортування в інші частини рослини [109], накопичувати іони за осмотичної адаптації [110], компартменталізувати іони у клітині [108], накопичувати розчинні органічні речовини [111] тощо. Накопичення осмолітів забезпечує внутрішню регуляцію осмотичного

потенціалу та спричиняє збільшення поглинання води корінням. У глікофітів рівень стійкості до засолення індивідуальний для кожного виду [112]. Серед культурних рослин практично всі види є глікофітами [97].

Більшість науковців вказують на три основні способи захисту рослини від сольового стресу: «осмотичний захист» [95, 113–117], «вакуольний захист» [118, 119] і «мембранний захист» [120, 121]. Тільки об'єднання всіх трьох варіантів захисту від стресової ситуації дозволяє клітині проявити максимальну резистентність до впливу солей [119, 122]. Але, незважаючи на ці способи захисту, підвищена концентрація солей викликає в рослинних організмах сильний стрес.

Оцінюючи рівень солестійкості сільськогосподарських культур, розділяють дві ланки – біологічну й агрономічну.

Біологічна солестійкість – межа засолення, за якої рослина здатна завершити свій життєвий цикл розвитку і сформувати життєздатне насіння. Вище цієї межі рослина гине або дає недорозвинуте насіння.

Агрономічна солестійкість вказує на скільки сорт чи вид знижує свою продуктивність за певних умов засолення порівняно з його врожайністю без засолення [48, 120, 123].

Встановлено, що стійкість до засолення різних сільськогосподарських культур і сортів змінюється в процесі онтогенезу. При цьому на ранніх етапах онтогенезу, а також в період формування репродуктивних органів, рослина характеризується найнижчою солестійкістю, що визначає перевагу використання цих етапів для відбору стійких форм [124].

Отже, стійкість до негативних чинників навколишнього природного середовища це результат сукупної дії низки захисних механізмів, зумовлених швидкістю проходження в клітині адаптивних фізіолого-біохімічних і морфо-анатомічних реакцій та багатовекторністю шляхів реалізації онтогенетичного розвитку рослинного організму.

1.4. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин

Одним із важливих напрямів сучасної біотехнології рослин, що отримав широке практичне застосування в селекційно-генетичних дослідженнях, є клітинна селекція *in vitro*. Клітинна селекція – це метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітинних ліній і соматоклональних варіацій за селективних умов *in vitro*. Клітинна селекція є розвитком мутаційної селекції, але реалізується на рівні поодиноких клітин із застосуванням прийомів *in vitro*, що дає їй, з одного боку, широкі можливості добору, а з іншого – створює певні труднощі пов'язані необхідністю регенерації цілісних рослин з окремих клітин і тканинних структур [2, 5].

Порівняно з традиційними методами, застосування клітинної селекції *in vitro* дає низку незаперечних переваг: можливість повного контролю вирощування біоматеріалу незалежно від умов навколишнього середовища; економія експериментальних площ і можливістю працювати з великою кількістю генотипів; швидкий прояв маркерних ознак і скринінг селекційного матеріалу; скорочення часу на виведення рослинних форм з бажаними ознаками [125-128].

Незважаючи на перспективність селекції на клітинному рівні, широке її використання сповільнюють певні труднощі, серед яких можна виділити наступні: внаслідок довготривалого стресового впливу спостерігається низький рівень або відсутність регенерації рослин зі стійких клітинних культур; не завжди зберігається прояв селективної ознаки та його ступінь за переходу з клітинного на рослинний рівень; господарсько-цінні ознаки рослин-регенерантів часто можуть бути зчеплені з небажаними; генетична нестабільність у культурі та можливі порушення геному; через епігенетичний контроль, відселектовані ознаки можуть не зберігатися в поколіннях [5, 129-134].

В. А. Висоцький [135] зазначає, що недостатнє використання в селекційному процесі соматоклональної мінливості та добору *in vitro* пов'язано з

труднощами ідентифікації спадкової природи отриманих змінених генотипів, різною поведінкою тканин в культуральних умовах та інтактних рослин *ex vitro*.

Нині існують дані наукової літератури щодо отримання біотехнологічними методами рослинних генотипів стійких до негативних біотичних та абіотичних чинників навколишнього середовища.

За використання культуральних фільтратів патогена або його токсинів виділено стійкі соматональні форми картоплі до фузаріозу [136, 137], пшениці – до борошнистої роси, бурої іржі й офіобольозу [138, 139], гороху – до кореневих гнилей, листостеблових плямистостей, аскохітозу й іржі [140, 141], перцю солодкого – до фузаріозного в'янення [142], огірків – до фузаріозу [143]. Створенні генотипи включено у процес виведення імунних сортів сільськогосподарських культур.

Значна частка наукових досліджень *in vitro* присвячена одержанню генотипів стійких до негативних абіотичних чинників, зокрема: цикорію – до дії іонів барію [144], гречки – іонів міді і цинку [145], огірків – іонів міді і цинку [146], вейгели квітучої – іонів міді [147], ячменю – до дії іонів алюмінію [148] тощо.

Вивчення впливу осмотичного та сольового стресу *in vitro* застосовують як у практичних цілях для створення резистентного селекційного матеріалу, так і для вирішення теоретичних завдань – дослідження впливу стресових чинників на біооб'єкт і механізму виникнення фізіологічної та біохімічної стійкості [149].

За проведення добору *in vitro* на стійкість до засолення найчастіше використовують солі NaCl та Na₂SO₄, рідше MgCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃ і CaSO₄ [150].

Спостерігається суттєвий поліморфізм стійкості рослин на міжвидовому та міжсорттовому рівнях у співвідношенні засолення сульфатом або хлоридом натрію. Саме тому термін «солестійкість», зазвичай, застосовують до хлоридо-сульфато-натрієвого засолення [151]. Н. В. Єлісеєва [152] встановила, що

фізіологічні процеси солестійкості рослин лежать у межах осмотичного тиску 0,3–1,8 мПа, що відповідає концентрації хлориду натрію 0,42–2,52 %.

У роботах Л. О. Рябовол та А. І. Любченка [153] встановлено, що відсоток виживання калюсної тканини цикорію коренеплідного, залежить від типу та концентрації солі в середовищі. Сульфатне засолення виявилось токсичнішим, аніж хлоридне. Граничною межею для проведення добору *in vitro* був 1,5 % рівень засолення живильного субстрату.

Для відбору *in vitro* солестійких калюсів рослини костриці червоної та мітлиці пагононосною культивували протягом двох пасажів на середовищах MS з додаванням 1,0 або 2,0 % NaCl. Регенерацію і вкорінення клонів також проводили на середовищах у присутності селективного чинника. У більшості зразків цих видів ознака солестійкості реалізувалась на рівні цілої рослини [154].

Одним із шляхів підвищення солестійкості рослин є трансформація генами різних іонних транспортерів, зокрема генами вакуолярного NHX-антипортера. Вчені [155] ввели ген вакуолярного NHX-антипортера ячменю HvNHX3 в рослини картоплі сортів Ювілей Жукова і Скороплідний-7. Для трансформації сконструювали бінарний вектор pCambia-HvNHX3, що несе ген HvNHX3 і маркерний ген стійкості до канаміцину *nptII*. На відміну від нетрансформованих рослин, трансгенні рослини сорту Скороплідний-7 укорінювались і розвивались у присутності 100 мМ NaCl, що вказує на високий рівень їхньої солестійкості.

І. А. Бугара та Е. А. Юнусова [156] показали можливість використання методу прямої клітинної селекції для відбору калюсних тканин *Glycine max* L., стійких до осмотичного стресу. На основі цитологічних досліджень відібрано морфогенні калюси сої, що культивували на живильних середовищах з різним вмістом NaCl. Ступеневе підвищення концентрації хлориду натрію сприяло збільшенню інтенсивності проліферації калюсних тканин.

За дослідження впливу різних концентрацій NaCl (0,25–2,0 %) на розвиток різних видів міскантусу в умовах *in vitro*, визначено зміни у ростових

процесах, вмісту хлорофілу, інтенсивності накопичення сухої речовини мікророслинами та їх здатності до вкорінення. Виділено селекційні зразки (*M. giganteus*, *M. sinensis*, *M. Sinensis Late*, *M. Sinensis Early*, *M. sinensis Silberspinne*), що характеризувались підвищеним рівнем толерантності до сольового стресу [157].

Для імітації *in vitro* стресового ефекту посухи застосовують доповнені осмотичноактивними речовинами живильні середовища. Здатність знижувати зовнішній водний потенціал мають поліетиленгліколь, маніт, осмотин сорбітол, сахароза або ксилоза [127].

Н. О. Єгоровою [158] розроблено спосіб отримання *in vitro* форм шавлії, стійких до осмотичного стресу. Експлантами використовували зрілі зародки сортів та сортозразків культурного виду *Salvia sclarea*. Для створення селективного фону живильне середовище доповнювали NaCl або манітом у концентраціях 0,7–1,0 та 4,0–8,0 % відповідно. Відбір розвинених проростків проводили впродовж 1,5–2 місяців культивування.

Методом прямого добору проведено скринінг *in vitro* гібридів F₂ пшениці м'якої та твердої ярої на стійкість до водного дефіциту за використання у якості стресового чинника маніту. Збільшення концентрації маніту з 0,2 до 0,8 М у всіх генотипів викликало пригнічення росту калюсної тканини. Встановлено, що концентрація 0,6 М маніту дозволяє диференціювати генотипи пшениці ярої за стійкістю до водного дефіциту. Найбільшою стійкістю до осмотичного стресу характеризувався гібрид F₂ Елегія миронівська / Краса Полісся [159].

За ведення клітинної селекції є кілька прийомів відбору стійких генотипів – жорсткий, м'який і ступеневий. Основою жорсткої селекції є застосування сублетальних концентрацій стресового чинника та багаторазового субкультивування в селекційних умовах. Для м'якої селекції застосовують адаптивні дози селективного чинника впродовж трьох–чотирьох пасажів. Суть ступеневої селекції полягає в поступовому збільшенні концентрації стресового агента та чергуванні культивування клітин у

селективних і неселективних умовах. Під час жорсткої та ступеневої селекції спостерігається повніша елімінація чутливих клітин, але при цьому важко отримати рослини-регенеранти. Клони, створені у результаті м'якого добору, не завжди зберігають маркерні ознаки клітинних ліній на рівні цілісної рослини [125].

Отже, незважаючи на окремі труднощі, клітинна селекція *in vitro* є перспективним методом створення стійкого до негативних чинників навколишнього середовища вихідного селекційного матеріалу, використання якого дає можливість прискорити процес створення адаптивних сортів і гібридів сільськогосподарських культур.

1.5. Використання біотехнологічних методів у селекції рижю ярого

Серед олійних сільськогосподарських культур особливої уваги заслуговує рижій ярий. Його насіння містить 40–45 % олії, що широко використовується в різних галузях – вживається в їжу, є сировиною для виробництва оліфи, лаків, фарб та пластмаси [37, 160].

Рижієва олія характеризується високим вмістом олеїнової (біля 16 %), лінолевої (до 20 %), ліноленової (до 35 %) жирних кислот і низьким вмістом ерукової кислоти (1,6–2,2 %). Вона має збалансований комплекс натуральних антиоксидантів і біологічно активних речовин, лікувальні та дієтичні властивості. Вживання цієї олії відновлює стійкість і еластичність кровоносних судин, знижує рівень холестерину в крові, нормалізує артеріальний тиск, запобігає порушенню жирового обміну та виникненню запальних процесів. Її рекомендовано при серцево-судинних захворюваннях і цукровому діабеті [49, 47].

Завдяки високій калорійності фітомаси (вміст енергії в насінні, олії та соломі, становив відповідно 26,4, 38,2 та 17,7 Дж/г) рижій може використовуватися як енергетична культура [48]. Його олія є цінною сировиною для виробництва біодизелю й авіаційного палива [2, 161].

Короткий період вегетації, стійкість до хвороб і шкідників, невибагливість до умов вирощування роблять технологію виробництва рижію ярого нескладною, дешевою й екологічно чистою [37, 160].

Незважаючи на цінність рижію, площі під цією культурою залишаються незначними. Однією з причин цього є недостатня селекційна робота. Так, на 2019 рік до Державного реєстру сортів, придатних до поширення в Україні внесено дев'ять сортів рижію ярого. Оригінаторами п'яти з них (Степовий 1, Славутич, Зевс, Престиж та Міраж) є Інститут олійних культур НААН. Сорти Клондайк і Гірський було створено у ННЦ «Інститут землеробства НААН» і Івано-Франківському інституті агропромислового виробництва УААН відповідно. У 2015 році було районовано сорти Євро 12 та Перемога, авторами яких є колектив Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України [162]. Для інтенсифікації селекційного процесу доцільним є використання біотехнологічних методів.

Перші повідомлення щодо особливостей культивування *in vitro* рижію ярого зроблено дослідниками SCRI (Великобританія) і Познанського природничого університету (Польща). Ними було розроблено систему регенерації *in vitro* пагонів з листових експлантів. Доведено, що для ефективного проходження процесу пагоноутворення необхідною умовою є наявність у живильному середовищі регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи. За комбінації 0,54 мкМ НОК та 4,44 мкМ 6-БАП отримано найвищий показник регенерації – 10 пагонів на одному експланті. На живильних субстратах, що містили лише ауксини, розвиток експлантів проходив або шляхом калюсогенезу, або ризогенезу [163]. Досліджено залежність шляхів розвитку експлантів (фрагменти гіпокотилля) сорту Боровський в стерильній культурі від концентрації та співвідношення регуляторів росту. Найінтенсивніше індукування калюсогенезу спостерігали на середовищі Мурасіге-Скуга доповненому 2,4-Д в концентрації 1,0 мг/л. Наростання калюсної тканини спостерігали вже через 5–8 діб культивування. Показник ефективності калюсогенезу був на високому рівні, на окремих

мікрокалюсах спостерігали утворення меристематичних осередків. Для регенерації пагонів живильні середовища рекомендовано модифікувати 2,0 мг/л НОК, 3,0 мг/л 6-БАП і 2,0 мг/л кінетину. У цьому варіанті в 72 % експлантів спостерігали морфогенез, у середньому з одного експланта формувалось 7,3 мікропагони [164].

Окремі дослідження було спрямовано на виявлення впливу абсцисової кислоти (АБК) на регенерацію *in vitro* рослин рижію. АБК викликала інгібуючу дію на калюсну тканину, пригнічуючи показники проліферації на 70–90 %, залежно від вмісту в живильному середовищі фітогормону. Концентрація 3,0 мг/л АБК викликала майже повний некроз експлантів. Проте за невисокої концентрації (0,3 мг/л) абсцисової кислоти спостерігали найвищу регенераційну активність – проходження соматичного ембріодогенезу відмічено у 53 % експлантів [165].

Т. Łuczkiwicz зі співавторами [166] провели аналіз шести генотипів рижію ярого та їхніх гібридних комбінацій за діалельних схрещувань щодо здатності морфогенезу в культуральних умовах. Було виявлено, що регенерація рослин проходила за непрямого органогенезу. Після восьми тижнів пасажування на регенераційних середовищах, залежно від походження, з одного мікрокалюса формувалось від 2,8 до 5,8 мікропагонів. Регенеровані рослинні лінії характеризувались індивідуальними морфологічними та біометричними показниками, що могло бути зумовлено соматональною варіабельністю чи епігенетичною мінливістю.

В Інституті біотехнології рослин Національної дослідницької ради Канади [167] розроблено технологію використання культури мікроспор *in vitro* для отримання гаплоїдних матеріалів рижію ярого. Мікроспори було виділено та висаджено на середовище В₅. Культивування проводилось у темних умовах за температурного режиму 24 °С на живильному середовищі NLN з додаванням 12,5 % сахарози та 12,5 % ПЕГ 4000. Найвищий показник ембріодогенезу складав 38 регенерантів на 100 тис. мікроспор. Отриманні гаплоїдні структури використовували в подальшому селекційному процесі.

Рижій, завдяки своїм біологічним особливостям, залучають до схем парасексуальної гібридизації *in vitro* для генетичного покращення інших представників родини капустяних, зокрема для підвищення стійкості до хвороб і шкідників. Наприклад, для надання гірчиці абіссінській стійкості до альтернاریозу застосовували метод хімічного злиття ізольованих протопластів. Середня частка формування гетерокаріонів склала 6,8 %. З гібридного мікрокалюса вдалось отримати регенеранти, гібридність яких було підтверджено морфологічним і цитологічним аналізами. Рослини-регенеранти проявляли здатність до пасажування *in vitro*, проте вкорінення біоматеріалу провести не вдалося [168]. Всі вегетативні гібриди *Camelina sativa* + *Brassica oleracea* мали проміжні характеристики між вихідними видами. Два регенеранти з протестованих характеризувалися підвищеною стійкістю до *Alternaria brassicicola*. Після вкорінення матеріал вирощували у відкритому ґрунті протягом 4–5 тижнів. Окремі рослини формували стерильні квіти [169].

За допомогою електрозлиття було отримано міжвидові соматичні гібриди *Brassica napus* + *Camelina sativa*. В якості експлантів використовували ізольовані протопласти. Гібридну ідентичність регенерантів визначали за використання проточної ДНК-цитометрії та SSR-маркерного аналізу. В ході проведених досліджень виділено три гібридних регенеранти, що порівняно з вихідними батьківськими формами вирізнялись проміжними морфологічними характеристиками. Насіння створених гібридних зразків мало покращений жирно-кислотний склад, зокрема підвищений вміст ліноленової кислоти [170].

Зафіксовано дані [171] про проведення клітинної селекції рижію ярого на стійкість до негативних чинників навколишнього середовища. Вивчалась можливість використання рижію для проведення фітомеліорації забруднених іонами важких металів ґрунтів. Для цього досліджували вплив полютантів на ріст і розвиток рослин рижію в умовах *in vitro*. Критична концентрація стресового чинника для росту рослин вважається 50 μM Cd, 500 μM Pb, 500 μM Zn і 100 μM Co. Було виділено генотипи з надвисокою експресією гена CsHMA3, що демонстрували підвищену стійкість до негативної дії іонів важких

металів. Трансгенні лінії рижію ярого вирізнялись ширшою формою листків за відношенням до рослин дикого типу внаслідок індукції генів, пов'язаних із зростанням ширини листкової пластини. Порівняно з вихідним сортом вони показали вищу насінневу продуктивність під впливом стресових навантажень.

Для визначення впливу засолення та добору солестійких форм рижію ярого проводилась клітинна селекція *in vitro*. Культуру проростків вирощували на селективному середовищі Мурасіге-Скуга до якого додавали NaCl у концентраціях від 0 до 200 мМ з кроком 25 мМ. Стійкість біоматеріалу визначали за параметрами росту, фізіологічними та біохімічними показниками. Концентрація хлориду натрію 200 мМ викликала затримку проростання, формування сім'ядолей, утворення першого справжнього листка на 30,6, 17,3 і 28,8 % відповідно контролю (без внесення NaCl). Також відмічено зниження висоти рослин, вмісту води в тканинах та вмісту хлорофілу на 85,4, 10,8 та 81,3 % відповідно [172].

Останнім часом *Camelina sativa* L. став об'єктом досліджень генетичної інженерії. У 2006 році розшифровано його генетичну карту за використання ДНК-маркерів поліморфізму довжини ампліфікованого фрагменту (AFLP) у популяції рекомбінантних інбредних ліній отриманих з гібридної популяції фенотипово різних сортів Lindo і Licalla. Було виявлено локалізацію локусів кількісних ознак, що відповідають за висоту рослин, насінневу продуктивність, вміст олії у насінні та інші господарсько-цінні характеристики. Генетичний аналіз показав мономорфні продукти ампліфікації, що свідчить про часткову гомологію геному *Camelina sativa* L. з іншими видами *Brassicaceae* [173].

Вивчаючи генетичний контроль біосинтезу жирних кислот у рижію, було виявлено три ізольовані копії FAD2, FAE1 інтергенної зони KCS17-FAE, три виражені гаплотипи спостерігаються для шести передбачених однокопійних генів. Цитометричний аналіз показав втричі більший вміст ДНК у *Camelina sativa* L. порівняно з дикими представниками цього роду. Все це вказує на поліплоїдну природу виду. Філогенетичний аналіз підтверджує можливість дублювання геному та аллогексаплоїдне походження

Camelina sativa L. [174].

Для трансформації рижію, уникаючи труднощів, що виникають за використання культури *in vitro*, було розроблено метод *in planta*, який передбачає агробактеріальну інокуляцію рослин на ранніх стадіях цвітіння. Ефективність методу становить 0,8 %. Генетичний аналіз показав, що більшість трансгенних рослин містять одну копію трансгена. Насіння генетично змінених форм рижію містить високий вміст рицинолевої кислоти [175]. Підвищити ефективність проведення генетичної трансформації можна за рахунок вакуумної інфільтрації. Бактеріальну інокуляцію рослини проводять у вакуумних ексікаторах протягом 5 хвилин за тиску 85 кПа. Застосовуючи цей метод, можна отримати понад 1 % трансгенного насіння. Використання флуоресцентних білків (DsRed) в якості візуальних маркерів дозволяє легко ідентифікувати трансгенні матеріали. При цьому генетичний аналіз показав, що більшість рослин містять одну копію трансгену. Також було виділено генотипи зі зміненим жирокислотним складом олії в насінні [176].

Вченими Інституту харчової біотехнології та геноміки НАНУ та Національного ботанічного саду ім. Н. Н. Гришка [177] розроблено технологію введення біоматеріалу в культуру *in vitro*. Визначено склад живильного середовища та концентрацію регуляторів росту, вивчено вплив типу і віку експлантів на індукцію утворення пагонів рижію ярого, а також встановлено концентрацію НОК, що викликає ризогенез в отриманих пагонів. Розроблено метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рижію за використання бінарного вектора pGH217, що несе ген-репортер β -глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки капусти цвітної і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину.

Групою дослідників з наукових центрів Гонконгу [178] методами генетичної трансформації було отримано лінії рижію зі зміною експресії генів, що кодують вуглецевий метаболізм. Підвищена активність гена *AtPAP2* сприяла стимулюванню активності фотосинтезу та пришвидшенню руху вуглеводів

транспортною системою рослин. Порівняно з рослинами дикого типу одержані трансгенні лінії характеризувались подовженими гіпокотиллями, раннім цвітінням, підвищеною насінневою продуктивністю та розмірами насінин. Внаслідок вказаних морфологічних змін урожайність створених генотипів підвищувалась на 50–110 % відносно вихідного сорту.

Отже, для інтенсифікації різноманітних напрямків селекційно-генетичних досліджень створення вихідних матеріалів рижію ярого доцільно використовувати біотехнологічні методи, широке впровадження яких у селекційному процесі вимагає розробки нових технологічних схем та підходів для вирішення конкретних завдань.

Висновки до розділу 1

1. Аналіз наукової літератури підтверджує ефективність застосування біотехнологічних методів у селекційному процесі створення вихідного матеріалу та адаптивній селекції рослин.
2. Різноманітність впливу стресових чинників навколишнього середовища та механізмів адаптації рослинних організмів зумовлює необхідність розробок нових і удосконалення існуючих методів добору *in vitro*. Особливість культивування біоматеріалу *in vitro* та проведення скринінгу на клітинному рівні залежить від генотипових особливостей, типу експланту, особливостей стресового чинника та кінцевої мети роботи.
3. Для рижію ярого ці питання остаточно не з'ясовані, а тому є актуальним, що спонукало нас до проведення досліджень з метою створення стійкого до стресових чинників засолення та посухи вихідного матеріалу за використання клітинної селекції.

За матеріалами розділу опубліковано чотири наукові праці [179–182].

Список джерел літератури за розділом 1

1. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Київ: Київський університет, 2005. 114 с.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.

3. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. *Комаровские чтения*. 2007. Вип. LV. С. 184–211.
4. Плаксина Т. В., Пищева Г. Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений. *Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН*, 2014, № 12. С. 22–30.
5. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.
6. Цыренов В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие. Улан-Удэ: Издательство ВСГТУ, 2003. 58 с.
7. Гамбург К. З., Рекославская Н. И., Швецова С. Г. Ауксины в культуре тканей и клеток растений. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1990. 243 с.
8. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. Москва: Наука, 1983. 96 с.
9. Бутенко Р. Г., Джердеманиев Ж. К., Гаврилова Н. Ф. Регенерация растений из каллусных тканей, полученных из разных органов сортов озимой пшеницы. *Физиология растений*. 1986. Т. 33. № 5. С. 837–842.
10. Дорсиев Л., Балканджиева Ю., Стенева М. Зависимость каллусогенеза и регенерации озимого ячменя от генотипа, пloidности и содержания 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в питательной среде. *Биология культивируемых клеток и битехнология растений*. Москва: Наука, 1991. С. 243–246.
11. Диас С., Долгих Ю. И., Шевелуха В. С. Взаимодействие генетической и физиологической регуляции морфогенеза в культуре тканей кукурузы *in vitro*. Материалы II Российского симпозиума *Новые методы биотехнологии растений*. Пущино, 1993. Т. 33. № 5. С. 837–842.
12. Орлов П. А. Темпы развития морфогенных структур в культуре пыльников пшеницы в зависимости от генотипа сорта. Материалы Международной научно-практической конференции

- Сельскохозяйственная биотехнология*. Горки, 1998. С. 124–128.
13. Лебедев В. А., Деменко В. И., Долгов С. В. Потенциальные возможности адвентивного органогенеза у различных сортов груши. *Известия ТСХА*. 2004. Вып. 4. С. 81-87.
 14. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология. Москва: Издательство МСХА, 1995. 310 с.
 15. Dahleen L. S., Bregitzer P. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus culture of commercial cultivars. *Crop Science*. 2002. № 42. P. 934–938.
 16. Фоменко Т. И., Кондрацкая И. П., Чумакова И. М. Соматоклональная вариабельность в культуре ткани картофеля. Материалы Международной научно-практической конференции *Сельскохозяйственная биотехнология*. Горки, 1998. С. 167-170.
 17. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. *Plant Physiology*. 1974. Vol. 25. P. 135-166.
 18. Hussey G., Falavigna A. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*. 1980. Vol. 31. P. 1675-1686.
 19. Fannesbech A., Fannesbech M. *In vitro* propagation of *Monstera doliciuosa*. *Horticultural Science*. 1980. Vol. 15. P. 740-741.
 20. Расторгуев С. Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений: монография. Мичуринск: Изд-во МГАУ, 2009. 170 с.
 21. Чеченева Т. Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2006. Т. 38. № 2. С. 163–175.
 22. Константинов Ю. М., Ривкин М. И. Возможный свободнорадикальный механизм возникновения соматоклональной изменчивости растений. Материалы Всесоюзного симпозиума *Молекулярные механизмы генетических процессов*. Москва, 1991. С. 166–185.

23. Ашапкин В. В., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. Эпигенетическая изменчивость у растений: наследуемость, адаптивность, эволюционное значение. *Физиология растений*. 2016. Т. 63. № 2. С. 191–204.
24. Larkin P. G., Scorcoft W. R. Somaklonal variation – source of variability from cell cultures for improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 1981. № 4. P. 197–214.
25. Никитина Е. Д., Хлебова Л. П., Пронина Р. Д. Соматклональная изменчивость *in vitro* как источник создания исходного материала для селекции мягкой пшеницы. *Acta Biologica Sibirica*. 2015. № 3–4. С. 171–186.
26. Юркова Г. Н. Настоящее и будущее культуры пшеницы *in vitro*. *Экспериментальная генетика растений в ускорении селекционного процесса*. Киев: Наукова думка, 1989. С. 128–140.
27. Сидорчук Ю. В., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. Морфогенетические реакции образцов сои (*Glycine max* L. Merr. и *Glycine ussuriensis* L.) в культуре *in vitro*. *Цитология и генетика*. 1999. Т. 33. № 5. С. 7–14.
28. Кунах В. А., Алхимова Е. Г., Войтюк Л. И. Изменчивость числа хромосом в каллусных тканях и регенерантах гороха. *Цитология и генетика*. 1984. № 1. С. 20–25.
29. Чеченева Т. М. Спонтанна та індукована мінливість кукурудзи *in vitro*: автореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2003. 43 с.
30. Berrios E. F., Gentzbittel L., Alibert G., Griveau Y., Berville A., Sarrafi A. Genetic control of *in vitro*-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuum* L.). *Plant Breeding*. 1999. 118. № 4. P. 359–361.
31. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998. Vol. 53, № 1. P. 67–74.
32. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и

- практике. *Основы сельскохозяйственной биотехнологии*. Москва: Агропромиздат, 1990. С. 154-235.
33. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
34. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
35. Калашникова Е. А. Клеточная и тканевая биотехнология в селекции и растениеводстве. *Сельскохозяйственная биотехнология*. Москва: Высшая школа, 2003. С. 77–160.
36. Калашніков С. Г., Кулик О. П. Вивчення впливу озонування на процеси клітинного метаболізму. Місце озонування серед індукторів активності ендогенних цитокінінів. *Вопросы химии и химической технологии*. 2009. № 2. С. 37–43.
37. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. Москва: Медгиз, 1960. 254 с.
38. Селье Г. На уровне целого организма. Москва: Наука, 1972. 122 с.
39. Урманцев Ю. А., Гудсков Н. Л. Проблема неспецифичности и специфичности ответных реакций на повреждающие воздействия. *Журнал общей биологии*. 1986. Т. 47. № 3. С. 337–349.
40. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В., Белявская Н. А., Климчук Д. А., Недуха Е. М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. Киев: Наукова думка, 2003. 277 с.
41. Пахомова В. М., Чернов И. А. Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений. *Известия РАН. Серия Биологическая*. 1996. № 6. С. 705–715.
42. Генкель П. А. Пути и перспективы развития физиологии жаро- и засухоустойчивости культурных растений. *Сельскохозяйственная биология*. 1983. 278 с.
43. Генкель П. А. Адаптация растений к экстремальным условиям

- окружающей среды. *Физиология растений*. 1978. Т. 25. № 5. С. 889–902.
44. Kuznetsov V. V., Rakitin V. Yu., Borisova N. N., Rotschupkin B. V. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? *Plant Physiology and Biochemistry*. 1993. Vol. 31. № 2. P. 181–188.
 45. Hughes M. A., Dunn M. A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 1996. Vol. 47. № 296. P. 291–305
 46. Geiken B., Masoj Idek J., Rizzuto M., Pompili M. L., Giardi M. T. Incorporation of [³⁵S] methionine in higher plants reveals that's stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 21. № 12. P. 1265–1273.
 47. Альтергот В. Ф. Физиологические механизмы адаптации и устойчивости у растений. Москва: Наука, 1982. 307 с.
 48. Жученко А. А. Адаптивный потенциал культурных растений. Кишинева: Штиинца, 1988. 766 с.
 49. Косаківська І. В., Голов'янюк І. В. Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків. *Український фітоценологічний збірник*. Київ, 2006. № 24. С. 3–17.
 50. Колупаєв Ю. Є. Основи фізіології стійкості рослин: курс лекцій. Харків: Міська друкарня, 2010. 121 с.
 51. Ткачов В. І., Ярошенко О. А., Антонюк В. П. Фітогормональний статус кореневої системи сортів озимої пшениці за дії екзогенного ауксину в умовах ґрунтової посухи. Матеріали II Міжнародної наукової конференції *Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти*. Харків, 2011. С. 126–127.
 52. Пьянков В. И., Мокронос А. Т. Основные тенденции изменения растительности Земли в связи с глобальным потеплением климата. *Физиология растений*. 1993. Т. 40. № 4. С. 515–531.
 53. Скляр В. Г. Екологічна фізіологія рослин: підручник. за ред. Злобіна Ю. А. Суми: Університетська книга, 2015. 271 с.

