

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва  
Національна академія аграрних наук України

Уманський національний університет садівництва  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

САХНО ТАМАРА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 581.1:633.854.78: 632.9

**ДИСЕРТАЦІЯ**

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СТІЙКОСТІ ЛІНІЙ І ГІБРИДІВ  
СОНЯШНИКА ДО ВОВЧКА (*OROVANCHE CUMANA* WALLR.)

03.00.12 – фізіологія рослин

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

Сахно Т. В. \_\_\_\_\_

Науковий керівник:

Петренкова Віра Павлівна,

доктор сільськогосподарських наук,

професор, член-кореспондент НААН

## АНОТАЦІЯ

Сахно Т. В. Морфофізіологічні особливості стійкості ліній і гібридів соняшника до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.12 «Фізіологія рослин». – Уманський національний університет садівництва МОН, Умань – 2017.

Нині з'ясовано вагомі аспекти морфобіологічних особливостей *Orobanche cumana* Wallr., який паразитує на соняшнику. Зокрема ідентифіковано гени стійкості до вовчка, розроблено молекулярно-генетичні методи їх маркування. Все це забезпечує подальше вдосконалення існуючих і розробку нових методів селекції соняшника на стійкість до вовчка. Разом з тим, до теперішнього часу залишається недостатньо дослідженими фізіолого-біохімічні процеси, які відбуваються на початкових етапах ураження рослин соняшника вовчком та обумовлюють його стійкість до паразита. Однак такі дані представляють цінність для поглиблення існуючих уявлень про біологічну природу стійкості рослин до паразита та для розробки методів її визначення.

У літературі є лише окремі повідомлення щодо зв'язку активності оксидоредуктаз та інтенсивності синтезу сполук фенольної природи за ураження соняшника патогенними грибами.

Традиційно для виявлення у генотипів стійкості до вовчка їх тестують методом штучного зараження з подальшим підрахунком кількості бульбочок паразита на коренях уражених рослин. Цей метод оцінювання є ефективним, але він потребує тривалого періоду для проникнення гаусторіїв вовчка в клітини рослини-господаря та подальшого формування бульбочок, за якими можна вести облік окомірно.

Виходячи зі встановленого захисного значення оксидоредуктаз та сполук фенольної природи за біотичного стресу рослин, припускаємо, що за

характером змін у біосинтезі фенольних сполук та активності оксидаз за ураження вовчком соняшника можна розробити метод визначення його стійкості до паразита. Власне, показники активності каталази та поліфенолоксидази можуть свідчити про потенційну стійкість соняшника до вовчка.

Ураховуючи значний обсяг дослідницьких робіт з розробки методів селекційного оцінювання генотипів соняшника на стійкість до вовчка, виявлено недостатній рівень досліджень щодо визначення впливу паразита на морфометричні та фізіологічні процеси в уражених рослинах, не розроблено нових методів попереднього оцінювання зразків, які б забезпечили виявлення достовірно стійких біотипів соняшника.

Вирішення цих актуальних питань стало підставою для виконання досліджень за темою дисертації.

Метою роботи було визначення особливостей морфогенезу та активності оксидаз і вмісту фенольних сполук у різних генотипів соняшника за ураження вовчком (*Orobanche cumana* Wallr.) та розробка методу попереднього біохімічного оцінювання його стійкості до паразита.

Для досягнення мети виконували такі завдання:

- визначити стійкість зразків соняшника до вовчка традиційними методами;
- охарактеризувати вплив ураження вовчком на морфологічні процеси зразків соняшника;
- з'ясувати залежність між рівнем стійкості до вовчка та вмістом фенольних сполук в рослинах соняшника;
- визначити особливості впливу зараження вовчком зразків соняшника на активність оксидаз у зв'язку із рівнем їх стійкості;
- розробити методику біохімічного оцінювання рослин соняшника за стійкістю до вовчка;

- розробити живильні середовища для культивування *in vitro* та з'ясувати можливість їх використання для створення стійкого до вовчка матеріалу соняшника.

Вперше в умовах України розроблено методику біохімічної оцінювання стійкості зразків соняшника до вовчка та проведено її порівняння з існуючими методиками, що забезпечило ефективність у доборі стійких біотипів.

Визначено реакцію генотипів соняшника на зараження вовчком, яка характеризувалась різним рівнем морфофізіологічних показників, фенольних сполук та активністю оксидаз у листках і коренях рослин.

Розроблено модифіковані живильні середовища для культивування соняшника *in vitro*, використання яких підвищує частку андрогенезу і сприяє збільшенню частки морфогенезу соняшника в подальшому.

Набуло подальшого розвитку використання в селекційній програмі Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України методу оцінювання генотипів соняшника на стійкість до вовчка. Розроблений в результаті досліджень біохімічний метод оцінювання на стійкість до вовчка (Патент № 79519 від 25.04.2013) сприяє прискоренню та здешевленню традиційного методу оцінювання і забезпечує виявлення цінного за стійкістю до вовчка селекційного матеріалу соняшника. Використання білкового компонента гідролізату казеїну (250 мг/л) у складі модифікованих живильних середовищ для культивування соняшника в умовах *in vitro* підвищує частку андрогенезу на 40 %, що сприяє подальшому морфогенезу.

Проаналізовано сучасні літературні дані про біологічні особливості вовчка, закономірності стійкості соняшника до нього, методи оцінювання селекційного матеріалу на стійкість до паразита. З'ясовано основні недосліджені питання щодо фізіолого-біохімічних механізмів взаємодії рослина-паразит та роль захисних реакцій при цьому. На підставі аналізу обґрунтовано актуальність досліджень, сформульовано мету і задачі

досліджень, розроблено методичний та методологічний підходи проведення дослідів.

Матеріалом досліджень були зразки культурного соняшника селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, зокрема фертильні чоловічі, стерильні материнські лінії та створені на їх основі комерційні гібриди. Лінії та гібриди соняшника були відібрані на основі даних лабораторії селекції та генетики соняшника та за каталогом гібридів соняшника Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, за якими всі зразки мають різний рівень стійкості до вовчка. Як стандарт сприйнятливості до вовчка використовували стерильну материнську лінію Сх 908 А, яка не має генів стійкості до вовчка, як стандарт стійкості – гібрид зарубіжної селекції (компанія “Pioneer DuPont”) PR64A71, стійкий до наявних рас вовчка. Для визначення расового складу вовчка використовували загальновідомі специфічні диференціатори стійкості, що використовуються в світовій практиці, зокрема не стійка лінія AD 66, сорт Рекорд – стійкий до раси С, лінія LC 1003 – стійка до раси Е, лінія LC 1093 – стійка до раси F та стійкий гібрид PR64A71.

Всі зразки соняшника вирощували в вегетаційних посудинах в умовах фітотрону Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України при температурі + 24 – 28°C, освітленні 4000 люкс та 16-годинному фотоперіоді. Для визначення стійкості зразків традиційним методом створювали штучний інфекційний фон. Для цього насіння соняшника висівали разом із насінням вовчка з розрахунку 1г на 5 кг ґрунту. Насіння вовчка було зібрано на території Харківської області та на сході Донецької області в Амвросіївському районі на посіві місцевого сорту, де популяція вовчка характеризується високою агресивністю і вірулентністю.

У процесі вегетації рослин соняшника визначали морфометричні показники – висоту рослин, кількість справжніх листків, їх площу за стандартною формулою. Підраховували також кількість бульбочок вовчка,

що утворились за період вегетації. Для проведення аналізів використовували по 10 рослин кожної лінії чи гібрида у варіантах досліду.

Загальний вміст фенолів у рослинних тканинах визначали спектрофотометричним методом на ULAB спектрофотометрі 101 при 760 нм. Активність ферментів визначали в листках та коренях 14-денних проростків дослідних рослин соняшника. Аналіз проводили спектрофотометричним методом на фотоколориметрі КФК-2 при 420 нм для вимірювання активності поліфенолоксидази, 470 нм – пероксидази та 405 нм – каталази.

Для визначення можливості використання культури *in vitro* у подальшій селекції соняшника на стійкість до вовчка використовували метод індукції андрогенезу на модифікованих живильних середовищах Мурасіге-Скуга.

У результаті проведених досліджень встановлено, що ступінь ураженості зразків соняшника вовчком суттєво варіював залежно від генотипу. Показано, що ураження вовчком пригнічує ріст рослин соняшника, однак, майже не впливає на морфологічні показники стійких генотипів соняшника.

Доведено, що ураження рослин соняшника вовчком значно впливає на вміст фенольних сполук. Так, за умов ураження рослин соняшнику паразитом рівень фенольних сполук в цілому підвищується як в листках, так і в коренях, за виключенням окремих зразків, у яких рівень фенолів як і в ліній-стандарту сприйнятливості знижувався за впливу вовчка. Встановлено, що стійкі та сприйнятливі генотипи відрізняються за рівнем фенолів в рослинах під дією *Orobanche cumana* Wallr. Показники стійких зразків були вищими за показники сприйнятливих.

З'ясовано, що ураження рослин соняшника квітковим паразитом суттєво впливає на активність ферментів. Найбільш чіткі закономірності спостерігали на 14 добу після ураження, що свідчить про доцільність проведення досліджень саме в цей період. Показано, що активність

ферментів значно зростає, окрім лінії-стандарту сприйнятливості, показники якої за умов ураження вовчком майже не змінюються або ж суттєво знижуються. Визначено, що показники активності поліфенолоксидази та каталази в листках контрольних рослин відповідають рівню стандарту стійкості, при цьому перевищують показники лінії-стандарту сприйнятливості, що свідчить про потенційну стійкість до вовчка (*Orobanchе сumana* Wallr.). Однак показники активності пероксидази в листках контрольних рослин неоднозначні і не забезпечують прогнозування стійкості до паразита. Встановлено, що показники активності ферментів у коренях контрольних рослин відповідають рівню стандарту стійкості, однак значно нижчі за показники стандарту сприйнятливості, а в деяких випадках – перевищують його. Це свідчить про доцільність обрання зеленого матеріалу (листки, сім'ядолі) для визначення потенційної стійкості соняшника до вовчка. На основі отриманих даних розроблено прискорений біохімічний метод оцінювання генотипів соняшника на стійкість до *Orobanchе сumana* Wallr., який базується на визначенні активності каталази у зеленому рослинному матеріалі.

З'ясовано, що частота калусогенезу зразків соняшника залежить від особливостей генотипу та від складу середовища культивування. Збагачення живильного середовища білковими компонентами суттєво збільшує частку калусогенезу. Тому, для подальших досліджень рекомендовано залучати до складу живильних середовищ гідролізат казеїну у концентрації 250 мг/л.

**Ключові слова:** морфологічні показники, соняшник, вовчок, фенольні сполуки, активність ферментів, методи оцінювання на стійкість.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

### *Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази у батьківських ліній та гібридів соняшнику при інокуляції вовчком. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. Вип.15 (№1008), 2012. С. 109-115. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, написання статті).

2. Задорожна О. А., Чигрин Т. В., Юшкіна Л. Л. Андрогагенез *in vitro* гібридів соняшнику за участю диких видів. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. Вип. 20, Т. 2. 2012. С. 108–112. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).

3. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Петренкова В. П. Активність поліфенолоксидази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche crotanica* Wallr.) генотипів соняшнику (*H. annuus* L.). Физиология и биохимия культурных растений. Т. 44. № 4. 2012. С. 355–360. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).

4. Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л., Чигрин Т. В., Супрун О. Г. Особливості андрогагенезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. Бюллетень Державного Нікітського бортанічного саду. № 105. 2012. С. 166–121. (частка авторства 30 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).

5. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Варіювання активності каталази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche crotanica* Wallr.) зразків соняшнику. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. Вип. 61. 2013. С. 189–194. (частка авторства 70 %, проведення експерименту узагальнення даних, написання статті).

6. Чигрин Т. В. Активность окислительно-восстановительных ферментов у разных по устойчивости к заразихе генотипов подсолнечника. Научно-технический бюллетень ВНИИМК «Масличные культуры». Вып.



155-156. 2013. С. 134–139.

7. Сахно Т. В. Морфометричні показники та вміст фенольних сполук у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Селекція і насінництво. Випуск 110. № 15. Харків. 2016. С. 117–122.

8. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Вміст фенольних сполук та морфометричні показники у зразків-диференціаторів соняшнику за умов ураження вовчком. Вісник аграрної науки Причорномор'я. вип. 4 (92). Миколаїв. 2016. С. 92–98. (частка авторства 70 %, проведення експерименту узагальнення даних, написання статті).

9. Сахно Т. В. Динаміка активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів соняшнику за ураження вовчком. Вісник СНАУ. Серія «Агрономія і біологія». вип. 9 (32). Суми, 2016. С. 3–9.

10. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Активність оксидоредуктаз у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Збірник наукових праць Уманського НУС. вип. 90. Ч. 1. Сільськогосподарські науки. Умань, 2017. С. 112–121. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

***Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:***

11. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андрогенна здатність пиляків соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (рослинний геном VI)» 7-10 вересня 2010 р. Одеса. С. 100. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, статистичний аналіз даних).

12. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андрогенез *in vitro* різних видів соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» 4-5 жовтня 2010 р. Харків. С. 25–26. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, статистичний аналіз даних).

13. Чигрин Т. В., Задорожная О. А., Юшкина Л. Л. Способность к андрогенезу в культуре *in vitro* пыльников разных видов подсолнечника. Сборник материалов VI Международной конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур» 24-25 февраля 2011. Краснодар, Россия. С. 357–361 (частка авторства 45 %, проведення експерименту, аналіз та узагальнення даних).

14. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність поліфенолоксидази у міжвидових гібридів соняшнику. Матеріали доповідей II Міжнародної наук. конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого–біохімічні і генетичні аспекти» 11-13 жовтня 2011 р. Харків. С. 89–90. (частка авторства 50 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

15. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази ліній соняшнику за інокуляції їх вовчком. Збірка матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» 11-13 травня 2012 р. Запоріжжя. С. 58–59. (частка авторства 65 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

16. Чигрин Т. В. Активність поліфенолоксидази та пероксидази у різних за стійкістю до вовчка генотипів соняшнику. Матеріали докладов V Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационно–инвестиционное развитие растениеводческой отрасли – состояние и перспективы» 4-6 июля 2012. Харьков. С. 23.

17. Чигрин Т. В., Задорожная О. А. Активность некоторых ферментов подсолнечника в связи с устойчивостью к заразице. Материалы VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 2-5 октября 2012. Москва, Россия. С. 487–491. (частка авторства 65 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

18. Сахно Т. В. Рівень фенольних сполук у генотипів соняшнику з різною стійкістю до *Orobanche cuman* Wallr. Збірка матеріалів

міжнародної наукової конференції «Стійкість соняшнику до біотичних та абіотичних факторів» 24-25 червня 2014 р. Харків. С. 67–68.

19. Сахно Т. В. Влияние заражения заразихой на ростовые процессы и содержание фенольных соединений у линий и гибридов подсолнечника. Материалы IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 20-25 апреля 2015 р. Москва, Россия. С. 425–430.

20. Сахно Т. В. Вплив ураження вовчком на морфометричні показники та загальний вміст фенолів у ліній-диференціаторів соняшнику. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» 7-8 липня 2016 р. Харків. С. 18–19.

***Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:***

21. Патент № 79519 на корисну модель «Спосіб прискореного визначення стійкості зразків соняшнику до вовчка (*Orobanche cunana* Wallr.)» від 25.04.2013./Задорожна О. А., Чигрин Т. В.; Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН; заявл.: 19.10.12; опубл.: 25.04.13. – Бюл. № 8 (частка авторства 50 %, проведення дослідів, аналіз даних).

## ABSTRACT

Sakhno T. V. Morphophysiological particularities of resistance of sunflower lines and hybrids to broomrape. – Manuscript.

Thesis for PhD degree in agriculture by specialty 03.00.12 – plant physiology. – Uman national university of horticulture, Uman – 2017.

Now we have clarified the important aspects of the morphological features of *O. Cumana* Wallr. Sunflower genes of resistance to broomrape were identified, molecular genetic methods for their labeling were developed as well. All this is significant for further improvement of existing and development of new methods of sunflower breeding for resistance to broomrape. At the same time, physiological and biochemical processes that occur at the initial stages of infection of sunflower with broomrape and cause its resistance to the parasite remain extremely poorly investigated. However, such data are very important for deepening existing ideas about the biological nature of plant resistance to a parasite and for developing methods of its determination.

In the literature there are only separate reports about the connection between the oxidoreductases activity and the intensity of phenolic compounds synthesis with the infection of sunflower with pathogenic fungi.

Traditionally, in order to identify resistance to broomrape in specimens, they are tested by the method of artificial plants infection with the subsequent calculation of the parasite nodules number on the roots. This method of evaluation is effective, but it takes much time and requires a period to introduce a parasite into the host plant cells, to form nodules that can be determined with an eye.

Proceeding from the established protective role of oxidoreductases and phenolic compounds in the plant biotic stress, we assume that by the characteristics of the changes in the phenolic compounds biosynthesis and the oxidases activity during sunflower infection with broomrape, methods for assessing its resistance to parasite can be developed. Actually, indicators of

activity of catalase and polyphenoloxidase may indicate the potential resistance of various sunflower genotypes to broomrape.

Taking into account a considerable amount of research work on the development of methods for the selection of sunflower genotypes for resistance to broomrape, a deficient level of research was conducted on the determination of the impact of the parasite on the morphometric and physiological processes in the affected plants; no new methods for preliminary evaluation of the samples were developed that would ensure the identification of reliable resistant biotypes of sunflower .

Solving these pressing issues became the basis for conducting research on the thesis topic.

The aim of the investigation was to determine the peculiarities of morphogenesis, oxidases activity and the phenolic compounds content in sunflower genotypes during infection with broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) and the development of a method for preliminary biochemical evaluation of its resistance to parasite.

To achieve the goal, the following tasks were performed:

- to determine the resistance of sunflower samples to broomrape using traditional methods;
- to characterize the impact of broomrape infection on the morphologic processes of sunflower samples;
- to clarify the relationship between the level of resistance to broomrape and the content of phenolic compounds in sunflower plants;
- to determine the peculiarities of the broomrape influence on the activity of oxidases in sunflower samples in connection with the level of their resistance;
- to develop a method of biochemical evaluation of sunflower plants for resistance to broomrape;
- to develop nutrient media for *in vitro* cultivation and to find out the possibility of using an *in vitro* culture to create a resistant to broomrape sunflower material.

For the first time in Ukraine, a method for biochemical evaluation of the resistance of sunflower samples to broomrape was developed and compared with existing methods, that ensured efficiency in breeding of the resistant forms.

The reaction of sunflower genotypes to broomrape infection was determined, that was characterized by the level of morphophysiological indices, phenolic compounds and activity of oxidases in the leaves and roots of sunflower plants.

It have been developed modified nutrient media for sunflower cultivation *in vitro*, the use of which increases the proportion of androgenesis and promotes an increase in the proportion of sunflower morphogenesis in the future.

Method of assessing sunflower genotypes for resistance to broomrape was used in the breeding program of the Plant Production Institute n.a. V. Ya. Yuryev of NAAS. The developed biochemical estimation method for resistance to broomrape (Patent No. 79519 from 25.04.2013) promotes the acceleration and cost reduction of the traditional method of assessment and ensures the detection of a sunflower breeding material with high level of resistance to broomrape. The use of the protein component of casein hydrolyzate (250 mg / l) as part of the modified nutrient medium for sunflower cultivation *in vitro* increases the proportion of androgenesis by 40%, which contributes to further morphogenesis.

The modern literary data about the biological features of broomrape, the laws of sunflower resistance to it and the methods for estimating the breeding material for the resistance to parasite have been analyzed. The main unexplored questions about physiological and biochemical mechanisms of plant-parasite interaction and the role of protective reactions in this case have been elucidated. Based on the analysis, the relevance of the studies was substantiated, the goals and objectives of the research were formulated, the methodological and methodological approaches to conducting the experiments were developed as well.

The sunflower samples breded in Plant Production Institute n.a. V. Ya. Yuryev of NAAS, like fertile father lines, sterile mother lines and hybrids created on their basis, were used as the material for the research.

The sunflower lines and hybrids were selected on the basis of the sunflower hybrids catalog and the data of the sunflower selection and genetics laboratory of Plant Production Institute n.a. V. Ya. Yuryev of NAAS, according to that all samples have a different level of resistance to broomrape. The sterile maternal line Cx 908 A, that doesn't have resistance genes to broomrape, was used as a susceptibility standard. The hybrid of foreign breeding company (Pioneer DuPont) PR64A71, resistant to the existing races of broomrape was used as a resistance standard.

The specific differentiators were used to determine the broomrape race. These are sunflower samples: susceptible line AD 66, sort Record – resistant to race C, line LC 1003 – resistant to race E, line LC 1093 – resistant to race F and resistant hybrid PR64A71.

All samples of sunflower were grown in vegetation containers in stable greenhouse conditions of Plant Production Institute n.a. V. Ya. Yuryev of NAAS at a temperature of +24 – +28 ° C, 4000 lux illumination and 16-hours photoperiod. To determine the resistance of samples by a traditional method, an artificial infectious background was created. For this purpose, sunflower seeds were planted along with the broomrape seeds at the rate of 1 g per 5 kg of soil. Broomrape seeds were collected on the territory of the Kharkov region and in the east of the Donetsk region in the Amvrosievsky district, where the broomrape population was characterized as high aggressive and virulent.

While the sunflower plants vegetation, morphometric parameters were determined – the plant height, the number of real leaves, their area by the standard formula. It was also counted the number of broomrape nodules formed during the vegetation. For the analysis, 10 plants of each line or hybrid were used in the trial variants.

The total phenols content in plant tissues was determined spectrophotometrically on a ULAB spectrophotometer 101 at 760 nm.

Enzyme activity was determined in the leaves and roots of 14-day sunflower research plants seedlings. The analysis was carried out spectrophotometrically on a photocolimeter KFK-2 at 420 nm for polyphenol oxidase, 470 nm for peroxidase and 405 nm for catalase.

To determine the possibility of using the in vitro culture in the further sunflower breeding for resistance to broomrape, the method of androgenesis induction on modified Murasine-Skuga nutrient media was used.

As a result of the conducted studies, it was established that the infestation degree of sunflower samples with broomrape varied significantly depending on the genotype.

It is shown that infection with broomrape inhibited the growth and development of sunflower plants. However, it doesn't affect the morphological indicators of resistant sunflower genotypes.

It is proved that the defeat of sunflower plants by broomrape significantly affects the content of phenolic compounds in the material. Thus, under inoculation the level of phenolic compounds increases both in the leaves and in the roots of sunflower plants, except some samples, as its phenol level decreased with broomrape infection as well as in the susceptibility standard line sample.

It has been established that resistant and susceptible genotypes differ in the level of phenols in plants under the broomrape influence. Phenols level in resistant samples was higher than it in susceptible ones.

It was found that inoculation of sunflower plants with broomrape significantly affects the enzymes activity. The clearest patterns were observed on the 14th day after infection, indicating that it is expedient to conduct further studies precisely in this phase.

It is shown that the activity of enzymes increases significantly, except the line-standard of susceptibility, as its indices hardly change or significantly decrease under inoculation with broomrape.



It was determined that polyphenol oxidase and catalase activity in the leaves of control plants is at the same level as in the resistant standard sample, and at the same time exceed the parameters of the susceptible line-standard. This may indicate a potential resistance to broomrape. However, peroxidase activity in the leaves of control plants is ambiguous and does not allow predicting resistance to the parasite.

It has been established that the enzyme activity in the roots of the control plants is at the same level as in the resistant standard sample, but it is much lower than the parameters of susceptible line-standard, and in some cases exceeds it. This indicates that to determine the potential resistance to broomrape, it is necessary to take green material (leaves, cotyledons) for investigations.

It is established that the callusogenesis frequency of sunflower samples depends on the genotype characteristics and on the culture medium composition.

The addition of protein components to the nutrient medium substantially increases the frequency of sunflower callusogenesis. Therefore, for further studies, it is recommended to add casein hydrolyzate to the nutrient medium at a concentration of 250 mg/l.