54. Мусієнко М. М., Жук В. В. Вплив екзогенного цитокініну на стійкість пшениці за умов посухи. *Вісник аграрної науки*. 2011. № 3 (695). С. 34-36.
55. Мусієнко М. М., Жук І. В. Молекулярні механізми індукції захисних реакцій рослин в умовах посухи. *Український ботанічний журнал*. 2009. Т. 66. № 4. С. 580–595.
56. Foyer C. H., Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*. 2000. Vol. 146. № 2. P. 359-388.
57. Shimazaki Y., Ookawa T., Hirasawa T. The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress. *Plant Physiology*. 2005. Vol. 139. № 2. P. 458-465.
58. Wilkinson S., Davies W. J. ABA-based chemical signaling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*. 2002. Vol. 25. № 1. P. 195-210.
59. Колупаєв Ю. Є., Косаківська І. В. Роль сигнальних систем і фітогормонів у реалізації стресових реакцій рослин. *Український ботанічний журнал*. 2008. Т. 65. № 3. С. 418-430.
60. Ramachandra-Reddy A. R., Chaitanya K. V., Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 161. № 9. P. 1189-1202.
61. Schachtman D. P., Goodger J. Q. D. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*. 2008. Vol. 13. № 6. P. 281-287.
62. Conlet T. R., Sharp R. E., Walker J. C. Water deficit rapidly stimulated the activity of a protein kinase in the elongating zone of the maize primary root. *Plant Physiology*. 1997. Vol. 113. № 2. P. 219-226.
63. Жук О. І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011. Т. 43. № 1. С. 26–37.
64. Жук О. І. Транспорт води в рослинах. *Вісник Харківського університету ім. Каразіна*. 2010. Вип. 11 (№ 905). С. 212–217.
65. Жук І. В., Мусієнко М. М. Вплив оксиду азоту на рослини пшениці в

- умовах посухи. *Вісник аграрної науки*. 2010. № 5 (685). С. 32–34.
66. Xiong L., Zhu J. K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 2003. Vol. 133. № 1. P. 29-36.
67. Zhang J., Tardieu F. Relative contribution of apices and mature tissues to ABA synthesis in droughted maize root systems. *Plant and Cell Physiology*. 1996. Vol. 37. № 4. P. 598-605.
68. Munns R., Sharp R. E. Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soil of low water potential. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1993. Vol. 20. № 3. P. 425-437.
69. Watt M., McCully M. E., Canny M. J. Formation and stabilization of rhizosheaths in *Zea mays* L. effect of soil water content. *Plant Physiology*. 1994. Vol. 106. № 1. P. 179-186.
70. Jia W., Davies W. J. Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant Physiology*. 2007. Vol. 143. № 1. P. 68-77.
71. Wilkinson S. Nitrate signaling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA and xylem sap pH in maize. *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58. № 10. P. 1705-1716.
72. Романов Г. А. Как цитокинины действуют на клетку. *Физиология растений*. 2009. Т. 56. № 2. С. 295-319.
73. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*. 2008. Vol. 59. № 1. P. 75-83.
74. Романов Г. А. Рецепторы фитогормонов. *Физиология растений*. 2002. Т. 49. № 4. С. 615-625.
75. Steudle E., Peterson C. A. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany*. 1998. Vol. 49. № 322. P. 775-788.
76. McCully M. How do real roots work? *Plant Physiology*. 1995. Vol. 109. № 1. P. 1-6.
77. Kaldenhoff R., Ribas-Carbo M., Sans J. F., Lovisolo C., Heckwolf M.,

- Uehlein N. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment*. 2000. Vol. 31. № 3. P. 658-666.
78. Luu D. T., Maurel C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment*. 2005. Vol. 28. № 1. P. 85-96.
79. Ruggiero C., Angelino G., Maggio A. Developmental regulation of water uptake in wheat. *Journal of Plant Physiology*. 2007. Vol. 164. № 9. P. 1170-1178.
80. Sack L., Holbrook N. M. Leaf hydraulic. *Annual Review of Plant Biology*. 2006. Vol. 57. P. 361-381.
81. Стасик О. О. Реакція фотосинтетичного апарату [С3]-рослин на водний дефіцит. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2007. Т. 39. № 1. С. 14-27.
82. Brodribb T. J., Field T. S., Jordan G. J. Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology*. 2007. Vol. 144. № 5. P. 1890-1898.
83. Cornic G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. 2000. Vol. 5. № 5. P. 187-188.
84. Oren R., Sperry J. S., Katul G. G., Pataki D. E., Ewers B. E., Phillips N., Schafer K. V. R. Survey and synthesis of intra and inter specific variation of stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell and Environment*. 1999. Vol. 22. № 6. P. 1515-1526.
85. Иванов Л. А., Роньжина Д. А., Иванова Л. А. Изменение листовых параметров как показатель смены функциональных типов степных растений вдоль градиента аридности. *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 3. С. 332-339.
86. Potters G., Pasternak T. P., Guisez Y., Palme K. J., Jansen M. A. Stress-induced morphogenetic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*. 2007. Vol. 12. № 3. P. 98-105.
87. Alonso R., Evisa S., Castillo F. J., Gimeno B. S. Interactive effects of ozone

- and drought stresson pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halpensis*. *Plant, Cell and Environment*. 2001. Vol. 24. № 6. P. 905-916.
88. Холодова В. П., Бормотова Т. С., Семенова О. Г., Дмитриева Г. А., Кузнецов Вл. В. Физиологические механизмы адаптации аллоцитоплазматических гибридов пшеницы к почвенной засухе. *Физиология растений*. 2007. Т. 54. № 4. С. 542-549.
89. Григора І. М., Шабарова С. І., Алейніков І. М. Ботаніка: навчальний посібник для аграрних університетів. Київ: Фітосоціоцентр, 2000. 196 с.
90. Балюк С. А., Медведєв В. В., Мірошніченко М. М., Скрильник Є. В., Тимченко Д. О., Фатєєв А. І., Христенко А. О., Цапко Ю. Л. Екологічний стан ґрунтів України. *Український географічний журнал*. 2012. № 2. С. 38–42.
91. Бондар О. І., Байрак О. М., Барановська В. Є., Третяк А. М., Ващенко В. М., Виговська Г. П., Михайленко Л. Є., Берзіна С. В., Давидова Л. І., Жук М. О., Коломійчук В. П., Мазурок В. С., Пилипчук М. О., Печений В. Л., Сташук А. І., Трофименко Ю. І., Бондар М. О., Борисюк М. М., Морозов В. В. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2014 році. Київ: Міністерство екології та природних ресурсів України. ФОП Грінь Д. С. 2016. 350 с.
92. Господаренко Г. М. Агрохімія: підручник. Київ: ТОВ «СІК ГРУП Україна», 2018. 560 с.
93. Bernstein L. Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dinamic phase. *American Journal of Botany*. 1963. Vol. 50. № 4. P.360–370.
94. Строгонов Б. П. Солеустойчивость растений. Физиология сельскохозяйственных растений. Москва: Издательство Московского университета, 1967. Т. 3. 270 с.
95. Белянская С. Л., Исханов С. К., Шамина З. Б. Влияние стрессовых факторов на культуру клеток и проростки риса. *Физиология растений*. 1991. Т. 38. № 6. С. 1218-1226.

96. Halperin S. J., Lynch J. P. Salt stress inhibits calcium transport in barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Annual Meeting of American Society Agronomy*. Madison, 1993. P. 113.
97. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 287 с.
98. Bernstein L., Hayward H. E. Physiology of salt tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. 1958. № 9. P. 25–46.
99. Ahmad P., Hakeem K. ul R., Kumaret A. Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 11. P. 26944–27003.
100. Rahdari P., Hoseini S. M. Salinity stress. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2011. Vol. 1. № 3. P. 63–66.
101. Volkov V. Salinity tolerance in plants. Quantitative approach to ion transport starting from halophytes and stepping to genetic and protein engineering for manipulating ion fluxes. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. P. 1-25.
102. Zhao Y., Wang T., Zhang W., Li X. SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 2010. Vol. 189. P. 1122-1134.
103. Chen Z., Pan Y. H., An L. Y. et al. Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2013. Vol. 60. № 3. P. 369-376.
104. Munns R., Brady C. J., Barlow E. W. Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1979. Vol. 6. P. 379-389.
105. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic press, 1980. Vol. 25. P. 497
106. Долгих Ю. И., Ларина С. Н., Шамина З. Б. Селекция на осмоустойчивость

- кукурузы *in vitro* и характеристика растений-регенерантов. *Физиология растений*. 1994. Т. 41. № 1. С. 114–117.
107. Lauchli A. Salt exclusion an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*. New York, 1984. P. 37–66.
108. Flowers T. J., Troke P. F., Yeo A. R. The mechanisms of salt tolerant halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 1977. Vol. 4. P. 89–121.
109. Jeschke W. D. Staples R. C, Toenissen R. H. K^+/Na^+ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. *Salinity Tolerance in Plants*. New York: Wiley, 1984. P. 37–66.
110. Bernstein L. Osmotic adjustment of plants to saline media. I. Steady state. *American Journal of Botany*. 1961. Vol. 48. № 10. P. 909–918.
111. Pollard A., Wyn Jones R. G. Enzyme activities in a concentrate solution of glycine betain and other solution. *Planta*. 1979. Vol. 144. P. 291–298.
112. McKeinse B. D., Leshen Y. A. Stress and stress copin in cultivated plants. London: Kluwer Academic Publisher, 1994. 256 p.
113. Блэк К. А., Работнова Т. А. Растение и почва. Москва: Колос, 1973. 503 с.
114. Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений: теория и практика. Кишинев: Штиинца, 1987. 498 с.
115. Dahleen L. S., Sluthmon D. D., Rinnes H. W. Agronomic train variation in oat lines derived from tissue culture. *Crop Science*. 1991. Vol. 31. P. 90–94.
116. Serrano R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*. 1996. Vol. 165. P. 1-52.
117. Smirnoff N. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*. 1998. Vol. 9. P. 214-219.
118. Удовенко Г. В. Солеустойчивость культурных растений. Ленинград: Колос, 1977. 215 с.
119. Дридзе И. Л., Майсурян А. Н. Изучение механизмов солеустойчивости клеточных линий сои и табака, резистентных к L-азетидин-2-карбоновой кислоте. *Биотехнология*. 1993. № 4. С. 26-29.

120. Строгонов Б. П., Клышев Л. К. Проблемы солеустойчивости растений. Ташкент: ФАН, 1989. 184 с.
121. Климашевский Э. Л. Генетический аспект минерального питания растений. Москва: Агропромиздат, 1991. 236 с.
122. Huang J., Redmann R. Root growth, respiration and ion relations of barley and wild barley under salt stress and contrasting calcium supply. *Annual Meeting of American Society Agronomy*. Madison, 1993. P. 114.
123. Удовенко Г. В., Гончарова Э. А. Влияние экстремальных условий среды на структуру урожая сельскохозяйственных растений. Ленинград: Гидрометеоиздат, 1982. 144 с.
124. Бессонова Е. И., Маматов Б. Н., Мансурова Х. И. Изменчивость солеустойчивости гибридов ячменя РГР2 в зависимости от степени засоления почвы. *Аграрная наука*. 1995. № 5. С. 54-55.
125. Долгих Ю. И. Принципы скрининга клеток *in vitro* с целью получения устойчивых к абиотическим стрессам форм растений. Материалы II Российского симпозиума *Новые методы биотехнологии растений*. Пущино, 1993. С. 103.
126. Вечернина Н. А., Тавркиладзе О. К. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул: Издательство Алтайского университета, 2014. 251 с.
127. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів: монографія. за ред. Моргун В. В. Київ: Логос, 2012. 428 с.
128. Дубровная О. В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49, № 4. Р. 279–292.
129. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского университета, 2003. 227 с.
130. Волощук С. І., Волощук Г. Д., Гірко В. С. Використання клітинних

технологій *in vitro* в селекції озимої пшениці на стійкість до грибних патогенів. *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть*. Київ: Логос, 2001. Т. 1. С. 625-634.

131. Волощук С. І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Київ, 2006. 16 с.
132. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2008. Т. 6. № 2. С. 191-200.
133. Джос Л., Калашникова Е. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу. *Сельскохозяйственная биотехнология: Избранные работы*. Москва: Евразия+, 2000. С. 61-71.
134. Лаврова Н. В. Разработка и применение биотехнологий для получения устойчивых к фузариозу растений озимой пшеницы (гаплоидная) и огурца (меристемная, каллусная и микроспорогенная): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 2006. 46 с.
135. Высоцкий В. А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве. *Садоводство и виноградарство*. 2006. № 2. С. 2-3.
136. Захарчук Н. А. Можливості клітинної селекції та соматоклональної варіабельності генотипів картоплі для створення сортів стійких до фузариозу. *Вісник ЖНАЕУ*. 2014. Т. 1. № 2 (42). С. 125-130
137. Малахова Н. П., Галиева Л. Д., Хасейн А., Калиева А. А., Тезекбаева Б. К., Мальцева Э. Р. *In vitro* селекция клеточных культур картофеля с культуральным фильтратом гриба *Fusarium solani*. *Вестник НАН Республики Казахстан*. 2016. Вып. 1. № 359. С. 170-177.
138. Маркелова Т. С., Веденеева М. Л. Оценка селекционного материала пшеницы на устойчивость к болезням *in vitro*. *Защита и карантин растений*. 2008. С. 26-27.
139. Бавол А. В., Зінченко М. О., Дубровна О. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника

- офіобольозу, за дії осмотичного стресу. *Цитология и генетика*. 2014. Т. 48. № 1. С. 60-66.
140. Соболева Г. В. Сравнительная оценка регенерантных линий гороха, полученных методами клеточной селекции. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015. № 1 (13). С. 20-25.
141. Соболева Г. В., Бударина Г. А., Соболев А. Н. Комплексная оценка регенерантных линий гороха полученных методом клеточной селекции *in vitro*. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2017. № 2 (22). С. 36-41.
142. Кондратенко С. І., Гарт О. Ю., Черненко О. В. Оцінка стійкості ліній перцю солодкого (*Capsicum annuum L.*) до фузаріозного в'янення на рівні *in vitro* та *in vivo*. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2017. № 4. (68). С. 23-35.
143. Ткачева А. А. Методы *in vitro* в селекции огурца на устойчивость к фузариозу. *Картофель и овощи*. 2006. № 8. С. 28–29.
144. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Єщенко О. В. Використання біотехнологічних методів для отримання вихідного матеріалу цикорію коренеплідного резистентного до абіотичних стресових чинників. Матеріали міжвузівської наукової конференції *Екологія – шляхи гармонізації відносин природи та суспільства*. Умань, 2009. С. 61.
145. Барсукова Е. Н. Адаптивные свойства селекционных образцов гречихи, толерантных к ионам тяжелых металлов. *Аграрная Россия*. 2017. № 8. С. 12-15.
146. Гаджиева И. Х., Алиева З. М., Рамазанова П. Б. Кросс-адаптация растений к почвенному засолению и тяжелым металлам. *Юг России: экология, развитие*. 2010. № 1. С. 26-32.
147. Землянухина О. А., Калаев В. Н., Воронина В. С., Епринцев А. Т. Биохимическая адаптация микроклонов вейгелы цветущей «Вариегата» *Weigela florida* «Variegata» Bunge A. D. С. к соле- и медьиндуцированным стрессам. *Сибирский лесной журнал*. 2017. № 6. С. 89–101

148. Шуплецова О. Н., Щенникова И. Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. № 20 (5). С. 623-628.
149. Халилова Л. А., Орлова Ю. В., Майорова О. В., Мясоедов Н. А., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В. Морфобиологический анализ мутанта ARA7 *Arabidopsis thaliana* в условиях солевого стресса. *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 3 (5). С. 74-80.
150. Тимофеева О. А. Биотехнологические подходы к созданию новых форм растений: научное пособие. Казань: Издательский центр КГУ, 2006. 54 с.
151. Сурин Н. А., Ляхова Н. Е., Тимина М. А. Теоретические и практические основы селекции ячменя на адаптивность. *Земледелие и селекция в Приенисейской Сибири*. Красноярск, 1996. С. 28–35.
152. Елисеева Н. С. Физиологические механизмы адаптивных реакций растений. Казань: Издательство Казанского университета, 1987. 130 с.
153. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Вплив солевого стресу на індукування клітинних ліній цикорію коренеплідного. *Збірник наукових праць УДАУ*. Умань, 2007. Вип. 65. С. 142–146.
154. Гладков Е. А., Долгих Ю. И., Гладкова О. В. Получение многолетних трав, устойчивых к хлоридному засолению, с помощью клеточной селекции. *Сельскохозяйственная биология*. 2014. № 4. С. 106-111.
155. Кривошеева А. Б. Получение и анализ солеустойчивости трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих гетерологичные гены вакуолярных антипортеров HvNHX2 или HvNHX3: дис. ... канд. биол. наук:03.01.05 — физиология и биохимия растений. Москва, 2015. 113 с.
156. Бугара И. А., Юнусова Э. А. Клеточная селекция каллусных культур *Glycine max* на устойчивость к осмотическому стрессу. *Экосистемы*. 2016. № 8. С. 83–87

157. Коцар М. О. Вплив сольового стресу *in vitro* на розвиток пагонів міскантусу. *Наукові праці ІБКіЦБ*. Вип. 21. 2014. С. 221–225.
158. Єгорова Н. О., Ставцева І. В., Пехаво О. А. Патент на корисну модель № 68312 від 26.03.2012 р. (Україна). Спосіб отримання форм шавлії, стійких до осмотичного стресу *in vitro*. Заявл. 01.08.2011; Опубл. 26.03.2012; Бюл. № 6. 4 с.
159. Пикало С. В., Демидов О. А., Прокопик Н. І., Волощук С. І., Юрченко Т. В., Хоменко С. О. Скринінг *in vitro* гібридів F₂ пшениці ярої на стійкість до водного дефіциту. *Science Rise: Biological Science*. 2018. № 3(12). С. 12-18.
160. Сергеева Л. Е. Изменение культуры клеток под действием стресса. Київ: Логос, 2001. 99 с.
161. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. Экологическая селекция растений. Минск: Тэхналогія. 1997. 372 с.
162. Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні на 2019 рік. URL: <http://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
163. Tattersall A., Millam S. Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1998. Vol. 55. Issue 2. P. 147–150.
164. Zandecka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. Regeneracja pędów z segmentów hypokotylowych Inianki siewnej *Camelina sativa* L. w kulturach *in vitro*. *Rośliny Oleiste*. 1999. T. XX. P. 631–636.
165. Mielcarek A., Zandecka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. Wpływ kwasu abscysynowego (ABA) na regenerację roślin *Camelina sativa* L. w warunkach kultury *in vitro*. *Rośliny Oleiste*. 2000. T. XXI. P. 309–314.
166. Łuczkiwicz T., Nawracała J., Strybe M., Satkiewicz K. Analiza genetyczna kilku cech ilościowych związanych z regeneracją Inianki siewnej (*Camelina sativa* L.) w warunkach kultur *in vitro*. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 2006. № 242. P. 261–266.
167. Ferrie A. M. R., Bethune T. D. A microspore embryogenesis protocol for

- Camelina sativa*, a multi-use crop. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2011. Vol. 106. Issue 3. P. 495–501.
168. Narasimhulu S. B., Kirti P. B., Bhatt S. R. Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1994. Vol. 13. Issue 11. P. 657–660.
169. Sigareva M. A., Earle E. D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1999. Vol. 98. Issue 1. P. 164–170.
170. Jiang J., Zhao X., Tian W., Li T., Wang Y. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content. 2009. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2009. Vol. 99. Issue 1. P. 91–595.
171. Park W., Feng Y., Ahn S. Alteration of leaf shape, improved metal tolerance, and productivity of seed by overexpression of CsHMA3 in *Camelina sativa*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. № 7. 96 p. URL: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/96>.
172. Khalid H., Kumari M., Grover A., Nasim M. Salinity stress tolerance of *Camelina* investigated *in vitro*. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2015. № 46 (4). P. 137–144.
173. Gehringer A., Friedt W., Lühs W., Snowdon R. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome*. 2006. № 49 (12). P. 1555-1563.
174. Hutcheon C., Ditt1 R., Beilstein M., Comai L., Schroeder J., Goldstein E., Shewmaker C., Nguyen T., De Rocher J., Kiser J. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC Plant Biology*. 2010. № 10. 233 p. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/233>.
175. Liu X., Brost J., Hutcheon C., Guilfoil R., Wilson A., Leung S., Shewmaker C., Rooke S., Nguyen T., Kiser J., Rocher J. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple

- large-scale screening of transformants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 2012. Vol. 48. Issue 5. P. 462–468.
176. Lu C., Kang J. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*. 2008. № 27. P. 273–278.
177. Емец А. И., Бойчук Ю. Н., Шиша Е. Н., Рахметов Д. Б., Блюм Я. Б. Введение в культуру *in vitro*, регенерация и генетическая трансформация рыжика посевного (*Camelina sativa*). *Цитология и генетика*. 2013. Т. 47, № 3. С. 14–20.
178. Zhang Y., Yu L., Yung KF., Leung D. Y., Sun F., Lim B. L., Over-expression of AtPAP2 in *Camelina sativa* leads to faster plant grow than dhhigher seed yield. *Biotechnology for Biofuels*. 2012. 5. 19 p. URL: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/19>.
179. 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.
180. Рябовол Л., Любченко А., Любченко І. Стан біотехнологічних досліджень рижію ярого. *Вісник ЛНАУ: Агрономія*. 2018. № 22(1). С. 13–20.
181. Любченко І. О. Сорти та селекція рижію ярого в Україні. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції *Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі*. Умань, 2018. С. 94–97.
182. 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. Умань, 2018. С. 44-46.

РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Рижій (*Camelina Crantz*) відноситься до родини *Brassicaceae*, роду *Camelina*. В Україні налічується його вісім видів: *Camelina sativa Grantz* – рижій посівний; *Camelina linikola Sch. et Sp.* – рижій льняний; *Camelina pilosa (DC.) Zing* – рижій волосистий; *Camelina caucasica (Sinsk.) Vass* – рижій кавказький; *Camelina laxa C. A. M.* – рижій рихлий; *Camelina albiflora Kotschyet Boiss* – рижій білокрітковий; *Camelina microflora Andrz* – рижій дрібнонасіний; *Camelina sylvestris Wallr.* – рижій лісовий. У культурі найпоширеніший рижій посівний ярий. Ботаніки схильні вважати, що культурний рижій (*Camelina sativa L.*) є збірним видом типу *conspicua* [1].

Рижій посівний ярий (*Camelina sativa (L.) Crantz*). Кількість хромосом $2n=40$. Однорічна рослина висотою від 40 до 100 см. Корінь – веретеноподібний, тонкий, проникає у ґрунт на глибину 40–60 см. Стебло розгалужується у верхній частині. Листки ланцетні, слабоопушені. Квітки дрібні блідо- або темно-жовті (у вигляді видовженої китиці). Цвітіння триває 20–30 діб. Рижій – самозапильна культура. Плід – грушоподібний стручок, містить 8–10 жовтих або червонувато-коричневих насінин. Довжина насінини становить 0,6–2,5 мм, маса 1000 насінин – 0,8–1,6 г.

Рижій маловимогливий до умов вирощування, майже не ушкоджується шкідниками та не уражується хворобами. Мінімальна температура проростання насіння становить 1 °С, оптимальна – 10–12 °С. Сходи з'являються через 8–10 діб після сівби. Рижій належить до рослин довгого дня, вегетаційний період триває 80–110 діб. Для завершення повного циклу розвитку рижій ярий потребує 1580–1790 °С суми активних температур [1–3].

У наших дослідженнях зі створення *in vitro* вихідного матеріалу рижію ярого, стійкого до стресових чинників, використовували рослинні експланти чотирьох сортів – Степовий 1, Клондайк, Перемога, Євро 12.

Сорт Степовий 1. Заявник – Інститут олійних культур НААН України. Рослини заввишки до 90 см. Кущ – напівзімкнутий. Листки – ланцетні, гладенькі, без опушення й антоціану. Стручок – з гладенькою поверхнею, носик – гострий. Насіння – жовте, еліпсоподібне. Маса 1000 насінин – 1,2 г. Вегетаційний період – 88 діб. Середня врожайність за роки випробування – від 1,0 до 1,8 т/га. Вміст жиру – 34 %, білка – 27 %. Сорт стійкий до вилягання, середньостійкий до осипання та посухи. Ураження хворобами нижче від середнього. Сорт внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 1996 році. Рекомендований до вирощування в Степу, Лісостепу та Поліссі [4, 5].

Сорт Клондайк. Заявник – ННЦ «Інститут землеробства НААН України». Сорт створено методом гібридизації з наступним індивідуально-сімейним добором. Висота рослин – 56–58 см. Стебло – округле, товщиною 2–3 мм з 4–5 гілками першого порядку. Суцвіття – довжиною 6–10 см. Плід – грушоподібний стручок, у якому розміщується 8–10 насінин світло-жовтого кольору. Маса 1000 насінин становить 1,5–1,8 г. Сорт вирізняється стійкістю до вилягання, розтріскування стручків і осипання насіння. Врожайність – 2,5 т/га, вміст олії в насінні – 39,4 %. Сорт занесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, у 2004 році та рекомендований до вирощування в Степу і Лісостепу [4, 6].

Сорт Перемога. Заявник – Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України. Рослина формує округле стебло висотою 75–80 см, з 10–12 гілками. Суцвіття – довжиною 20 см. Плід – грушоподібний стручок, у якому розміщується 8–10 насінин світло-жовтого кольору. Маса 1000 насінин – 1,9 г. Сорт відзначається стійкістю до вилягання, розтріскування стручків і осипання насіння. Урожайність насіння – 1,8 т/га, вміст олії – 40 %, вміст ерукової кислоти – 1,3 %. Сорт занесений до

Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2015 році [4, 7].

Сорт Євро 12. Заявник – Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України. Рослина висотою 75–80 см. Стебло – діаметром 4,5 мм з 8–10 гілками першого порядку. Суцвіття – довжиною 23 см. Плід – грушоподібний стручок, у якому розміщується 9–10 насінин. Сорт стійкий до хвороб і шкідників. Урожайність – 2,0 т/га, маса 1000 насінин – 2,2 г, стійкість до обсіпання – 9 балів, вміст олії – 38 %, вміст ерукової кислоти – 1,2 %. Сорт занесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2015 році [4, 7].

2.2. Умови проведення досліджень *in vitro*

Перший етап досліджень проводили у навчально-науково-виробничій біотехнологічній лабораторії Уманського національного університету садівництва впродовж 2014–2017 років. У роботі використовувались методи і умови культивування тканин *in vitro* за Р. Г. Бутенко [8].

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.

2.3. Вирощування *ex vitro* рослинного матеріалу рижію ярого

Другий етап досліджень передбачав вирощування створеного рослинного матеріалу в польових умовах. Отримані *in vitro* рослинні форми рижію ярого апробувались упродовж 2016–2019 років на дослідних ділянках кафедри

генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва. Рослини регенеранти (R_0) висаджували у відкритий ґрунт за схемою 45×10 см. Наступні покоління (R_1 – R_4) висівали з міжряддям 30 см за норми висіву 2 млн насінин/га. Сівбу, боротьбу з бур'янами та збирання врожаю проводили вручну.

Ґрунт дослідного поля відноситься до чорноземів опідзолених малогумусних важкосуглинкових. Вони вирізняються невисоким вмістом гумусу (3,31 % в 0–30 см шарі) і мають грудкувато-пилувату структуру. За вмістом рухомих форм фосфору і калію ґрунт належить до середньо забезпечених (80–130 мг/кг ґрунту), а за вмістом легкогідролізованого азоту – до малозабезпечених (100 мг/кг ґрунту) і має слабокислу, близьку до нейтральної реакцію ґрунтового розчину (рН 6,5–6,7) і високу водопроникність [9].

Регіон характеризується нестійким зволоженням і періодичними посухами. Розподіл опадів за періодами вегетації й інтенсивністю нерівномірний. У теплий період (квітень–жовтень) випадає майже 70,0 % річної їх кількості.

За тепловим режимом клімат регіону помірно-середньо-континентальний. Гідротермічний коефіцієнт за Висоцьким – 1,1–1,2. Сума активних температур варіює від 2400 до 3200 °С, причому період з активними температурами триває 140–160 діб. Тривалість періоду із середньодобовою температурою понад 5 °С становить 250 діб [10].

Сума опадів за 2016–2019 сільськогосподарські роки, становила відповідно 492, 680 і 421,4 мм (табл. 2.1). Порівняно з середніми багаторічними показниками у 2016–2017 сільськогосподарському році опадів було менше на 140,6 мм, у 2017–2018 – на 47,6 мм більше, а в 2018–2019 на 211,6 мм менше. При цьому впродовж трьох років досліджень у місяці вегетації культури спостерігали дефіцит вологи.

Найсухішими були червень 2017 року (–40,6 мм від норми), липень 2017 року (–46,0 мм), квітень 2018 року (–30,5 мм), травень 2018 року (–36,7 мм від багаторічної норми). Дефіцит вологи співпадав з критичними фазами водоспоживання культури, проте, завдяки осінньо-зимовим запасам вологи, рослини майже не потерпали від весняної посухи.

Таблиця 2.1

Сума опадів за роки проведення досліджень, мм
(за даними метеостанції Умань)

С.-г. рік	Всього за с.-г. рік	Місяць											
		X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Середньо-багаторічна	633,0	33	43	48	47	44	39	48	55	87	87	59	43
2016–2017	524,2	87,0	49,2	33,2	21,8	38,9	25,8	53,3	46,4	41,0	59,2	29,9	38,5
± від норми	-108,8	54	6,2	-14,8	-25,2	-5,1	-13,2	5,3	-8,6	-46	-27,8	-29,1	-4,5
2017–2018	680,6	53,9	37,9	102,2	58,4	43,7	65,6	17,5	18,3	82,4	92,9	2,6	105,2
± від норми	47,6	20,9	-5,1	54,2	11,4	-0,3	26,6	-30,5	-36,7	-4,6	5,9	-56,4	62,2
2018–2019	420,8	13,8	49,9	50,5	55,1	23,8	16,3	22,4	35,6	69,8	33,8	19,2	30,6
± від норми	-212,2	-19,2	6,9	2,5	8,1	-20,2	-22,7	-25,6	-19,4	-17,2	-53,2	-39,8	-12,4

Середня температура повітря за роки проведення досліджень була вищою порівняно з середнім багаторічним показником і відповідно складала 8,9, 9,1 і 9,5 °С у 2016–2017, 2017–2018 і 2018–2019 сільськогосподарських роках (табл. 2.2). У 2016–2017 році підвищення середньорічної позначки відбулося за рахунок високих температур повітря у зимові місяці. Температура повітря впродовж вегетаційного періоду культури (квітень–червень) була на 2,6–4,9 °С нижче середньобагаторічних даних. Це істотно знизило негативний вплив дефіциту опадів на рослини.

Вегетаційний період 2018 року характеризувався підвищеним температурним режимом. Так, середньодобова температура квітня

перевищувала багаторічну позначку на 5,0 °С, травня – на 3,3 °С, а червня – на 2,6 °С.

Таблиця 2.2

Температура повітря за роки проведення досліджень, °С

(за даними метеостанції Умань)

С.-г. рік	Всього за с.-г. рік	Місяць											
		X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Середньо-багаторічна	7,4	7,6	2,1	-2,4	-5,7	-4,2	0,4	8,5	14,6	17,6	19	18,2	13,6
2016–2017	9,0	6,5	1,7	-1,9	-5,2	-2,8	5,9	9,7	14,8	20,0	20,6	22,1	16,5
± від норми	1,6	-1,1	-0,4	0,5	0,5	1,4	5,5	1,2	0,2	2,4	1,6	3,9	2,9
2017–2018	9,7	8,7	3,4	2,1	-3	-3,6	-1,5	13,5	17,9	20,2	20,7	22,1	15,8
± від норми	2,3	1,1	1,3	4,5	2,7	0,6	-1,9	5,0	3,3	2,6	1,7	3,9	2,2
2018–2019	9,6	10,1	0,2	-2,0	-4,7	0,5	4,5	9,6	17,0	23,4	20,0	20,7	15,6
± від норми	2,2	2,5	-1,9	0,4	1,0	4,7	4,1	1,1	2,4	5,8	1,0	2,5	2,0

У 2019 році найспекотнішим виявився червень – середньодобова температура становила 22,4 °С, що на 4,8 °С вище норми. У квітні–травні місяцях перевищення середьобагаторічних температурних даних становило 1,1–2,4 °С.

Середньорічний показник відносної вологості повітря у 2016–2017 сільськогосподарському році становив 73 %, що на 3 % нижче норми (табл. 2.3). За період вегетації культури найнижчий показник вологості повітря зафіксовано у травні (60 %).

Незважаючи на те, що середньорічний показник відносної вологості повітря у 2017–2018 сільськогосподарському році майже не відрізнявся від середньобагаторічного, у квітні та травні зафіксовано найнижчу вологість повітря (58 %), що було менше від норми на 10 і 6 % відповідно.

Найнижчу відносну вологість повітря у 2019 році відмічено у березні та у квітні – 14 і 6 % нижче багаторічного значення.

Таблиця 2.3

Відносна вологість повітря за роки проведення досліджень, %
(за даними метеостанції Умань)

С.-г. рік	Всього за с.-г. рік	Місяць											
		X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Середньо-багаторічна	76	80	87	88	86	85	82	68	64	66	67	68	73
2016–2017	73	74	85	85	84	83	76	60	63	64	65	64	69
± від норми	-3	-6	-2	-3	-2	-2	-6	-8	-1	-2	-2	-4	-4
2017–2018	75	80	86	89	85	83	81	58	58	67	75	62	74
± від норми	-1	0	-1	1	-1	-2	-1	-10	-6	1	8	-6	1
2018–2019	74	79	86	90	86	82	68	62	72	69	67	63	67
± від норми	-2	-1	-1	2	0	-3	-14	-6	8	3	0	-5	-7

Отже, роки апробації селекційного матеріалу *ex vitro* характеризувались дефіцитом вологи та підвищеним температурним режимом, що дозволило ідентифікувати посухостійкість зразків у польових умовах вирощування.

2.4. Методика проведення досліджень

Дослід 1. Стерилізація експлантів рижію ярого за введення у культуру *in vitro*.

За введення в культуру *in vitro* рослинний матеріал стерилізували. Перед основною стерилізацією експланти витримували в розчині миючого засобу протягом 30 хвилин і ретельно промивали проточною водою, після чого обробляли 70 %-м розчином етанолу одну хвилину.

Основну стерилізацію експлантів (насіння та проростки) рижію ярого проводили використовуючи різні хімічні речовини: етанол (C₂H₅OH), комерційний препарат «Білизна», перекис водню (H₂O₂), перманганат калію (KMnO₄).

Стерилізацію проводили за різної експозиції та концентрації стерилізуючих агентів (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Варіанти стерилізації експлантів рижію ярого при введенні у культуру *in vitro*

Стерилізатор	Концентрація	Експозиція, хв.
C ₂ H ₅ OH	70%	10
C ₂ H ₅ OH	70%	20
«Білизна»	1:1	10
«Білизна»	1:1	20
«Білизна»	1:2	10
«Білизна»	1:2	20
H ₂ O ₂	10 %	10
H ₂ O ₂	10 %	20
KMnO ₄	0,5 %	10
KMnO ₄	0,5 %	20
KMnO ₄	1,0 %	10
KMnO ₄	1,0 %	20

Після проведення знезаражування, біоматеріал промивали в стерильній дистильованій воді до повного видалення стерилізатора з тканин експланту.

За проведення оцінки різних варіантів стерилізації враховували частку стерильних життєздатних та інфікованих експлантів і некроз біоматеріалу. Ефективність стерилізації визначали на восьму добу культивування за виходом життєздатних стерильних експлантів, морфологічними показниками та приростом біомаси.

Культивували біоматеріал на живильних середовищах за прописами Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шенка-Хильдебранта, що різнились за вмістом і співвідношенням мікро- та макроелементів (додаток А).

Дослід 2. Індукування, культивування та морфогенез калусної тканини рижію ярого. Для індукції калусогенезу базові середовища модифікували регуляторами росту ауксинової (2,4-дихлорфеноксоцтова кислота) та цитокінінової (6-бензиламінопурин) природи в різних концентраціях (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.

Для визначення інтенсивності наростання калюсів біоматеріал зважували на початку та в кінці кожного пасажу. Інтенсивність наростання визначали за формулою Кепліна [11]:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad (1)$$

де ΔW – відносний приріст маси;
 W_0 – початкова маса калюсу;
 W_t – кінцева маса калюсу;

Такий спосіб оцінки дає можливість уникнути помилок від впливу на ріст тканин величини експланту.

Морфогенні характеристики калюсів визначали за шестибальною шкалою [8] (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Шкала визначення морфогенних показників калюсних тканин рижію ярого

Бал	Характеристика калюсу
5	Тканина жовтого або світло-жовтого забарвлення із зеленими осередками, цілком структурована без розпушених водянистих ділянок
4	Тканина жовтого або світло-жовтого забарвлення із зеленими осередками, структурована, але має 20–30 % розпушених ділянок
3	Тканина на 70,0 % складається з обводнених клітин, частково містить жовті структуровані ділянки без зелених осередків
2	Тканина має розпушену і обводнену консистенцію
1	Лише невелика частина експланту утворює морфогенний калюс
0	Експлант гине, калюсогенез не відбувається

За оцінки калюсної тканини враховували її консинстенцію, забарвлення і

регенераційну здатність. Морфогенними вважалися калюси оцінені на 5–3 бали.

Інтенсивність морфогенезу визначали за часткою мікрокалюсів на яких спостерігали новоутворення та кількістю рослин-регенерантів з одного транспланту.

Дослід 3. Мікроклональне розмноження рижію ярого. 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 дослідів проводили за коефіцієнтом розмноження, біометричними показниками рослин-регенерантів, інтенсивністю ризогенезу.

Дослід 4. Визначення плідності отриманого матеріалу. Ідентифікацію плідності проводили шляхом підрахунку кількості хромосом у давлених препаратах, отриманих із калюсу чи соматичних клітин апікальної меристеми клонованих рослин рижію ярого за методикою З. П. Паушевої [12].

Цитологічний аналіз включав наступні послідовні процеси:

1. Перенесення рослин в умови знижених позитивних температур (3–5⁰С) на 10–12 годин.
2. Для індукції мітотичних поділів – відновлення оптимальних умов вирощування (20–24⁰С) на 1–2 години.
3. Перенесення об'єктів досліджень в 0,03 % розчин оксихіноліну на 1–2 години за температури 2–4⁰С.
4. Фіксація матеріалу і мацерація в розчині 96⁰ алкоголю і концентрованої соляної кислоти у співвідношенні 2:1 впродовж 5–15 хв.
5. Промивання матеріалу в дистильованій воді 5 хв.
6. Фарбування ацетокарміном або ацетоарсеїном та приготування препаратів.

Підрахунок хромосом проводили за допомогою мікроскопа МБІ–13.

Дослід 5. Клітинна селекція рижію ярого на стійкість до стресових чинників. Селективну систему *in vitro*, для добору соле- та посухостійких

сомаклональних клітинних ліній рижію ярого, створювали додаючи до живильного середовища хлорид натрію або маніт.

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 наростання біомаси на селективних середовищах у порівнянні з контролем і збереження ними морфогенних властивостей.

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

Дослід 6. Оцінка стійкості рослин до селективних чинників в умовах *ex vitro*. 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. Осмотичний тиск в обох варіантах становив 10 атм [13–15].

Посівні показники насіння рижію ярого визначали згідно ДСТУ 4138–

2002 «Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості» [16].

Схожість насіння визначали на 10-ту добу пророщування, енергію – на четверту добу. Окрім того визначали силу росту – масу 100 проростків, довжину та масу пагонів і коренів. Отримані результати порівнювали з показниками посівних якостей у контрольному варіанті (пророщування в дистильованій воді).

До групи стійких відносили генотипи в яких відношення схожості насіння в стресових умовах порівняно з контролем становило понад 60 %, до середньостійких – 30–60 %, нестійких – менше 30 % [13].

Дослід 7. Оцінювання рослин регенерантів рижію ярого за біологічними та господарсько-цінними ознаками в умовах *ex vitro*. Вирощування рослин і проведення обліків виконували згідно Методики польових досліджень [17], Методики проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС-тест) [18] і Методики проведення кваліфікаційної (технічної) експертизи сортів рослин з визначення показників придатності до поширення в Україні [19].

Опис морфологічних ідентифікаційних ознак проводили методом візуальної оцінки. Експертизі піддавали 120 рослин, розділених на три повторення.

Визначали біологічну стійкість рослин (збереженість) – як відношення [13] нормально розвинутих рослин, що досягли повної стиглості, до кількості сходів (2):

$$B = \frac{C}{B} \times 100\%, \quad (2)$$

де B – біологічна стійкість, %;

B – кількість рослин після сходів (шт/1м²);

C – кількість рослин на період збирання (шт/1м²).

Урожайність визначали шляхом зважування насіння з облікової ділянки

з перерахуванням на гектарну площу. Окрім того, визначали морфологічні особливості та структуру врожаю створених соматоклональних ліній – висоту та гілкування рослин, кількість стручків на рослині, кількість насінин у стручку, масу 1000 насінин.

Під час фенологічних спостережень відмічали фази – сходи, формування розетки, бутонізація, початок і повне цвітіння, зелений стручок, технічна стиглість [18, 19].

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили за методами дисперсійного, кореляційного і варіаційного аналізу згідно рекомендацій В. О. Єщенка та інших [17] Е. Р. Ермантраута [20].

Висновки до розділу 2

1. Для створеного вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до абіотичних чинників використовували сорти-донори експлантів різноманітні за генетичним та еколого-географічним походженням, що характеризуються комплексом цінних господарських ознак, це дає можливість отримання зразків з високими якісними показниками.

2. Погодні умови за роки досліджень вирізнялись значним відхиленням відносно середніх багаторічних даних, що суттєво вплинуло на характеристики генотипів і дозволило оцінити посухостійкість матеріалів у польових умовах вирощування.

3. Методики, що використовувались у дослідженнях, є загально прийнятими та ефективними, що дає змогу достовірно провести точну оцінку експериментальних даних.

Список джерел літератури за розділом 2.

1. Жуковский П. М. Культурные растения и их сородичи. Ленинград: Колос, 1964. 792 с.
2. Семенова Е. Ф., Буянкин В. И., Тарасов А. С. Масличный рыжик: биология, технология, эффективность. Волгоград: Издательство ВолГУ, 2007. 82 с.

3. Шевченко І. А., Поляков О. І., Ведмедєва К. В., Комарова І. Б. Рижій, сафлор, кунжут. Стратегія виробництва олійної сировини в Україні (малопоширені культури). Запоріжжя: СТАТУС, 2017. 40 с.
4. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2019 рік. URL: <http://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
5. Каталог сортів і гібридів ІОК НААН України. URL: <http://imk.zp.ua/index.php/kataloh-sortiv-ta-hibrydiv/ryzhii/146-stepovuyu-1>
6. Реєстр сортів і заявок ННЦ «Інститут землеробства НААН». URL: <http://zemlerobstvo.com/wp-content/uploads/Реєстр-сортів-2018.pdf>
7. Сорти нових високоолійних культур, як джерело біодизеля. URL: <http://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/PDF/0812.pdf>.
8. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 272 с.
9. Недвига М. В., Хомчак М. Ю., Осадчий О. С., Бойко Л. Д. Лабораторний і польовий практикум з ґрунтознавства. Київ: Агропромвидав України, 1999. 240 с.
10. Мороз П. І., Лук'янець В. Л., Косенко І. С., Мороз О. К. Природа Черкащини: стан, проблеми раціонального природокористування та охорони в контексті виживання. Миколаїв: АТ «СІМАО», Одеса: ОКФА, 1996. 400 с.
11. Caplin S. M., Steward F. C. Effect of coconut water on the growth of explants from carrot root. *Science* 108, 1948. P. 655-657.
12. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
13. Удовенко Г. В. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Ленинград: Колос, 1976. 318 с.
14. Третьяков Н. Н. Практикум по физиологии растений. Москва: Колос, 1990. 271 с.
15. Бессонова В. П. Практикум з фізіології рослин. Дніпропетровськ: РВВ ДДАУ, 2006. 316 с.

- 16.ДСТУ 4138–2002 «Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості». Київ: Держстандарт України, 2003. 173 с.
- 17.Єщенко В. О., Копитко П. Г., Опришко В. П., Костогриз П. В. Основи наукових досліджень в агрономії. Київ: Дія, 2005. 288 с.
- 18.Методика проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС-тест). Олійні. за ред. С. О. Ткачик. Київ: Ніланд-ЛТД, 2014. 178 с.
- 19.Методика проведення експертизи сортів рослин групи технічних та кормових на придатність до поширення в Україні; за ред. С. О. Ткачик. Вінниця: Корзун Д. Ю., 2016. 73 с.
- 20.Ермантраут Е. Р., Бобро М. А., Гопцій Т. І., та ін. Методика наукових досліджень в агрономії: навчальний посібник. Харків: Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва, 2008. 64 с.

РОЗДІЛ 3. ІНДУКЦІЯ МОРФОГЕННОЇ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ РИЖІЮ ЯРОГО

3.1. Стерилізація експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*

В нативних умовах поверхня органів рослин зазвичай забруднена спорами різних мікроорганізмів, які, потрапляючи у живильне середовище, здатні інтенсивно розмножуватись, виділяти в субстрат токсини та поглинати з нього поживні речовини. Це викликає пригнічення ростових процесів і може спричинити загибель експлантів. Тому, однією з визначальних умов отримання культури ізольованих тканин та органів *in vitro* є стерилізація рослинних експлантів [1, 2].

Для стерилізації біооб'єктів використовують різні хімічні речовини – сполуки на основі хлору і ртуті, феноли, органічні та мінеральні кислоти, перекис водню, перманганат калію, спирт тощо. Стерилізуючі агенти повинні ефективно знищувати небажану мікрофлору, не здійснюючи сильний токсичний вплив на об'єкт і повністю вимиватися з тканин експланту після стерилізації [1].

Ефективність створення асептичної культури *in vitro* залежить від низки чинників – видових особливостей, умов вирощування донорських рослин, типу експланту та його фізіологічного стану, стерилізуючого агента, його концентрації і режиму стерилізації тощо. За підбору оптимальної схеми проведення стерилізації вихід асептичних експлантів, що зберігають життєздатність в умовах *in vitro*, у різних біовидів становить 68–95 % [3–7].

У наших дослідженнях експлантами використовували проростки та насіння рижію ярого сорту Степовий 1.

Стерилізуючі хімічні агенти, що використовували в досліді, характеризувалися індивідуальним впливом на культуру експлантів рижію ярого (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Ефективність стерилізації експлантів рижію ярого

Варіанти досліджень	Вихід експлантів, %					
	Насіння			Проростки		
	стерильних життєздатних	інфікованих	некрот	стерильних життєздатних	інфікованих	некрот
C ₂ H ₅ OH 70% – 10 хв.	59,6	32,0	8,4	10,4	12,1	77,5
C ₂ H ₅ OH 70% – 20 хв.	60,3	28,1	11,6	10,6	5,4	84,0
«Білизна» 1:1 – 10 хв.	70,1	12,3	17,6	37,4	2,6	60,0
«Білизна» 1:1 – 20 хв.	75,6	2,1	22,3	8,3	1,6	90,1
«Білизна» 1:2 – 10 хв.	79,1	12,8	8,1	64,3	13,0	22,7
«Білизна» 1:2 – 20 хв.	90,6	1,3	8,1	13,4	2,3	84,3
H ₂ O ₂ 10 % – 10 хв.	69,3	15,3	15,4	59,0	12,8	28,2
H ₂ O ₂ 10 % – 20 хв.	73,0	11,7	15,3	52,4	10,3	37,3
KMnO ₄ 0,5 % – 10 хв.	87,6	10,0	2,4	76,4	11,3	12,3
KMnO ₄ 0,5 % – 20 хв.	87,1	5,6	7,3	64,7	5,0	30,3
KMnO ₄ 1,0 % – 10 хв.	90,6	4,7	4,7	82,7	1,6	15,7
KMnO ₄ 1,0 % – 20 хв.	94,3	1,6	4,1	49,4	0,6	50,0
<i>HIP₀₁</i>	4,75	0,78	0,72	1,75	0,33	4,42

Найнижчу ефективність стерилізації експлантів спостерігали за використання 70 % етилового спирту. У цьому варіанті досліді відмічено найвищий показник інфікування матеріалу (28,1–32 %). Продовження експозиції стерилізації не давало позитивних результатів. Вихід життєздатних

стерильних експлантів за стерилізації насіння не перевищував 59,6–60,3 %, а проростків – 10,4–10,6 %.

Комерційний препарат «Білизна» (діюча речовина гіпохлорид натрію) розводили з дистильованою водою у співвідношенні 1:1 та 1:2. Вказаний стерилізатор характеризувався високим токсичним впливом на живі організми. У концентрації 1:1 гіпохлорид натрію викликав значну частку некрозу експлантів. Для насіння цей показник за 10-ти хвилинної обробки становив 17,6 %, а за експозиції 20 хвилин підвищувався до 22,3 %. При цьому, вихід стерильних життєздатних біоструктур, відповідно складав 70,1 та 75,6 %. За стерилізації проростків за експозиції 10 хвилин, некроз спостерігався у 60,0 % експлантів, вихід життєздатних стерильних експлантів при цьому становив 37,4 %. Продовження тривалості стерилізації до 20 хвилин викликало загибель біоматеріалу на рівні 90,1 % і знижувало ефективність стерилізації до 8,3 %.

Нижча концентрація гіпохлориду натрію (1:2) забезпечувала високий показник знищення небажаної мікрофлори – вихід інфікованих експлантів не перевищував 13,0 %. За обробки насіння, оптимальною виявилась експозиція 20 хвилин, – за якої ефективність стерилізації становила 90,6 %. Для проростків вказана експозиція була високотоксичною, викликаючи некроз 84,3 % матеріалу. Стерилізація проростків ефективно проходила за тривалості 10 хвилин – вихід стерильних життєздатних експлантів становив 64,3 %.

Тривалість обробки насіння перекисом водню не впливала на ефективність стерилізації. В обох варіантах вихід стерильних життєздатних експлантів був на рівні 69,3–73,0 %. Для проростків оптимальною виявилась експозиція 10 хвилин – ефективність стерилізації становила 59,0 %. Продовження тривалості стерилізації знижувало вихід життєздатних стерильних експлантів на 12,1 % за високого некрозу біоматеріалу.

Використання перманганату калію у концентрації 0,5 % забезпечувало ефективність стерилізації насіння рижюю ярого на рівні 87,1–87,6 %. За збільшення експозиції стерилізації частка інфікованих експлантів

зменшувалась на 44,3 %. Десятихвилинна експозиція була оптимальною для стерилізації проростків – вихід стерильних життєздатних експлантів становив 76,4 %. Подовження тривалості стерилізації до 20 хвилин знижувало ефективність стерилізації до 64,7 %. За токсичного впливу препарату некроз експлантів складав 30,3 %.

Підвищення концентрації KMnO_4 до 1,0 % спричиняло підсилення токсичної дії як на експланти рижію ярого, так і на патогенну мікрофлору. За вказаної концентрації стерилізуючого агента відмічено найнижчий показник інфікування експлантів (3,2 %). За обробки насіння ефективність стерилізації за різних експозицій істотно не відрізнялась 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 %.

Не менш важливим показником, що вказує на вдалий підбір умов стерилізації, є інтенсивність росту біомаси на початкових етапах пасажування (табл. 3.2).

Анатомічні та морфологічні особливості проростка і насінини зумовлюють індивідуальні особливості щодо здатності стерилізуючих речовин акумулюватись у тканинах експлантів і здійснювати довготривалий токсичний вплив. За використання в якості експлантів насіння в середньому за всіх схем стерилізації відносний приріст первинної культури становив 13,8 пункти, що було в 1,7 рази більше ніж за використання проростків.

Істотне пригнічення культури рижію ярого відмічено за використання стерилізатором гіпохлориду натрію. Залежно від концентрації стерилізуючого чинника та експозиції обробки, відносний приріст біоматеріалу варіював від 10,3 до 12,8 одиниць за використання насіння та від 4,3 до 5,7 – за використання проростків.

Перманганат калію та перекис водню здійснювали на культуру рижію ярого рівнозначний стресовий вплив. Відносний приріст культури отриманої з

насіння в середньому складав 15,3 пункти за використання H_2O_2 і 14,7 за використання $KMnO_4$. Для культури проростків ці показники були значно нижчими і відповідно становили 9,8 і 9,1 пункти.

Таблиця 3.2

Вплив умов стерилізації на інтенсивність наростання біомаси експлантів рижю ярого

Варіант досліджу	Відносний приріст (ΔW)	
	насіння	проростки
C_2H_5OH 70% – 10 хв.	15,6±0,9	14,0±1,1
C_2H_5OH 70% – 20 хв.	15,1±0,8	13,4±0,91
«Білизна» 1:1 – 10 хв.	10,6±0,6	4,4±0,7
«Білизна» 1:1 – 20 хв.	10,3±0,7	4,3±0,5
«Білизна» 1:2 – 10 хв.	12,8±0,8	5,7±0,7
«Білизна» 1:2 – 20 хв.	12,1±0,8	5,3±0,6
H_2O_2 10 % – 10 хв.	15,4±1,0	9,9±0,8
H_2O_2 10 % – 20 хв.	15,1±0,9	9,7±1,0
$KMnO_4$ 0,5 % – 10 хв.	15,7±0,9	9,5±0,9
$KMnO_4$ 0,5 % – 20 хв.	14,6±0,8	9,5±0,9
$KMnO_4$ 1,0 % – 10 хв.	15,5±1,0	9,2±0,8
$KMnO_4$ 1,0 % – 20 хв.	13,0±0,9	8,2±0,8
HIP_{01}	0,9	0,3

Найвищий відносний приріст біомаси рижю ярого спостерігався за стерилізації експлантів етанолом. За використання C_2H_5OH різниця між інтенсивністю наростання культури, отриманої з насінин та проростків, була мінімальною, а відносний приріст біомаси складав 15,1–15,6 і 13,4–14,0 пунктів відповідно.

Отже, встановлено, що за введення в ізолювану культуру насіння проростків рижю ярого стерилізатором доцільно використовувати $KMnO_4$

концентрацією 1,0 % за експозиції 10 хвилин. Його застосування дозволило отримати 94,3 % стерильного життєздатного матеріалу.

3.2. Індукування калюсогенезу рижію ярого

Одним з основних типів рослинних біоматеріалів, що використовуються в дослідженнях *in vitro*, є калюсна тканина. Калюс є вихідним матеріалом для створення біооб'єктів – ембріодів, ізольованих протопластів, суспензійної культури тощо. Розробка ефективної технології отримання та програмованого культивування калюсної тканини визначає подальший успіх біотехнологічних досліджень з ізольованою культурою [8, 9].

Процес калюсогенезу залежить від низки внутрішніх і зовнішніх чинників – генотипу, типу експланту, фізичних умов культивування, складу живильного середовища, концентрації та співвідношення регуляторів росту. Параметри індукування калюсу *in vitro* підбираються експериментально для кожного біовиду окремо [10–15].

У роботі Л. О. Рябовол і А. І. Любченка [16] для індукування калюсогенезу цикорію коренеплідного відмічено перевагу використання експлантів з молодими мітотично активними клітинами. Тому в наших дослідженнях з вивчення калюсогенезу рижію ярого в якості експлантів використовували проростки сорту Степовий 1. Живильні середовища за прописом Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шенка-Хильдебранта доповнювали ауксинами та цитокінінами у різних концентраціях і співвідношеннях.

На 8–12 добу культивування біоматеріалу на модифікованих живильних середовищах відмічали зміну форми та потовщення гіпокотеля і сім'ядолей, а згодом – утворення на поверхні експлантів первинного калюсу. Надалі відбувалась хаотична проліферація калюсної тканини (рис. 3.1).

У результаті проведених досліджень встановлено залежність інтенсивності калусогенезу рижію ярого від складу живильного середовища та його модифікації фітогормонами.



Рис. 3.1 Формування калусної тканини з експлантів рижію ярого.

Найінтенсивніше індукування калусної маси отримано на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга. У 25,3 % висаджених експлантів відмічено проліферацію калусної тканини. За використання культуральних субстратів в основу яких входили макро- та мікроелементи за прописами Шенка-Хильдебранта і Гамборга, у середньому інтенсивність індукування калусогенезу становила 18,8 і 17,5 % (табл. 3.3). В результаті досліджень встановлено вплив вмісту в живильному середовищі регуляторів росту на проліферацію калусної маси рижію ярого.

Таблиця 3.3

**Вплив модифікації живильного середовища на інтенсивність
калюсогенезу рижію ярого, %**

Концентрація регулятора росту, мг/л		Базове живильне середовище (A)					
2,4-Д (B)	6-БАП (C)	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

НІР₀₁: A – 0,5; B – 0,4; C – 0,6; AB – 1,1; AC – 1,0; BC – 1,4; ABC – 2,4

На безгормональних середовищах (контроль) не відмічено ініціації 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 тканини становила 76,6 %. За використання середовищ за прописом Шенка-Хильдебранта і Гамборга цей показник відповідно складав 55,9 і 52,1 %.

Підвищення концентрації 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти 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 %.

Однією з головних характеристик, що вказує на придатність калюсу до використання, як вихідного матеріалу у подальших біотехнологічних дослідженнях, є його морфогенні показники. Морфогенний калюс має світло-жовте забарвлення, середньо-обводнену і напівщільну консистенцію. На поверхні тканин, за створення відповідних умов (гормональний баланс живильного середовища), утворювались меристемоактивні осередки (рис. 3.2).

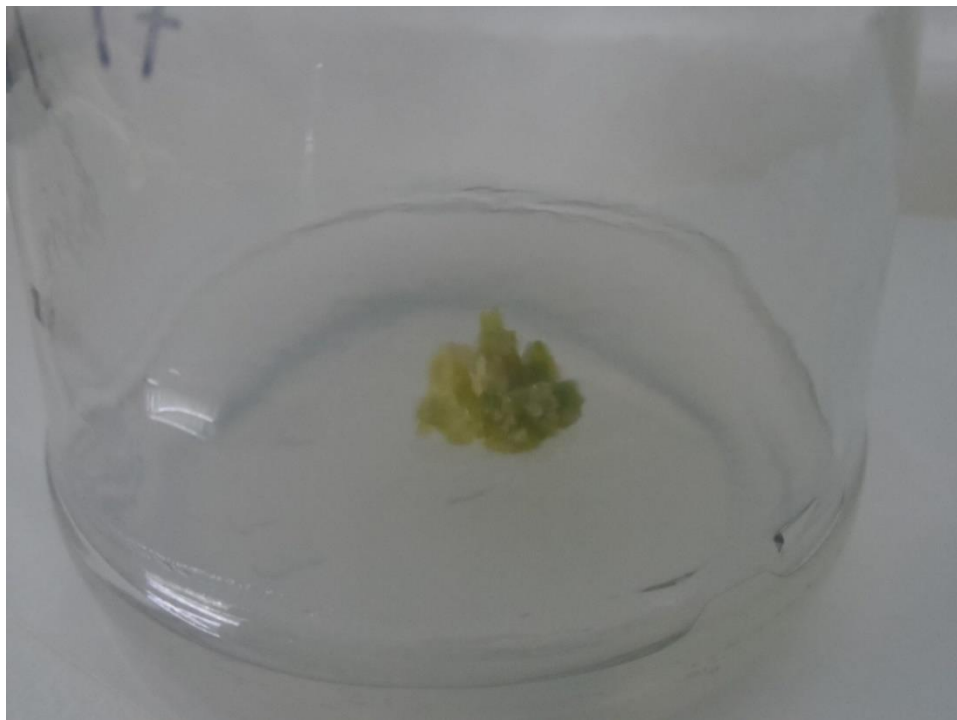


Рис. 3.2 Морфогенно активна калюсна тканина рижію ярого

Найвищий показник індукції морфогенного калюсу відзначено за

модифікації живильного середовища невисокими (0,1 %) концентраціями ауксинів і підвищеними (1,0 %) цитокинінів. За вказаного співвідношення регуляторів росту 73,4 % експлантів, висаджених на модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, формували морфогенну калюсну тканину, а за використання середовищ Шенка-Хильдебранта і Гамборга – 46,2 і 42,4 % відповідно. Калюси були середньо обводненими, білого або світло-зеленого забарвлення і мали напівщільну консистенцію з великою кількістю морфогенно активних осередків.

Підвищення концентрації 2,4-Д у субстраті до 1,5 мг/л пригнічувало індукцію отримання морфогенного калюсу. Утворені мікрокалюси мали біле забарвлення, розпушену або обводнену структуру та низький регенераційний потенціал.

Проведений порівняльний аналіз встановив частку впливу досліджуваних чинників (склад живильного середовища, концентрація 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти та 6-бензилоамінопурину) на показники проліферації калюсної тканини рижію ярого (рис. 3.3).

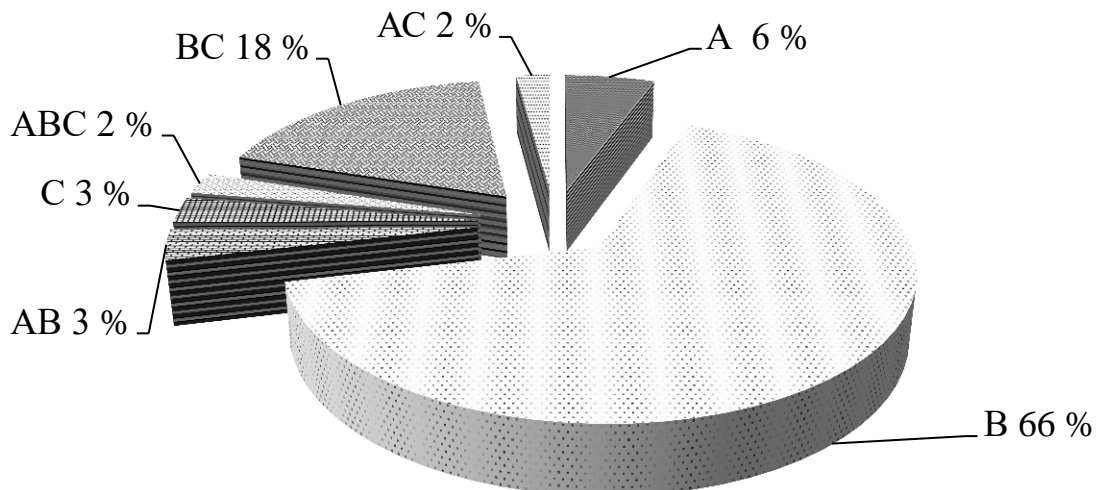


Рис. 3.3 Частка впливу досліджуваних чинників на індукцію калюсогенезу рижію ярого

фактор А – склад базового живильного середовища; фактор В – концентрація 2,4-Д; фактор С – концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС – взаємодія факторів.

На основі трьохфакторного дисперсійного аналізу доведено, що на індукцію калусогенезу істотно впливають вміст і співвідношення регуляторів росту в живильному середовищі. Частка впливу концентрації 2,4-Д на процес проліферації була найвищою і становила 66 %, взаємодія факторів В і С (концентрація ауксинів та цитокінінів) порівняно з цим мала менший вплив – 18 %. Вплив складу живильного середовища склав лише 6 %.

Отже, розроблено живильне середовище для індукції та проліферації морфогенної калусної тканини рижію ярого. Встановлено, що модифікація 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП середовища MS дає можливість стимулювати формування калюсу у 73,4 % експлантів.

3.3. Морфогенез калусних тканин рижію ярого

В умовах *in vitro* розвиток калусних клітин може відбуватись різними шляхами: вторинна регенерація цілої рослини; за органогенезу чи соматичного ембріодогенезу; проліферація калусної тканини; втрата клітинами морфогенних властивостей; звикання рости на безгормональних середовищах [17, 18].

У наших дослідженнях, залежно від морфологічних особливостей первинної культури та впливу зовнішніх чинників відмічено чотири типи розвитку калусних тканин рижію ярого (рис. 3.4).

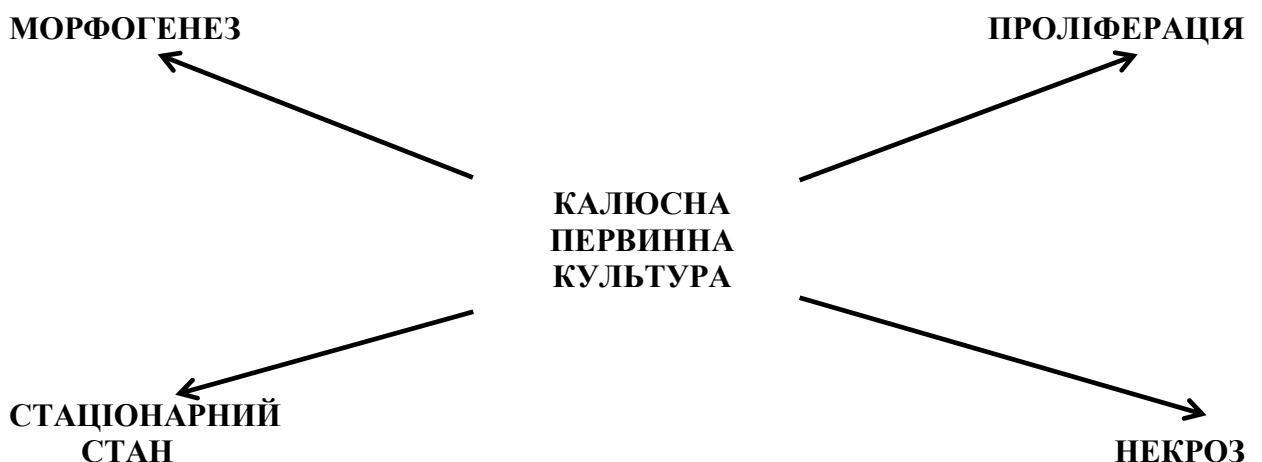


Рис. 3.4 Напрямки розвитку калусної тканини рижію ярого залежно від умов культивування *in vitro*

За стаціонарного стану морфогенні програми не реалізовувались, проліферація була незначна або повністю відсутня, проте мікрокалюси зберігали життєздатність. Проліферація калюсної біомаси була пов'язана з інтенсивним поділом дедиференційованих клітин і хаотичним наростанням тканин. Морфогенез супроводжувався новоутворенням диференційованих структур (тканин, органів, соматичних ембріодів) із маси недиференційованих клітин.

За розробки клітинних технологій важливим є вивчення й оптимізація умов активування морфогенного потенціалу калюсних тканин і отримання рослин-регенерантів. Цей етап біотехнологічних досліджень є досить складним, оскільки довготривале культивування калюсної маси в стресових умовах *in vitro* спричиняє зниження або повну втрату ними регенераційної здатності [19].

В основі регенерації *in vitro* лежить тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин реалізувати свій потенціал розвитку з утворенням цілого організму, тобто фенотипово реалізувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК [9, 8].

У дослідженнях з різними біовидами встановлено вплив на морфогенез генотипових особливостей, типу калюсних тканин, тривалості та умов культивування біоматеріалу, складу та гормонального балансу живильного середовища [20–24].

У культуральних умовах розрізняють такі типи морфогенезу: органогенез – утворення органів (бруньок, пагонів, коренів); гістогенез – утворення калюсними клітинами елементів тканин; ембріодогенез – утворення біполярних (подібних до зиготного зародка) соматичних утворень, що мають зачатки головних органів [9].

В наших дослідженнях морфогенний розвиток калюсів рижію ярого проходив шляхом гомогенезу – на поверхні тканини утворювались адвентивні пагони (рис. 3.5).



Рис. 3.5 Утворення адвентивних пагонів з калусної маси рижію ярого

Внаслідок проведених дослідів встановлено залежність регенераційної здатності калусної тканини рижію ярого від концентрації в живильному середовищі регуляторів росту (рис. 3.6).

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.

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 % .