Based on the data obtained, an accelerated method for determining sunflower resistance to broomrape was developed, based on the determination of catalase activity in green plant material.

**Key words:** morphophysiological parameters, sunflower, broomrape, phenolic compounds, enzyme activity, evaluation methods for resistance

## PUBLICATIONS LIST

**Proceedings in which the main scientific results of the dissertation are published:**

1. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A. Activity of peroxidase in sunflower lines and hybrids during broomrape infestation. Bulletin of Kharkiv National University. Series biology. Vp. 15 (No. 1008), 2012. P. 109-115. (share of authorship is 70 %, conducting an experiment, writing an article).

2. Zadorozhnaya O. A., Chigrin T. V., Yushkina L. L. *In vitro* androgenesis of sunflower hybrids with the participation of wild species. Bulletin of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. V. 20, T. 2. 2012. P. 108-112. (share of authorship is 40 %, conducting an experiment, analyzing data, writing an article).

3. Chigrin T. V., Zadorozhna O. A., Petrenkova V. P. The activity of polyphenoloxidase in different by resistance to *Orobanche cumana* Wallr. genotypes of sunflower (*H. annuus* L.). Physiology and biochemistry of cultivated plants. T. 44. No. 4. 2012. P. 355-360. (share of authorship is 70 %, conducting an experiment, analyzing data, writing an article).

4. Zadorozhnaya O. A., Yushkina L. L., Chigrin T. V., Suprun O. G. Peculiarities of androgenesis in culture *in vitro* of various sunflower species. Bulletin of the State Nikita Botanic Gardens. No. 105. 2012. P. 166-121. (share of authorship 30 %, conducting an experiment, analyzing data, writing an article).

5. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A. Variation of catalase activity in different by resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) samples of sunflower. Visnyk of L'viv Univ. Biological series. V. 61. 2013. P. 189-194. (share of authorship is 70 %, conducting an experiment of data generalization, writing an article).

6. Chigrin T. V. Activity of redox enzymes in different by resistance to broomrape genotypes of sunflower. Scientific and technical bulletin of VNIIMK "Oil Cultures". V. 155-156. 2013. P. 134-139.

7. Sakhno T. V. Morphometric indices and content of phenolic compounds in sunflower lines and hybrids under broomrape infaction. Selection and seed production. Issue 110. № 15. Kharkiv. 2016. P. 117-122.

8. Sakhno T. V., Petrenkova V. P. The content of phenolic compounds and morphometric indices in sunflower-differentiators samples under broomrape infaction. Bulletin of the Agrarian Science of the Black Sea Region. V. 4 (92). Mykolayiv. 2016. P. 92-98. (share of authorship is 70 %, conducting an experiment of data generalization, writing an article).

9. Sakhno T. V. Dynamics of redox enzymes activity in sunflower differentiators under broomrape infaction. SNAU Bulletin. Series "Agronomy and Biology". V. 9 (32). Sumy, 2016. P. 3-9.

10. Sakhno T. V., Petrenkova V. P. Activity of redox enzymes in sunflower lines and hybrids under broomrape infaction. Collection of scientific works of Uman National University of horticulture. V. 90 (1). Agricultural sciences. Uman, 2017. P. 112-121. (share of authorship is 70%, conducting an experiment, analyzing and summarizing data, writing an article).

**Proceedings certifying approbation of the dissertation materials:**

11. Chigrin T.V., Zadorozhna O.A., Yushkina L. L. Androgenic ability of sunflower anthers. Collection of materials of the International scientific conference "Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety (plant genom VI)" September 7-10, 2010. Odessa. P. 100. (share of authorship is 40 %, conducting an experiment, statistical analysis of data).

12. Chigrin T.V., Zadorozhna O. A., Yushkina L. L. *In vitro* androgenesis of different sunflower spicies. Collection of materials of the International scientific conference "Ecology of Sustainable Development of the Agrosphere and the Noosphere Perspective of the Information Society" October 4-5, 2010. Kharkiv. P. 25-26. (share of authorship is 40 %, conducting an experiment, statistical data analysis).

13. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A., Yushkina L. L. Ability to androgenesis in anthers culture *in vitro* of different sunflower species. The

collection of materials of the VI International Conference of Young Scientists and Specialists "Innovative Directions of Research in Selection and Technology of Oilseed Cultivation" February 24-25, 2011. Krasnodar, Russia. P. 357-361 (45 % of authorship, experimentation, analysis and data aggregation).

14. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A. Polyphenoloxidase activity in interspecific hybrids of sunflower. Materials of the reports of the II International Science. Conference "Regulation of Plant Growth and Development: Physiological-Biochemical and Genetic Aspects" October 11-13, 2011. Kharkiv. P. 89-90. (share of authorship is 50 %, conducting an experiment, analyzing data, writing abstracts).

15. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A. Peroxidase activity of sunflower lines under broomrape infestation. Collection of materials of the III International scientific and practical conference "Modern problems of biology, ecology and chemistry" May 11-13, 2012 Zaporizhzhya. P. 58-59. (share of authorship is 65 %, conducting an experiment, analyzing data, writing abstracts).

16. Chigrin T. V. The activity of polyphenoloxidase and peroxidase in different by resistance to broomrape genotypes of sunflower. Materials of the reports of the V International Scientific and Practical Conference of Young Scientists "Innovative and investment development of the plant-growing industry - state and perspectives" July 4-6, 2012. Kharkiv. P. 23

17. Chigrin T. V., Zadorozhnaya O. A. Activity of some sunflower enzymes in connection with resistance to broomrape. Materials of the VIII International Symposium "Phenolic Compounds: Fundamental and Applied Aspects" October 2-5, 2012. Moscow, Russia. P. 487-491. (share of authorship is 65 %, conducting an experiment, analyzing data, writing abstracts).

18. Sakhno T. V. The level of phenolic compounds in sunflower genotypes with varying resistance to *Orobanche cumana* Wallr. Collection of materials of the International scientific conference "Sustainability of sunflower to biotic and abiotic factors" June 24-25, 2014. Kharkiv. P. 67-68.

19. Sakhno T. V. Influence of broomrape infaction on growth processes and the content of phenolic compounds in sunflower lines and hybrids. Materials of the IX International Symposium "Phenolic Compounds: Fundamental and Applied Aspects" April 20-25, Moscow, Russia. P. 425-430.

20. Sakhno T. V. Influence of broomrape infaction on morphometric indices and total content of phenols in sunflower differentiators. Materials of the International scientific-practical conference of young scientists "Innovative trends in the field of plant cultivation" July 7-8, 2016. Kharkiv. P. 18-19.

**Proceedings that additionally reflect the scientific results of the dissertation:**

21. Utility model patent No. 79519 "A method of accelerated determination of the sunflower samples resistance to broomrape (*Orobanche sumana* Wallr.)". Dated April 25, 2013 / Zadorozhnaya O. A., Chigrin T. V .; Yuryev Plant Production Institute of NAAS; Statement: 19.10.12; published: 25.04.13. – Bull. No. 8 (share of authorship is 50 %, conducting research, data analysis).

ЗМІСТ	Стр.
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ЗАКОНОМІРНОСТІ ФОРМУВАННЯ СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО ВОВЧКА ( <i>OROBANCHE CUMANA</i> WALLR.) ТА МЕТОДИ ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ (огляд літератури)	31
1.1. Біологічні особливості розвитку вовчка	31
1.1.1. Ботанічна характеристика <i>Orobanchae cumana</i> Wallr.	31
1.1.2. Розповсюдження та вірулентність вовчка	37
1.2. Механізм розпізнавання патогена рослиною	39
1.3. Роль активних форм кисню в індукуванні захисних реакцій	42
1.4. Зміна активності антиоксидантних ферментів за взаємодії рослина-патоген	43
1.5. Роль фенольних сполук у формуванні стійкості соняшника до вовчка	44
1.6. Сучасні методи, що використовуються в селекції на стійкість до вовчка	45
1.6.1. Біотехнологічні методи в селекції соняшника	46
1.6.2. Методи оцінювання матеріалу соняшника на стійкість до вовчка ( <i>Orobanchae cumana</i> Wallr.)	50
Висновки до розділу 1	58
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	60
2.1. Матеріал досліджень	60
2.2. Методика проведення досліджень	61
2.2.1. Методи обліку та спостережень	62
2.2.2. Методика визначення загального вмісту фенольних сполук у рослинному матеріалі соняшника	63
2.2.3. Методика проведення біохімічного аналізу активності окисно-відновних ферментів	65

2.2.4. Методика індукції андрогенезу фертильних чоловічих ліній соняшника	69
Висновки до розділу 2	71
<b>РОЗДІЛ 3. РІВЕНЬ СТІЙКОСТІ ТА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЗА ВПЛИВУ УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ</b>	72
3.1. Рівень ураженості та морфологічні показники зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком	72
3.2 Рівень ураженості ліній і гібридів соняшника вовчком	74
3.3. Морфологічні показники ліній та гібридів соняшника за умов ураження вовчком	77
Висновки до розділу 3.	81
<b>РОЗДІЛ 4. ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У РОСЛИНАХ СОНЯШНИКА ЗА УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ.</b>	83
4.1. Вміст фенольних сполук у рослинах зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком	83
4.2. Вміст фенольних сполук у рослинах ліній та гібридів соняшника за ураження вовчком	86
Висновки до розділу 4	90
<b>РОЗДІЛ 5. АКТИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ФЕРМЕНТІВ У РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ СОНЯШНИКА ЗА УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ</b>	93
5.1. Аналіз дослідного матеріалу за активністю ферментів	93
5.1.1. Активність оксидоредуктаз у зразків диференціаторів стійкості соняшника за ураження вовчком	93
5.1.2. Активність поліфенолоксидази дослідних генотипів соняшника	103
5.1.3. Активність пероксидази дослідних генотипів соняшника	110
5.1.4. Активність каталази дослідних генотипів соняшника	117
5.2. Розробка біохімічного методу оцінювання соняшника за стійкістю до вовчка	122
Висновки до розділу 5	124

РОЗДІЛ 6. ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ СТВОРЕННЯ СТІЙКОГО МАТЕРІАЛУ СОНЯШНИКА ДО ВОВЧКА	127
Висновки до розділу 6	131
ВИСНОВКИ	133
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	136
ДОДАТКИ	161



## ВСТУП

Соняшник найбільш важлива олійна культура в Україні. Його частка у виробництві олії становить майже 70 % [1]. У результаті багаторічних досліджень вітчизняними вченими створено нові, високо адаптивні, врожайні сорти і гібриди, з високим вмістом олії в насінні та високою її якістю, урожай насіння яких перевищує 3,0-4,0 т/га [2, 3].

Значних втрат урожаю ця цінна олійна культура зазнає від паразитичної рослини вовчка соняшникового (*Orobanche cumana* Wallr.), яка, живлячись за рахунок рослини соняшника, пригнічує її ріст і розвиток, що й зумовлює зниження її продуктивності [4, 5]. Воно може сягати до 50%, а в окремі роки урожай втрачається повністю на значних площах [6]. На теперішній час відомо понад 100 видів вовчка. Зазвичай на соняшника паразитує вовчок звичайний (*O. cumana* Wallr.). Цей паразит є одним з основних біотичних факторів, які негативно впливають на урожайність соняшника на території східної та південної Європи, Середнього Сходу, Росії, України та Китаю [7 – 12].

Доведено, що найбільш економічно вигідним є створення та вирощування стійких до вовчка сортів та гібридів соняшника [13, 14, 15]. Разом з тим показано, що вирощування стійких до вовчка генотипів зумовлює формування нових, більш вірулентних рас паразита [16 – 21].

Отже, викладене дає підставу вважати, що необхідні подальші дослідження біологічних особливостей вовчка, фізіолого-генетичних механізмів стійкості до нього соняшника з метою стабілізації урожаю та його якості цієї цінної олійної культури.

**Актуальність теми.** Нині з'ясовано вагомі аспекти морфобіологічних особливостей *Orobanche cumana* Wallr., який паразитує на соняшнику [22, 23]. Зокрема ідентифіковано гени стійкості до вовчка, розроблено молекулярно-генетичні методи їх маркування [24 – 32]. Все це забезпечує

подальше вдосконалення існуючих і розробку нових методів селекції соняшника на стійкість до вовчка.