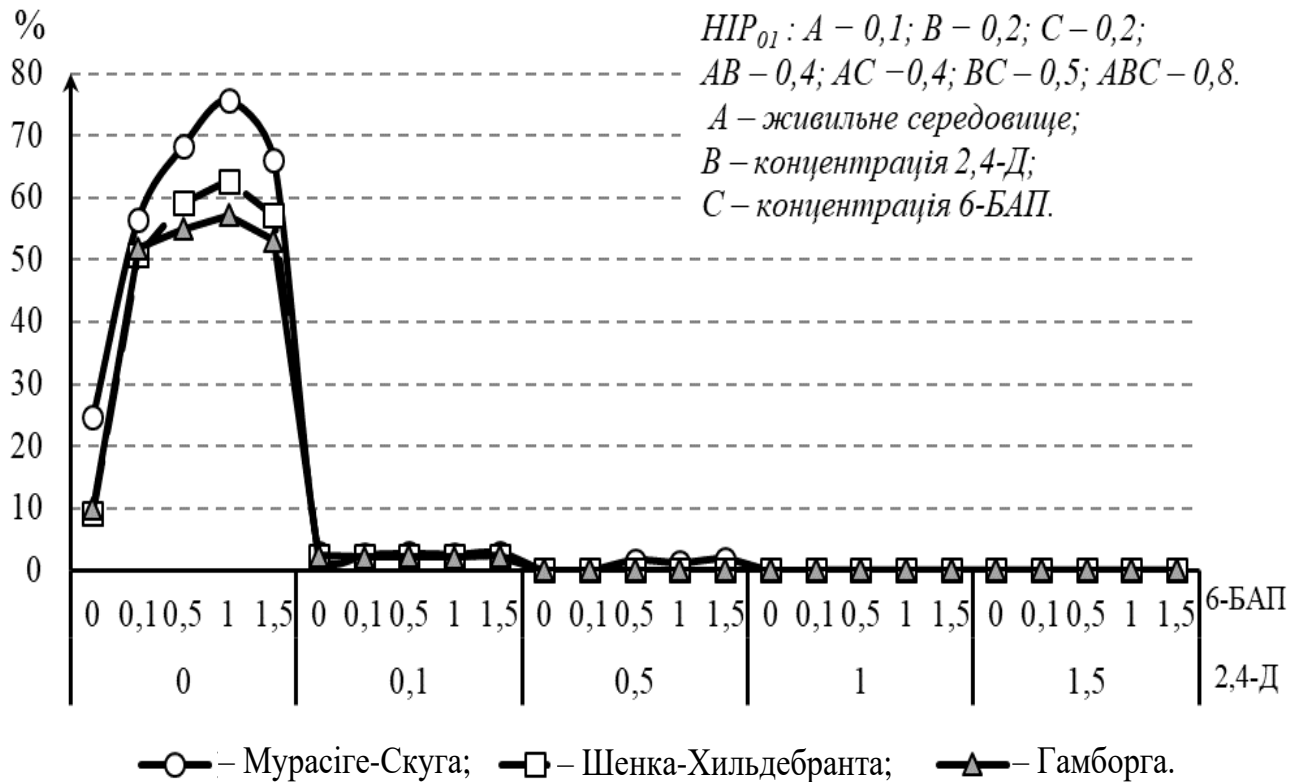


Рис. 3.6 Морфогенез калюсної тканини рижію ярого залежно від модифікації живильних середовищ регуляторами росту, %

Зменшення і зниження вмісту 6-бензиламінопурину в живильному середовищі спричиняло зниження морфогенної активності калюсу. Частка мікрокалюсів на яких спостерігали формування новоутворень при концентрації 0,1 мг/л 6-БАП на живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга становила 56,5 %, Шенка-Хильдебранта – 50,8 %, Гамборга – 51,9 % (у середньому на 6,5 % менше порівняно з найкращим варіантом). За концентрації цитокініну на рівні 0,5 мг/л вказаний показник відповідно становив – 68,4, 59,2 і 55,0 %. Підвищення вмісту 6-бензиламінопурину до 1,5 мг/л знижувало інтенсивність морфогенезу калюсних ліній рижію ярого у середньому на 9,9 %.

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

Склад базового живильного середовища несуттєво впливав на інтенсивність регенерації *in vitro* рижію ярого. За використання середовища за прописом Мурасіге-Скуга, в середньому за варіантами модифікацій регуляторами росту, показник морфогенної активності становив 12,4 %, а за використання субстратів Гамборга та Шенка-Хильдебранта – 9,5 % і 10,0 % відповідно.

За оцінки придатності живильних субстратів до морфогенезу калюсних тканин рижію ярого враховували не лише відсоток калюсів на яких проходив морфогенез, але і вихід регенерантів із одного мікрокалюсу (табл. 3.4).

У середньому на модифікованих живильних середовищах з одного мікрокалюсу рижію ярого масою 30–40 мг було регенеровано 3,3 мікропагона. На середовищі MS цей показник становив 4,1 мікропагона, на живильних субстрактах за прописом Шенка-Хильдебранта і Гамбора інтенсивність регенерації була нижчою на 29,5 і 27,5 % відповідно

На безгормональних середовищах інтенсивність морфогенезу залежно від його основного складу, варіювала від 2,5 до 3,8 регенеранти на мікрокалюс.

На регенераційних середовищах, що не містили 2,4-Д у середньому з одного мікрокалюса формувалось 4,2 регенеранти. На середовищі MS цей показник складав 5,3, на середовищі SH – 3,7, на середовищі B₅ – 3,6 регенеранти. Присутність у живильному субстраті ауксину в концентрації 0,1 мг/л знижувало інтенсивність регенерації калюса у середньому на 45,3 % (на середовищі MS з одного калюса утворювалось 2,9 регенеранти, на середовищах Шенка-Хильденбранта та Гамборга – 2,1 регенеранти).

Таблиця 3.4

Інтенсивність морфогенезу калюсної тканини рижію ярого залежно від модифікації живильного середовища, шт. рослин-регенерантів на мікрокалюс

Концентрація регуляторів росту, мг/л		Базове живильне середовище (A)		
2,4-Д (B)	6-БАП (C)	Мурасіге-Скуга	Шенка-Хильдебранта	Гамборга
0,0	0,0	3,8±0,2	2,7±0,7	2,5±0,6
	0,1	4,6±0,6	3,2±0,3	3,4±0,5
	0,5	5,8±0,2	4,1±0,4	4,0±0,4
	1,0	6,3±0,5	4,4±0,3	4,0±0,4
	1,5	6,0±0,8	4,2±0,7	4,4±0,1
0,1	0,0	2,0±0,1	1,4±0,4	1,5±0,4
	0,1	2,5±0,4	1,8±0,6	2,0±0,5
	0,5	3,0±0,1	2,1±0,1	2,5±0,4
	1,0	3,6±0,4	2,5±0,5	2,5±0,4
	1,5	3,4±0,3	2,4±0,1	2,0±0,4
<i>НІР₀₁ факторів: A – 0,3; B – 0,2; C – 0,4;</i>				
<i>взаємодії факторів: AB – 0,4; AC – 0,6; BC – 0,5; ABC – 0,9</i>				

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.

Проведений дисперсійний аналіз отриманих експериментальних даних дає нам змогу виявити вплив досліджуваних факторів на процес морфогенезу калюсних тканин рижію ярого (рис. 3.7).

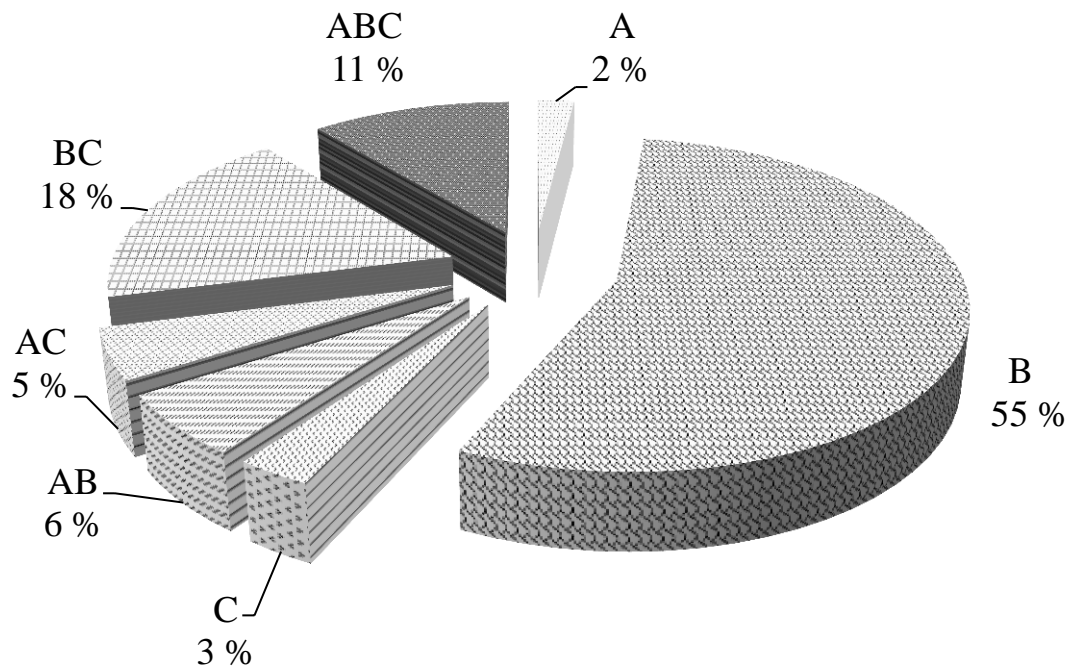


Рис. 3.7 Частка впливу досліджуваних чинників на інтенсивність проходження морфогенезу калусної тканини рижію ярого
 фактор А – склад базового живильного середовища; фактор В – концентрація 2,4-Д; фактор С – концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС – взаємодія факторів.

Визначальними чинниками індукції морфогенезу *in vitro* біоматеріалу рижію ярого є концентрація в субстраті 2,4-Д (частка впливу – 55 %), співвідношення ауксинів та цитокінінів (частка впливу – 18 %), та взаємодія всіх трьох досліджуваних факторів (частка впливу – 11 %). Вплив основного складу живильного середовища склав 2 %.

3.4. Мікроклональне розмноження рослин рижію ярого

Для прискорення селекційного процесу доцільно використовувати біотехнологічні методи, зокрема мікроклональне розмноження – масове

вегетативне клонування в умовах *in vitro*, що виключає появу генетично змінених форм [9].

Використання мікроклонального розмноження в селекційному процесі дає можливість працювати протягом року незалежно від погодних умов, добирати рослинний матеріал з бажаними ознаками та відтворювати його без генетичних змін, отримувати максимальну кількість копій з невеликої кількості вихідного матеріалу, інтенсивно розмножувати рослини з низькою фертильністю чи життєздатністю, створювати банк рослин з господарсько-цінними характеристиками, отримувати безвірусний оздоровлений насіннєвий матеріал тощо [8, 25].

Генетичною основою вегетативного розмноження є властивість рослинних клітин реалізувати власну генетичну інформацію, що забезпечує їх диференціацію і розвиток до цілого організму. За мікроклонального розмноження найстабільніше матеріал зберігається за використання в якості вихідного матеріалу апікальної меристеми [2].

Активація розвитку пазушних бруньок і використання бічних пагонів є одним із найпоширеніших методів вегетативного розмноження рослин в умовах *in vitro*. Він ґрунтується на блокуванні апікального домінування, що досягається видаленням верхівкової меристеми стебла або модифікацією живильного середовища регуляторами росту цитокінінової природи [9, 25].

Тривалий час вважалося, що використання мікроклонального розмноження можна застосовувати лише для культур, що здатні до вегетативного розмноження в природних умовах. Нині технологію розмноження *in vitro* розроблено для сільськогосподарських, лікарських, декоративних та лісових культур [25–30].

Ефективність мікророзмноження залежить від низки чинників, головними з яких є склад живильного середовища та концентрація і співвідношення у ньому регуляторів росту. Для рижію ярого це питання є маловивченим, що і спонукало нас до проведення досліджень у цьому напрямку.

За результатами проведених досліджень встановлено, що для рижію ярого характерний горизонтальний тип черенкування. Розмноження біоматеріалу відбувається за рахунок формування бічних адвентивних бруньок (рис. 3.8).



А

Б

Рис. 3.8 Мікроклональне розмноження рижію ярого

а – початок пасажу; б – інтенсивне закладання адвентивних бруньок.

Встановлено залежність інтенсивності мікроклонального розмноження від основного складу живильного середовища (рис. 3.9). Найвищий коефіцієнт розмноження отримано на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга. У середньому з одного висадженого експлантату за 20 діб культивування утворювалось 4,0 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.

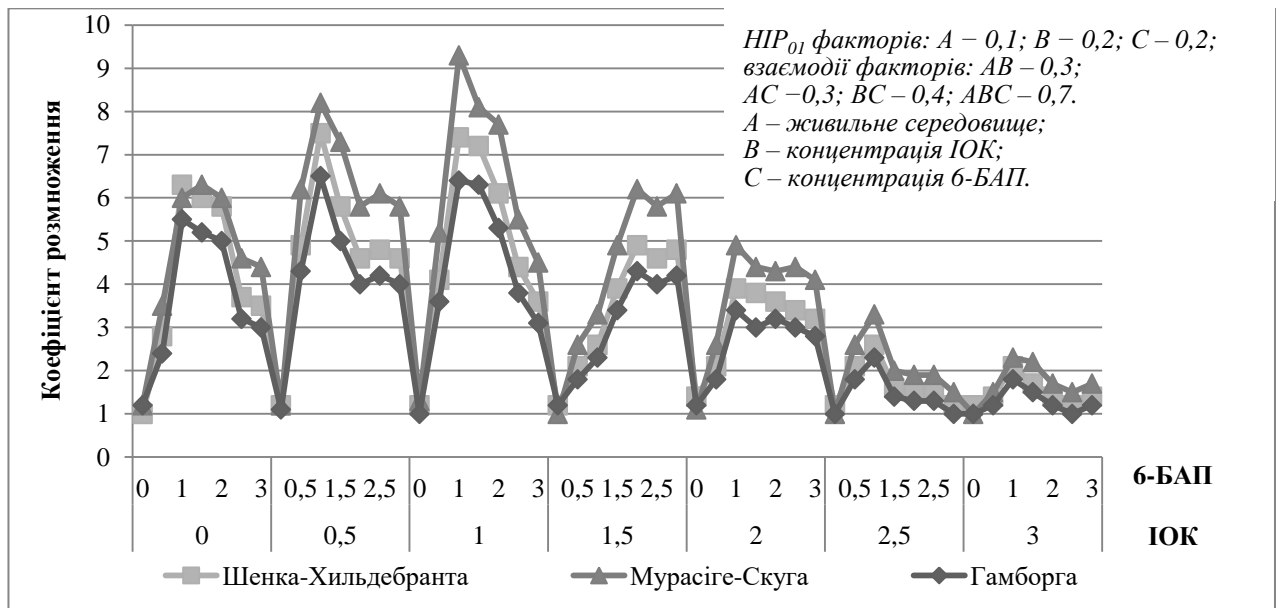


Рис. 3.9 Вплив модифікації живильних середовищ на коефіцієнт розмноження *in vitro* рижію ярого

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.

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

Важливим показником ефективності мікроклонального розмноження є морфологічні характеристики отриманих рослинних матеріалів. Інтенсивність наростання рослин-регенерантів рижію ярого істотно залежить від складу модифікованого живильного середовища (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

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
Гамборга (A)									
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
Мурасіге-Скуга (A)									
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
Шенка-Хильдебранта (A)									
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>НІР₀₁ (висота рослин): A – 4; B – 5; C – 5; AB – 8; AC – 6; BC – 6; ABC – 14;</i>									
<i>НІР₀₁ (приріст біомаси): A – 8; B – 10; C – 6; AB – 13; AC – 11; BC – 15; ABC – 24;</i>									
<i>НІР₀₁ (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 індувало формування клонів висотою 52–53 мм на середовищі Гамборга, 48–55 мм – на середовищі Мурасіге-Скуга і 46–48 мм – на середовищі Шенка-Хильдебранта (НІР₀₁ABC=14). Підвищення вмісту цитокініну понад 1,0 мг/л суттєво знижувало висоту отриманих рослин. На модифікованих живильних середовищах Гамборга та Мурасіге-Скуга середня маса однієї рослини відповідно становила 79 та 76 мг. На середовищі Шенка-

Хильдебранта цей показник був меншим на 21 % і становив 62 мг. Найбільша маса рослин (78–102 мг) зафіксована за модифікації живильного середовища ауксинами у концентрації 1,0 мг/л.

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 на 26–31 % істотно нижчими.

На основі дисперсійного аналізу було встановлено, що на інтенсивність мікророзмноження *in vitro* істотний вплив мали вміст та співвідношення регуляторів росту в живильному середовищі (рис. 3.10).

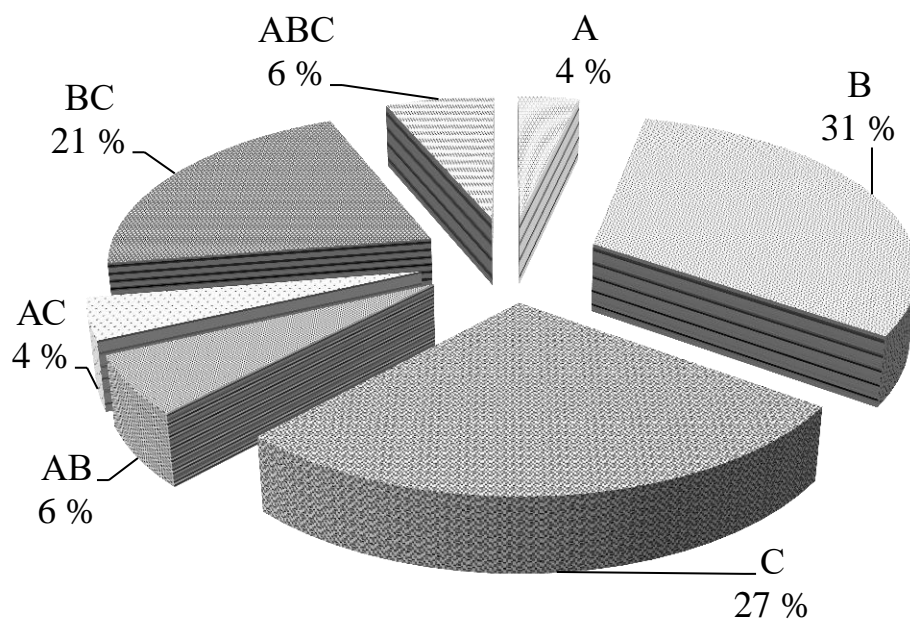


Рис. 3.10 Частка впливу досліджуваних чинників на інтенсивність мікроклонального розмноження рижію ярого:

фактор А – склад базового живильного середовища; фактор В – концентрація ІОК; фактор С – концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС – взаємодія факторів.

Частка впливу концентрації ІОК на коефіцієнт розмноження була найвищою і становила 31 %, концентрації 6-БАП – 27 %. Частка впливу взаємодії факторів В і С (співвідношення ауксинів та цитокінінів) становила 21 %, а складу базового живильного середовища – лише 4 %.

Отже, підтверджено, що для розмноження створеного вихідного рослинного матеріалу рижію ярого доцільно використовувати мікроклонування.

Підібрано модифіковане живильне середовище з додаванням 1,0 мг/л ІОК та 6-БАП, що забезпечує коефіцієнт розмноження на рівні 9,3 шт. рослин масою 94 мг за 20 діб культивування.

3.5. Цитологічний аналіз отриманого біоматеріалу рижію ярого

Калюсна тканина рижію ярого характеризується високою генетичною гетерогенністю. За цитологічного аналізу в калюсній тканині було ідентифіковано клітини з різним рівнем плоїдності (табл. 3.6). Геномні мутації в умовах *in vitro* зумовлено різними чинниками. Окрема частина змін каріотипу може виникати в клітинах експланту до введення їх в стерильну культуру, де вони закономірно виникають у процесі диференціювання, а в онтогенезі накопичуються випадкові зміни і мутації. Під час індукції калюсогенезу і подальшої проліферації *in vitro*, клітини знаходяться в умовах, що суттєво відрізняються від умов інтактного організму і перевищують межі норми реакції вихідного генотипу, що призводить до збільшення геномної мінливості [31].

Для виду *Camelina sativa* (L.) Crantz диплоїдний набір становить 40 хромосом [32]. У кінці субкультивування 49,1 % калюсних клітин мали збалансований диплоїдний набір хромосом.

Таблиця 3.6

Рівень плідності отриманих структур рижію ярого (у середньому за генотипами)*

Рівень плідності матеріалу	Тип біоматеріалу		
	калюс	соматичний ембріоїд	рослина-регенерант
Гаплоїд	18,0±0,6	3,2±0,3	2,5±0,2
Диплоїд	49,1±0,8	79,2±1,2	76,0±0,5
Триплоїд	10,5±0,4	7,3±0,6	5,5±0,3
Тетраплоїд	9,2±0,4	3,2±0,8	2,3±0,6
Анеуплоїд	13,2±0,6	7,1±0,5	8,4±0,7
Міксоплоїд	–	0,0	5,3±0,5

*Примітка: подано у відсотках до проаналізованого матеріалу;

Гаплоїдний рівень виявлено у 18,0 % проаналізованих клітин. Гаплоїдні клітини були дрібнішими, мали зменшену кількість органел і характеризувались коротким мітотичним циклом. Гаплоїдні калюсні клітини можуть виникати внаслідок редукційного мітозу або поступової елімінації хромосом до основного числа [33, 34].

За проходження дедиференціації та проліферації калюсної тканини рижію ярого, поряд зі зменшенням кількості хромосом у клітинах, спостерігали і явище поліплоїдії. З маси калюсних тканин 10,5 % та 9,2 % клітин відповідно мали триплоїдну та тетраплоїдну природу. Поліплоїдні тканини утворюються внаслідок ендоредуплікації та ендополіплоїдії, рівень поліплоїдизації залежить від початкової плідності вихідного експланту [35, 36] та впливу екзогенних регуляторів росту, зокрема підтверджено поліплоїдогенну дію 2,4-Д та НОК [37, 38]

Біля 13,2 % клітин у калюсній тканині рижію ярого були анеуплоїдами і мали набір хромосом некратний до основного числа. Анеуплоїдія пояснюється нерозходженням хромосом в анафазі [39].

Внаслідок реалізації морфогенетичного потенціалу калюсних канин рижію ярого вдалось отримати інтактні рослини. Морфогенез проходив як

шляхом органогенезу, так і шляхом соматичного ембріодогенезу. У порівнянні з калюсною тканиною, отримані рослини характеризувались збалансованішим каріотипом. Диплоїдний набір мали 79,2 % соматичних ембріодів та 76,0 % рослин-регенерантів, отриманих шляхом органогенезу. Гаплоїдною структурою характеризувались відповідно 3,2 та 2,5 % рослин. Гаплоїдні рослини, в порівнянні з диплоїдними, мали зменшені біометричні показники та нижчу життєздатність.

В отриманих рослинних структурах, поряд зі зменшенням числа хромосом, спостерігали виникнення поліплоїдних форм. У соматичних ембріодів частка триплоїдів та тетраплоїдів становила 7,3 та 3,2 % відповідно. Для рослин отриманих шляхом органогенезу цей показник відповідно складав 5,5 та 8,4 %.

Показник виникнення анеуплоїдних рослин за соматичного ембріодогенезу становив 7,1 %, за органогенезу — 8,4 %. Спостерігали утворення як моно- та нулісомиків, так і три- та тетрасомиків.

Шляхом органогенезу було отримано 5,3 % рослин, які були міксоплоїдами. Це явище обумовлено тим, що за цього типу органогенезу інтактна рослина формується із групи клітин, які можуть мати різну генетичну природу. Серед соматичних ембріодів міксоплоїдних форм не виявлено — соматичний ембріод розвивається з однієї вегетативної проембріональної клітини.

Отже, калюсна тканина рижію ярого представлена клітинами різної плоїдності. Отримані інтактні рослини мали менший розмах геномної мінливості. Соматичні ембріоди були генетично стабільнішими у порівнянні з рослинами, що виникли внаслідок органогенезу.

Висновки до розділу 3

1. Для стерилізації експлантів рижію ярого найефективніше використовувати 1,0 % розчин перманганату калію експозицією 10 хвилин. За

цієї схеми стерилізації вихід життєздатних експлантів з насіння складав 90,6 %, за відносного приросту біомаси 15,5 одиниць, з проростків – 82,7 % і 9,2 пункти відповідно.

2. Розроблено склад живильного середовища для індукції калюсогенезу рижію ярого. Проліферація калюсної тканини найінтенсивніше проходить на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП. Найвпливовішим чинником індукції калюсної тканини визначено концентрацію в субстраті ауксину.

3. Підібрано культуральний субстрат для морфогенезу калюсної біомаси рижію ярого. Найвищу активність морфогенезу (75,8 %) калюсної тканини відмічено на модифікованому 1,0 мг/л 6-БАП живильному середовищі Мурасіге-Скуга за повної відсутності в субстраті ауксинів. З одного мікрокалюса в середньому регенеровано 6,3 пагона.

4. Для розмноження селекційного матеріалу рижію ярого доцільно використовувати мікроклональне розмноження. За мікроклонування найвищий коефіцієнт розмноження (9,3 клони за пасаж) відмічено на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації 1,0 мг/л ІОК та 6-БАП.

За матеріалами розділу опубліковано 11 праць [40-50].

Список джерел літератури за розділом 3.

1. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Київ: Київський університет, 2005. 114 с.
2. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 272 с.
3. Карзіна Н., Митрофанова І. Розвиток експлантів ломиносу (*Clematis L.*) на етапі введення за умов *in vitro*. *Вісник Львівського університету. Серія ботанічна*. 2014. № 64. С. 67–74.

4. Иванова Н. Н., Митрофанова И. В., Шишкина Е. Л. Особенности развития эксплантов фейхоа на этапе введения в культуру. *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского*. 2012. Том 25 (64). № 4. С. 67–71.
5. Нескородов Я. Б., Скрыбин К. Г. Индукция множественного побегообразования у эксплантов подсолнечника в культуре *in vitro*. *Научно-технический бюллетень Всероссийского НИИ масличных культур*. 2009. № 2 (141). С. 146–151.
6. Черненко А. Д., Небиков М. В. Стерилизація експлантів ріпаку озимого для введення в культуру *in vitro*. *Автохтонні та інтродуковані рослини*. 2010. № 6. С. 117–120.
7. Ташлицкая Л. М., Юркова И. Н., Сидякин А. И., Жупанов И. В. Получение каллусной культуры донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L.) и ее цитоморфологические особенности. *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского*. 2011. Том 24 (63). № 2. С. 284–290.
8. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. *Комаровские чтения*. 2007. Вып. LV. С. 184–211.
9. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
10. Озигит И. И. Индукция каллуса и регенерация растений из зрелых зародышей подсолнечника. *Физиология растений*. 2006. Т. 53. № 4. С. 621–624.
11. Костюкова Ю. А. Особенности каллусогенеза и морфогенеза в культуре тканей различных видов гречихи: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 – физиология и биохимия растений. Казань, 1999. 155 с.
12. Константинов А. В. Влияние состава гормонов в среде прекультивирования на регенерацию в каллусных культурах березы повислой (*Betula pendula* Roth.). *Modern Phytomorphology*. 2013. № 4. С. 241–244.

13. Сельдимирова О. А., Круглова Н. Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклинных каллусах пшеницы *in vitro*. *Известия Уфимского НЦ РАН*. 2015. № 1. С. 33–39.
14. Гонтаренко С. М., Герасименко Г. М. Шляхи андрогенезу пиляків цукрових буряків у культурі *in vitro*. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 95-річчю ІБКіЦК НААН. Вінниця, 2017. С. 189–191.
15. Чернобровкина М. А., Хватков П. А., Леонтьева А. В., Долгов С. В. Изучение морфогенетического потенциала озимого рапса отечественной селекции в культуре *in vitro*. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017. № 11 (часть 2) С. 260–264.
16. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Умови індукції та культивування морфогенної калюсної тканини *Cichorium intubus* L. Матеріали всеукраїнської наук. конференції молодих вчених. Умань, 2006. С. 32–33.
17. Расторгуев С. Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений. Мичуринск: Издательство Мичуринского государственного аграрного университета, 2009. 170 с.
18. Левенко Б. А., Новак Т. В. Культура клеток и тканей в селекции основных сельскохозяйственных растений. Киев: Изд-во УкрНИИНТИ, 1987. 35 с.
19. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка. 1990. 280 с.
20. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Morphogenesis *in vitro* in maize inbred lines from the Lancaster heterotic group. *Cytology and Genetics*. 2017. Vol. 51, № 1, P. 48–53.
21. Фоменко Т. И., Малюш М. К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2010. Т. 42. № 4. С. 306–314.
22. Якимова О. В., Егорова Н. А. Каллусогенез и морфогенез в культуре изолированных органов и тканей *Melissa officinalis* L. *In vitro*. *Ученые записки Таврического национального университета*

- им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2014. Том 27(66). № 5. С. 191–201.
23. Нгуен Тхань Хай. Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных клеток и тканей подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *Известия ТСХА*. Вып. 2. 2007. С. 116–124.
24. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Індукування соматичного ембріодогенезу *Cichorium intybus* L. Матеріали міжнарод. науково-практичної конференції «Аграрний форум – 2006». Суми, 2006. С. 15.
25. Плаксина Т. В., Пищева Г. Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений. *Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН*. 2014. № 12. С. 22–30.
26. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова думка, 1992. 232 с.
27. Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Терек В. О. Мікрклональне розмноження рослин *Trifolium pratense* L. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*. 2010. № 28. С. 1–4.
28. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Сержук О. П. Умови мікророзмноження *in vitro* солестійких соматоклонів цикорію коренеплідного при їх повторному ретестуванні. *Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних ресурсів*. 2011. № 12. С. 161–165.
29. Сергиенко О. Ф. Оптимизация методики микрклонального размножения моркови. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2000. Т. 32. № 3. С. 232–235.
30. Шистибратов К. А., Лебедев В. Г., Мирошников А. И. Размножение древесных растений *in vitro* (клональные технологии). *Биотехнология*. 2008. № 5. С. 4–22.
31. Кунах В. А. Жебраковские чтения III. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2011. 56 с.

32. Жуковский П. М. Культурные растения и их сородичи. Ленинград: Колос, 1964. 792 с.
33. Сидоров Б. П., Соколов Н. Н., Вакуленко Н. А., Огородникова А. Р. Блокада веретена и гипоплоидный рост при колхициновом митозе // В кн.: Полиплоидия и селекция. М.-Л., Наука, 1965. С. 109-122.
34. Сахаров В. В., Мансурова Л. И., Науменко В. А., Мелконова Е. Ф. Геномные мутации в соматических клетках полиплоидов кавказской ромашки. Эксперим. мутагенез животных, растений и микроорганизмов: Тез. докл. М., 1965. Ч. 2. С. 60-62
35. Хрустпалева Л. И., Карлов Г. И. Кинетика полиплоидизации клеток в первичном каллусе у различных генотипов люцерны. Цитол. и генет. 1995. 29, №2. С. 31–36.
36. Pijnacker L. P., Sree R. K., Dijkhuis P., Ferwerda M. A. Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. Theor. and Appl. Genet, 1989. 77, N 1. P. 102–110.
37. Долежел Й., Новак Ф. Й. Кариологические изменения в ходе дедифференцировки клеток чеснока (*Allium sativum* L.). Культура клеток раст. и биотехнол. М.: Наука, 1986. С. 20–25.
38. Jha S., Sen S. Induction of mitosis in polytene nuclei and hormonal effect on nuclear changes during callus initiation in diploid *Urginea indica* Kunth. (Liliaceae). Genetica. 1990. 80, N 1. P. 9–15.
39. Kim K. M., Baenziger P. S., Rybczynski J. J., Arumuganathan K. Characterization of ploidy levels of wheat microspore-derived plants using laser flow cytometry. *In vitro* Cell. Develop. Biol. Plant. 2003. 39, № 6. P. 663–668.
40. Любченко А. І, Любченко І. О. Отримання стерильної культури *Camelina sativa* L. Збірник наукових праць УНУС. 2017. Вип. № 90. С. 197–205.

41. Любченко І. О., Любченко А. І., Рябовол Л. О. Модифікація живильних середовищ для індукування калусогенезу *in vitro* рижію ярого. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2018. № 1 (71). URL: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/10019-21446-1-SM.pdf>.
42. 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.
43. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Любченко І. О. Отримання *in vitro* морфогенної калусної біомаси рижію ярого. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених, присвяченої 170-й річниці від дня заснування Уманського національного університету садівництва. Умань, 2014. С. 49–50.
44. 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. Умань, 2015. С. 55-56.
45. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Індукція формування морфогенної калусної 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. Умань, 2015. С. 31–33.
46. 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*. Умань, 2015. С. 74–75.
47. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Отримання культури *in vitro* рижію ярого. Матеріали Міжнародної наукової конференції *Селекційно-генетична наука і освіта*. Умань, 2016. С. 216–218.

48. 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.
49. Любченко І. О., Любченко А. І. Індукція морфогенезу калюсної тканини рижію ярого. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції *Актуальні питання сучасної аграрної науки*, присвячену 150-річчю заснування факультету агрономії Уманського НУС. Умань, 2017. С. 70–71.
50. 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 калюсної тканини рижію ярого; Заявл. 22.02.2019; Оpubл. 27.08.2019; Бюл. №16. 3 с.

РОЗДІЛ 4.