Разом з тим, до теперішнього часу залишається недостатньо дослідженими фізіолого-біохімічні процеси, які відбуваються на початкових етапах ураження рослин соняшника вовчком та обумовлюють його стійкість до паразита. Однак такі дані представляють цінність для поглиблення існуючих уявлень про біологічну природу стійкості рослин до паразита та для розробки методів її визначення.

У літературі є лише окремі повідомлення щодо зв'язку активності оксидоредуктаз та інтенсивності синтезу сполук фенольної природи за ураження соняшника патогенними грибами [33, 35 – 38] та вовчком [34].

Традиційно для виявлення у генотипів стійкості до вовчка їх тестують методом штучного зараження з подальшим підрахунком кількості бульбочок паразита на коренях уражених рослин. Цей метод оцінювання є ефективним, але він потребує тривалого періоду для проникнення гаусторіїв вовчка в клітини рослини-господаря та подальшого формування бульбочок, за якими можна вести облік окомірно [39].

Виходячи зі встановленого захисного значення оксидоредуктаз [40,41] та сполук фенольної природи [42] за біотичного стресу рослин, припускаємо, що за характером змін у біосинтезі фенольних сполук та активності оксидаз за ураження вовчком соняшника можна розробити метод визначення його стійкості до паразита. Власне, показники активності каталази та поліфенолоксидази можуть свідчити про потенційну стійкість соняшника до вовчка.

Ураховуючи значний обсяг дослідницьких робіт з розробки методів селекційного оцінювання генотипів соняшника на стійкість до вовчка, виявлено недостатній рівень досліджень щодо визначення впливу паразита на морфометричні та фізіологічні процеси в уражених рослинах, не розроблено нових методів попереднього оцінювання зразків, які б забезпечили виявлення достовірно стійких біотипів соняшника.

Вирішення цих актуальних питань стало підставою для виконання досліджень за темою дисертації.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Наукові дослідження за темою дисертації виконано в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України (ІР НААН) впродовж 2010 – 2016 рр. у відповідності з завданням 23.01.01.13.Ф «Розробка методів добору матеріалу соняшника (*Helianthus annuus* L.) з цінними господарськими ознаками, включаючи стійкість до вовчка (*Orobanche cunana* Wallr.) з використанням сучасних методів досліджень» (№ ДР 0111U003386) згідно НТП «Поліпшення генотипів рослин з використання досягнень сучасної біотехнології (Сільськогосподарська біотехнологія) 2011 – 2015 рр.».

**Мета та завдання досліджень.** Метою роботи було визначення особливостей морфогенезу та активності оксидаз і вмісту фенольних сполук у різних генотипів соняшника за ураження вовчком (*Orobanche cunana* Wallr.) та розробка методу попереднього біохімічного оцінювання його стійкості до паразита.

Для досягнення мети виконували такі завдання:

- визначити стійкість зразків соняшника до вовчка традиційними методами;
- охарактеризувати вплив ураження вовчком на морфологічні процеси зразків соняшника;
- з'ясувати залежність між рівнем стійкості до вовчка та вмістом фенольних сполук в рослинах соняшника;
- визначити особливості впливу зараження вовчком зразків соняшника на активність оксидаз у зв'язку із рівнем їх стійкості;
- розробити методіку біохімічного оцінювання рослин соняшника за стійкістю до вовчка;

- розробити живильні середовища для культивування *in vitro* та з'ясувати можливість їх використання для створення стійкого до вовчка матеріалу соняшника.

*Методи дослідження:* вегетаційний – для визначення стійкості зразків соняшника до вовчка за підрахунком бульбочок на уражених рослинах, морфологічні аналізи – для визначення висоти рослин та ін., біохімічні – для визначення рівня фенольних сполук, активності оксидаз, біотехнологічні – для визначення можливості використання культури *in vitro* для створення стійкого матеріалу соняшника, статистичні – для визначення достовірності одержаних результатів.

**Наукова новизна роботи.** Наукова новизна досліджень характеризується вирішенням нового наукового завдання з визначення особливостей морфофізіологічних показників генотипів соняшника за ураження вовчком, розробки біохімічного методу попереднього оцінювання зразків соняшника на стійкість до вовчка та визначення на його основі генотипів з високим рівнем стійкості до паразита, цінних для селекції культури.

Вперше в умовах України розроблено методіку біохімічної оцінювання стійкості зразків соняшника до вовчка та проведено її порівняння з існуючими методиками, що забезпечило ефективність у доборі стійких біотипів.

Визначено реакцію генотипів соняшника на зараження вовчком, яка характеризувалась різним рівнем морфофізіологічних показників, фенольних сполук та активністю оксидаз у листках і коренях рослин.

Розроблено модифіковані живильні середовища для культивування соняшника *in vitro*, використання яких підвищує частку андрогенезу і сприяє збільшенню частки морфогенезу соняшника в подальшому.

Набуло подальшого розвитку використання в селекційній програмі Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України методу оцінювання генотипів соняшника на стійкість до вовчка.

**Практична цінність роботи.** Розроблений в результаті досліджень біохімічний метод оцінювання на стійкість до вовчка (Патент № 79519 від 25.04.2013) сприяє прискоренню та здешевленню традиційного методу оцінювання і забезпечує виявлення цінного за стійкістю до вовчка селекційного матеріалу соняшника. Використання білкового компоненту гідролізату казеїну (250 мг/л) у складі модифікованих живильних середовищ для культивування соняшника в умовах *in vitro* підвищує частку андрогенезу на 40 %, що сприяє подальшому морфогенезу.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота виконана автором самостійно і є завершеним науковим дослідженням. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, разом з науковим керівником сформульовано мету і завдання, самостійно виконано лабораторні дослідження, здійснено аналіз світової та вітчизняної літератури за темою дисертації, проведено статистичну обробку отриманих даних, узагальнено результати досліджень та підготовлено їх до друку.

В дисертації використано наукові публікації, написані як особисто, так і у співавторстві. В опублікованих роботах, що виконані у співавторстві, частка автора становить від 30 до 70 % і полягає в одержанні експериментальних даних і узагальненні результатів досліджень. Права співавторів не порушено.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень оприлюднено та обговорено на засіданнях селекційної секції вченої ради Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України (2010-2013 рр.), міжнародних наукових конференціях «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Рослинний геном VI)» (Одеса, 2010 р.), «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» (Харків, 2010 р.), «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого – біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 2011 р.), міжнародній конференції молодих вчених та спеціалістів «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания

масличных культур» (Краснодар, 2011 р.), міжнародних науково-практичних конференціях «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012 р.), міжнародних наукових конференціях «Инновационно – инвестиционное развитие растениеводческой отрасли – состояние и перспективы» (Харків, 2012 р.), «Стійкість соняшника до біотичних та абіотичних факторів» (Харків, 2014 р.), VIII та IX міжнародних симпозіумах «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012, 2015 рр.), міжнародній науковій конференції «Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» (Харків, 2016 р.).

**Публікації.** Матеріали дисертаційної роботи висвітлено у 21 науковій праці, з яких десять статей опубліковано у фахових наукових виданнях, в тому числі одна в закордонному, десять тез доповідей на наукових конференціях, один патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках загального машинописного тексту (комп'ютерний набір), у тому числі основного тексту – 114 сторінок. Структурно робота містить вступ, шість розділів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел (224 найменувань, з яких 116 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 26 таблицями та 25 рисунками.

РОЗДІЛ 1  
ЗАКОНОМІРНОСТІ ФОРМУВАННЯ СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО  
ВОВЧКА (*Orobanchae cumana* Wallr.) ТА МЕТОДИ ЇЇ  
ВИЗНАЧЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Ботаніко-біологічні особливості вовчка соняшникового  
(*Orobanchae cumana* Wallr.)

Упродовж останніх років проблема розповсюдження високо вірулентних рас вовчка на території України стала дуже серйозною. Уражуються не тільки вітчизняні сорти та гібриди, а й зразки зарубіжної селекції. Селекція на стійкість до вовчка проводиться постійно впродовж всієї історії вирощування соняшника. Інтенсифікація вирощування цієї культури в останні десятиліття призвела до появи та швидкого розповсюдження нових високо вірулентних рас паразита [43]. Разом з тим, на теперішній час спостерігається дефіцит необхідної наукової інформації про фізіологічні та морфологічні особливості вовчка, біохімічні механізми взаємодії з рослиною-живителем та способи боротьби з паразитом.

1.1.1 Ботанічна характеристика *Orobanchae cumana* Wallr.

Найчисленніша група облигатних підземних паразитів - вовчкові. Рід вовчок – *Orobanchae* в порівнянні з іншими родами родини відрізняється винятковою різноманітністю видового складу (відомо до 120 видів). Пояснюється це широким ареалом поширення і великим діапазоном у виборі рослин-живителів. Представники роду Вовчок паразитують на дикорослих, культурних і бур'янистих рослинах [44].

У межах нашої країни налічується понад 40 видів вовчка, в тому числі п'ять видів є паразитами культурних рослин. Найбільш шкідливі види заражають технічні, кормові, декоративні, овочеві, баштанні культури:

вовчок соняшниковий – *Orobanche cumana* Wallr., вовчок гіллястий, або конопляний, – *O. ramosa* L., вовчок єгипетський, або баштанний, – *O. aegyptiaca* Pers., вовчок Мутеля – *O. mutellii* F.W.Schultz і вовчок люцерновий – *O. lutea* Baumg.

В процесі еволюції всі органи рослин цього роду, крім стебла, квіток і плодів, зазнали значних змін: коріння перетворилися в короткі м'ясисті волокна-присоски (гаусторії), що присмоктуються до коренів рослини-хазяїна, листя втратили хлорофіл і стали дрібними бурими, жовтими або лілуватими лусочками з почерговим розташуванням. Стебло вовчка має світло-бурий, жовтий, рожевий або синюватий колір, м'ясисте, прямостояче, нерозгалужене або гіллясте. Висота стебла може досягати 50 см і більше.

При сильному засміченні ґрунту насінням вовчка та за наявності сприйнятливої рослини на кореневій системі однієї рослини може налічуватись до 200 квітконосів паразита і більше [45].

Квітки вовчка пазушні, п'ятичленні, синього, білуватого або фіолетового кольору, з чотирма тичинками, зібрані по кілька десятків в колос або колосовидну волоть. Вони здатні до самозапилення в тому випадку, якщо не було перехресного, яке здійснюється за допомогою вовчкової мухи-фітомізи – *Phytomyza orobanchia* Kalt. і джмелів. Зав'язь – верхня. Плід – коробочка, що розкривається двома або трьома стулками і містить до 2 тис. насіння. Насіння дрібне, довжиною 0,2–0,6 мм, шириною 0,17–0,25 мм, округле або довгасте, темно-буре, з комірчастою поверхнею. На одній рослині вовчка їх може бути до 100 тис. [44].

Майже всі види вовчка характеризуються порівняно високою спеціалізацією. Кожен вид пристосований до паразитування на обмеженому колі рослин-живителів, що належать тільки до однієї або декількох певних родин, родів і видів.

Вовчок соняшниковий (*Orobanche cumana* Wallr.) паразитує переважно на соняшника; з інших рослин уражує томат, тютюн, махорку, сафлор, полин та ін. Вовчок єгипетський, або баштанний, уражує близько



70 видів рослин, у тому числі картоплю, тютюн, капусту, томат, гарбузові. Вовчок гіллястий, або конопляний, уражує в основному тютюн, томат, також коноплі, капусту, моркву, диню й ін. [46].

Спеціалізація вовчка змінювалася в процесі еволюції, чому сприяв природний відбір і діяльність людини. Поряд з новими формами рослин у процесі постійно мінливих взаємовідносин паразита і рослини-живителя виникали і поширювалися нові фізіологічні популяції і раси паразита, що розрізняються вірулентністю і здатністю долати захисні властивості організму рослини-живителя. Число рас паразита в конкретному регіоні, районі визначається тривалістю обробітку рослини-живителя і різноманітністю його генотипів. Поява нових більш агресивних рас вовчка призводить до втрати генотипами імунітету. Наприклад, у стійких до вовчка сортів соняшника на місці проникнення паразита в корінь утворюються здуття, що перешкоджають подальшому його розвитку. У сприйнятливих сортів таких утворень не спостерігається.

Розвиток паразита визначається не тільки імунологічними властивостями рослини-живителя, але й строками сівби, родючістю ґрунту, запасом його насіння в ґрунті, глибиною його закладення, структурою кореневої системи рослини-живителя, кількістю вологи в ґрунті і т.д. Залежно від біології рослини-живителя у вовчка з'явилися форми багаторічні, дворічні, однорічні та навіть ефемери [47].

Характерними ознаками окремих видів вовчка слугують морфологія стебла і квітки, а також паразитична спеціалізація.

Вовчок соняшниковий відрізняється від інших видів вовчка нерозгалудженим стеблом з висотою до 30 см і більше. Приквітки у нього яйцеподібні, гострі; віночок довжиною 12–20 мм, трубчастий, сильно зігнутий вперед, на кінці майже не розширений, має коричневе забарвлення. Вид добре розвивається на культурних і дикорослих представниках родин пасльонові й айстрові. Серед них – соняшник, тютюн, махорка, томат, перилла, сафлор, полин морський, полин австралійський, полин гіркий,

полин звичайний, лопух звичайний та ін. Вовчок соняшниковий не уражує рицину, сою, капусту, картоплю, гірчицю.

Легке, як пил, насіння вовчка вільно розноситься вітром, водою, пристає з ґрунтом до ніг людей, що його обробляють, переноситься пиловими бурями на величезні відстані.

Зародок у насінні вовчка, так само як і в багатьох інших паразитичних рослин, недорозвинений, складається з груп клітин, оточених запасною тканиною, що містить поживні речовини, необхідні проростку до тих пір, поки він не проникне в рослину-живитель. Оптимальна температура для проростання насіння вовчка – 22–25°C. Воно не проростає при температурі нижче 20 °C і вище 45 °C, деякі – вище 50 °C [48].

Насіння вовчка здатне проростати на будь-якій глибині орного горизонту під впливом корневих виділень певних видів рослин-живителів. Э.С.Терехин вважає, що залежність проростання насіння вовчкових від корневих виділень живителя є однією з важливіших еволюційних адаптацій поряд з високою насінневою продуктивністю та життєздатністю, що зберігається впродовж 8-12 років. За даними деяких дослідників, з підвищенням концентрації корневих виділень до певної межі підвищується і відсоток пророслого насіння. У менш зволоженому ґрунті концентрація корневих виділень буде вищою, тому особливо сильне виснаження соняшника вовчком спостерігається в посушливі роки.

Кореневі виділення салату, льону, кукурудзи, сої, багаторічних бобових трав (люцерни, конюшини), томату, земляної груші та інших стимулюють проростання насіння вовчка, але оскільки ці культури стійкі до вовчка, його проростки, не знаходячи відповідних рослин-живителів, гинуть. На цьому явищі ґрунтується застосування провокаційних посівів у боротьбі з вовчком [46, 47].

Число пророслого насіння вовчка та енергія його проростання залежать не тільки від корневих виділень рослини-живителя, а й від цілого ряду інших умов: від виду рослини-живителя, її імунологічних властивостей

від концентрації клітинного соку, від вірулентності вовчка та близькості його насіння до кореня рослини-живителя, від рН середовища, температури і вологості ґрунту та ін.

Проростання насіння вовчка, розсіяного в ґрунті, його прикріплення і розвиток відбуваються поступово в міру розростання кореневої системи рослини-живителя. Тому на коренях однієї рослини-живителя можна спостерігати всі фази розвитку паразита – від проростання насіння до дозрівання коробочок. Від моменту проростання насіння вовчка до появи пагонів на поверхні ґрунту проходить не менше 1,5–2 місяців [49].

Вовчок відносять до групи квіткових рослин-паразитів із хімічною стимуляцією проростання кореневими ексудатами рослини-живителя. За сучасними уявленнями насіння багатьох паразитичних квіткових рослин, у тому числі і вовчкових, проходять 3 стадії від дозрівання до початку розвитку паростків, зокрема спокою, підготовки до проростання та стимуляції проростання.

За сприятливих умов насіння вовчка може знаходитись у стані спокою, зберігаючи життєздатність 10–20 років. Однак під впливом зовнішніх факторів період спокою може скорочуватись, а життєздатність насіння знижуватись. Зокрема, на скорочення періоду спокою суттєво впливає низька температура [44].

Погоджуючись із відомою закономірністю, що масове проростання насіння вовчка відбувається під впливом корневих ексудатів рослин-живителів, слід урахувати виявлення факту, що підвищення концентрації корневих виділень рослин-живителів сприяло підвищенню кількості пророслого насіння вовчка лише до певного оптимального рівня, після чого відмічено негативну динаміку процесу проростання.

Виділяють декілька стадій розвитку насіння вовчка.

Перша – стадія ниткоподібного проростка, яка характеризується ростом із базального полюса редукованого зародка. Ниткоподібний

проросток має всі основні елементи радіальної структури: меристематичний апекс, епідерму, центральний тяж.

Друга – стадія гаусторії, яка характеризується проникненням клітин (інвазією) термального полюса ниткоподібного проростка у тканини кореня рослини-хазяїна для встановлення контакту з його провідною судинною системою та формуванням присоски (гаусторії). Кореневі ексудати соняшника не тільки стимулюють проростання зародка, а й регулюють напрямок розвитку (хемотропізм) ниткоподібних проростків у напрямку кореня хазяїна. Було відмічено, що проникнення у корені соняшника проростків вовчка (у середньому через 7-10 діб після масового проростання насіння) відбувалось за умови знаходження його на відстані не меншій за 2 мм. При цьому кореневі ексудати, як зазначається, в деяких випадках поширювались на відстань до 2 см у ґрунті [50].

На третій стадії – стадії бульбочки – відбувається формування бульбочки із тканин проростка у місці його проникнення у тканини кореня рослини-живителя. Бульбочка вовчкових – спеціалізований орган накопичення поживних речовин та створення структурної основи для формування апекса пагона та вторинних гаусторієутворюючих органів (системи вегетативного розмноження). Відмінність бульбочки від інших запасних органів у тому, що запаси енергетичних сполук у ній утворюються на короткий термін та витрачаються відразу ж після накопичення. Це необхідно тому, що запасні речовини ендодерми та зародка майже повністю витрачаються під час проростання насіння та досягнення системи живлення для паразита – васкулярної системи кореня рослини-живителя.

Четверта стадія характеризується формуванням апекса пагона із осередків меристем, що в подальшому сформує суцвіття та плід [44, 45, 47, 48].

У нормі для *Orobanche cumanana* Wallr. характерні два типу розвитку пагона. Перший – пагін формується ендогенним шляхом, тобто закладка меристематичних осередків відбувається в бульбочці [46]. У більшості

проростків вовчка спостерігається екзогенний тип розвитку пагона, коли епикотиллярна зона редукованого зародка після виконання функції гаусторія не відмирає, а трансформується в апекс пагона, з якого надалі формується пагін. В дослідженнях Антонової Т.С. та інших показано, що в Ростовських популяціях вовчка часто спостерігається висока частота одночасного розвитку пагонів двома цими шляхами [51].

### 1.1.2 Розповсюдження та вірулентність вовчка

Перші свідчення про успіхи в галузі селекції по створенню стійких до вовчка сортів та шкідливість паразита, відносяться до 1907 року [52]. Пізніше Саціперов Ф.А. [53, 54], вивчаючи зразки, зібрані в Саратовській губернії, описав два сорти народної селекції – Армавірський та Зеленка, які на інфікованому фоні практично не уражувалися вовчком. Перші офіційно зареєстровані сорти соняшника, створені Плачек Є.М. [55] та Пустовойтом В.С. [56], були стійкими до вовчка груп раси А, а саме сорти Круглик А-41, Саратовський 169, Фуксинка 3, Зеленка 10, Чорнянка 35, Краснодарський 631 та ін.

Однак наприкінці 20-х і початку 30-х років минулого сторіччя було відмічено, що практично всі раніше створені сорти уражуються вовчком. Це призвело до того, що в ряді районів України, Північного Кавказу та Воронезької області вирощування соняшника стало в ті часи нерентабельним. В 1934–1935 рр. академік Жданов Л.А. [57] в результаті селекції створив сорти Жданівський 8281, Жданівський 8835 та ін., які були стійкими до вовчка не тільки груп раси А, а й до нових, більш вірулентних груп раси вовчка В. Пізніше академіком Пустовойтом В.С. були створені подібні сорти соняшника Армавірський 762, Зеленка 61 [56.]. Найбільше розповсюдження в повоєнні та післявоєнні роки набули його сорти соняшника Передовик, ВНІМК 1646, ВНІМК 8931 та Армавірський 3497 [58]. Їх висівали більше, ніж на 3 млн. га товарних площ соняшника.

На початку 60-х років минулого сторіччя виникла так звана „молдавська” популяція рас (раса С) вовчка, до якої всі промислові сорти вітчизняної селекції виявилися сприйнятливими [59].

На початку 80-х років втрати урожаю соняшника від ураження вовчком стають основним чинником, що лімітував його вирощування в Румунії, Іспанії, Туреччині, Болгарії, де інтенсивно культивували цю олійну культуру [60, 61]. В середині 80-х років минулого сторіччя, проаналізувавши вірулентність Румунської популяції вовчка, насіння якої було зібрано в регіоні Браїла, і Одеської популяції, насіння якої було зібрано в Придунайському регіоні області, науковці дійшли до висновку про існування вже п'яти рас паразита [62, 63].

На сьогодні в світі відомі вже 8 рас: А, В, С, D, E, F, G та Н. Останні з них є найбільш вірулентними. Вірулентні популяції вовчка рас F та G, знайдені спочатку в Румунії, потім в Іспанії та Туреччині [26, 65, 20, 66, 67, 9], а також на південних територіях Російської Федерації. Так, високо вірулентні раси вовчка E, F, G та Н знайдені в районах Волгоградської та Ростовської областей [68].

Проблема поширення вовчка на полях важлива сьогодні не тільки для країн Європи і Російської Федерації, але й для України, де посівні площі соняшника займають чи не найбільшу частку. В Україні вовчок поширений в Одеській, Миколаївській, Херсонській, Запорізькій, Дніпропетровській, Донецькій та Луганській областях. Зустрічається він також у північних і північно-східних районах Харківської, Кіровоградської та Черкаської областей [1].

У деяких районах України останнім часом спостерігається ураження вовчком гібридів соняшника, стійких до раси E. Втрата резистентності гібридами соняшника, таких як Згода, Од-249 та інших (СГІ), Арена (Сингента), Рімі, Титанік, NSH-2017 (Новий Сад), PR-63H80 (Піонер) та деяких інших свідчать про імовірне виникнення та інтенсивне накопичення нових, більш вірулентних рас паразита [69].

В останні роки високо вірулентні раси F та G все частіше виявляють в Одеській, Донецькій, Луганській, Харківській областях України [70, 71].

Дослідження вчених Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН, спрямовані на пошук та вивчення стійких до вовчка біотипів соняшника, розпочато ще у 60-ті роки ХХ століття [16]. Повна відсутність на той час стійкості сортів соняшника до нових рас вовчка спонукала до проведення пошуку джерел стійкості серед дикорослих видів роду *Helianthus*. Було виділено джерела стійкості до основних збудників хвороб соняшника, в тому числі і до вовчка, шляхом схрещування соняшника з однорічними та багаторічними дикорослими видами. На основі багаторічного гексаплоїдного виду *Helianthus tuberosus* L., з використанням парних та насичуючих схрещувань, а також індивідуального добору на жорсткому інфекційному фоні, було створено різноманітні за морфологічними та господарськими ознаками стійкі до вовчка біотиби [70].