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ РИЖІЮ ЯРОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

4.1. Добір *in vitro* стійких до хлориду натрію клітинних ліній рижію ярого

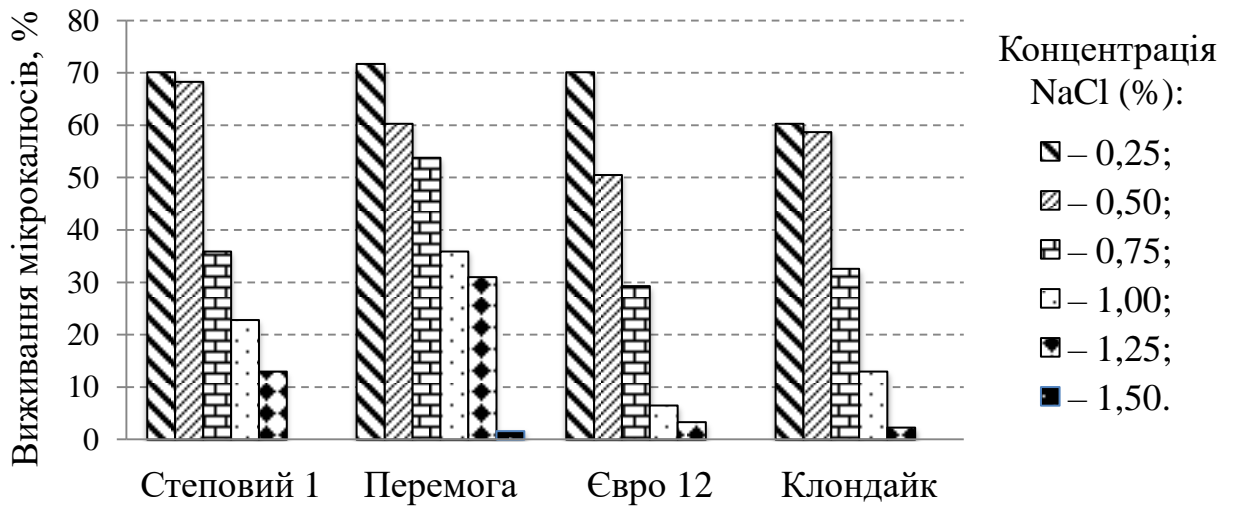
Сучасним перспективним напрямком генетично-селекційних досліджень рослин є екологічна селекція, одним із аспектів реалізації якої є добір генотипів з широкою нормою реакції на дію зовнішніх чинників [1]. Створення резистентних рослинних форм – процес довготривалий і вимагає від селекціонера застосування спеціальних дороговартісних і складних у виконанні заходів. Нині існують дані про отримання *in vitro* солестійких форм багатьох сільськогосподарських культур, зокрема, пшениці [2, 3], тритикале [4], картоплі [5–7], буряка цукрового [8], цикорію коренеплідного [9], ячменю ярого [10] тощо. Підбір оптимальної концентрації селективного чинника в живильному середовищі – одне з важливих питань ведення добору *in vitro*. Недостатній стресовий тиск не дає можливості чітко провести ранжування досліджуваних генотипів за рівнем стійкості та виділити резистентні клітинні лінії. Занадто висока концентрація селективного чинника може спричинити повну загибель культури. Параметри добору *in vitro* визначаються експериментальним шляхом залежно від видових і сортових особливостей, типу вихідного матеріалу, токсичності селективного агента тощо [11].

У наших дослідженнях калюсну тканину рижію ярого 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 калусної біомаси, втрату структури та утворення некротичних зон. Надалі фіксували загибель несолестійких генотипів (рис. 4.1).

Таблиця 4.1



НІР₀₁: А – 1,0; В – 1,2; АВ – 2,3. А – концентрація у живильному середовищі NaCl; В – сорт-донор експлантів.

Рис. 4.1 Життєздатність калусу рижію ярого залежно від концентрації хлориду натрію та генотипу вихідного матеріалу

Присутність у живильному середовищі хлориду натрію в концентрації 0,25 % спричинило загибель 28,3–29,9 % мікрокалюсів отриманих із сортів Перемога, Степовий 1 і Євро 12, а з сорту Клондайк цей показник становив 39,7 %. За збільшення концентрації селективного агенту до 0,5 % виживання біоматеріалів *in vitro* становило в середньому за генотипами 59,5 %, за мінімального значення з сорту Євро 12 (50,5 %), а максимального – Степовий 1 (68,3 %). Засолення культурального субстрату на рівні 0,75 % знижувало виживання калусної тканини, індукованої з експлантів сортів Степовий 1, Євро 12 і Клондайк відповідно до 35,9, 29,3, і 32,6 %. За вказаного рівня засолення 53,8 % мікрокалюсів з сорту Перемога зберігали життєздатність.

Підвищення концентрації NaCl понад 1,0 % дає змогу провести ранжування генотипів за рівнем солестійкості. Це підтверджується в роботі Н. Khalid зі співавторами [12], які рекомендують проводити добір *in vitro* рижію ярого за вмісту в живильному середовищі хлориду натрію 200 мМ. За 1 % концентрації NaCl рівень збереження життєздатності калюсної тканини отриманої з експлантів сортів Перемога і Степовий 1 відповідно складав 35,9 і 22,8 %, а сортів Євро 12 і Клондайк – 6,5 і 13,0 % відповідно.

Межею солестійкості калюсних тканин сортів Клондайк, Євро 12 і Степовий 1 є 1,25 % рівень засолення, при цьому показники виживання експлантів становили 2,3, 3,3 і 13,0 % відповідно. 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 основі отриманих даних був проведений порівняльний аналіз впливу досліджуваних чинників (генотип донора експланта, концентрація хлориду натрію в живильному середовищі) на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах сольового стресу (рис. 4.2).

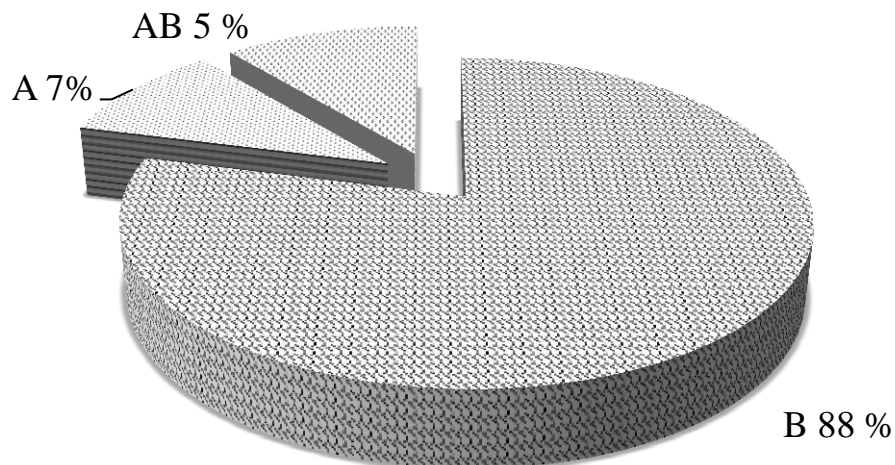


Рис. 4.2 Частка впливу досліджуваних чинників на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах сольового стресу:

А – концентрація хлориду натрію в живильному середовищі; В – генотип донора експланта; АВ – взаємодія чинників.

Серед чинників, що аналізувались у досліді, найбільший вплив на виживання мікрокалюсів рижію ярого в умовах сольового стресу мав генотип експланту 88 %. Частка впливу рівня засолення живильного середовища і сукупна дія обох чинників відповідно становила 7 та 5 %.

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.4.1).

Таблиця 4.1

Інтенсивність проліферації калюсної тканини рижію ярого залежно від концентрації в живильному середовищі хлориду натрію

Концентрація NaCl, % (A)	Кількість життєздатного калюсу отриманого із експлантів сортів (B)							
	Степовий 1		Перемога		Євро 12		Клондайк	
	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%
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

НІР₀₁: A – 0,2; B – 0,2; AB; – 0,5

Найбільший відносний приріст калюсної маси відмічався з калюсу сортів Степовий 1 (9,2 пункти) і Перемога (8,6 пункти). Інтенсивність наростання біомаси калюсу сортів Євро 12 і Клондайк була набагато нижчою і

відповідно становила 3,5 і 4,0 пункти. 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.

За 0,5 % концентрації хлориду натрію понад 60 % поверхні калюсних тканин мала світло-жовтий колір і структуровану консистенцію. Відносний приріст біомаси склав 1,7–3,1 пункти. У цьому варіанті найістотніше зниження темпів приросту калюсної тканини за відношенням до контролю відмічено в калюсу сорту Степовий 1 (на 70,7 %), а найменше – з сорту Клондайк (на 27,5 %). Проте, така відмінність пов'язана не стільки з рівнем стійкості вихідних генотипів до селективного чинника, а з різними показниками проліферації досліджуваних генотипіву оптимальних умовах вирощування.

Підвищення вмісту селективного агента в живильному середовищі до 0,75 % викликало зниження інтенсивності наростання біомаси на 55,2–85,9 % і зниження регенераційної здатності мікрокалюсів. Відносний приріст калюсу сортів Степовий 1 і Євро 12 склав 1,3, сорту Клондайк – 1,5, сорту Перемога – 1,6 пункти.

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. Мікрокалюси мали низьку регенераційну здатність. Тканини набували розпушеної консистенції, меристематично активні осередки складали менше 10 % поверхні експлантів.

Хлоридне засолення концентрацією 1,25 % викликало сильне пригнічення проліферації і морфогенних властивостей калюсної тканини рижію ярого. Інтенсивність наростання біомаси знижувалась на 95,0–89,5 %, відносний

приріст калюсу сортів Євро 12 і Клондайк був низьким (0,2 пункти), а мікрокалюси різко знижували здатність до морфогенезу. Приріст біомаси сортів Степовий 1 і Перемога відповідно становив 0,7 і 0,9 пункти.

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.

За порівняльного аналізу впливу чинників, (генотип і концентрація хлориду натрію), на показники проліферації калюсної тканини рижію ярого в умовах сольового стресу встановлено, що хоча калюсна тканина досліджуваних сортів відрізнялась за рівнем солестійкості, найбільший вплив на інтенсивність наростання біоматеріалу в умовах сольового стресу мала концентрація селективного агента в живильному середовищі (73 %). Рівень впливу генотипу донорного матеріалу склав 10 %, взаємодія досліджуваних факторів – 17 %.

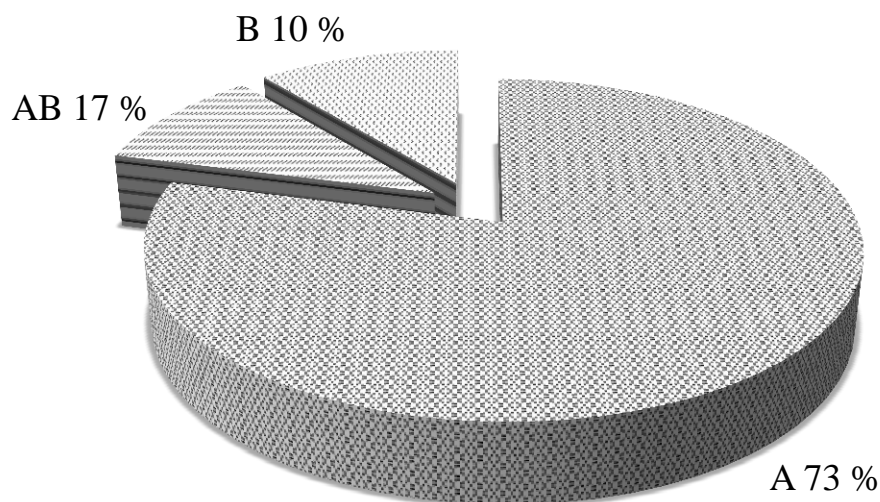


Рис.4.3 Частка впливу досліджуваних чинників на інтенсивність проліферації калюсної тканини рижію ярого в умовах сольового стресу:

А – концентрація хлориду натрію в живильному середовищі; фактор В – генотип рослини донора експланта; АВ – взаємодія факторів.

Для підвищення стійкості калусної культури рижію ярого, проводили ступеневу клітинну селекцію, збільшуючи концентрацію NaCl у селективному середовищі. Існують дані наукової літератури щодо переваг поступового підвищення сили стресового тиску за проведення добору *in vitro* [13–15].

Клітинні лінії рижію ярого, відібрані на середовищах з низьким вмістом солей (0,5 %), переносили на селективні середовища з вищим рівнем засолення, збільшуючи тиск стресового агента.

Елімінація чутливих до засолення калусів на селективних середовищах з 1,0 % вмістом NaCl проходила впродовж п'яти пасажів (табл. 4.2). Найвищі темпи добору соматональних ліній відмічено на перших етапах культивування. У кінці першого пасажу виживання біоматеріалів отриманих з сорту Степовий 1 складало 48,1 %, Перемога – 56,0 %, Клондайк – 43,9 %, Євро 12 – 35,0 %. При подальшому продовженні культивування калусних тканин за 1,0 % вмісту хлориду натрію в живильному субстраті відмічено зниження показників відмирання калюсу. Після другого пасажу виживання біоматеріалу залежно від генотипу варіювало в межах 72,1–76,1 %, третього – 74,8–83,0 %, а четвертого – 88,0–96,8 %.

Таблиця 4.2

Динаміка виживання біоматеріалу рижію ярого на селективному середовищі з 1,0 % NaCl за проведення ступеневої селекції

Калюс, отриманий з експлантів сортів	Кількість висаджених калюсів, шт.	Кількість життєздатних калусів у кінці пасажу									
		1		2		3		4		5	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	593	285	48,1	208	73,0	158	76,0	139	88,0	133	95,4
Перемога	664	372	56,0	283	76,1	235	83,0	218	92,8	218	100,0
Євро 12	471	165	35,0	119	72,1	89	74,8	84	94,4	84	100,0
Клондайк	494	217	43,9	159	73,3	124	78,0	120	96,8	116	96,2

Наприкінці п'ятого пасажу показник виживання калюсу з сорту Степовий 1 становив 95,4 %, сорту Клондайк – 96,2 %, сортів Перемога і Євро 12 – 100,0 %. Загалом на цьому етапі добору було виділено 127 калюсних ліній сорту Степовий солевитривалість яких становила 1,0 %. З калюсу сортів Перемога, Євро 12 і Клондайк виділено 218, 84 і 116 ліній відповідно. Одержані *in vitro* стійкі калюсні лінії висаджували на середовища без селективного чинника, а потім знову повертали в умови засолення. Солестійкість створених ліній зберігалась надалі.

З метою підвищення солестійкості культури клітин рижію ярого було проведено наступний етап добору на селективних середовищах з 1,25 % вмістом NaCl, використовуючи матеріал відселектований на попередніх стадіях.

Наприкінці першого субкультивування за 1,25 % рівня хлоридного засолення відмічено найвищий показник виживання біоматеріалу сорту Перемога – 65,1 %. Збереженість калюсу сортів Степовий 1, Клондайк і Євро 12 відповідно становила 53,9; 32,8 і 27,9 % (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Динаміка виживання біоматеріалу рижію ярого на селективному середовищі з 1,25 % NaCl за проведення ступеневої селекції

Калюс, отриманий з експлантів сортів	Кількість висаджених калюсів, шт.	Кількість життєздатних калюсів у кінці пасажу									
		1		2		3		4		5	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	167	90	53,9	61	67,8	48	78,7	45	93,8	45	100,0
Перемога	272	177	65,1	124	70,1	92	74,2	92	100,0	88	95,7
Євро 12	104	29	27,9	16	55,2	11	68,8	10	90,9	10	100,0
Клондайк	119	39	32,8	17	43,6	12	70,6	10	83,3	10	100,0

Частка виживання біоматеріалів рижію ярого за концентрації 1,25 %

NaCl зі збільшенням тривалості добору підвищувалась. Залежно від вихідного генотипу після другого пасажу виживання калюсних тканин становило 43,6–70,1 %, третього – 68,8–78,7 %, четвертого – 83,3–100,0 %, п'ятого – 95,7–100,0 %. Надалі усі отримані клітинні лінії рижію ярого зберігали стійкість до селективного чинника за вказаної концентрації. На цьому етапі клітинної селекції було відібрано 88 клітинних ліній сорту Перемога, 45 ліній-сорту Степовий 1 та по 10 калюсних ліній-сортів Євро 12 і Клондайк. Отримані біоматеріали мали добрі та задовільні морфогенні показники.

Хлоридне засолення за 1,5 % концентрації викликало сильне пригнічення проліферації калюсної тканини рижію ярого та втрату морфогенних показників. Калюси набували темного забарвлення, збільшувалась площа некротичних ділянок.

Елімінація нестійких біоматеріалів відбувалась впродовж чотирьох пасажів, після чого кількість стійких ліній залишалась сталою. У порівнянні з попередніми етапами роботи відмічено нижчий показник відмирання трансплантів, що можна пов'язати з поступовим підвищенням сили стресового тиску (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Динаміка виживання біоматеріалу рижію ярого на селективному середовищі з 1,5 % NaCl за проведення ступеневої селекції

Калюс, отриманий з експлантів сортів	Кількість висаджених калюсів, шт.	Кількість життєздатних калюсів у кінці пасажу							
		1		2		3		4	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	45	37	82,2	35	94,6	35	100,0	35	100
Перемога	94	79	84,0	68	86,1	65	95,6	60	92,3
Євро 12	10	6	60,0	4	66,7	4	100,0	4	100,0
Клондайк	10	6	60,0	5	83,3	4	80,0	4	100,0

Наприкінці першого субкультивування за вказаної концентрації хлориду натрію виживання калусної тканини сорту Перемога становило 84,0 %, Степовий 1 – 82,2 %, Євро 12 і Клондайк – 60,0 %. Після другого пасажу у середньому за генотипами виживання біоматеріалів становило 82,7 %. Надалі частка виживання калусів варіювала від 80,0 % до 100,0 %.

Отже, в ході клітинної селекції, що тривала понад 15 місяців, відібрано клітинні лінії рижію ярого з різною стійкістю до хлоридного засолення. Калус отриманий з різних сортів рижію ярого характеризувався індивідуальними показниками стійкості до стресового чинника. Проте, для всіх генотипів межею проведення ступеневого добору *in vitro* на стійкість до засолення була 1,5 % концентрація в живильному середовищі хлориду натрію (табл. 4.5)

Найвищий показник виживання рижію ярого відмічено у клітинних ліній сорту Перемога. До 1,0 % концентрації стійкість зберігали 272 клітинні лінії, або 41,0 % від загальної кількості калусних штамів, що було використано для добору *in vitro*, 94 клітинних лінії (14,2 %) відзначалися стійкістю до 1,25 % концентрації солі в живильному середовищі. Верхню межу засолення витримувало 8,4 % досліджуваних біоматеріалів – 56 клітинних ліній зберігали життєздатність за концентрації NaCl на рівні 1,5 %.

Таблиця 4.5

Результати проведення багатоступеневого добору *in vitro* калусних ліній рижію ярого на стійкість до хлориду натрію

Генотип	Рівень засолення, %					
	1,0		1,25		1,5	
	отримано клітинних ліній, шт.	частка виживання %	отримано клітинних ліній, шт.	частка виживання %	отримано клітинних ліній, шт.	частка виживання %
Степовий 1	167	28,2	45	7,6	35	5,9
Перемога	272	41,0	94	14,2	56	8,4
Євро 12	104	22,1	10	2,1	4	0,8
Клондайк	119	24,1	10	2,1	4	0,8

До 1,0 % рівня засолення живильного субстрату стійкими виявились 167 клітинних ліній отриманих з експлантів сорту Степовий 1, частка виживання біоматеріалу становила 28,2 %. За проведення добору на селективних середовищах за концентрації хлориду натрію на рівні 1,25 % вказаний показник становив 7,6 %. На цьому етапі ступеневої селекції *in vitro* вдалось відібрати 45 солестійких калюсних ліній. За 1,5 % вмісту NaCl в культуральному середовищі життєздатність зберігали 35 клітинних ліній, що становило 5,9 % від початкового вихідного матеріалу.

Біоматеріали, отримані з експлантів сортів рижю ярого Євро 12 і Клондайк, мали рівнозначні показники за рівнем солестійкості. Так, за 1,0 % концентрації селективного чинника в субстраті життєздатність зберігали 104 клітинні лінії (22,1 %) сорту Євро 12 та 119 (24,1 %) – сорту Клондайк. Підвищення сили стресового тиску до 1,25 % знижувало виживання номерів до 2,1 %. Стійкість до 1,5 % хлоридного засолення зберігали по чотири клітинних ліній.

Загалом у середньому за генотипами на рівні 1,0 % засолення було відібрано 662 клітинні лінії або 30,3 % від початкової кількості вихідного матеріалу. За підвищення вмісту хлориду натрію до 1,25 % загальна частка виживання калюсного матеріалу становила 7,3 %. На останньому етапі клітинної селекції за 1,5 % концентрації хлориду натрію відібрано 99 калюсних ліній (4,5 %) рижю ярого, що зберігали здатність до проліферації і були використані для подальшої селекційної роботи.

Виділені біоматеріали відрізнялись індивідуальними показниками проліферації за засолення та в контрольному варіанті досліду. Створені клітинні лінії за рівнем стійкості до стресового чинника (відношення між ростовими показниками в стресових та оптимальних умовах вирощування) ранжували на п'ять груп.

Середній показник відносного приросту біомаси відібраних 35 калюсних ліній, отриманих з експлантів сорту Степовий 1, в контрольних умовах вирощування становив 5,9 пункти (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Ранжування клітинних ліній рижію ярого сорту Степовий 1 за
рівнем стійкості до 1,5 % концентрації NaCl**

Показник	Рівень солестійкості					HIP ₀₁
	≥50 %	40–49 %	30–39 %	20–29 %	≤19 %	
Кількість клітинних ліній, шт.	2	5	7	10	11	–
Частка клітинних ліній, %	5,7	14,3	20,0	28,6	31,4	–
Відносний приріст в умовах контрольного варіанту	6,0	5,6	6,2	5,9	5,7	0,3
Відносний приріст в стресових умовах	3,1	2,5	2,2	1,6	0,7	0,1
Відношення приросту біомаси в стресових умовах до контролю, %	51,6	45,3	35,7	26,0	12,2	1,9

У присутності селективного чинника інтенсивність проліферації знижувалась на 72,9 % (середній відносний приріст калюсної тканини в умовах засолення – 1,6). Дві клітинні лінії (5,7 % від загальної кількості номерів) виявились найстійкішими – зниження приросту біомаси в умовах засолення відбувалось менше ніж на половину (на 48,4 %). Високий рівень солестійкості відмічено у п'яти відібраних калюсних ліній (14,3 %). В оптимальних умовах контрольного варіанту відносний приріст виділених номерів у середньому становив 5,6 пункти, в умовах стресу – 2,5 пункти, зниження проліферації – на 54,7 %.

Сім досліджуваних зразків за приростом біомаси мали середні показники (у стресових умовах приріст становив 2,2 пункти, що становило 35,7 % до контролю).

Присутність хлориду натрію в живильному середовищі у 60,0 % отриманих соматоклональних ліній (21 номер) спричиняло зниження інтенсивності росту біомаси понад 70 %.

Найвищі показники проліферації калюсів сорту Степовий 1 в умовах контролю відмічено в калюсних ліній С-326, С-402, С-586, найнижчі – С-189, С-121 і С-38 (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

**Ростові характеристики, стійких до 1,5 % концентрації NaCl,
клітинних ліній рижю ярого сорту Степовий 1**

Калюсна лінія	Відносний приріст біомаси в умовах контролю	Відносний приріст біомаси в стресових умовах	Відношення приросту біомаси за стресових умов до контролю, %
С-586	7,7±0,3	4,0±0,2	51,9
С-38	4,3±0,1	2,2±0,1	51,2
С-121	3,8±0,1	1,8±0,1	47,4
С-87	6,3±0,2	2,9±0,1	46,0
С-419	6,1±0,2	2,8±0,1	45,9
С-18	5,8±0,3	2,6±0,2	44,8
С-234	5,9±0,2	2,5±0,1	42,4
С-189	3,4±0,1	1,3±0,1	38,2
С-402	7,6±0,3	2,9±0,1	38,2
С-326	7,4±0,1	2,8±0,1	37,8
С-384	5,8±0,2	2,1±0,1	36,2
С-524	6,6±0,2	2,3±0,2	34,8
С-49	6,9±0,1	2,3±0,0	33,3
С-545	5,7±0,1	1,8±0,1	31,6
<i>HIP₀₁</i>	0,3	0,1	2,3

Середній показник відносного приросту виділених генотипів в оптимальних умовах становив 6,0, у присутності 1,5 % NaCl – варіював від 1,3 до 4,0 (середній показник – 2,5). Найменше зниження проліферації калюсної маси відмічено у ліній С-586 (51,9 %) та С-38 (51,2 %). Лінія С-586 характеризувалась високими показниками наростання біомаси як в контрольних умовах (відносний приріст становив 7,7 пункти), так і в присутності селективного агенту (відносний приріст склав 4,0 пункти). Номери С-121, С-87, С-419, С-18, С-234 знижували інтенсивність росту тканин у присутності хлориду натрію на 52,6–57,6 %. Відносний приріст калюсної маси ліній С-189, С-402, С-326, С-384, С-524, С-49, С-545 у селективних умовах становив 31,6–38,2 % за відношенням до росту на живильних середовищах контрольного варіанту.

Серед 56 відібраних на селективних середовищах клітинних ліній рижію ярого сорту Перемога, з різницею ростових показників у контрольних і стресових умовах, найвищу стійкість мали дві калюсні лінії (3,6 % від загальної кількості отриманого матеріалу) (табл.4.8).

Таблиця 4.8

Ранжування клітинних ліній рижію ярого сорту Перемога за рівнем стійкості до 1,5 % концентрації NaCl

Показник	Рівні солестійкості					HIP ₀₁
	≥50 %	40–49 %	30–39 %	20–29 %	≤19 %	
Кількість клітинних ліній, шт.	2	10	15	15	14	–
Частка клітинних ліній, %	3,6	17,8	26,8	26,8	25,0	–
Відносний приріст в умовах контрольного варіанту	3,0	5,3	4,9	4,3	4,6	0,2
Відносний приріст в стресових умовах	1,8	2,2	1,7	1,1	0,7	0,1
Відношення приросту біомаси в стресових умовах до контролю, %	58,7	42,2	34,7	24,8	15,2	2,0

У 10 номерів у стресових умовах відмічено зниження активності проліферації на 40–49 % порівняно з контрольним варіантом (в середньому відносний приріст у контрольному варіанті становив 5,3 пункти, а в умовах засолення – 2,2).

За стійкістю до хлориду натрію, найбільша частка отриманих біоматеріалів (по 15 ліній у кожній групі) мала зниження ростових показників у межах від 20–29 до 30–39 %. В оптимальних умовах приріст біомаси вказаних номерів становив 4,3 і 4,9 пункти, а в присутності NaCl – 1,1 і 1,7 пункти відповідно.

Найістотніше зниження проліферації, як реакція на сольовий стрес, відмічено у 14 клітинних ліній рижію ярого сорту Перемога. Хоча в контрольному варіанті досліду калюс показував досить високі темпи наростання (у середньому за генотипами відносний приріст становив 4,6 пункти) проте в умовах засолення інтенсивність калюсогенезу знижувалась на 84,8 %.

Найменше пригнічення проліферації калюсної тканини (на 38,5–44,1 %) в умовах 1,5% концентрації відмічено у ліній П-476 і П-46 сорту Перемога, хоча в умовах контролю вказані матеріали мали невисокі показники росту (відповідно 2,6 і 3,4 пункти) (табл.4.9).

Інтенсивність росту біомаси ліній П-485, П-646, П-505, П-202, П-618, П-534, П-40, П-658, П-592 і П-248 в присутності хлориду натрію варіювала в межах 40,5–46,7 % від показників оптимальних умов, що було вищим від середнього значення (40,2%) вибірки. Найвищі темпи калюсогенезу як в контрольних, так і в стресових умовах вирощування відмічено у клітинній лінії П-534. Відносний приріст біомаси без селективного чинника становив 11,3 пункти, в умовах засолення – 4,8 пункти. У решти виділених матеріалів відносний приріст у стресових умовах знижувався відносно приросту контрольного варіанту на 61,0–68,7 %.

Таблиця 4.9

**Ростові характеристики найбільш стійких до 1,5 % концентрації
NaCl клітинних ліній рижію ярого сорту Перемога**

Генотип	Відносний приріст в контрольних умовах	Відносний приріст в стресових умовах	Відношення приросту біомаси в стресових умовах до контролю, %
П-476	2,6±0,1	1,6±0,2	61,5
П-46	3,4±0,1	1,9±0,1	55,9
П-485	4,5±0,1	2,1±0,1	46,7
П-646	4,3±0,2	1,9±0,1	44,2
П-505	3,2±0,2	1,4±0,1	43,8
П-202	3,0±0,2	1,3±0,1	43,3
П-618	3,7±0,3	1,6±0,2	43,2
П-534	11,3±0,1	4,8±0,2	42,5
П-40	7,2±0,3	3,0±0,1	41,7
П-658	7,0±0,1	2,9±0,1	41,4
П-592	5,1±0,1	2,1±0,1	41,2
П-248	3,7±0,1	1,5±0,1	40,5
П-338	4,1±0,2	1,6±0,1	39,0
П-263	6,2±0,2	2,4±0,2	38,7
П-583	6,0±0,1	2,3±0,0	38,3
П-34	6,8±0,1	2,6±0,1	38,2
П-378	6,4±0,1	2,4±0,1	37,5
П-245	2,7±0,1	1,0±0,1	37,0
П-314	6,5±0,1	2,4±0,1	36,9
П-623	6,1±0,1	2,2±0,1	36,1
П-542	3,6±0,1	1,3±0,1	36,1
П-611	4,8±0,1	1,7±0,1	35,4
П-570	8,0±0,1	2,8±0,1	35,0
П-512	2,9±0,1	1,0±0,1	34,5
П-652	5,2±0,1	1,7±0,1	32,7
П-180	2,8±0,1	0,9±0,1	32,1
П-88	3,2±0,1	1,0±0,1	31,3
<i>HIP₀₁</i>	0,2	0,1	2,2

Стійкість до 1,5 % концентрації хлориду натрію в живильному середовищі мали чотири клітинні лінії рижію ярого сорту Євро 12 (табл. 4.10). Найвищі показники проліферації, в контрольних (6,7 пункта) і селективних умовах (2,8 пункти) відмічено у калюсної лінії Є-405. У вказаного матеріалу засолення живильного субстрату викликало зниження інтенсивності проліферації на 58,2 %.

Таблиця 4.10

**Ростові характеристики стійких до 1,5 % концентрації NaCl
клітинних ліній рижію ярого сорту Євро 12**

Калюсна лінія	Відносний приріст в умовах контролю	Відносний приріст у стресових умовах	Відношення приросту біомаси за стресових умовах до контролю, %
Є-405	6,7±0,3	2,8±0,2	41,8
Є-223	4,2±0,1	1,6±0,1	38,1
Є-121	5,2±0,2	1,3±0,2	25,0
Є-468	3,8±0,2	0,6±0,1	15,8
<i>HIP₀₁</i>	0,3	0,1	1,7

Децо нижчі показники стійкості до стресового чинника мала калюсна лінія Є-223 – відносний приріст у присутності селективного чинника становив 1,6 пункти, що складало 38,1 % до контролю. В оптимальних умовах клітинна лінія Є-121 характеризувалась досить високими темпами проліферації (5,2 пункти), проте присутність NaCl в концентрації 1,5 % знижувала цей показник на 75 % (відносний приріст у селективному варіанті становив 1,3 пункти). Найнижчу солестійкість відмічено в клітинній лінії Є-468. Відносний приріст як в оптимальних, так і стресових умовах був низький – відповідно 3,8 і 0,6 пункти. Дія хлориду натрію пригнічувала ростові показники калюсної лінії на 84,2 %.

У таблиці 4.11 наведено ростові характеристики стійких до 1,5 % вмісту хлориду натрію клітинних ліній рижію ярого сорту Клондайк. Загалом

відібрано чотири лінії. Порівняно з біоматеріалами отриманими з інших сортів-донорів, ці матеріали характеризувались нижчою стійкістю до селективного чинника – за присутності в живильному середовищі хлориду натрію показники проліферації становили 18,8–32,1 %.

Таблиця 4.11

**Ростові характеристики стійких до 1,5 % концентрації NaCl
клітинних ліній рижію ярого сорту Клондайк**

Калюсна лінія	Відносний приріст в умовах контролю	Відносний приріст у стресових умовах	Відношення приросту біомаси за стресових умов до контролю, %
К-480	5,3±0,1	1,7±0,2	32,1
К-478	4,0±0,1	1,1±0,1	27,5
К-185	6,4±0,2	1,6±0,1	25,0
К-327	3,2±0,1	0,6±0,2	18,8
<i>HIP₀₁</i>	0,3	0,1	1,4

Найстійкішою до дії NaCl була лінія К-480. У контрольному варіанті відносний приріст калюсу становив 5,3 пункти, а в селективних умовах був на 67,9 % нижчим. Номер К-478 у присутності стресового чинника знижував активність проліферації на 72,5 % (в оптимальних умовах відносний приріст калюсної тканини становив 4,0 пункти). Лінія К-185 в неселективних умовах мала найвищі ростові показники (6,4 пункти), а в умовах засолення – 1,6 пункти, що становило 25,0 %.

Отже, за проведення ступеневої клітинної селекції встановлено, що поступове збільшення концентрації стресового чинника на калюсну біомасу дає можливість виділити стійкі до 1,5 % концентрації NaCl лінії культури. Приріст калюсної біомаси на селективних середовищах істотно залежав від генотипу вихідного матеріалу.

4.2. Індукування морфогенезу солестійких клітинних ліній рижію ярого

Одним з найскладніших етапів за проведення клітинної селекції є індукція морфогенезу відібраних клітинних ліній та отримання рослин-регенерантів. Унаслідок довготривалого культивування біоматеріалу в умовах стресових чинників їх регенераційні показники різко знижувалися [16–18].

За даними В. А. Кунаха [19] блокування регенераційної здатності може бути генетичним внаслідок відсутності тотипотентності через накопичення генетичних змін, що виникають у процесі тривалого культивування клітин *in vitro*. Епігенетичне блокування, спричинене стабільними, проте потенційно зворотними змінами у функціонуванні генів, необхідних для організованого розвитку. Відсутність необхідних зовнішніх сигналів (регуляторів росту, фізичних умов культивування) зумовлює фізіологічне блокування морфогенезу.