## 1.2 Механізм розпізнавання патогена рослиною

Стійкість рослин до хвороб, що спричинюють такі збудники як паразитичні рослини, гриби, бактерії або віруси, часто залежить від здатності рослини розпізнати патоген на ранніх етапах інфекційного процесу. Механізми захисту рослин від патогенів можуть бути специфічними, які засновані на наявності певних генів як рослини, так і патогена, і метаболітів, що кодуються цими генами, а також неспецифічними, які визначаються незалежними від генетичних характеристик факторами.

За теорією Flor “ген-на-ген” рослина має ген стійкості *R*-ген, а патоген – авірулентний ген *Avr*-ген. Для активізації захисної відповіді необхідна експресія відповідного *R*-гена рослини і *Avr*-гена патогена [72]. *R*-гени кодують рецептори для впізнавання специфічних еліситорів патогена, які кодуються *Avr*-генами. За специфічної стійкості рослини-хазяїна до реакції

сприйняття залучаються рецептори з високим ступенем специфічності до патогена, які кодуються конститутивними *R*-генами стійкості і локалізовані або на плазматичній мембрані, або в цитозолі [73]. Більше ніж 20 *R*-генів з визначеною специфічністю до *Avr*-генів ізольовано з різних рослин. Вони однаково діють проти вірусних, бактеріальних і грибних патогенів, а також проти рослин-паразитів, нематод і комах [73]. *R*-гени рослин кодують білки, що визначають як впізнавання специфічних *Avr*-білків, так і ініціюють сигнальну трансдукцію, що призводить до розгортання комплексу реакцій захисної відповіді [74]. Біологічна функція *Avr*-генів полягає в тому, щоб не дати можливості рослині викликати захисну відповідь, яка негативно вплине на патоген. *Avr*-гени визначають патогенність [75], а також властивість патогена до росту і розвитку в рослині, навіть за формування імунних реакцій [76].

Ідентифіковано більше 20 *R*-генів і 5 класів *R*-білків: внутрішньоклітинні протеїнкінази (PKs), внутрішньоклітинні рецепторподібні протеїнкінази (LRR), рецепторподібні протеїнкінази з обов'язковою нукліотидною послідовністю (NBS), NBS-LRR-білки з областю, подібною до цитоплазматичного домену рецептора IL-1R ссавців і TIR-білка *Drosophila*, а також білки з LRR-доменом, що кодують мембранні зовнішньо клітинні білки [77, 78]. Показано, що LRR-зона представлена в *R*-генах і відповідає за специфічність процесу впізнавання патогена [73]. Значні відомості стосовно структури *R*-генів і *R*-білків доповнюють картину взаємодії “ген-на-ген” і механізм впізнавання патогена рослиною.

Первинним сигналом, який активує складний процес фітоімунітету, є елісители. Елісители являють собою біологічно активні молекули, що продукуються як патогеном (екзогенні елісители), так і рослиною (ендогенні елісители). Велика частина еліситорів входить до складу клітинної стінки патогена як структурні компоненти. До еліситорів також належать харпін і продукти *Avr*-генів, що несуть функцію токсичних речовин, а також ферменти, що деградують клітинну стінку [79].



Крім того, елісители можна поділити на загальні (неспецифічні) та расоспецифічні (специфічні). Загальні елісители здатні викликати захисні реакції за будь-яких відносин рослини і патогена, а расоспецифічні індукують захисні відповіді, що призводять до стійкості, тільки в специфічних для патогенів рослинах-живителів. Така стійкість формується за взаємодії продуктів *Avr*-гена і *R*-гена [77]. Однаковою дією специфічних і неспецифічних еліситорів патогенів є здатність зв'язуватись з рецептором плазмалеми, викликаючи його фосфорилування і змінюючи конформацію [80]. Активація рецептора призводить до передавання й примноження сигналу елісителя, що викликає експресію захисних генів і синтез білків у відповідь на інфікування [81].

Крім специфічної стійкості, яка обумовлена взаємодією “ген-на-ген”, рослина здатна активувати захисну відповідь без *R*-гена і *Avr*-гена. Неспецифічними елісителями виступають низькомолекулярні сполуки – олігосахариди, білки, глікопротеїни грибів або бактерій, що індукують накопичення фітоалексинів [80, 82]. Білкові елісители синтезуються патогеном, а біологічно активні олігосахариди можуть продукуватись як патогенними грибами або бактеріями, так і рослиною за рахунок гідролаз, що синтезуються двома організмами. Активність гідролаз вища в стійких рослинах за дії патогена: глюконази і хітинази визначають стійкість рослин проти патогенів, причому можуть діяти як самостійно, так і сумісно, а також з фенілаланінаміакліазою як ключові ферменти синтезу захисних сполук [83]. Олігосахариди, на відміну від токсинів, навіть за низької концентрації індукують реакції захисної відповіді [80]. Але найбільшою відмінністю олігосахаридів від деяких інших еліситорів є те, що вони не викликають реакцію надчутливості, яка здатна переростати в клітинну загибель [84].

В залежності від природи елісителя, а також від рецептора, який ним активується, змінюються йонні потоки, запускається каскад реакцій, який залучає протеїнкінази, елементи сигнальних систем, підвищення вмісту саліцилової кислоти, і відповідно утворення захисних сполук [85]. За

активації MAP-кіназної системи відбувається регуляція транскрипції [86, 87], за активації НАДФН-оксидазної (супероксидсинтазної) сигнальної системи підвищується вміст активних форм кисню, що пригнічує розвиток патогенів, за активації NO-синтазної сигнальної системи відбувається підвищення активації протеїнкіназ і утворення захисних сполук [85].

### 1.3 Роль активних форм кисню в індукуванні захисних реакцій

За інфікування патогеном у рослин включаються як активні, так і пасивні механізми захисту. Структурні бар'єри або антимікробні сполуки, що попереджають проникнення патогена, – пасивні механізми. Активні захисні механізми включають реакцію надчутливості, синтез фітоалексинів і PR-білків (*pathogenesis-related*), йонні потоки крізь плазматичну мембрану, генерацію активних форм кисню, лігніфікацію тощо.

PR-білки синтезуються рослиною у відповідь на патоген, можуть накопичуватись не тільки в місці інфекції, але й поширюватись по всьому організмові. PR-білки – загальна назва всіх патоген-індукованих білків і їх гомологів. Більшість PR-білків індукується дією ендогенних стресових гормонів, у тому числі саліцилової і жасмонової кислот та етилену, рівень яких значно підвищується в інфікованих тканинах [88, 89].

Підвищена генерація активних форм кисню призводить до активації захисних генів, що кодують ферменти, які беруть участь у захисті від окислювального стресу [90, 91]. Пероксидази – відомий клас PR-білків, які індукуються рослиною за інфікування патогеном. Вони належать до білків PR-9 [92] і обмежують клітинне поширення патогена через утворення структурних бар'єрів за рахунок окиснювальних реакцій між білками і фенолами, у реакції відкладення лігніну на клітинних стінках [93] або через генерацію активних форм кисню і активних сполук азоту [88]. Пероксидази контролюють пул активних форм кисню, в тому числі  $H_2O_2$ . Діючи разом пероксидаза (PR-9),  $\beta$ -1,3-глюканаза (PR-2) і деякі інші PR-білки

перешкоджають поширенню патогена чи паразита [92] за рахунок відкладення лігніну на клітинних стінках [93].

#### 1.4 Зміна активності антиоксидантних ферментів за взаємодії рослина-патоген

За взаємодії рослини і патогена відбуваються зміни в окиснювальних реакціях, що призводить до надпродукції активних форм кисню. Як з одного боку призводять до розвитку патологічних процесів – реакції надчутливості і некрозів. З іншого боку, захисні реакції пов'язані з діяльністю низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбат, глутатіон, пролін та ін.) і антиоксидантних ферментів (поліфенолоксидаза, каталаза, пероксидаза). Саме ферментні системи синтезу й утилізації активних форм кисню визначають стійкість рослин до патогена.

На першому етапі взаємодії патогена з рослиною активізується мембранозалежна NADPH-оксидаза: відбувається відновлення молекулярного кисню з утворенням супероксидного радикалу – джерела інших активних форм кисню [94].

Надлишок  $H_2O_2$  утилізується ферментами каталазою (КФ 1.11.1.6) і пероксидазою (КФ 1.11.1.7). Каталаза виконує значну роль у зниженні рівня  $H_2O_2$  в пероксисомах. Пероксидази – ферменти, які здатні до генерації, а також до нейтралізації активних форм кисню. Пероксидаза знаходиться в цитозолі або локалізована в клітинних стінках. Саме локалізовані з клітинною стінкою ферменти здатні до генерації супероксидного радикалу і пероксиду водню [95, 96, 97], який залучається до процесів лігніфікації. Пероксидази характеризуються великою кількістю ізоферментів, що мають різну субстратну специфічність за різних значень рН. Оптимум рН ізоферментів пероксидаз визначає їх активність і участь в захисних реакціях.

Активність ферментів, які залучені до захисних реакцій проти оксидативного стресу, збільшується в більшій мірі у стійких форм рослин [98]. Високий рівень активності окиснювальних ферментів – пероксидази, каталази характерний для тканин стійких видів роду *Phlox* [99], картоплі [100], при цьому підвищення активності ферментів відбувається в період первинного контакту рослини і патогена. Розчинні ізоферменти пероксидаз клітинної оболонки легко відокремлюються і здатні циркулювати в апопласті рослини, стимулюючи “імунну відповідь” [101].

Показано, що існують різні механізми активації пероксидази рослин, які пов’язані зі стійкістю до патогена [96]. У стійких рослин активізуються зовнішньоклітинні пероксидази, а також відбувається синтез ферментів *de novo* [102]. При цьому відбувається швидке накопичення супероксидного радикалу і пероксиду водню, що активізує синтез захисних генів і, як наслідок, окиснювальний спалах. У сприйнятливих рослинах підвищення активності пероксидази – процес більш тривалий у часі і пов’язаний лише з синтезом ферментів *de novo* [100]. Стійкість рослин також пов’язують зі слабкозв’язаними з клітинною стінкою пероксидазами [103].

У той же час показано, що система генерації і деградації активних форм кисню рослини може використовуватись іншим учасником патосистеми. Активні форми кисню відіграють важливу роль у формуванні сумісних відносин рослина-патоген і можуть сприяти розвитку захворювання [104].

1.5 Роль фенольних сполук у формуванні стійкості соняшника до вовчка.

Важливу роль у формуванні стійкості до патогенів відіграють фенольні сполуки – речовини вторинного метаболізму, що акумулюються в рослинних органах, можуть бути окиснені до складних гідроксикумаринів

(аупін, скополетин, скополін), мають протимікробну дію, а також перешкоджають проникненню вовчка в тканини кореня соняшника.

Більшість авторів у своїх дослідженнях показують значне підвищення рівня фенольних сполук за інфекції [105, 106]. Фізична реакція рослини може включати потовщення клітинної стінки за допомогою лігніну. Однак, в основному, роль фенольних сполук заключається в інгібуванні патогена, перешкоджаючи його потраплянню у рослинні клітини (ізоляція, інактивація ферментів). Захисна реакція рослини в цілому пов'язана із накопиченням мРНК захисних генів. Деякі з фенольних сполук синтезуються в рослині постійно, деякі – у відповідь на дію патогена і є частиною захисного механізму рослини [107, 108]. Наприклад, у томатів спостерігали після інфекційну активацію фенольного метаболізму. Також спостерігали в листках томатів тимчасове підвищення водорозчинних фенолів, таких як хлорогенова та корична кислоти, у відповідь на дію *Clavibacter sp.* У літературі наведено прямі докази інгібування росту патогенних для томатів грибів за рахунок змін у складі фенольних сполук [106].

Рослинні токсини діють різними способами. Сполуки, що мають негативний ефект на ріст, розвиток або виживання іншого організму, можуть називатись токсинами.

Наприклад, сапоніни руйнують клітинні стінки, гідроксиціанід, що утворюється із ціаністих глікозидів, перешкоджає клітинному диханню. Але механізми дії інших токсинів потребують вивчення [109].

## 1.6 Сучасні методи, що використовуються в селекції на стійкість до вовчка

У зв'язку із постійною появою і поширенням нових рас вовчка на сьогодні залишається необхідність розробки нових методів боротьби із

паразитом, а також методів ідентифікації стійких зразків соняшника та успішне використання їх в селекції культури.