Відібрані в ході селекції *in vitro* клітинні лінії рижію ярого з найвищим рівнем стійкості до сольового стресу переносили на розроблені нами модифіковані живильні середовища для отримання рослин-регенерантів. Регенерацію рослин проводили як в оптимальних умовах контрольного варіанту (без засолення), так і за дії NaCl (1,5 %).

Досліджувані генотипи мали індивідуальні регенераційні показники (табл. 4.12). Загалом з 99 клітинних ліній на регенераційних живильних середовищах в умовах контролю морфогенез проходив у 65 ліній (65,7 %). Присутність хлориду натрію знижувала частку морфогенно активних номерів до 56,6 % (регенераційні процеси відмічено у 56 клітинних ліній). Найвищі показники збереження морфогенного потенціалу відмічено у матеріалів отриманих з сорту Клондайк – у контрольному варіанті спостерігали морфогенез у всіх ліній, у присутності селективного чинника – 75,0 %. Для

біотипів отриманих з сорту Євро 12 цей показник відповідно становив 50,0 і 75,0 %.

У 26 клітинних лінії (74,2 %) індукованих з експлантів сорту Степовий 1 за створення оптимальних умов відмічено проходження активних регенераційних процесів. У селективних умовах морфогенну активність реалізовували 60,0 % біоматеріалу (21 клітинна лінія).

Таблиця 4.12

Морфогенна активність солестійких калюсних ліній рижію ярого залежно від сортових особливостей та умов регенерації

Сорт-донор експланту	Кількість морфогенних ліній			
	у контрольному варіанті		у селективних умовах, NaCl 1,5 %	
	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	26	74,2	21	60,0
Перемога	33	58,9	29	51,8
Євро 12	2	50,0	3	75,0
Клондайк	4	100,0	3	75,0
<i>НІР₀₁</i>	–	3,9	–	3,7

У контрольному варіанті дослід з індукування морфогенезу солестійких ліній рижію ярого сорту Перемога у 33 калюсних ліній вдалось отримати рослини-регенеранти, що становило 58,9 % від загальної кількості матеріалу. Присутність NaCl знижувала отримання регенерантів – морфогенез відмічено у 29 клітинних ліній (51,8 %).

Довготривале субкультивування біоматеріалів рижію ярого в умовах стресу спричиняло істотне зниження їхньої морфогенної активності. За створення оптимальних умов з первинної калюсної тканини масою 30–40 мг утворювалось 6,3 рослин регенерантів. Отримані клітинні лінії

характеризувались індивідуальними показниками регенерації як у контрольних умовах, так і за присутності NaCl (рис. 4.4). У середньому за генотипами в неселективних умовах з одного мікрокалюса формувалось 1,9 рослин-регенерантів. Найнижчий показник мали лінії сорту Клондайк (1,6 регенеранта), найвищі – Євро (2,1 регенеранта). В умовах сольового стресу найвищу активність морфогенезу відмічено у калюсних ліній сорту Перемога (1,6 регенеранта з одного мікрокалюса), найнижчі – у сорту Клондайк (0,9 регенеранта).

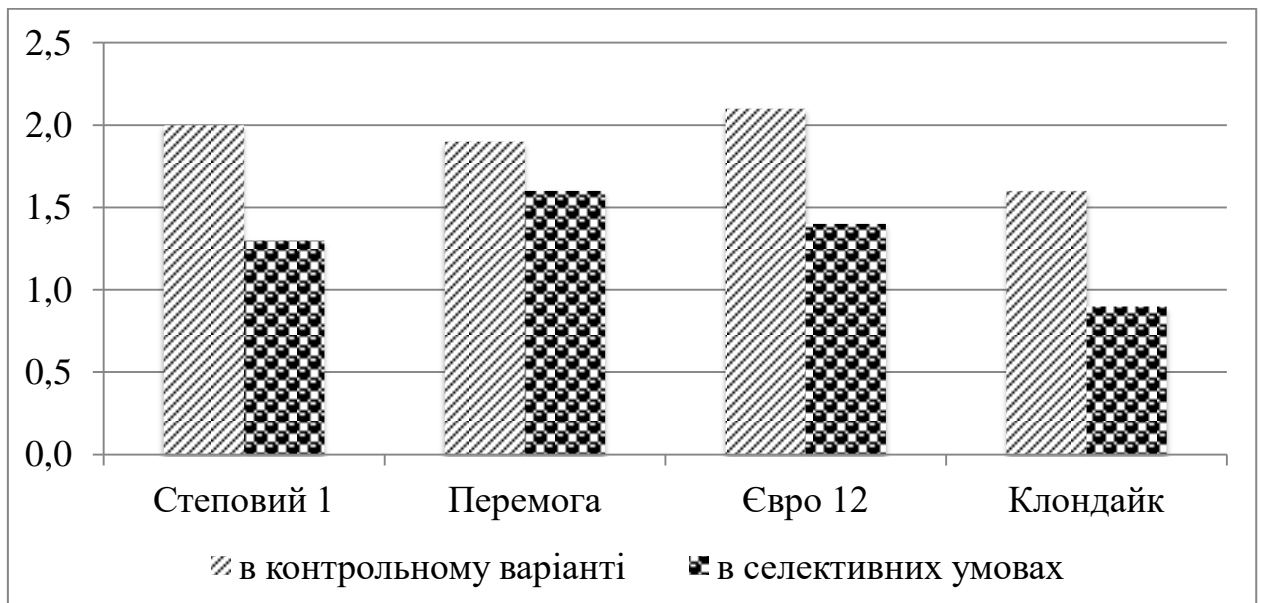


Рис. 4.4 Морфогенна активність солестійких клітинних ліній рижю ярого залежно від сортових особливостей та умов проведення регенерації, шт.

Наявність у живильному середовищі NaCl (1,5 %) знижувало регенераційну активність мікрокалюсів рижю ярого на 31,6 %. Найменше зниження відмічено у калюсних ліній сорту Перемога (на 15,8 %), найбільше – у сорту Клондайк (на 43,7 %).

Досліджувані генотипи відрізнялись як за рівнем солестійкості, так і за збереженням здатності до регенерації та морфогенною активністю

мікрокалюсів, що в кінцевому результаті вплинуло на отримання рослин-регенерантів з стійких до хлоридного засолення матеріалів рижію ярого (табл. 4.13).

Найбільше рослинних структур отримано з клітинних ліній сорту Перемога. 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 з великою кількістю створених солестійких матеріалів.

Таблиця 4.13

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

З 35 клітинних ліній рижію ярого сорту Степовий 1, що вирізнялись стійкістю до 1,5 % концентрації NaCl, було регеновано 142 рослини. З них у присутності селективного чинника 37,3 %, у варіанті досліду без хлоридного засолення – 62,7 %. Отримані результати пов'язано з високими показниками регенераційного потенціалу ліній (60,0–74,2 %) та морфогенної активності мікрокалюсів (1,3–2,0 рослини-регенеранта з одного мікрокалюса).

З клітинних ліній індукованих з сортів Євро 12 і Клондайк, незважаючи

на досить високі відносні показники регенераційної здатності, було отримано найменше рослин-регенерантів (відповідно 16 і 17 шт.). Низький вихід рослин з клітинних структур пов'язаний з малою кількістю калюсних ліній, що було відібрано в результаті селекції *in vitro* (по чотири клітинні лінії з кожного сорту). З калюсних структур сорту Євро 12, як в присутності стресового чинника, так і в оптимальних умовах, регенеровано однакову кількість рослин (по вісім). На регенераційних середовищах у присутності NaCl з біоматеріалу сорту Клондайк отримано п'ять рослинних ліній, що становило 29,4 %. На контрольних морфогенних субстратах регенеровано 12 рослин (70,6 %).

Отже, 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 генотипом на 45,4 %.

4.3. Ретестування рослин-регенерантів рижію ярого на стійкість до хлориду натрію

Встановлено [15–18], що за проведення добору *in vitro* стійкість до стресу на клітинному рівні не завжди зберігається на рівні цілісної рослини. Це явище виникає внаслідок, так званого, «фізіологічного звикання» клітин або їхнього «перехресного живлення». Особливо часто це спостерігається за використання вихідним матеріалом калюсних тканин з високою щільністю [11]. Тому обов'язковим етапом клітинної селекції є повторне ретестування рослин-регенерантів за максимально допустимої концентрації селективного чинника для виділення резистентних генотипів.

Рослинні матеріали індуковані з солестійких клітинних ліній сорту Степовий 1 в контрольних умовах забезпечили виживання за ретестування на рівні 37,5 %, а отримані в присутності селективного чинника – 50,0 % (табл. 4.14). Такі низькі показники пов'язані з невеликою кількістю

апробованого матеріалу (12 рослинних ліній).

Таблиця 4.14

Вживання рослинного матеріалу рижію ярого сорту Степовий 1 залежно від рівня солестійкості вихідних клітинних ліній та умов проведення регенерації

Рівень солестійкості клітинних ліній	Оптимальні умови вирощування (контроль)		Селективні умови (1,5% NaCl)		Всього	
	ліній	%	ліній	%	ліній	%
≥50 %	3	37,5	2	50,0	5	41,7
40–49 %	14	60,9	17	100,0	21	52,5
30–39 %	13	39,4	19	86,4	22	40,0
20–29 %	5	26,3	8	80,0	13	44,8
≤19 %	0	0,0	–	–	0	0
<i>HIP₀₁</i>	–	1,6	–	4,0	–	1,8

Вживання рослинних матеріалів отриманих у контрольних та селективних умовах з калюсних тканин з рівнем солестійкості вище середнього відповідно становило 60,9 та 100,0 %. Регенеранти з середньостійких клітинних ліній і ліній з рівнем стійкості нижче середнього забезпечували збереження зразків на рівні 40,0 і 44,8 %. Не зберігали стійкість до стресового чинника рослинні номери індуковані з калюсів низького рівня солестійкості.

Життєздатність зберігали три рослинні ліній (42,9 %) отримані в оптимальних умовах з солестійких калюсних структур сорту Перемога. Рослинні матеріали індуковані за присутності NaCl забезпечували 100,0 % виживання за ретестування (табл. 4.15).

Збереженість рослин індукованих з калюсу з рівнем стійкості 40–49 % і 30–39 % відрізнялась несуттєво та в середньому за варіантами становила 63,6 і 59,0 % відповідно.

Таблиця 4.15

Виживання рослинного матеріалу рижію ярого сорту Перемога залежно від рівня солестійкості вихідних клітинних ліній та умов регенерації

Рівень солестійкості клітинних ліній	Отриманих в контрольних умовах		Отриманих в умовах стресу		Всього	
	ліній	%	ліній	%	ліній	%
≥50 %	3	42,9	7	100,0	10	71,4
40–49 %	22	47,8	34	81,0	56	63,6
30–39 %	22	44,9	24	82,8	46	59,0
20–29 %	4	26,7	5	71,4	9	40,9
≤19 %	1	33,3	1	100,0	2	50,0
<i>НІР₀₁</i>	–	2,0	–	3,7	–	2,8

Рослинний матеріал отриманий в умовах контролю з низько-стійких клітинних ліній забезпечував збереження на рівні 26,7 і 33,3 % відповідно, а номери індуковані в присутності селективного чинника – 71,4 і 100,0 %.

Загалом за повторного субкультивування регенерантів у присутності селективного чинника використовували 16 рослинних ліній сорту Євро 12 і 17 – сорту Клондайк. Тому, отримано високий показник збереженості матеріалу (табл. 4.16).

Для матеріалів сорту Євро 12 найнижчий відсоток виживання отриманих з калюсної лінії Є-405 (37,5 %). З клітинної лінії Є-121 індуковано одну рослинну лінію, що зберігала стійкість до стресового чинника на рівні цілісного організму. Біоматеріал індукований з калюсної лінії Є-223 в умовах контролю забезпечував виживання рослин на рівні 50,0 %, на стресових регенераційних середовищах – 100,0 %.

Таблиця 4.16

**Вживання рослинного матеріалу рижю ярого сортів Євро 12 і Клондайк
залежно від рівня солестійкості вихідних клітинних ліній та умов
регенерації**

Генотип	Отриманих в контрольних умовах		Отриманих в умовах стресу		Всього	
	ліній	%	ліній	%	ліній	%
Є-121	–	–	1	100	1	100,0
Є-223	2	50	3	100	5	71,4
Є-405	1	25	2	50	3	37,5
<i>НІР₀₁</i>	–	1,9	–	4,2	–	3,5
К-185	3	75,0	1	100,0	4	80,0
К-327	0	0,0	–	–	0	0,0
К-478	2	40,0	2	100,0	4	57,1
К-480	1	50,0	2	100,0	3	75,0
<i>НІР₀₁</i>	–	2,1	–	3,8	–	2,7

Найвищу збереженість за ретестування рослин-регенерантів спостерігали у калюсної лінії К-185 – загалом 80,0 %. Деяко нижчі показники відмічено у лінії К-480 – загалом 75,0 %, зниження зумовлене нижчим виживанням матеріалів отриманих в контрольних умовах (50,0 %). Схожа ситуація спостерігалась з рослинними матеріалами отриманими з лінії К-478 (загалом показник виживання становив 57,1 %). Рослинні структури індуковані з калюсної лінії К-327 не зберігали стійкості до сольового стресу на рівні цілісної рослини.

Загалом найбільшу кількість матеріалів, що зберігали стійкість до стресового чинника на рівні цілісної рослини, отримано з клітинних ліній сорту Перемога – 123 рослинні лінії, що становило 59,7 % від загальної кількості номерів (табл. 4.17). У рослинних ліній індукованих на контрольних

регенераційних середовищах відсоток збереженості становив 43,3 %, а за присутності NaCl – підвищувався до 82,6 %.

Таблиця 4.17

Результати ретестування рослинного матеріалу рижію ярого

Сорт	Лінії отримані в контрольних умовах		Лінії отримані в умовах стресу		Всього	
	ліній	%	ліній	%	ліній	%
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>НІР₀₁</i>	-	2,4	-	5,0	-	3,3

Виживання генотипів сорту Степовий 1 отриманих у неселективних умовах становило 38,2 %, а індукованих за дії стресового чинника – 99,1 %. Загалом було відібрано 81 рослинну лінію (57,0 %), що характеризувались стійкістю до хлориду натрію на рівні рослини.

Найвищі відносні показники виживання регенерантів відмічено за ретестування біоматеріалу сорту Клондайк – 50,0 % у рослинних матеріалів отриманих в оптимальних умовах, 100,0 % – у номерів регенерованих за дії хлориду натрію. Проте, внаслідок незначної кількості рослин-регенерантів індукованих на попередніх етапах роботи, стійкість до селективного чинника на рівні цілісної рослини мали 11 рослинних ліній. І лише дев'ять номерів сорту Євро 12 характеризувались стійкістю до стресового агента, що становило 56,3 % від загальної кількості отриманих рослинних ліній.

Отже, за ведення клітинної селекції рижію ярого загалом виділено 224 рослинні лінії, що зберігали стійкість до селективного чинника (1,5 % концентрація NaCl) за переходу з клітинного рівня на рівень цілісної рослини, що становило 58,8 % від отриманих зразків. У рослинних матеріалів

індукованих на регенераційних середовищах контролю відсоток збереженості становив 41,5 %, а отриманих за впливу NaCl цей показник підвищувався до 84,9 %.

4.4. Вплив маніту на культуру тканин рижію ярого

Для створення *in vitro* посухостійких форм сільськогосподарських культур селективним чинником використовують різні осмотично активні речовини, що знижують зовнішній водний потенціал культурального середовища. До таких речовин відносять поліетиленгліколь (ПЕГ) різної молекулярної маси, сахарозу, сорбітол, ксилозу, осмотин, маніт тощо [20].

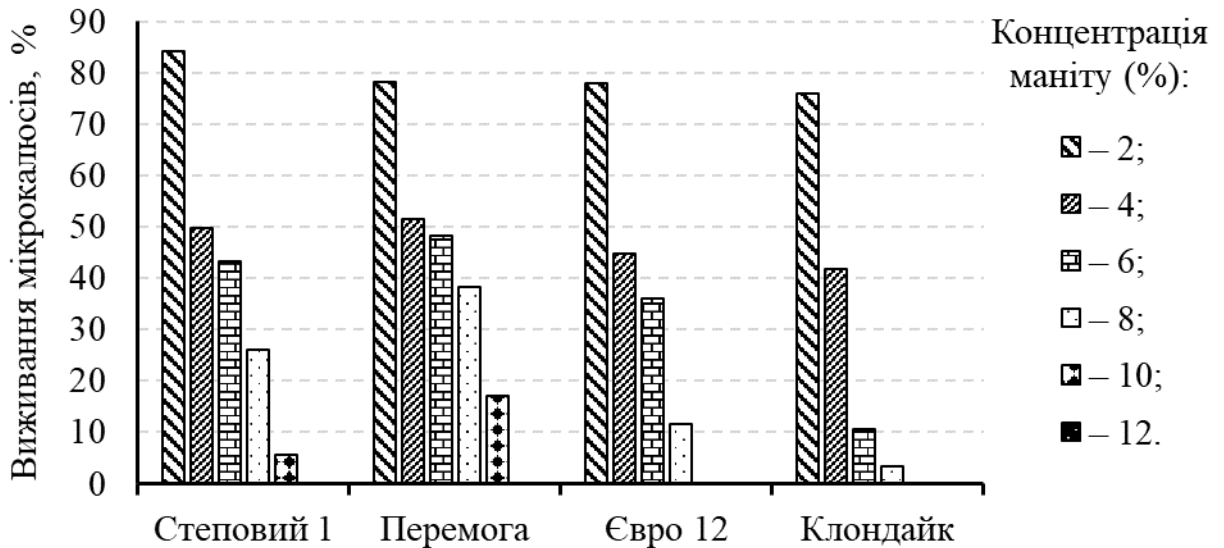
О. В. Дубровною зі співавторами [21] встановлено, що для пшениці селективна система з манітом є найефективнішою, оскільки забезпечує повну елімінацію чутливих клітин і високу життєздатність рослин-регенерантів. На перевагу використання маніту також вказує А. Butt [22].

За ведення клітинної селекції вирішальне значення має концентрація селективного агента в живильному середовищі. За використання низьких концентрацій не можливо відібрати стійкі генотипи, а за високих – спостерігається зниження життєздатності та інтенсивності регенерації біоструктур. За добору *in vitro* для кожного біовиду оптимальну концентрацію маніту підбирають експериментальним шляхом [23–26].

Щоб визначити вплив 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. 4.5). Найвищий показник виживання калюсу відмічено у матеріалів, отриманих з сорту Степовий 1 (84,2 %). Підвищення вмісту селективного чинника до 4 % спричиняла зниження виживання калюсної маси сорту Степовий 1 до 49,7 %, Перемога – 51,6 %, Євро 12– 44,8 %, Клондайк – 41,8 %.

За 6 % концентрації маніту спостерігали суттєві відмінності стійкості генотипів до осмотичного стресу. Найменш стійким був калюс отриманий з експлантів сорту Клондайк за збереженості тканини 10,5 %. Для інших генотипів виживання біоматеріалів варіювало від 36,0 до 48,2 %.



НІР₀₁: A – 1,0; B – 1,2; AB – 2,3; A – концентрація у живильному середовищі маніту, B – сорт-донор експлантів

Рис. 4.5 Життєздатність калюсної тканини рижію ярого залежно від концентрації маніту та генотипу вихідного матеріалу

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 калюсної 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 калюсні тканини індуковані з експлантів сортів Степовий 1 і Перемога, частка стійких калюсних ліній, відповідно становила 5,6 та 17,0 %. Подальше збільшення концентрації селективного чинника виявилось летальним для калюсу всіх генотипів.

За результатами одержаних експериментальних даних було проведено порівняльний аналіз впливу досліджуваних чинників (генотип і концентрація

маніту в живильному середовищі) на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах осмотичного стресу (рис. 4.6).

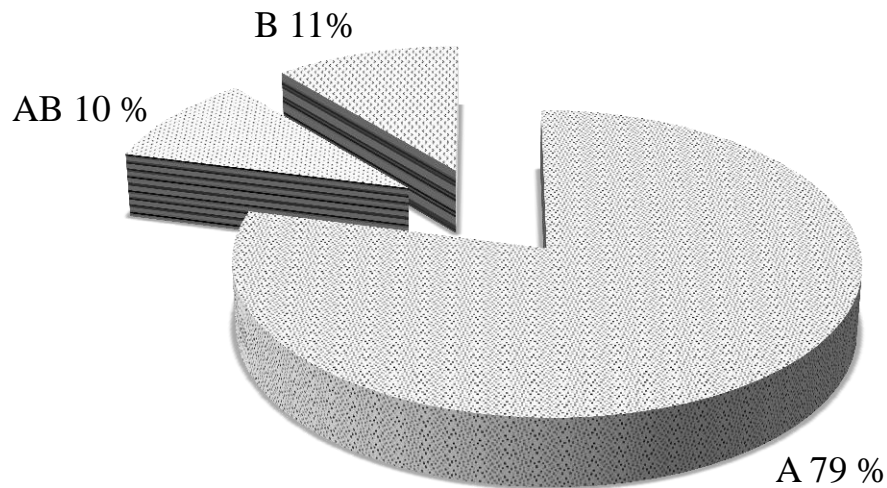


Рис. 4.6 Частка впливу досліджуваних чинників на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах осмотичного стресу:

А – концентрація маніту в живильному середовищі; В – генотип рослини донора експланта; АВ – взаємодія факторів.

Найбільший вплив на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах осмотичного стресу мала концентрація маніту в живильному середовищі (79 %). Частка впливу генотипу рослини донора експланта і сукупна дія обох чинників відповідно становила 11 та 10 %.

Отже, за дії осмотичного чинника на калюсну тканину рижію ярого, встановлено, що 8–10 % концентрація маніту є оптимальною за ведення клітиної селекції на посухостійкість.

Виділено матеріали (Степовий 1, Перемога), що можуть використовуватись донорами стійкості експлантів для створення посухостійкої калюсної культури.

Висновки до розділу 4

1. Розроблено багатоступеневу схему клітинної селекції рижію ярого на стійкість до хлоридного засолення, що дає можливість відібрати клітинні лінії та рослини-регенеранти стійкі до негативної дії стресового чинника.

2. Встановлено, що 1,5 % концентрація в живильному середовищі NaCl є граничною для ведення добору *in vitro* рижію ярого. Частка клітинних структур отриманих із експланту сорту Степовий 1, що зберігали життєздатність за вказаного рівня засолення становила 5,9 %, Перемога – 8,4 %, Євро 12 і Клондайк – 0,8 % від початкової кількості біоматеріалу.

3. Довготривале культивування клітинних ліній рижію ярого спричиняло зниження регенераційної здатності. Загалом отримано 381 рослину-регенерант, з яких 39,9 % – у присутності NaCl. Вміст у регенераційному середовищі хлориду натрію знижував отримання рослин у середньому за генотипами на 45,4 %.

4. За переходу з клітинного рівня на рівень цілісної рослини 58,8 % досліджуваних генотипів зберігали стійкість до селективного чинника. У рослинного матеріалу індукованого на регенераційних середовищах контрольного варіанту збереженість складає 41,5 %, отриманого за дії NaCl – підвищується до 84,9 %. Загалом стійких до хлоридного засолення на рівні інтактної рослини виділено 224 рослинні лінії рижію ярого.

5. Для добору посухостійких калюсних ліній рижію ярого за використання маніту, встановлено оптимальну концентрацію (8–10%) селективного чинника в живильному середовищі.

6. Доведено, що отримання осмотичностійкого матеріалу є генетично зумовленим чинником.

Список використаних джерел літератури за розділом 4

1. Сюков В. В., Захаров В. Г., Менибаев А. И. Экологическая селекция растений: типы и практика. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. №21(5). С. 534–536.
2. Barakat M. N., Abdel-Latif T. H. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*. 1996. Vol. 91, № 2. P. 127–140.
3. Akhtar S., Niaz M., Rahman S., Asif M. Study of somaclonal variation in wheat for the induction of salinity tolerance. *Agricultural Research*. 2012. Vol. 50 (2). P. 165-176.
4. Пикало С. В., Волощук С. І. Отримання соматоклональних варіантів тритикале з підвищеною солестійкістю і їх оцінка. *Миронівський вісник*. 2015. Вип. 1. С. 119–130.
5. Muhammad Shah Zaman, Ghulam Muhammad Ali, Aish Muhammad, Khalid Farooq, Iqbal Hussain. *In vitro* screening of salt tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Sarhad Journal of Agriculture*. 2015. Vol. 31. № 2. P. 106–113.
6. Kikuchi A., Huynh H. D., Endo T., Watanabe K. Review of recent transgenic studies on abiotic stress tolerance and future molecular breeding in potato. *Breeding Science*. 2015. Vol. 65 (1). P. 85–102.
7. Апушев А. К., Сулейменова С. С., Егизбаева Р. К. Клеточная селекция картофеля на засухоустойчивость. *Известия национальной академии наук республики Казахстан*. 2014. № 1. С. 32–34.
8. Небиков М. В. Добір посухостійких біотипів цукрового буряка в умовах культури *in vitro*. *Цукрові буряки*. 2003. № 4. С. 18–19.
9. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Вплив сольового стресу на індукування клітинних ліній цикорію коренеплідного. *Збірник наукових праць УДАУ*. Умань. 2007. № 65. С. 142–146.

10. Кобышева Е. Н., Зобова Н. В. Результативность получения растений-регенерантов ярового ячменя в культуре *in vitro* на селективных средах. *Вестник КрасГАУ*. 2006. № 10. С. 137–141.
11. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.
12. Khalid H., Kumari M., Grover A., Nasim M. Salinity stress tolerance of *Camelina* investigated *in vitro*. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2015. № 46 (4). P. 137–144.
13. Пикало С. В., Зінченко М. О., Волощук С. І., Дубровна О. В. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту. *Biotechnologia Acta*. Vol. 8. № 2. 2015. С. 69–77.
14. Бавол А. В., Зінченко М. О., Дубровна О. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозу, за дії осмотичного стресу. *Цитологія і генетика*. 2014. Т. 48. № 1. С. 60–66.
15. Долгих Ю. И. Принципы скрининга клеток *in vitro* с целью получения устойчивых к абиотическим стрессам форм растений. Материалы II Российского симпозиума *Новые методы биотехнологии растений*. Пущино, 1993. С. 103.
16. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Морфогенез солестійких калюсних ліній цикорію коренеплідного. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених. Умань, 2010. С. 29–30.
17. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: монографія. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
18. Егорова Н. А. Разработка методических основ клеточной селекции лаванды *in vitro* на устойчивость к NaCl. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. 2011. № 5. С. 173–179.
19. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.

20. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів: монографія. за ред. Моргун В. В. Київ: Логос, 2012. 428 с.
21. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.
22. Butt A., Ahmed N., Mubin M. Effect of pEG and mannitol induced water stress on regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2015. Vol. 52. № 4. P. 1025–1033.
23. Аль-Холани Х. А., Долгих Ю. И. Определение концентрации манита для использования в процессе клеточной селекции на устойчивость к засухе у кукурузы. *Вестник РУДН, Серия Агронимия и животноводство*. 2007. № 1–2. С. 38–42.
24. Пикало С. В., Бавол А. В., Дубровна О. В. Цитогенетичні особливості калюсних культур тритикале озимого за дії осмотичного стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Том 17. С. 2219–3782.
25. Коцар М. О., Бех Н. С. Моніторинг видів міскантусу на посухостійкість з використанням біотехнологічних методів. *Збірник наукових праць ІБКіЦБ*. 2013. Вип. 17. С. 233–236.
26. Пикало С. В., Демидов О. А., Прокопик Н. І., Волощук С. І., Юрченко Т. В., Хоменко С. О. Скринінг *in vitro* гібридів F₂ пшениці ярої на стійкість до водного дефіциту. *Science Rise: Biological Science*. 2018. №3(12): 10.15587/2519-8025.2018.133030
27. 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.
28. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Добір *in vitro* клітинних ліній рижю ярого стійких до осмотичного стресу. *Матеріали VI міжнародної науково-практичної конференції Актуальні питання сучасної аграрної науки, присвячену 150-річчю заснування факультету агрономії Уманського НУС*. Умань, 2018. С. 101–103

29. Любченко І. О. Морфогенна активність *in vitro* солестійких клітинних ліній рижію ярого. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції *Актуальні питання агротехнологій*. Умань, 2019. С. 55–56.
30. Любченко І. О. Збереження ознаки стійкості до NaCl у соматиклонів 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. Умань, 2019. С. 58–60.

РОЗДІЛ 5.
ОЦІНКА СТВОРЕНИХ СОМАКЛОНАЛЬНИХ ЛІНІЙ РИЖІО ЯРОГО
В УМОВАХ *EX VITRO*

5.1. Реакція насіннєвого матеріалу соматоклональних ліній рижіо ярого на стресові чинники

Отримані соматоклональні рослинні лінії рижіо ярого, після мікротоклонального розмноження, укорінення й адаптації, переносили 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 (рис 5.1)



А



Б

Рис. 5.1 Рослини-регенеранти (R_1) солестійких соматоклональних ліній рижіо ярого в умовах *ex vitro*: а – нормально розвинені рослини, що сформували насіння; б – стерильні рослини з низькою життєздатністю.

Загалом насіння вдалось отримати з 68 соматоклональних ліній рижю ярого, що становило 30,3 % від загальної кількості матеріалу, який було перенесено у відкритий ґрунт (рис. 5.2).

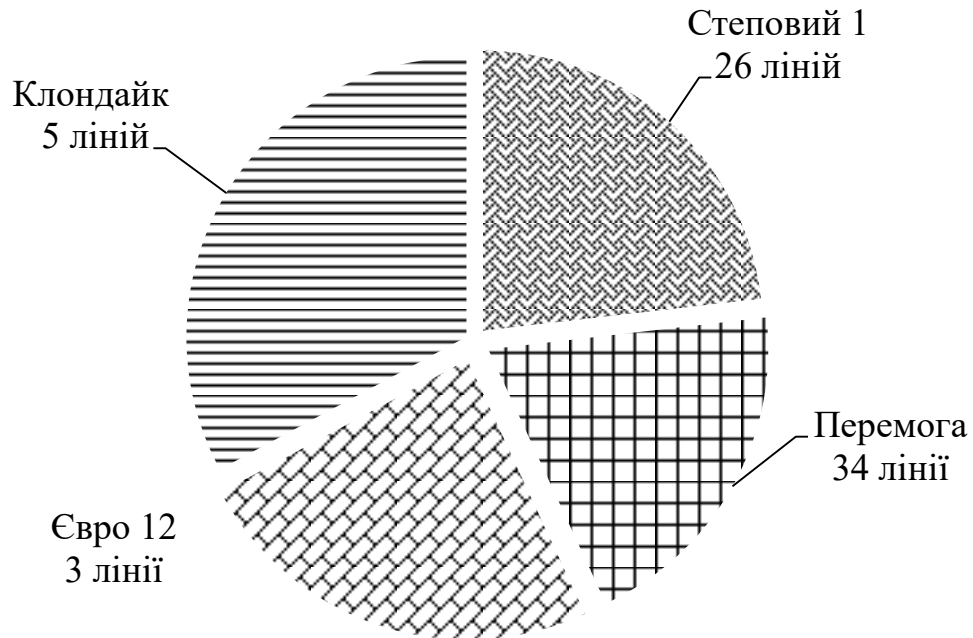


Рис. 5.2 Результати отримання насіння з соматоклональних рослинних ліній рижю ярого

Найбільшу кількість фертильних соматоклональних рослинних ліній отриманих з сорту Перемога – 34 номерів (27,6 % від загальної кількості біоматеріалів). У 26 рослинних ліній (32,1 %) сорту Степовий 1 вдалось отримати повноцінне насіння. У генотипів, індукованих з сортів Євро 12 і Клондайк, незважаючи на високі відносні показники, отримано найменшу кількість насіннєвого матеріалу.

Рослинні матеріали R_1 з яких вдалось отримати насіннєвий матеріал використовували в подальших дослідженнях.

Одним із ефективних способів оцінки генотипів сільськогосподарських культур на стійкість до негативних чинників навколишнього середовища є лабораторне тестування насіння і проростків у присутності стресового чинника. Цей метод дає змогу залучити до роботи велику кількість селекційних зразків, провести жорстке бракування матеріалу на ранніх етапах

селекційного процесу і зменшити напруженість трудовітких робіт у вегетаційний період [1, 2].

Г. В. Удовенком [3] було розроблено класифікаційну шкалу, за допомогою якої, на основі одержаних даних, можна ранжувати отриманий матеріал за рівнем стійкості до стресових чинників. До групи стійких відносили генотипи, схожість і ростові показники яких у стресових умовах становили понад 60 % порівняно з контролем, до групи середньостійких – 30–60 %, до нестійких – менше 30 %.

Селективними агентами, що створюють осмотичний тиск, використовували хлорид натрію та маніт у концентраціях 1,3 % і 4,0 % відповідно. В обох випадках створювали зовнішній осмотичний тиск на рівні 10 атм.

Досліджувані сорти та, створені біотехнологічними методами, генотипи рижію ярого характеризувались індивідуальними показниками схожості насіння та сили росту проростків як у контрольному варіанті, так і у стресових умовах.

У таблиці 5.1 наведено результати вивчення впливу NaCl і маніту на культуру проростків рижію ярого сорту Степовий 1. Схожість насіння досліджуваних генотипів в оптимальних умовах варіювала від 76,4 до 98,4 % і в середньому становила 87,0 %. Найнижчу схожість мали номери С-121-11 та С-328-7. За присутності хлориду натрію у сорту Степовий 1 схожість насіння знижувалась до 15,9 %, що становило 16,2 % до контролю. У відібраних соматоклональних ліній показник схожості в умовах засолення знижувався в середньому на 47,8 %. Найменше зниження (на 34,8–39,6 %) цього показника за умов засолення відмічено у генотипів С-121-2, С-234-8, С-384-4 і С-419-6. Схожість насіння відібраних рослинних ліній за проведення пророщування у присутності маніту в середньому становила 52,2 %, що становило 60,2 % до контролю. Для сорту-стандарту схожість насіння в умовах осмотичного стресу була на рівні 33,6 %. Найвищі показники схожості насіння в селективному варіанті мали генотипи С-87-4, С-121-11, С-234-8 і С-419-6.

Таблиця 5.1

**Вплив осмотичного та сольового стресу на показники якості насіння
сомаклональних ліній (R₁) рижію ярого отриманих з сорту Степовий 1**

Зразок	Схожість насіння, %					Маса 100 проростків, г				
	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю
Степовий 1	98,4	15,9	16,2	33,6	34,1	2,91	1,22	41,4	1,42	48,3
C-18-2	87,2	36,7	42,1	48,9	56,1	2,23	1,33	59,1	1,43	63,6
C-18-9	90,3	43,2	47,8	48,2	53,4	1,74	0,78	47,1	0,93	52,9
C-87-4	84,5	53,9	63,8	59,2	70,0	3,22	2,01	62,5	2,12	65,6
C-87-7	85,2	52,9	62,1	58,1	68,2	2,41	1,63	66,6	1,63	66,6
C-121-2	92,5	56,1	60,6	64,0	69,2	2,74	1,71	63,3	1,84	66,6
C-121-11	78,2	49,9	63,8	54,8	70,1	3,02	1,89	63,3	1,91	63,3
C-225-2	85,4	41,8	48,9	48,0	56,2	2,43	1,38	58,3	1,52	62,5
C-234-8	90,1	58,9	65,4	63,3	70,2	3,01	1,93	63,3	2,33	76,7
C-326-9	88,2	54,0	61,2	61,7	70,0	2,81	1,82	64,3	1,91	67,9
C-328-7	76,4	41,6	54,5	50,6	66,2	2,32	1,21	52,2	1,62	69,6
C-384-4	95,7	59,6	62,3	67,3	70,3	2,93	2,04	69,0	2,11	72,4
C-384-6	84,7	44,9	53,0	53,4	63,1	2,34	1,13	47,8	1,21	52,2
C-384-10	90,3	32,0	35,4	36,8	40,7	2,32	0,91	39,1	1,12	47,8
C-402-2	91,0	53,1	58,4	56,5	62,1	2,81	1,13	39,3	1,11	39,3
C-402-6	80,3	48,5	60,4	53,2	66,3	3,09	1,89	61,3	2,41	77,4
C-419-6	85,1	55,5	65,2	70,6	71,2	3,02	2,01	66,7	2,22	73,3
C-419-8	92,4	41,9	45,3	52,5	56,8	2,16	0,67	31,8	0,89	40,9
C-425-2	83,2	27,8	33,4	48,1	57,8	2,17	1,03	40,0	1,21	48,0
C-425-5	84,3	33,9	40,2	50,7	60,2	2,32	1,14	47,8	1,21	52,2
C-440-2	90,3	36,2	40,1	50,7	56,2	1,79	0,62	33,3	0,89	50,0
C-462-4	84,3	32,8	38,9	40,0	47,5	2,36	1,01	41,7	1,11	45,8
C-483-2	87,2	39,8	45,6	45,6	52,3	2,57	0,63	23,1	0,78	30,8
C-524-1	88,0	46,0	52,3	53,1	60,3	2,81	1,51	53,6	1,71	60,7
C-524-4	82,1	41,2	50,2	51,9	63,2	2,82	0,81	28,6	1,81	64,3
C-545-7	90,2	27,8	30,8	43,5	48,2	2,92	0,93	31,0	1,21	41,4
C-586-7	83,4	52,0	62,3	55,3	66,3	3,01	1,92	63,3	2,11	70,0
HIP ₀₅	4,3	2,2	2,5	2,6	3,0	0,1	0,1	2,5	0,1	2,8

Отримані соматоклональні рослинні лінії відрізнялись за силою росту проростків у контрольному варіанті досліду та за присутності селективних чинників. У контрольних умовах маса 100 проростків сорту Степовий 1 становила 2,9 г. На рівні сорту-стандарту цей показник відмічено у соматоклональних ліній С-87-4, С-384-4, С-402-6, С-419-6 і С-545-7, а істотно перевищували контроль – С-121-11 і С-234-8.

Сольовий стрес знижував ростові показники проростків у сорту Степовий 1 на 75,6 %, у досліджуваних номерів залежно від генотипу на 33,4–76,9 %. Найвищу інтенсивність наростання біомаси проростків відмічено у номерів С-87-4, С-121-11, С-234-8, С-384-4, С-402-6, С-419-6 і С-586-7. Маса 100 проростків залежно від генотипу коливалась від 1,9 до 2,0 г, що становило 62,5–69,0 % до контролю. Маніт здійснював менший стресовий вплив на проростки соматоклональних ліній рижію ярого – в середньому приріст біомаси становив 56,4 % до контролю.

За показниками схожості насіння та приростом біомаси проростків можна виділити соматоклональні рослинні лінії рижію ярого, отримані з сорту Степовий 1, з високою стійкістю до осмотичного стресу (С-18-2, С-328-7, С-524-1, С-524-4,) і з комплексною стійкістю до засолення й осмотичного стресу (С-87-4, С-121-11, С-234-8, С-402-6 і С-419-6).

Схожість насіння генотипів рижію ярого, отриманих з експлантів сорту Перемога, за пророщування в дистильованій воді (контроль) в середньому становила 82,8 %. Найвищий показник мали номери П-145-1, П-248-8, П-534-2, П-623-2, П-658-8, найменший – П-307-2, П-338-4, П-485-4, П-646-3. В умовах сольового стресу схожість насіння створених соматоклонів варіювала від 18,6 до 60,3 %, що становило 20,2–69,5 % від контролю. Найвищі показники схожості насіння (61,1–69,5 % до контролю) відмічено у генотипів П-46-2, П-46-5, П-248-8, П-485-4, П-646-3. Дія NaCl також проявлялась у пригнічені біометричних показників проростків рижію ярого. За 1,3 % рівня засолення маса проростків досліджуваних рослинних ліній зменшувалась на 28,6–74,7 %. Найвищі ростові показники (маса 100 проростків) мали номери П-46-5 (2,0 г), П-202-6 (1,9 г), П-485-4 (2,0 г), П-646-3 (2,0 г), П-658-8 (1,9 г), що становило 61,9–71,4 % до контрольного варіанту.

Таблиця 5.2

**Вплив осмотичного та сольового стресу на показники якості насіння
соматоклональних ліній (R₁) рижію ярого отриманих з сорту Перемога**

Зразок	Схожість насіння, %					Маса 100 проростків, г				
	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю
Перемога	97,3	18,2	18,7	35,6	36,6	2,51	0,81	32,0	1,03	40,0
П-40-3	75,6	40,7	53,8	56,3	74,5	2,62	1,51	57,7	1,72	65,4
П-40-12	85,4	35,8	41,9	45,6	53,4	2,04	1,11	55,0	1,21	60,0
П-46-2	75,3	51,3	68,1	62,3	82,7	2,63	1,72	65,4	2,02	76,9
П-46-5	80,6	56,0	69,5	65,6	81,4	3,21	2,04	62,5	2,24	68,8
П-88-2	72,3	38,2	52,8	49,3	68,2	1,64	0,91	56,3	1,02	62,5
П-112-2	85,6	45,2	52,8	46,3	54,1	2,32	1,01	43,5	1,03	43,5
П-145-1	92,4	35,8	38,7	45,3	49,0	2,83	1,22	42,9	1,52	53,6
П-202-6	88,3	58,2	65,9	68,7	77,8	3,02	1,93	63,3	2,02	66,7
П-202-7	85,4	53,8	63,0	62,4	73,1	2,71	1,72	63,0	1,72	63,0
П-248-8	95,3	60,3	63,3	70,1	73,6	2,34	1,51	65,2	1,63	69,6
П-263-2	90,2	43,8	48,6	50,3	55,8	1,52	0,62	40,0	0,84	53,3
П-263-9	85,6	55,3	64,6	68,2	79,7	2,31	1,32	56,5	1,32	56,5
П-307-2	62,1	32,4	52,2	35,4	57,0	2,36	1,04	41,7	1,23	50,0
П-314-4	74,6	38,6	51,7	40,3	54,0	2,01	0,81	40,0	0,78	40,0
П-314-7	85,6	25,4	29,7	42,3	49,4	3,16	1,32	40,6	1,54	46,9
П-338-4	68,2	38,4	56,3	40,3	59,1	2,17	1,22	54,5	1,52	68,2
П-382-2	90,2	25,6	28,4	39,6	43,9	2,38	0,93	37,5	1,21	50,0
П-476-5	82,3	54,3	66,0	56,2	68,3	2,58	1,32	50,0	1,31	50,0
П-485-2	85,6	47,5	55,5	58,3	68,1	1,88	1,13	57,9	1,32	68,4
П-485-3	73,2	48,5	66,3	52,3	71,4	2,59	1,45	57,7	1,83	69,2
П-485-4	65,4	45,6	69,7	56,4	86,2	3,12	2,01	64,5	2,22	71,0
П-492-7	78,4	25,3	32,3	32,1	40,9	2,41	0,71	29,2	1,04	41,7
П-505-5	82,0	42,4	51,7	58,3	71,1	2,83	0,92	32,1	1,12	39,3
П-534-2	95,6	48,6	50,8	50,2	52,5	2,32	1,23	52,2	1,32	56,5
П-542-2	90,2	35,2	39,0	40,3	44,7	1,81	0,64	33,3	1,04	55,6
П-570-4	85,3	42,1	49,4	47,2	55,3	2,01	1,09	55,0	1,33	65,0
П-583-2	94,3	34,2	36,3	40,2	42,6	1,72	0,69	41,2	0,84	47,1
П-592-11	77,5	40,2	51,9	43,3	55,9	1,91	1,01	52,6	1,01	52,6
П-618-6	80,2	47,5	59,2	60,1	74,9	2,32	1,31	56,5	1,61	69,6
П-623-2	92,1	18,6	20,2	36,0	39,1	1,71	0,62	35,3	0,84	47,1

Продовження табл. 5.2

П-646-3	64,8	39,6	61,1	43,6	67,3	2,83	2,01	71,4	2,03	71,4
П-652-8	75,8	22,3	29,4	34,3	45,3	2,04	0,93	45,0	1,14	55,0
П-658-1	90,3	45,9	50,8	60,3	66,8	1,91	1,02	52,6	1,21	63,2
П-658-8	95,4	55,3	58,0	64,2	67,3	2,73	1,91	70,4	2,02	74,1
<i>НІР₀₅</i>	5,0	2,5	3,1	3,0	3,7	0,1	0,1	3,0	0,1	3,5

За хлоридного засолення схожість насіння сорту-стандарту Перемога становила 18,2 %, маса 100 проростків – 0,8 г, що відповідно становило 18,7 і 32,0 % до контролю.

Сомаклональні рослинні лінії, отримані з сорту Перемога, за показниками схожості насіння менше реагували на маніт. Схожість насіння понад 60 % в умовах осмотичного стресу до показників контролю мали 16 селекційних номерів.

Присутність маніту за прощування насіння, знижувала масу проростків у середньому за генотипами на 42,0 %. Найбільше зниження біометричних показників відмічено у селекційних номерів П-112-2, П-314-4, П-314-7, П-492-7, П-505-5, П-583-2 і П-623-2.

Отже, на рівні проростків найвищу стійкість до обох стресових чинників мали сомаклональні рослинні лінії П-46-2, П-46-5, П-248-8, П-646-3.

Насінневий матеріал вдалось отримати з трьох сомаклональних ліній індукованих з експлантів рижію ярого сорту Євро 12. У присутності хлориду натрію схожість насіння сорту-стандарту була на 85,1 % нижчою порівняно з контролем і становила 14,1 %, наявність маніту в живильному середовищі знижувала схожість до 24,2 %. Маса 100 проростків у контрольному варіанті становила 2,13 г, а в присутності NaCl – 0,62 г, що становило 28,6 % від контролю, в присутності маніту – 0,81 г або 38,1 % до контролю (табл. 5.3.).

Найвищі показники якості насіння в стресових умовах мали сомаклональні лінії Є-405-5 і Є-405-8. Схожість насіння та біометричні характеристики проростків вказаних селекційних номерів в стресових умовах були нижчими більше ніж на 60 % порівняно з контролем. Генотип Є-121-2

характеризувався високою масою проростків як у контрольному, так і в селективних варіантах досліджу, проте мав низьку схожість насіння.

Таблиця 5.3

Вплив осмотичного та сольового стресу на показники якості насіння соматоклональних ліній (R₁) рижію ярого отриманих з сорту Євро 12

Зразок	Схожість насіння, %					Маса 100 проростків, г				
	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю
Євро 12	94,6	14,1	14,9	24,2	25,6	2,13	0,62	28,6	0,81	38,1
Є-121-2	75,6	35,3	46,7	41,3	54,6	2,04	1,24	60,0	1,33	65,0
Є-405-5	81,3	52,6	64,7	55,3	68,0	2,42	1,62	66,7	1,82	75,0
Є-405-8	80,4	48,6	60,4	54,2	67,4	1,91	1,23	63,2	1,31	68,4
<i>HIP₀₅</i>	4,1	1,9	2,3	2,2	2,7	0,1	0,1	2,6	0,1	3,1

Соматоклональні рослинні лінії рижію ярого, отримані з сорту Клондайк, відрізнялись між собою та вихідним сортом за показниками схожості насіння та силою росту в контрольних і селективних умовах (табл. 5.4). За пророщування в дистильованій воді схожість насіння досліджуваних зразків варіювала від 62,3 до 96,3 %. Хлорид натрію, здійснюючи стресовий вплив, знижував схожість насіння у середньому за генотипами на 5,1 %. Для сорту-стандарту схожість насіння в умовах сольового стресу становила 12,8 % до контрольного варіанту. Найвищі абсолютні показники схожості мали лінії К-480-2 і К-480-4 – відповідно 52,3 і 50,3 %, що становило 61,4 і 62,6 % до контрольного варіанту. Рослинна лінія К-478-2 через низьку схожість насіння в контрольному варіанті мала найвищу схожість насіння у присутності NaCl (72,7 %).

Схожість насіння сорту Клондайк у присутності маніту становила 15,2 %. За осмотичного стресу всі досліджувані генотипи (окрім лінії К-185-7) мали показники схожості насіння вищі понад 60,0 % від контролю.

Таблиця 5.4

Вплив осмотичного та сольового стресу на посівні показники насіння соматоклональних ліній (R₁) рижію ярого, отриманих з сорту Клондайк

Зразок	Схожість насіння, %					Маса 100 проростків, г				
	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю	контроль	NaCl	у % до контролю	маніт	у % до контролю
Клондайк	96,3	12,3	12,8	15,2	15,8	2,03	0,44	20,0	0,44	20,0
К-185-7	85,6	32,4	37,9	45,3	52,9	1,41	0,61	42,9	1,02	71,4
К-478-2	62,3	45,3	72,7	46,7	75,0	2,43	1,83	75,0	2,00	83,3
К-478-7	75,3	35,2	46,7	45,2	60,0	2,21	1,32	59,1	1,20	54,5
К-480-2	85,2	52,3	61,4	56,8	66,7	1,73	1,21	70,6	1,31	76,5
К-480-4	80,3	50,3	62,6	57,2	71,2	2,52	1,64	64,0	2,03	80,0
<i>HIP₀₅</i>	4,0	1,9	2,5	2,2	2,8	0,1	0,1	2,8	0,1	3,4

Маса 100 проростків вихідного сорту Клондайк становила 2,03 г, отриманих соматоклональних форм – від 1,41 до 2,51 г. Обидва стресових чинника знижували масу проростків сорту Клондайк на 80,0 %. За сольового стресу маса 100 проростків створених генотипів коливалась від 0,60 до 1,83 г, що становило 62,3 % від контролю. Присутність маніту знижувала біометричні показники проростків на 26,9 %

Соматоклональні лінії К-478-2, К-480-2 і К-480-4 за схожістю насіння мали найвищі показники стійкості до стресових чинників.

Отже, в процесі досліджень виділено зразки рижію ярого з високою комплексною стійкістю до сольового й осмотичного стресів – С-87-4,

C-87-7, C-121-2, C-121-11, C-234-8, C-326-9, C-384-4, C-402-6, C-419-6, C-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. Вказані соматоклональні рослинні лінії рижію ярого були апробовані на рівні інтактно́ї рослини.

5.2 Біологічна стійкість соматоклональних ліній рижію ярого

Кінцева густина рослин на одиниці площі – один з основних чинників, що визначає врожайність сільськогосподарських культур. Щільність посіву на період збирання залежить від польової схожості насіння та виживання (збереження) рослин протягом вегетації.

Під час вегетаційного періоду на сільськогосподарські рослини діє низка негативних зовнішніх чинників (кліматичні та едафічні фактори, хвороби, шкідники тощо). Іноді диференціювати їхній вплив на біооб'єкт важко, тому за селекційної оцінки вихідного матеріалу визначають такий показник, як біологічна стійкість або збереженість. Тобто відношення нормально розвинутих рослин, що досягли повної стиглості, до кількості повноцінних сходів [3]. Біологічна стійкість визначається пластичністю зразка, його комплексною стійкістю до біотичних та абіотичних чинників, швидкими темпами початкового росту рослин на ранніх етапах розвитку.

Досліджувані зразки рижію ярого мали індивідуальні показники польової схожості насіння та збереження рослин впродовж вегетації культури, що в кінцевому результаті вплинуло на щільність посівів в період збирання.

У середньому за генотипами найвищий показник польової схожості насіння рижію ярого відмічено у 2018 році – він варіював від 81,6 % у сорту Клондайк до 92,4 % у зразків C-234-8 і П-202-6. У 2017 і 2018 роках польова схожість насіння досліджуваних номерів у середньому за генотипами

відповідно становила 86,0 і 85,7 % (табл. 5.5). Вищу схожість насіння в 2018 році пов'язано з підвищеним температурним режимом і достатнім забезпеченням вологою за рахунок опадів осінньо-зимового періоду.

Таблиця 5.5

Польова схожість насіння соматоклональних ліній рижію ярого, %

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік
Степовий 1	87,2	89,5	86,8
Перемога	87,9	89,1	87,6
Євро 12	82,0	83,3	81,8
Клондайк	80,6	81,6	80,4
С-87-4	88,1	89,7	87,8
С-87-7	88,9	90,0	88,5
С-121-2	88,0	89,5	87,7
С-121-11	86,4	88,4	86,1
С-234-8	89,2	92,4	88,8
С-326-9	86,0	88,4	85,7
С-384-4	82,8	82,6	82,6
С-402-6	88,0	89,1	87,7
С-419-6	80,3	86,7	80,1
С-586-7	87,1	86,7	86,7
П-46-2	86,0	88,4	85,7
П-46-5	88,8	91,2	88,4
П-202-6	90,0	92,2	89,6
П-202-7	80,3	83,3	80,1
П-248-8	87,1	88,6	86,7
П-485-4	88,0	89,3	87,7
П-618-6	84,2	84,5	83,9
П-646-3	86,4	87,7	86,1
П-658-8	86,0	88,4	85,7
Є-405-5	86,1	89,7	85,8
Є-405-8	80,6	82,8	80,4
К-478-2	89,1	88,4	88,7
К-480-2	84,1	86,5	83,8
К-480-4	88,0	89,5	87,7
<i>HIP</i> ₀₅	4,0	4,4	4,2

У середньому за роки досліджень польова схожість насіння селекційних матеріалів рижію ярого становила від 80,9 до 90,6 %. Найвищу польову схожість відмічено у сорту Перемога та номерів С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-402-6, П-202-6, К-478-2, К-480-4. Найстабільнішими за цим показником у роки досліджень були сорти Перемога, Євро 12, Клондайк і зразки С-87-7, С-384-4, С-586-7, П-618-6, К-478-2.

За три роки досліджень збереженість рослин досліджуваних селекційних номерів рижію ярого становила 89,2 % (табл. 5.6). У 2017 році цей показник в середньому за генотипами був на рівні 90,2 %, у 2018 році – 88,1 %, а в 2019 році – 89,4 %.

Таблиця 5.6

Біологічна стійкість соматоклональних ліній рижію ярого

Зразок	2017 рік		2018 рік		2019 рік	
	щільність рослин, млн / га	збереженість рослин, %	щільність рослин, млн / га	збереженість рослин, %	щільність рослин, млн / га	збереженість рослин, %
Степовий 1	1,63	93,4	1,55	86,4	1,60	91,8
Перемога	1,66	94,2	1,57	88,1	1,60	91,7
Євро 12	1,46	89,1	1,38	82,7	1,44	87,8
Клондайк	1,39	86,3	1,30	79,6	1,36	84,5
С-87-4	1,70	96,4	1,67	93,3	1,66	94,6
С-87-7	1,72	96,4	1,72	95,7	1,69	95,5
С-121-2	1,67	95,1	1,69	94,5	1,62	92,6
С-121-11	1,68	97,2	1,67	94,5	1,63	94,8
С-234-8	1,66	93,5	1,68	90,6	1,65	92,9
С-326-9	1,44	83,8	1,51	85,5	1,41	82,2
С-384-4	1,28	77,2	1,23	74,6	1,31	79,1
С-402-6	1,53	86,9	1,56	87,8	1,47	84,2
С-419-6	1,54	95,4	1,52	88,1	1,47	91,8
С-586-7	1,47	84,2	1,48	85,7	1,44	83,2
П-46-2	1,57	91,1	1,64	92,5	1,59	92,8
П-46-5	1,73	97,4	1,73	95,3	1,69	95,7
П-202-6	1,51	84,0	1,62	87,8	1,54	86,1
П-202-7	1,40	87,1	1,42	84,8	1,39	86,7
П-248-8	1,48	84,8	1,55	87,6	1,44	83,2
П-485-4	1,64	92,9	1,66	92,6	1,62	92,8

Продовження табл. 5.6

П-618-6	1,55	92,0	1,45	85,8	1,53	91,1
П-646-3	1,69	97,9	1,60	91,4	1,67	97,1
П-658-8	1,39	81,0	1,44	81,6	1,41	82,2
Є-405-5	1,63	95,0	1,60	89,3	1,63	94,8
Є-405-8	1,36	84,3	1,40	84,6	1,40	87,1
К-478-2	1,53	86,1	1,50	84,7	1,51	85,2
К-480-2	1,54	91,9	1,48	85,7	1,48	87,8
К-480-4	1,61	91,3	1,56	87,3	1,62	92,7
<i>НІР₀₅</i>	<i>0,08</i>	<i>4,4</i>	<i>0,08</i>	<i>4,3</i>	<i>0,07</i>	<i>4,3</i>

Збереженість рослин сорту Степовий 1 за роки досліджень коливалась від 86,4 до 93,4 %, Перемога – від 88,1 до 94,2 %, Євро 12 – від 82,7 до 89,1 %, Клондайк – від 79,6 до 86,3 %. Найвищу (94–96 %) збереженість рослин відмічено у соматоклональних ліній рижію ярого С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, П-646-3, П-46-5. Найнижчою комплексною стійкістю до негативних чинників навколишнього природного середовища характеризувались селекційні номери С-326-9, С-384-4, С-586-7, П-248-8, П-658-8.

З урахуванням польової схожості насіння та виживання рослин впродовж вегетації у 2017 і 2018 роках на період збирання культури створені зразки рижію ярого забезпечували щільність рослин 1,55 млн/га, а в 2018 році – 1,53 млн/га.

Завдяки високій польовій схожості насіння та комплексній стійкості рослин до негативних чинників середовища, у середньому за роки досліджень найвищу щільність стеблестою на період збирання (1,60–1,72 млн/га) відмічено у соматоклональних рослинних ліній рижію ярого С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, С-234-8, П-46-2, П-46-5, П-485-4, П-646-3, Є-405-5.

Отже, за апробації створених матеріалів рижію ярого виділено зразки, що характеризуються високою польовою схожістю та збереженістю рослин на рівні 94–96 %.

5.3. Аналіз періоду вегетації створених соматоклональних ліній рижію ярого

Тривалість періоду вегетації – важлива селекційна характеристика сортів сільськогосподарських культур. Використання в господарстві матеріалів різних груп стиглості дає можливість без втрати врожаю подовжити період збирання культури, раціонально використати технічні ресурси господарства і знизити ризик впливу негативних чинників навколишнього середовища на врожай. Пізньостиглі сорти, зазвичай, врожайніші та стійкіші до стресових чинників середовища. Використання генотипів з коротким періодом вегетації дає можливість використати культуру як попередник для озимих та розміщувати їх у післяукісних і післяжнивних посівах. Тривалість періоду вегетації – генетична особливість сорту чи гібриду, що залежить від умов вирощування (агротехніка, погодні умови тощо). Поєднання ранньостиглості з високою врожайністю та якістю продукції є важливим напрямком селекції сільськогосподарських рослин [1–3].

Період вегетації культури визначається тривалістю проходження окремих фенологічних фаз. Дати настання фаз розвитку створених соматоклональних ліній та вихідних сортів рижію у роки досліджень наведено в додатках Б1 – Б3, а тривалість проходження фенологічних фаз в середньому за період досліджень – в таблиці 5.7. Строки сівби рижію ярого у досліді залежали від погодних умов. Сівбу створених селекційних матеріалів проводили 04 квітня в 2017 році, 16 квітня в 2018 році та 25 березня в 2019 році.

Тривалість періоду «сівба–сходи» не залежала від генотипових особливостей і становила у 2017 і 2018 роках дев'ять діб, а у 2019 роках – 13 діб. Швидкість проростання насіння залежала від погодних умов. Зниження

температури повітря після сівби культури у 2019 році спричинило затримку отримання сходів.

Таблиця 5.7

**Тривалість фенологічних фаз розвитку створених соматональних ліній
рижію ярого, діб (2017–2019) рр.**

Зразок	Фенологічна фаза					
	сівба–сходи	сходи – формування розетки	формування розетки – бутонізація	бутонізація – цвітіння	цвітіння – зелений стручок	зелений стручок – технічна стиглість
Степовий 1	10	9	24	13	14	30
Перемога	10	9	21	13	13	27
Євро 12	10	9	21	13	11	26
Клондайк	10	8	21	12	10	26
С-87-4	10	11	24	14	13	31
С-87-7	10	10	23	17	14	29
С-121-2	10	11	23	16	13	29
С-121-11	10	10	22	16	14	29
С-234-8	10	10	21	15	15	29
С-326-9	11	9	22	14	14	29
С-384-4	10	10	24	16	12	30
С-402-6	10	9	23	15	13	31
С-419-6	10	9	23	15	13	30
С-586-7	10	10	22	15	14	29
П-46-2	10	10	21	12	14	27
П-46-5	10	10	22	13	14	27
П-202-6	10	10	23	13	13	27
П-202-7	10	12	21	13	15	28
П-248-8	10	10	22	13	15	28
П-485-4	10	11	20	11	12	28
П-618-6	10	9	19	11	12	26
П-646-3	10	10	20	15	14	28
П-658-8	10	11	20	13	13	29
Є-405-5	10	10	20	13	13	28
Є-405-8	10	9	21	12	13	27
К-478-2	10	9	19	13	12	27
К-480-2	10	10	21	13	12	27
К-480-4	10	11	21	14	12	28

Формування розетки було найкоротшою фенологічною фазою розвитку культури – в середньому за генотипами і погодними умовами 8–13 діб. У 2018 році формування розетки всіх зразків проходило швидше, що пов'язано з пізнішими термінами сівби, високими температурами і дефіцитом вологи у квітні місяці.

Тривалість періоду стеблуння та бутонізації в середньому за генотипами в 2017 році становила 26 діб, у 2018 році – 18, а в 2019 році – 20 діб. Низька температура повітря та задовільна вологозабезпеченість у травні 2017 року сприяла подовженню періоду формування генеративних пагонів рижію ярого. У середньому за три роки досліджень найтривалішою ця фаза була у сорту Степовий 1 і зразків С-87-4 та С-384-4, а найкоротшою – у номерів С-87-4 і С-384-4 та відповідно становила 24 і 19 діб.

Тривалість цвітіння рослин рижію ярого за роки досліджень залежно від генотипу варіювала від 8 до 27 діб. Найрозтягнутіший період цвітіння відмічено у зразків С-384-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11 (16–17 діб). У селекційних номерів П-485-4 і П-618-6 період цвітіння був найкоротший і становив 11 діб. У 2017 році в середньому цвітіння тривало 12 діб, у 2018 році – 13, а в 2019 році – 16 діб.

Достигання врожаю рижію ярого розпочинається з фази зеленого стручка, що в середньому за генотипами у 2017 році становило 12 діб, у 2018 році – 15, у 2019 році – 13 діб. За роки досліджень найшвидшим проходженням фази зеленого стручка характеризувався сорт Клондайк (10 діб), найдовшим – зразок С-87-7 (17 діб). Період від початку побуріння стручків до настання повної стиглості насіння у 2017 та 2019 роках у середньому за генотипами тривав 29 діб, а в 2018 році – 27 діб. Найкоротшою фаза дозрівання була у сортів Євро 12 та Клондайк і в середньому за роки досліджень становила 26 діб, найтривалішою – у селекційних зразків С-402-6 і С-87-4.

Період вегетації досліджуваних генотипів рижію ярого у 2017 році в середньому становив 91 добу, у 2018 році – 80, а у 2019 році –

89 діб (табл. 5.8). Скорочення тривалості вегетації у 2018 році пов'язане з високими температурами повітря та дефіцитом вологи впродовж періоду розвитку культури.

Таблиця 5.8

Тривалість вегетаційного періоду створених соматоклональних ліній рижію ярого, діб

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	95	82	94	90
Перемога	90	76	85	84
Євро 12	83	72	86	80
Клондайк	81	71	82	78
С-87-4	95	89	95	93
С-87-7	95	90	93	93
С-121-2	95	86	93	91
С-121-11	95	85	94	91
С-234-8	95	82	93	90
С-326-9	95	80	90	88
С-384-4	95	85	94	91
С-402-6	96	80	94	90
С-419-6	94	85	89	89
С-586-7	95	85	91	90
П-46-2	89	76	89	85
П-46-5	90	81	86	86
П-202-6	90	80	90	87
П-202-7	94	78	91	88
П-248-8	93	82	90	88
П-485-4	91	72	84	82
П-618-6	84	68	83	78
П-646-3	93	79	89	87
П-658-8	92	77	87	85
Є-405-5	88	79	85	84
Є-405-8	87	73	88	83
К-478-2	80	77	81	79
К-480-2	86	78	83	82
К-480-4	88	82	87	86
<i>НІР₀₅</i>	4,5	4,0	4,4	—

Серед вихідних сортів у середньому за три роки досліджень найтриваліший період вегетації (90 діб) відмічено у сорту Степовий 1. Тривалість вегетації сортів Перемога, Євро 12 і Клондайк відповідно становила 84, 80 і 78 діб.

Веgetаційний період створених соматоклональних рослинних ліній отриманих з калюсної тканини сорту Степовий 1 в середньому становив у 2017 році 95 діб, у 2018 році – 82–90, у 2019 році – 89–95 діб. Для зразків отриманих з біоматеріалу сорту Перемога цей показник в середньому відповідно становив 84–94, 68–81 і 83–91 діб, з сорту Євро 12 – 87–88, 73–79 і 85–88 діб, а з сорту Клондайк – 80–88, 77–82 і 81–87 діб. Найстабільнішими за тривалістю вегетації були селекційні номери С-87-4, С-87-7, Є-405-5, К-478-2, К-480-2, К-480-4 – різниця періоду вегетації у різні роки становила 5–8 діб. Соматоклональні рослинні лінії рижію ярого С-402-6, П-46-2, П-202-7, П-485-4, П-618-6, Є-405-8 характеризувались істотною різницею тривалості вегетації (понад 13–14 діб).

Згідно Методики проведення експертизи сортів рижію ярого на відмінність, однорідність, стабільність [4] отримані дані дали можливість ранжувати створені соматоклональні рослинні лінії за тривалістю вегетації на групи: 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.

Отже, створені матеріали різнились за тривалістю періоду вегетації, що істотно залежала від умов навколишнього природного середовища та генотипу вихідного матеріалу.

5.4. Морфологічні особливості та продуктивність стійких сомаклональних ліній рижію ярого

Відібрані рослинні лінії рижію ярого характеризувались індивідуальними морфологічними показниками та відрізнялись від вихідних сортів. Біометричні особливості стебла, кількість та розмір стручків, маса тисячі насінин є важливими господарськими і сортовизначальними ознаками, що характеризують селекційну цінність створених матеріалів.

Висота рослин і діаметр стебла – показники, що визначають продуктивність рослин, придатність до механізованого вирощування та збирання. Зразки з добре розвинутим стеблом мають високу стійкість до вилягання.

У 2017 році в середньому за генотипом висота рослин становила 63 см (табл. 5.9). Максимальне значення відмічено у номерів С-402-6, С-419-6, П-248-8 – 72 см, мінімальне – 42 см у зразка К-480-2. У 2018 році залежно від сортових особливостей висота рослин варіювала від 45 до 70 см, за середньогрупового значення 59 см. У 2019 році в середньому за генотипами висота рослин становила 62 см. Найвищі сортозразки П-646-3 і П-658-8 мали висоту 72 см, найнижчі К-480-2 – 40 см.

За три роки досліджень у середньому за генотипами висота рослин створених зразків становила 61 см. Серед вихідних матеріалів найвищу висоту рослин мали сорти Степовий 1 і Перемога – (61 і 60 см відповідно) найнижчу Євро 12 (49 см).