### 1.6.1 Біотехнологічні методи в селекції соняшника

Технології культури рослинних тканин стали потужним механізмом для вивчення фундаментальних та прикладних проблем в біології рослин. Технологія культури тканин пропонує прекрасні можливості в додаток до традиційних методів селекції рослин та покращення частково в сфері генотипової еволюції та мікроклональному розмноженні. Вчені всього світу бажають використовувати методи *in vitro* для розвитку та селекції економічно вигідних видів рослин, а саме тих, що включені в модифікацію та покращення рослин для харчової, текстильної та паливної промисловостей. З підвищенням чисельності населення та зменшенням кількості посівних площ землі необхідність у використанні новітніх біотехнологічних методів зростає [1, 6, 7].

Користь методу культури рослинних тканин на теперішній час та в майбутньому тісно пов'язана із успішною регенерацією цілої рослини, однак регенерація можлива не для всіх видів рослин. Для успішної індукції калусогенезу з подальшою регенерацією потрібно підібрати та стандартизувати живильне середовище. Основні потреби в живильних елементах рослинних клітин культури *in vitro* дуже подібні до загальних потреб рослини. Для задоволення конкретних потреб культури клітин було розроблено декілька загальних живильних середовищ [110, 111, 112, 113], які підтримують ріст та морфогенез широкого кола видів рослин.

Метод культури тканин соняшника. Використання біотехнологічних методів для покращення якостей соняшника лімітовано в основному складністю регенерації рослинних тканин. Регенерація соняшника шляхом органогенезу високо мінлива та залежить від генотипу, специфічних компонентів живильного середовища та природи експланту. В 90-ті роки

було описано багато методик для регенерації шляхом органогенезу та соматичного ембріодогенезу у різних видів. Відмічено, що параметри регенерації рослин соняшника знаходяться під кількісним генним контролем.

Перші спроби отримати калус у соняшника, який диференціювався б у нову рослину, проведені ще у 1974 році. Rogers et al, [114] успішно отримали калус з ЦМС лінії соняшника, однак з нього вдалося одержали лише корені. Перша регенерація рослини соняшника була відмічена Sadhu [115]. З тих пір проведено багато успішних спроб отримати регенеранти, використовуючи різноманітні експланти, серед яких незрілі та зрілі зародки [116, 117], меристеми [118], пиляки [119], гіпокотилі [120] та сім'ядолі [121].

Хоча регенеранти в культурі тканин і було отримано в попередніх дослідженнях інбредних ліній та гібридів використовуючи методи раннього органогенезу [122] та соматичного ембріодогенезу [123], соняшник залишається складною культурою для трансформації та регенерації [124]. На процес регенерації соняшника впливає багато факторів як окремо, так і комплексно. Так, відмічено дію генотипу [125, 118, 126], складу поживного середовища [118], віку та типу експлантат [125, 127, 128, 129], а також оточуючого середовища [130]. Висока частота регенерантів, їх нормальна морфологія та продукція насіння є необхідними для постійного використання біотехнологічних методів у селекції соняшника.

Культура клітин, ізольованих протопластів, отримані калусні тканини можуть слугувати об'єктами для подальшої роботи над вивченням механізмів стійкості до патогенів та створенню стійких форм, використовуючи провокаційні живильні середовища, що містять токсини досліджуваних патогенів [131, 132, 133, 134]. Крім того, такі об'єкти доцільно використовувати для вивчення механізмів стійкості до абіотичних чинників, таких як засоленість ґрунтів, посуха та ін. [135, 136, 137].

Використання методу індукції андрогенезу у створенні нових форм соняшника стійкого до вовчка. Важливу роль в створенні інбредних ліній із важливими для селекції ознаками, такими як, наприклад, стійкість до патогенів і паразитів, методом самозапилення є дуже трудомістким процесом та потребує багато часу, навіть із використанням сучасної техніки вирощування незрілих зародків. Доцільно використовувати інші сучасні методи. Так, гомозиготну дигаплоїдну лінію можна отримати шляхом індукованого андро- чи гіногенезу з подальшою спонтанною чи індукованою диплоїдизацією хромосомного набору. Дослідження в цьому напрямку проводяться ще з 60-х років ХХ сторіччя. Подвоєні гаплоїди отримували як спонтанно, так і експериментально. Найпоширенішою технікою отримання подвоєних гаплоїдів є метод індукції андрогенезу шляхом культивування видалених пиляків. Цей метод успішно застосовується для ячменю [138, 139], пшениці та тритікале [140, 141], кукурудзи [142, 143], ріпаку, гірчиці [144], льону [145] та інших культур. Фактично за останні 30 років культуру пиляків апробували майже на всіх сільськогосподарських культурах.

Метод індукції андрогенезу соняшника *in vitro* використовують як з метою створення гомозиготної лінії для подальшого створення цінних гібридів, так і для створення міжвидових гібридів. Відомо, що при схрещуванні дикорослих видів соняшника із культурними отримані гібриди часто повністю або частково є стерильними. Однак, такі гібриди є донорними рослинами для культури пиляків та мікроспор. У результаті чого можна підвищити фертильність зразків, що допоможе інтрогресії важливих ознак у геном культурного соняшника. Відомі роботи деяких лабораторій на дикорослих видах соняшника та міжвидових гібридах з подальшою демонстрацією декількох гаплоїдних рослин. Описано андрогенез *in vitro* для таких видів соняшника як *Helianthus annuus* L., *H. occidentalis* Riddell., *H. decapitalus* L., *H. tuberosus* та міжвидових гібридів *H. annuus* / *H. occidentalis*, *H. annuus* / *H. tuberosus* [146].



Що стосується створення гомозиготних ліній, було отримано ембріоїди шляхом андрогенезу, однак лише декілька із них виявилися гаплоїдними [147]. При цьому за аналізом результатів виявлено декілька проблем цього методу. По-перше, велике значення для отримання гаплоїдних рослин має генотип та середовище культивування. По-друге, має місце слабе проростання зародків та дорослих рослин. По-третє, передчасне побуріння пиляків провокує появу некрозів, що суттєво знижує ефективність методу. Навіть, при отриманні значного відсотка ембріоїдів із пиляків (20%) було відмічено низьку схожість у зв'язку із некрозом, вітрифікацією, калусогенезом чи браком апікальної меристеми.

Як зазначено вище, середовище культивування має велике значення для отримання повноцінних гаплоїдних рослин, а також для успішного мікроклонального розмноження [148]. Так, вченими дослідним шляхом було встановлено, що успішна регенерація пагонів соняшника можлива на середовищі із половинним вмістом макросолей MS та повним вмістом мікросолей MS з додаванням амінокислот та високою концентрацією цукрози (120 мг/л). Було отримано пагони з пиляків гібрида *H. annuus* / *H. decapetalus* та у дикорослого виду *H. divaricatus* на середовищі із концентрацією зеатину 5 мг/л. При цьому інші комбінації гормонів, такі як кінетин (0,2 мг/л) і 2,4 Д (1 мг/л) провокували активний калусогенез без подальшої регенерації пагонів. Натомість, на середовищі, що містило 2 мг/л БАП, 0,2 мг/л ІОК та 20 мг/л аденіну відмічено повторний приріст калусу та регенерацію пагонів [149].

Відмічено регенерацію шести рослин з пиляків французького сорту Інґа, два з яких виявилися гаплоїдними [150]. Ще одну гаплоїдну рослину вдалося отримати з сорту Luciole. Також було отримано гапло-, полі- та анеуплоїдні рослини соняшника із пиляків чотирьох гексаплоїдних та одного диплоїдного дикорослих видів соняшника та їх гібридів із культурними лініями. Найкращі результати відмічено у гібрида *H. annuus* / *H. resinosus*. Нові рослини було отримано із 53% його пиляків. Оптимальне

середовище містило 0,5 мг/л НОК та 0,5 мг/л БАП. В той же час, з пиляків гібрида *H. annuus* / *H. tuberosus* не вдалося отримати жодної рослини. Це ще раз підтверджує значний вплив генотипу на знатність до андрогенезу [151].

#### 1.6.2 Методи оцінювання дослідного матеріалу соняшника на стійкість до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.)

Традиційні методи оцінювання на стійкість. Найбільш ефективним методом боротьби із вовчком є створення сортів та гібридів соняшника. Однак з'являються нові більш вірулентні раси цього паразита, тому даний метод завжди є актуальним. При цьому важливе значення має надійне оцінювання стійкості численного селекційного матеріалу. Але метод оцінювання соняшника на стійкість потребує подальшого удосконалення у напрямку скорочення строків, зменшення затрат, спрощення робіт та, основне, підвищення достовірності.

Перші спроби оцінювання стійкості соняшника до вовчка базувались на підрахунку кількості суцвіть рослин-паразита в полі на природному інфекційному фоні. Однак цей метод виявився ненадійним для порівняльного аналізу селекційного матеріалу.

Початок удосконалення методики оцінювання соняшника на стійкість поклав В.С. Пустовойт [56], створивши польову інфекційну ділянку шляхом внесення в ґрунт певної кількості насіння вовчка. В 1928 році на Армавірському опорному пункті ВНДІОК, що був спеціально організований для селекції соняшника на стійкість до вовчка, В.С. Пустовойт створив на площі 8 га інфекційний фон шляхом внесення 256 кг насіння вовчка, що відіграло вирішальну роль у боротьбі із расами А та Б. Однак польовий метод має суттєвий недолік, що полягає у недостатній надійності розпізнавання генотипів за фенотипами у зв'язку із значною спадковою мінливістю ознаки ураженості вовчком. У результаті пошуків В. С. Пустовойт розробив вегетаційний метод, в якому рослини соняшника

вирощували в квіткових горщиках у ґрунті, який був заражений насінням вовчка. Через 2,5 місяці після посіву, відмивши кореневу систему рослин соняшника від ґрунту, можна було характеризувати імунологічні властивості того чи іншого генотипу. В подальшому після серії проведених польових дослідів було встановлено, що визначення стійкості до вовчка можливе і на більш ранніх стадіях розвитку рослин (30-45 діб після сходів соняшника) шляхом перегляду молодих коренів, викопаних з ґрунту молодих рослин соняшника. У подальшому В.Ф. Кунін [43] також зробив висновок, що оцінювати селекційний матеріал краще не у полі, а в окремому вегетаційному досліді, в якому рослини вирощувались у паперових стаканчиках із піщаним ґрунтом та насінням вовчка, а стійкість визначали на 40-50 добу після сходів.

У подальшому вченими ВНДІОК проведено лабораторні дослідження з вивчення фізіології імунітету соняшника до нових рас вовчка, етапів інфекційного процесу у стійких та сприйнятливих генотипів соняшника. Спостереження за коренями молодих рослин дозволяли спостерігати хід інфекційного процесу і чітку різницю між сприйнятливим та стійким зразками можна побачити вже на 12-14 добу після сходів [39]. Встановлено, що проростання насіння квіткового паразита, проникнення ростової трубки у корінь рослини соняшника, формування первинного гаусторія та проникнення його в зону центрального циліндра проходять однаково як у стійких, так і сприйнятливих генотипів та займають 8-9 діб від проростання насіння соняшника. Далі у сприйнятливих генотипів клітини первинного гаусторія *Orobanche cumanana* Wallr. проникають у судини ксилеми соняшника, утворюється загальна провідна система хазяїна і паразита, починається енергійний ріст вовчка і вже на 12-14 добу його округле жовте тіло можна виявити навіть при малому збільшенні мікроскопа. В той час, як на коренях стійких зразків клітини паразита не можуть проникнути в судини хазяїна і, не отримуючи поживних речовин, гинуть, не залишаючи на коренях потовщень, як у сприйнятливих рослин.

Гістологічні методи. Визначення механізмів захисту в дослідженнях пошкоджених рослинних тканин під мікроскопом свідчить, що інфекція патогенними мікроорганізмами й паразитами не завжди успішна та може бути припинена змінами в клітинах та тканинах рослини-живителя, які можна побачити неозброєним оком. Такі морфологічні зміни, як правило, включають індукцію запрограмованої загибелі клітин та появу структурних змін у клітинній стінці.