Отримані дані дали можливість ранжувати створені сомаклональні лінії за висотою рослин на три групи. Згідно Методики проведення експертизи сортів на відмінність, однорідність, стабільність [4] до низькорослих (менше 60 см) віднесено зразки С-586-7, П-202-6, П-202-7, П-618-6, Є-405-5, К-478-2, К480-2, К-480-4, середньорослих (60–70 см) – С-87-4, С-121-2, С-121-11, С-234-8, С-326-9, С-384-4, С-402-6, С-419-6, П-46-2, П-46-5, П-248-8, П-485-4, П-646-3, П-658-8, Є-405-8; високорослих (понад 70 см) – С-87-7.

Таблиця 5.9

Статистичні характеристики стебла створених соматоклональних ліній ріжюю ярого

Зразок	2017 рік		2018 рік		2019 рік	
	висота рослин, см	діаметр стебла, мм	висота рослин, см	діаметр стебла, мм	висота рослин, см	діаметр стебла, мм
Степовий 1	62	3,0	60	2,2	62	3,3
Перемога	65	3,4	54	3,0	61	3,0
Євро 12	52	3,1	46	2,3	50	2,8
Клондайк	60	2,4	45	1,4	53	2,2
С-87-4	64	2,7	65	2,6	62	3,0
С-87-7	70	3,5	70	2,9	71	3,2
С-121-2	68	3,2	64	2,7	71	3,0
С-121-11	71	3,5	67	2,6	70	3,0
С-234-8	62	3,7	53	1,8	67	3,2
С-326-9	67	3,8	62	3,0	65	3,1
С-384-4	70	2,6	68	2,4	70	2,8
С-402-6	72	3,0	67	2,7	70	3,0
С-419-6	72	2,5	70	2,3	68	2,4
С-586-7	56	2,3	54	2,0	54	2,2
П-46-2	70	3,6	64	3,0	66	3,4
П-46-5	64	4,1	60	3,2	63	3,7
П-202-6	54	2,4	54	2,0	57	2,5
П-202-7	57	2,0	55	1,8	53	1,8
П-248-8	72	3,6	68	3,4	70	3,2
П-485-4	66	3,2	56	2,5	64	3,0
П-618-6	62	2,5	54	2,0	56	2,2
П-646-3	70	3,2	64	2,7	72	3,0
П-658-8	68	3,7	65	3,0	72	3,4
Є-405-5	58	3,2	54	3,0	55	3,2
Є-405-8	60	3,0	60	2,4	62	2,8
К-478-2	47	1,8	45	1,5	50	1,8
К-480-2	42	3,6	40	3,4	40	3,6
К-480-4	58	3,4	54	3,0	60	3,5
<i>HIP₀₅</i>	3	0,2	3	0,1	3	0,1

У 2018 році рослини рижію ярого всіх селекційних зразків формували стебло найменшого діаметру – у середньому за генотипом 2,5 мм. У 2017 і 2019 роках цей показник відповідно становив 3,1 та 2,9 мм. Загалом за період проведення досліджень залежно від погодних умов і генетичних особливостей фіксували показники діаметра стебла від 1,4 до 4,1 мм.

Серед сортів донорів експлантів найгрубше стебло формували рослини сорту Перемога (3,1 мм), найтонше – сорту Клондайк (2,0 мм). Сорти Степовий 1 і Євро 12 за діаметром стебла істотно не відрізнялись (2,8 і 2,7 мм відповідно). За цим показником відмічено суттєві відмінності у створених соматоклональних рослинних ліній рижію ярого. Рослини селекційних номерів К-478-2 і П-202-7 формували найтонше стебло – 1,7 і 1,9 мм відповідно. Зразки С-326-9, П-46-2, П-46-5, П-248-8, П-658-8, К-480-2 вирізнялись найбільшим діаметром стебла – від 3,3 до 3,7 мм. Найстабільнішими за цією ознакою були номери С-384-4, С-402-6, П-248-8, Є-405-5, К-480-2.

Важливою сортовою ознакою рижію ярого є гілкування рослин. Інтенсивність гілкування хрестоцвітих культур залежить від генетичних особливостей, строку сівби, норми висіву, погодних умов і забезпечення рослин елементами живлення [5]. У наших дослідженнях норма висіву культури була низькою (2 млн шт. насінин/га), тому вихідні сорти і відібрані соматоклональні рослинні лінії характеризувались досить високим рівнем гілкування стебла (табл. 5.10).

У середньому за роки досліджень коефіцієнт гілкування рослин рижію ярого становив 8,6. Зокрема, найінтенсивніше гілкування відмічено в 2017 році – залежно від генотипу на одній рослині формувалось від 6 до 14 гілок. У 2018 і 2019 роках цей показник був відповідно на 21,1 та 7,4 % нижчим. У 2018 році коефіцієнт гілкування залежно від генотипу варіювало від 4,3 до 12,1 (у середньому 7,5), а в 2019 – від 5,3 до 12,8 (у середньому 8,8).

Серед вихідних сортів найбільшу кількість гілок формували рослини сорту Перемога – в середньому 8 шт. Істотно не відрізнялись за гілкуванням стебла рослини сортів Степовий 1 і Євро 12 – коефіцієнт гілкування

відповідно становив 7,3 та 7,1. Найменш гіллястим було стебло в сорту Клондайк.

Таблиця 5.10

Гілкування рослин соматоклональних ліній рижію ярого, шт.

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	8,0	6,6	7,4	7,3
Перемога	9,1	7,2	8,3	8,2
Євро 12	9,0	5,2	7,2	7,1
Клондайк	5,8	4,3	5,6	5,2
С-87-4	7,7	8,0	8,4	8,0
С-87-7	13,0	7,6	9,0	9,9
С-121-2	11,6	9,4	11,8	10,9
С-121-11	9,6	5,2	8,3	7,7
С-234-8	11,2	6,7	9,4	9,1
С-326-9	10,1	7,9	9,0	9,0
С-384-4	5,6	4,9	6,1	5,5
С-402-6	9,4	7,0	9,0	8,5
С-419-6	8,7	6,8	6,7	7,4
С-586-7	9,6	7,2	8,6	8,5
П-46-2	14,1	11,2	12,6	12,6
П-46-5	12,3	11,1	12,0	11,8
П-202-6	6,2	4,7	5,3	5,4
П-202-7	6,2	5,8	5,9	6,0
П-248-8	13,4	12,1	12,8	12,8
П-485-4	12,2	8,0	10,1	10,1
П-618-6	8,1	7,4	8,0	7,8
П-646-3	10,6	8,9	10,8	10,1
П-658-8	11,2	9,1	11,4	10,6
Є-405-5	8,6	6,7	8,4	7,9
Є-405-8	10,1	8,2	9,8	9,4
К-478-2	6,2	5,8	6,5	6,2
К-480-2	9,1	8,0	8,4	8,5
К-480-4	10,8	8,4	9,2	9,5
<i>НІР₀₅</i>	<i>0,5</i>	<i>0,4</i>	<i>0,4</i>	–

Одержані соматоклональні форми рижію ярого за інтенсивністю гілкування стебла мали індивідуальні показники – залежно від року досліджень і генотипу в середньому на рослині формувалось від 4 до 14 гілок.

Більшість селекційних номерів (окрім С-384-4, П-202-6, П-202-7 і П-618-6) за цією ознакою істотно перевищували вихідні сорти.

Згідно Методики проведення експертизи сортів на відмінність, однорідність, стабільність [4] створені соматоклональні лінії рижію ярого за інтенсивністю галуження стебла можна поділити на три групи: слабкий ступінь гілкування (до 6 гілок) – С-384-4, П-202-6; помірний ступінь гілкування (6–9 гілок) – С-87-4, С-121-11, С-326-9, С-402-6, С-419-6, С-586-7, П-202-7, П-618-6, Є-405-5, К-478-2, К-480-2; сильний ступінь гілкування (понад 9 гілок) – С-87-7, С-121-2, С-234-8, П-46-2, П-46-5, П-248-8, П-485-4, П-646-3, П-658-8, К-405-8, К-480-4.

За кількістю стручків на рослині відмічено значний розмах мінливості досліджуваних зразків та істотний вплив на нього генетичних особливостей та погодних умов у роки досліджень (табл. 5.12). Залежно від генотипу на одній рослині у 2017 році утворювалось від 52,9 до 164,2 стручків, у 2018 році – від 24,1 до 152,3, а в 2019 році – від 24,7 до 184,7 стручків. Рослини соматоклональних ліній рижію ярого у 2017 і 2019 роках формували відповідно на 17,1 та 23,6 % більшу кількість стручків порівняно з 2018 роком. Порівняно з середніми багаторічними даними, найменше зниження інтенсивності формування стручків у 2018 році, відмічено у соматоклональних форм С-87-4, П-202-7, П-248-8, П-646-3, Є-405-5.

Таблиця 5.11

Кількість стручків на рослині створених соматоклональних ліній рижію ярого, шт.

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	93,1	79,4	114,5	99,1
Перемога	164,2	104,8	144,9	144,0
Євро 12	107,6	48,6	79,4	82,5
Клондайк	52,9	24,1	24,7	35,9
С-87-4	80,4	81,6	105,2	92,0
С-87-7	120,9	128,2	162,3	137,1
С-121-2	131,6	152,3	166,7	161,4
С-121-11	129,7	113,1	152,9	136,7
С-234-8	135,2	81,6	133,7	135,3

Продовження таблиці 5.11

C-326-9	94,1	76,9	129,9	103,8
C-384-4	71,4	73,3	92,6	81,7
C-402-6	111,2	132,6	154,2	136,8
C-419-6	103,4	76,9	101,6	97,8
C-586-7	80,1	78,1	88,9	85,3
П-46-2	148,4	98,8	109,1	124,3
П-46-5	128,0	124,1	147,4	139,4
П-202-6	132,4	121,0	108,3	125,5
П-202-7	115,7	98,5	110,3	112,5
П-248-8	126,7	109,9	132,9	127,9
П-485-4	127,8	121,2	125,0	129,4
П-618-6	89,0	76,9	101,7	92,5
П-646-3	124,4	128,2	141,0	138,8
П-658-8	111,2	111,1	100,0	111,5
Є-405-5	116,8	101,6	113,6	115,0
Є-405-8	121,7	99,7	124,6	119,8
К-478-2	83,9	85,0	99,2	92,5
К-480-2	146,3	87,7	145,5	131,9
К-480-4	151,4	118,2	145,5	144,0
<i>НІР₀₅</i>	6,5	4,9	6,0	–

Найбільшу кількість стручків серед вихідних форм формували рослини сорту Перемога (144,0 шт.), найменшу – Клондайк (35,9 шт.), а для сортів Степовий і Євро 12 цей показник відповідно становив 99,1 і 82,5 шт.

Серед створених соматоклональних ліній рижію ярого найменшу кількість стручків (81,2–97,8 шт.) формували селекційні номери С-87-4, С-384-4, С-419-6, С-586-7, П-618-6, К-478-2, а на рослинах зразків С-87-7, С-121-2, С-121-11, С-234-8, С-402-6, П-46-5, П-646-3, К-480-2, К-480-4 утворювалась найбільша їхня кількість – від 113,1 до 166,7 шт.

Рівень урожайності насіння рижію ярого залежить від кількості насінин у стручку. За результатами досліджень виявлено відмінності за цим показником між створеними соматоклональними лініями та вихідними сортами донорами експлантів (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

Кількість насінин у стручку створених соматоклональних ліній рижію ярого, шт.

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	12,9	12,6	12,7	12,7
Перемога	13,4	12,4	13,8	13,2
Євро 12	13,6	12,0	12,6	12,7
Клондайк	10,2	8,9	10,8	10,0
С-87-4	11,2	9,8	10,3	10,4
С-87-7	12,6	10,8	12,8	12,1
С-121-2	12,1	10,1	11,5	11,2
С-121-11	13,3	10,2	10,7	11,4
С-234-8	11,8	9,8	10,2	10,6
С-326-9	8,2	8,0	8,4	8,2
С-384-4	9,7	8,4	9,0	9,0
С-402-6	11,2	8,7	11,2	10,4
С-419-6	8,7	8,0	8,2	8,3
С-586-7	14,6	12,8	13,5	13,6
П-46-2	9,7	9,2	10,0	9,6
П-46-5	13,1	12,4	13,0	12,8
П-202-6	13,6	12,4	12,0	12,7
П-202-7	14,0	13,2	13,6	13,6
П-248-8	14,2	14,0	13,8	14,0
П-485-4	12,8	12,0	12,0	12,3
П-618-6	14,6	13,0	14,2	13,9
П-646-3	13,6	12,0	13,0	12,9
П-658-8	10,8	9,0	10,0	9,9
Є-405-5	13,7	12,8	13,2	13,2
Є-405-8	12,1	10,8	12,4	11,8
К-478-2	11,7	9,8	11,0	10,8
К-480-2	12,3	11,4	11,0	11,6
К-480-4	10,7	10,0	11,0	10,6
<i>НІР₀₅</i>	<i>0,6</i>	<i>0,5</i>	<i>0,6</i>	–

У середньому за генотипами в одному стручку максимальна кількість насінин була на рівні 14,6 шт., мінімальна – 8,0 шт.

Серед вихідних матеріалів за роками досліджень найбільшу кількість насінин в стручку (13,2 шт.) формували рослини сорту Перемога, найменшу – Клондайк (9,9 шт.).

Створені соматоклональні форми рижію ярого мали індивідуальні показники за кількістю насінин у стручку та відрізнялись від сортів донорів експлантів. Найменшу кількість насінин у стручку (8,3 шт.) формували селекційні номери С-419-6 та С-326-9. Середня кількість насінин була на рівні 11,6 шт. Перевищували середньогруповий показник рослини зразки С-586-7, П-202-7, П-248-8, П-618-6 і Є-405-5.

Важливим елементом в структурі врожаю хрестоцвітих олійних культур є маса 1000 насінин. Окрім цього, великовагове виповнене насіння характеризується високими технологічними показниками за придатністю до переробки. Маса 1000 насінин є основною сортовирізняльною ознакою рижію ярого.

У 2017 і 2019 роках маса 1000 насінин досліджуваних генотипів у середньому становила 1,10 г (табл. 5.13). У 2017 році цей показник варіював від 0,83 до 1,41 г, у 2019 році – від 1,03 до 1,42 г. Завдяки достатній кількості опадів за другу половину літа відбувся інтенсивний налив зерна, у 2018 році маса 1000 насінин у середньому за генотипом становила 1,19 г, що на 8,3 % було більше, порівняно з 2017 і 2019 роками.

Серед сортів донорів експлантів найкрупніше насіння формували рослини сорту Клондайк і Степовий 1 – маса 1000 насінин відповідно становила 1,32 і 1,21 г. Найменшим цей показник був у сорту Перемога (0,94 г).

Таблиця 5.13

Маса 1000 насінин створених соматоклональних ліній рижію ярого, г

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	1,24	1,24	1,14	1,21
Перемога	0,91	1,00	0,91	0,94
Євро 12	0,80	1,21	1,11	1,04
Клондайк	1,02	1,41	1,52	1,32
С-87-4	1,43	1,53	1,24	1,40
С-87-7	1,31	1,30	1,11	1,24
С-121-2	1,33	1,33	1,24	1,30
С-121-11	1,20	1,30	1,10	1,20
С-234-8	1,28	1,39	1,19	1,29
С-326-9	1,43	1,34	1,13	1,30
С-384-4	1,34	1,33	1,23	1,30
С-402-6	1,30	1,30	1,10	1,23
С-419-6	1,21	1,31	1,21	1,24
С-586-7	1,00	1,02	1,01	1,01
П-46-2	1,03	1,12	1,14	1,10
П-46-5	1,34	1,33	1,22	1,30
П-202-6	0,80	1,00	1,00	0,93
П-202-7	1,02	1,01	1,02	1,02
П-248-8	1,21	1,31	1,20	1,24
П-485-4	1,10	1,11	1,20	1,14
П-618-6	0,90	1,00	0,90	0,93
П-646-3	1,21	1,30	1,21	1,24
П-658-8	0,92	1,03	1,04	1,00
Є-405-5	0,93	1,04	1,03	1,00
Є-405-8	1,13	1,34	1,12	1,20
К-478-2	1,11	1,20	1,10	1,14
К-480-2	0,92	1,03	1,04	1,00
К-480-4	1,01	1,10	1,00	1,04
<i>НІР₀₅</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	–

Найбільшу масу 1000 насінин зафіксовано у лінії С-87-4 (1,40 г), найменшу у номерів П-202-6 і П-618-6 (0,93 г). Соматоклональні форми рижію ярого С-121-2, С-234-8, С-326-9, С-384-4, П-46-5 не істотно поступались кращому генотипу.

Усі створені соматоклональні лінії рижію ярого, окрім С-87-4, формували насіння середньої величини (маса 1000 насінин 0,80–1,34 г). Селекційний номер С-87-4 відноситься до групи великоплідних форм.

Головним показником цінності селекційного матеріалу сільськогосподарських культур є врожайність. Вихідні сорти та, відібрані під час клітинної селекції, соматоклональні рослинні лінії характеризувались індивідуальними морфологічними характеристиками та показниками адаптивності до навколишнього середовища, що в результаті визначило продуктивність посівів. Не всі зразки змогли компенсувати низьку щільність посіву високою індивідуальною продуктивністю рослин. Серед сортів донорів експлантів найнижчу врожайність зафіксовано в сорту Клондайк (0,56 т/га). Рослини сортів Перемога і Степовий 1 формували потужнішу надземну масу з добре розвинутим генеративним апаратом, що зумовило високу індивідуальну продуктивність. В середньому за роки досліджень урожайність насіння цих сортів відповідно становила 2,46 і 2,03 т/га (табл. 5.14).

Таблиця 5.14

Урожайність створених соматоклональних ліній рижію ярого, т/га

Зразок	2017 рік	2018 рік	2019 рік	Середнє
Степовий 1	2,11	1,67	2,30	2,03
Перемога	2,96	1,84	2,59	2,46
Євро 12	1,54	0,87	1,43	1,28
Клондайк	0,75	0,39	0,54	0,56
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

Продовження таблиці 5.14

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</i> ₀₅	0,13	0,10	0,12	–

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.

Отже, у процесі досліджень створено соматоклональні лінії рижію ярого, що істотно перевищували за врожайністю, масою 1000 насінин, кількістю насінин у стручку. Найвищою врожайністю вирізнялися лінії 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). Їх доцільно використовувати донорами вказаних ознак у селекції на продуктивність культури.

Висновки до розділу 5

1. За апробації створених самоклональних ліній рижію ярого встановлено, що схожість насіння та сила росту проростків за пророщування насіння у присутності хлориду натрію та маніту відповідно становила 73–20 та 86–40 % від контролю.
2. Найвищі показники збереження рослин впродовж вегетації (біля 95 %) відмічено у самоклональних ліній рижію ярого С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, П-46-5 та П-646-3.

3. Період вегетації створених соматоклональних ліній залежав від генотипу і варіював від 68 до 95 діб. Отримані зразки розділено 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 та пізньостиглі – С-87-4, С-87-7, С-121-2, С-121-11, С-384-4.
4. Отриманні матеріали характеризувались індивідуальними морфологічними показниками. Залежно від генотипу та погодних умов висота рослин варіювали від 40 до 72 см, інтенсивність гілкування стебла – від 4,9 до 13,0 гілок, кількість стручків на рослині – від 73,3 до 166,7 шт., кількість насінин у стручку – від 8,2 до 14,2 шт., маса 1000 насінин – від 0,8 до 1,4 г, що зумовило різну продуктивність рослин створених селекційних матеріалів.
5. Урожайність насіння соматоклональних ліній залежала від генотипу і варіювала від 0,89 до 3,48 т/га. Завдяки високій біологічній стійкості та індивідуальній продуктивності, виділено найурожайніші зразки С-87-7, С-121-2, П-46-5 і П-646-3, урожайність насіння відповідно становила 3,11, 3,17, 3,34 та 3,09 т/га. Після розмноження створений матеріал буде передано до Державної науково-технічної експертизи сортів рослин.

За результатами п'ятого розділу опубліковано три наукові праці [6–8].

Список джерел літератури за розділом 5.

1. Васильківський С. П., Кочмарський С. В. Селекція і насінництво польових культур: Підручник. Миронівка: Миронівська друкарня, 2016. 376 с.
2. Зінченко О. І., Салатенко В. Н., Білоножко М. А. Рослинництво: Підручник. Київ: Аграрна освіта, 2001. 591 с.
3. Білявська Л. Г., Присяжнюк О. І. Модель ранньостиглого сорту сої. *Новітні агротехнології*. 2018. № 6. URL: <http://jna.bio.gov.ua/article/view/165365>.

4. Методика проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС-тест). Олійні. за ред. С. О. Ткачик. Київ: Ніланд-ЛТД, 2014. 178 с.
5. Лихочвор А. М. Урожайність та якість насіння рижю ярого залежно від впливу елементів технології вирощування в умовах Лісостепу Західного: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Вінниця, 2017. 23 с.
6. Любченко І. О., Любченко А. І., Сержук О. П. Характеристика соматоклональних ліній рижю ярого отриманих методами клітинної селекції. Матеріали Міжнародної наукової конференції *Селекційно-генетична наука і освіта*, присвяченій 150-річчю факультету агрономії Уманського національного університету садівництва. Умань, 2018. С. 153-154.
7. Любченко А. І., Любченко І. О. Аналіз продуктивності рослин соматоклональних ліній рижю ярого. *Збірник наукових праць УНУС*. 2020. Вип. № 96. С. 303–319.
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.

ВИСНОВКИ

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 додаванні 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 соматональних 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.

ДОДАТКИ

Додаток А

Склад основного живильного середовища (Murashige T., Scoog F., 1962; Gamborg O.L., Eveleigh D.E., 1968; Schenk R.U., Hilderbrandt A.C., 1972)

Компоненти середовища	Кількість речовини, мг/л		
	Середовище Мурасіге–Скуга (MS)	Середовище Гамборга (B ₅)	Середовище Шенка–Хильдебрант (SH)
Основні неорганічні поживні речовини:			
NH ₄ NO ₃	1650	–	–
KNO ₃	1900	2500	2500
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	150	200
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370	250	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134	–
KH ₂ PO ₄	170	–	170
Na ₂ H ₂ PO ₄ * H ₂ O	–	150	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	–	300
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	50	50	50
Джерело мікроелементів:			
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	5,0
MnSO ₄ * H ₂ O	22,3	10,0	10,0
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	0,25	0,1
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025	0,25	0,2
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,6	2,0	1,0
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25	0,1
KJ	0,83	0,75	1,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	1	2	2
Джерело заліза F-хелат:			
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,8	27,8	15,0
Na ₂ -ЕДТА * 2H ₂ O	37,3	37,3	20,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	5	5	7

Додаток Б1

Дата настання фенологічних фаз розвитку соматоклональних ліній рижію ярого, 2017

Зразок	Фенологічні фази					
	сходи	формування розетки	бутонізація	цвітіння	зелений стручок	технічна стиглість
Степовий 1	13.04	24.04	24.05	03.06	16.06	17.07
Перемога	13.04	24.04	19.05	03.06	15.06	12.07
Євро 12	13.04	23.04	18.05	02.06	08.06	05.07
Клондайк	13.04	22.04	17.05	03.06	08.06	03.07
С-87-4	13.04	25.04	22.05	02.06	16.06	17.07
С-87-7	13.04	24.04	24.05	04.06	18.06	17.07
С-121-2	13.04	26.04	22.05	02.06	16.06	17.07
С-121-11	13.04	25.04	20.05	02.06	16.06	17.07
С-234-8	13.04	24.04	20.05	02.06	15.06	17.07
С-326-9	13.04	24.04	20.05	02.06	16.06	17.07
С-384-4	13.04	24.04	24.05	05.06	16.06	17.07
С-402-6	13.04	23.04	24.05	04.06	16.06	18.07
С-419-6	13.04	22.04	22.05	03.06	16.06	16.07
С-586-7	13.04	24.04	22.05	03.06	17.06	17.07
П-46-2	13.04	24.04	19.05	31.05	13.06	11.07
П-46-5	13.04	24.04	21.05	02.06	15.06	12.07
П-202-6	13.04	24.04	20.05	02.06	15.06	12.07
П-202-7	13.04	26.04	19.05	02.06	16.06	16.07
П-248-8	13.04	24.04	19.05	03.06	17.06	15.07
П-485-4	13.04	26.04	20.05	02.06	13.06	13.07
П-618-6	13.04	24.04	16.05	29.05	08.06	06.07
П-646-3	13.04	24.04	19.05	03.06	17.06	15.07
П-658-8	13.04	27.04	19.05	02.06	15.06	14.07
Є-405-5	13.04	25.04	19.05	01.06	13.06	10.07
Є-405-8	13.04	23.04	18.05	30.05	11.06	09.07
К-478-2	13.04	23.04	14.05	28.05	05.06	02.07
К-480-2	13.04	23.04	19.05	03.06	11.06	08.07
К-480-4	13.04	25.04	19.05	04.06	12.06	10.07

Примітка: сівбу проводили 04.04.2017

Додаток Б2

Дата настання фенологічних фаз розвитку соматоклональних ліній рижію ярого, 2018

Зразок	Фенологічні фази					
	сходи	формування розетки	бутонізація	цвітіння	зелений стручок	технічна стиглість
Степовий 1	25.04	02.05	20.05	01.06	16.06	16.07
Перемога	25.04	02.05	20.05	30.05	13.06	10.07
Євро 12	25.04	02.05	20.05	30.05	12.06	06.07
Клондайк	25.04	30.04	18.05	26.05	10.06	05.07
С-87-4	25.04	04.05	26.05	05.06	20.06	23.07
С-87-7	24.04	03.05	22.05	05.06	21.06	23.07
С-121-2	25.04	04.05	24.05	07.06	22.06	20.07
С-121-11	25.04	04.05	23.05	06.06	21.06	19.07
С-234-8	25.04	03.05	20.05	03.06	20.06	16.07
С-326-9	26.04	03.05	22.05	03.06	17.06	15.07
С-384-4	25.04	03.05	22.05	05.06	20.06	19.07
С-402-6	25.04	02.05	20.05	01.06	16.06	14.07
С-419-6	25.04	04.05	22.05	05.06	19.06	19.07
С-586-7	25.04	04.05	22.05	06.06	21.06	19.07
П-46-2	25.04	05.05	22.05	01.06	16.06	10.07
П-46-5	25.04	04.05	24.05	06.06	20.06	15.07
П-202-6	25.04	04.05	24.05	03.06	19.06	14.07
П-202-7	25.04	04.05	22.05	01.06	17.06	14.07
П-248-8	25.04	03.05	23.05	05.06	21.06	16.07
П-485-4	25.04	03.05	21.05	29.05	12.06	06.07
П-618-6	25.04	02.05	19.05	27.05	09.06	02.07
П-646-3	25.04	03.05	21.05	04.06	17.06	13.07
П-658-8	25.04	03.05	21.05	31.05	14.06	11.07
Є-405-5	25.04	04.05	21.05	03.06	17.06	13.07
Є-405-8	25.04	02.05	20.05	30.05	12.06	07.07
К-478-2	24.04	02.05	20.05	31.05	15.06	10.07
К-480-2	25.04	03.05	21.05	02.06	17.06	14.07
К-480-4	25.04	04.05	23.05	04.06	19.06	16.07

Примітка: сівбу проводили 16.04.2018

Додаток БЗ

Дата настання фенологічних фаз розвитку соматоклональних ліній рижюю ярого, 2019

Зразок	Фенологічні фази					
	сходи	формування розетки	бутонізація	цвітіння	зелений стручок	технічна стиглість
Степовий 1	07.04	17.04	10.05	28.05	11.06	10.07
Перемога	07.04	17.04	07.05	20.05	03.06	01.07
Євро 12	07.04	17.04	08.05	22.05	04.06	02.07
Клондайк	07.04	18.04	07.05	19.05	30.05	28.06
С-87-4	07.04	20.04	13.05	03.06	13.06	11.07
С-87-7	07.04	18.04	07.05	03.06	14.06	09.07
С-121-2	07.04	17.04	09.05	02.06	11.06	09.07
С-121-11	07.04	17.04	08.05	30.05	11.06	10.07
С-234-8	07.04	17.04	07.05	25.05	10.06	09.07
С-326-9	07.04	17.04	07.05	25.05	08.06	06.07
С-384-4	07.04	17.04	09.05	30.05	10.06	10.07
С-402-6	07.04	16.04	07.05	28.05	08.06	10.07
С-419-6	07.04	15.04	05.05	25.05	06.06	05.07
С-586-7	07.04	17.04	07.05	25.05	07.06	07.07
П-46-2	07.04	17.04	08.05	23.05	05.06	05.07
П-46-5	06.04	17.04	05.05	19.05	02.06	01.07
П-202-6	07.04	17.04	11.05	27.05	08.06	06.07
П-202-7	06.04	13.04	10.05	24.05	08.06	06.07
П-248-8	07.04	13.04	11.05	23.05	06.06	06.07
П-485-4	07.04	13.04	07.05	20.05	30.05	30.06
П-618-6	07.04	17.04	06.05	18.05	01.06	29.06
П-646-3	07.04	18.04	06.05	22.05	05.06	05.07
П-658-8	07.04	18.04	08.05	22.05	03.06	03.07
Є-405-5	07.04	17.04	05.05	18.05	01.06	01.07
Є-405-8	07.04	18.04	07.05	21.05	05.06	04.07
К-478-2	06.04	16.04	04.05	17.05	29.05	26.06
К-480-2	07.04	18.04	06.05	19.05	31.05	29.06
К-480-4	07.04	13.04	09.05	23.05	05.06	03.07

Примітка: сівбу проводили 25.03.2019

Додаток В



Продовження додатку В



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **136523** (13) **U**
(51) МПК
A01H 1/06 (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 01822</p> <p>(22) Дата подання заявки: 22.02.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2019</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2019, Бюл.№ 16</p>	<p>(72) Винахідник(и): Любченко Інна Олександрівна (UA), Рябовол Людмила Олегівна (UA), Любченко Андрій Іванович (UA), Рябовол Ярослав Сергійович (UA), Діордієва Ірина Павлівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА, вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаська обл., 20300 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ІНДУКУВАННЯ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ РИЖІЮ ЯРОГО**(57) Реферат:**

Спосіб індукування калюсної тканини рижію ярого включає культивування експланту на агаризованому живильному середовищі, що містить амоній азотнокислий, калій азотнокислий, кальцій хлористий, магній сірчаноокислий, калій фосфорнокислий однозаміщений залізо сірчаноокисле, етилендіамінтетраацетат натрію, борну кислоту, марганець сірчаноокислий, цинк сірчаноокислий, калій йодистий, натрій молібденовокислий, мідь сірчаноокислу, кобальт хлористий, піридоксин-HCl, тіамін-HCl, нікотинову кислоту, мезоінозит, аденін, гіберелінову кислоту, 6-бензиламінопурін, сахарозу, агар-агар. Культивування рослин проводять на живильному середовищі, яке додатково містить аскорбінову кислоту, гліцин, 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту.

UA 136523 U

Додаток Г

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.nbuuv.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 И. А.**, Любченко А. И., 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 від дня 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 калусної 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 соматональних 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 соматонів 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.

Додаток Д1

ПОГОДЖЕНО

Ректор Уманського національного
університету садівництва МОН
УкраїниО. О. Непочатенко
«25» 06 2020 року

ЗАТВЕРДЖУЮ

Голова ФГ «Поляна лісова»
Уманського району,
Черкаської областіВ. Є. Войтко
«25» 06 2020 року

АКТ

ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВО-ДОСЛІДНОЇ РОБОТИ

Замовник – ФГ «Поляна Лісова» Уманського району, Черкаської області в особі голови.

Даним актом стверджується, що результати наукової роботи Любченко І. О. за темою: «Створення вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до стресових чинників за використання біотехнологічних методів», виконаної в Уманському національному університеті садівництва, запроваджено в ФГ «Поляна лісова».

1. Вид впровадження — соматоклональна лінія рижію ярого С-87-7.
2. Характеристика масштабів впровадження — у 2019 році на площі 0,6 га.
3. Новизна результатів науково-дослідної роботи — отримано урожайність культури на рівні 3,0 т/га.
4. Економічний ефект — висока рентабельність виробництва.
5. Соціальний і науково-технічний ефект — збереження родючості ґрунту, охорона навколишнього природного середовища, раціональне використання коштів та енергоресурсів господарства.

Даний акт участі в фінансових операціях не бере.

Від Уманського національного
університету садівництва
відповідальний за впровадження
аспірант кафедри генетики
селекції рослин та біотехнології

Любченко І. О. Любченко
«25» 06 2020 року

Від ФГ «Поляна Лісова»
Уманського району,
Черкаської області
голова



В. Є. Войтко
«25» 06 2020 року

Додаток ДЗ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Уманського національного
університету садівництва МОН
України

[Signature] О. О. Непочатенко
26 » 05 2020 року

АКТ

ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВО-ДОСЛІДНОЇ РОБОТИ

Даний акт складено завідувачем навчально-науково-виробничої лабораторії біотехнології В. М. Майбородою, з одного боку, та аспіранткою кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології І. О. Любченко, з другого боку, в тому, що І. О. Любченко у період з 2014 по 2019 рр. передала для апробації та впровадження наступні розробки:

- технологію стерилізації експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*;
- живильні середовища для індукування, культивування та морфогенезу калюсної тканини рижію ярого;
- технологію мікроклонального розмноження рослин рижію ярого.

Завідувач
навчально-науково-виробничої
лабораторії біотехнології
Уманського НУС

В. М. Майборода

Аспірантка кафедри генетики,
селекції рослин та біотехнології
Уманського НУС

І. О. Любченко