Гістологічні методи оцінювання [50, 152, 153] матеріалу на стійкість до вовчка базуються на цитологічному та гістологічному аналізах тканин рослин, уражених патогенними організмами або вовчком та дають змогу оцінити ступінь ураженості на початкових етапах зараження.

Проаналізовано два гібриди соняшника: стійкий до вовчка та сприйнятливий. Після 10-20-денного зараження вовчком поздовжні та поперечні зрізи коренів уражених рослин забарвлювали та під мікроскопом ідентифікували підвищений рівень фенольних сполук у місці проникнення паразита, закупорення судин, лігніфікацію клітинних стінок, локальні некрози у стійких зразків чи проникнення паразита глибоко в тканини рослини-хазяїна, формування бульбочки.

Вчені ВНДІОК [49, 50, 55] виявили, що епідермальним клітинам всіх органів соняшника властива неспецифічна реакція, що проявляється однаково на дію будь-якого патогена. Різні за стійкістю біотики соняшника відрізняються за швидкістю реакції. Так, у стійких генотипів дослідники виявили два типи захисних реакцій: кортикальний та судинний. Кортикальний тип це неспецифічна реакція клітин кори кореня на дію вовчка раси В, що представляє собою процес окисно-відновних реакцій з утворенням токсичних для живих клітин речовин, зокрема попередників лігніну, який надалі як кінцевий продукт реакції ізолює клітини разом із паразитом. Судинний тип – специфічна захисна реакція проти раси С, що виникає за участю пероксидази паразита, яка каталізує утворення

патологічного лігніну в стінках судин на шляху клітини гаусторія паразита, який проникає в корінь рослини-живителя .

На основі цих даних вченими розроблено гістологічний метод оцінювання селекційного матеріалу соняшника на стійкість до вовчка (*Orobanche cumanana* Wallr.) за наявністю некротичних плям на коренях у місцях загиблих гаусторіїв вовчка.

Молекулярно-генетичні методи оцінювання. Для вовчка характерна швидка еволюція нових рас. Вірулентні популяції вовчка рас F та G, виявлено в Іспанії та Туреччині [154, 155], а в останні роки їх все частіше відмічають у Одеській, Донецькій, Харківській областях України [70, 71]. Вірулентні раси вовчка подолали відомі гени стійкості *Or1*, *Or2*, *Or3*, *Or4*, *Or5* культурного соняшника і швидко поширюються. Результати оцінювання соняшника на стійкість до популяцій раси F показали, що дикорослі види соняшника залишаються головним джерелом генів стійкості [156].

Гени стійкості соняшника до рас вовчка А-Е є домінантними, тоді як стійкість до раси F, що залежить від генетичного фону, знаходиться під контролем рецесивних генів, розташованих у двох локусах, або під контролем одного домінантного гена.

Perez-Vich вивчав успадкування стійкості до раси F у міжвидового амфіплоїда [156, 157, 158], отриманого від схрещування *H. annuus* із двома дикорослими видами соняшника *H. divaricatus* та *H. grosseserratus*. Він припустив, що стійкість контролюється одним геном, однак досліді показали, що стійкість у цього гібрида контролюється двома генами, один з яких експресується під впливом зовнішніх факторів.

За даними Velasco et al.[21] стійкість до раси G вовчка у виду соняшника *H. debilis ssp. lardiflorus* контролюється домінантними алелями одного локусу. В подальшому, ним було сформовано колекцію зразків для диференціації за генами *Or1*, *Or2*, *Or3*, *Or4* та *Or5*, що включала зразки Круглик А-41, Ждановський 8281, Рекорд, S-1358 та Р-1380. З появою нових

рас вовчка, колекцію було поповнено зразком LC 1093, який несе ген стійкості *Or6*.

Фенотипове оцінювання стійкості соняшника за стійкістю до вовчка є трудомістким процесом, потребує значних затрат часу та дуже залежить від умов навколишнього середовища, через що є велика вірогідність помилки. Сучасним методом селекції соняшника є метод добору зразків з цінними генами за допомогою молекулярних маркерів, які дозволяють виділити стійкі та сприйнятливі до вовчка генотипи соняшника. Вчені вважають, що гени стійкості *Or1–Or5* тісно зчеплені. Було встановлено один RAPD та 5 SCAR молекулярних маркерів та картовано ген *Or5*. Визначено, що RTS29 маркер зчеплений з геном *Or5* і знаходиться на відстані 21,4 сМ від нього. Якщо маркер знаходиться на великій відстані (більше 25 сМ), досить часто відбуваються рекомбінації, тому доцільно використовувати маркер, що знаходиться на меншій відстані. Для гена *Or5* таким маркером є ORS 1036, що знаходиться на відстані 7,5 сМ [159, 160].

Завдяки використанню таких маркерів можна стверджувати про наявність гену *Or5* в певних генотипах, що, в свою чергу, свідчить про їх стійкість до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.).

Біохімічні основи для створення нового методу оцінювання стійкості до вовчка. Стійкість до вовчка проявляється не тільки в експресії генів стійкості, а й в певних біохімічних реакціях, направлених на знешкодження паразита. Так, у відповідь на проникнення паразита у коренях соняшника відбуваються процеси лігніфікації в стінках клітин кореня. Вчені відмічають у деяких стійких генотипів соняшника утворення каллози всередині ксилеми при тісному контакті з паразитом. У деяких випадках судини повністю перекриваються, тим самим перекриваючи шлях для використання паразитом води та поживних речовин. У дикорослого виду *Helianthus debilis* шар інкапсульованих клітин зупиняє проникнення гаусторії паразита углиб кореня хазяїна. За даними інших вчених у механізми стійкості до вовчка

включені такі антиоксидантні ферменти як пероксидаза, ендоглютиназа, поліфенолоксидаза, каталаза.

Фітоалексини як фактори стійкості до вовчка вперше почав вивчати Wegmann [161]. Вони є низькомолекулярними речовинами вторинного метаболізму фенольної природи, що забезпечують рослині захист, так як синтезуються у відповідь на проникнення патогена. Однак фітоалексини є активними захисними речовинами тільки, якщо вони синтезуються досить швидко і в достатній концентрації. Ці речовини соняшника, а саме скополетин та аупін, інгібують проростання насіння вовчка, що підтверджено дослідями із синтетичним стимулятором проростання насіння вовчка. Синтез фітоалексинів обумовлений дією еліситорів, що можуть бути компонентами клітинної стінки патогена або специфічними білками бактерій чи грибів. Фітоалексини знайдені в коренях соняшника. Це підтверджує той факт, що фітоалексини є факторами стійкості до вовчка. Так, скополетин синтезується в коренях, а аупін – в листках [162, 163].

Однак, чисельні дослідження показали, що велика кількість фенольних сполук є токсичною для рослини. Тож, у формуванні стійкості рослини до біотичних факторів вагоме значення мають окисно-відновні ферменти.

Поліфенолоксидаза та пероксидаза є основними оксидоредуктазами, що окислюють фенольні сполуки. Поліфенолоксидаза, або фенолоксидаза – фермент, що має широке розповсюдження в рослинних тканинах та приймає участь у дихальних процесах рослин, окислює феноли до хінонів за участю кисню. Активність поліфенолоксидази в період ураження соняшника патогенами вивчена дуже обмежено [33, 39]. Так, встановлено, що при ураженні кошиків соняшника збудником сірої гнилі (*Botrytis cinerea* Fr.), поліфенолоксидаза у стійких рослин має вищу чутливість до виділених патогенів під час ураження та швидко активується [33]. Це свідчить про те, що у кошиках стійких рослин у відповідь на ураження збудником сірої гнилі відбувається швидке окиснення поліфенолів, внаслідок чого

швидкість утворення хімічного бар'єру з продуктів розпаду фенолів випереджає швидкість проникнення гриба. У нестійких рослин при ураженні патогеном активність поліфенолоксидази підвищується незначно або не підвищується зовсім.

Пероксидази каталізують реакцію окиснення певних хімічних сполук (фенолів та ароматичних амінів) за рахунок надлишку кисню перекису. Пероксидази можуть бути кваліфіковані в залежності від біологічних джерел їх отримання або в залежності від природи субстратів, на які вони впливають. До субстратів можна віднести: 1) майже всі феноли (пірокатехін, гваякол, пірогалол, галлова кислота, бензидин, фенилендіамін та ін.); 2) ароматичні аміни (анілін, диметиланілін та ін.); 3) йодистий водень; 4) легко окислювальні речовини (аскорбінова кислота, нітроти та ін.). Джерелом активного кисню при каталітичній дії пероксидази можуть бути також органічні перекиси, перекиси ненасичених жирних кислот. На рівні з каталітичною дією, за рахунок перекису водню, пероксидаза здатна функціонувати як оксидаза, каталізуючи окиснення субстрату за рахунок молекулярного кисню за відсутності перекису водню. Поліфеноли у вільному стані або у формі різноманітних складних сполук (глікозиди, дубильні речовини) та ароматичні аміни є найбільш поширеними субстратами, на які діє пероксидаза в рослинних тканинах. Експериментально доведено роль цього ферменту в процесі окисної конденсації поліфенолів при утворенні танінів. Хінони, що утворюються при окисненні фенолів, є акцепторами водню і, таким чином, можуть приймати участь в окисненні різних органічних речовин. Тобто пероксидаза може окислювати значну кількість сполук. Відомо, що різниця в реакціях на інфекцію стійких та сприйнятливих видів рослин пов'язана зі специфічними особливостями окисних систем. Особливість окисних систем у стійких генотипів полягає в тому, що інфекція викликає активацію окисних процесів, тоді як у сприйнятливих – пригнічення або відсутність активації. Значна частина загального посилення окисних процесів у стійких генотипів



обумовлена активною дією пероксидази, яка має високу стійкість до токсинів, що виділяють патогени. На рівні із цим ферментом, таку стійкість мають протейнові ферменти, з дією яких пов'язана активність пероксидази. Її активація під дією інфекції є характерною біохімічною реакцією, за якою визначають стійкість рослини. Дослідники вже давно визнавали роль пероксидази у захисних реакціях рослин. Відомо про збільшення активності пероксидази у пшениці (*Triticum dicoccum* (Schrank.) Schuebl., *T.durum* (Desf.)) за умови її ураження збудником стеблової іржі (*Puccinia graminis* f.sp.tritici Erikss, et Henn) [164], у ячменю (*Hordeum sativum* Jessen.) за умови його ураження збудником борошнистої роси (*Erysiphe graminis* f.sp hordei Marchal.) [165]. Відомо також про більш високу активність пероксидази при ураженні *Botrytis cinerea* (Pers.) в тканинах стійкого сорту капусти, ніж у сорту, що уражується [166]. Щодо соняшника, то встановлена більш висока активність пероксидази у стійких до вовчка рослин після ураження їх паразитом у порівнянні зі здоровими, у сприйнятливих генотипів вона майже не відрізнялась [36, 167, 168].

Каталаза – двохкомпонентний фермент, що складається з білку та зв'язаною із ним простетичної групи. Активність каталази в рослинних клітинах зосереджена, в основному, в пероксисомах, які також мають у собі ферменти, що утворюють перекис водню: глюкозооксидозу, уратоксидазу та флавопротейндегідрогеназу. Частково каталаза локалізується в мікротомах і в цитозолі. Її відносять до ферментів, що довго зберігають високу активність, а швидкість реакції розкладу перекису водню лімітується тільки швидкістю дифузії субстрату до активного центра ферменту. Інгібіторами каталази є синильна кислота, сірководень, фторид.

Відомо, що активність каталази вища у стійких генотипів [169]. Активність каталази соняшника під час біотичного стресу вивчена дуже обмежено.

Відомо, що активність каталази соняшника (*Helianthus annuus* L.) варіює залежно від біотичного фактора [170]. Так, при тривалому впливі

збудника несправжньої борошністої роси (*Plasmopara helianthi* Novot. f. *helianthi*) активність каталази поступово збільшується і перевищує показники здорових рослин. При інфікуванні збудником іржі (*Puccinia helianthi* Schw.) уражені зразки мають менші показники активності каталази, ніж контрольні. Під час ураження активність каталази збільшувалась. При інфікуванні рослин *Phomopsis helianthi* Munt. спостерігається спочатку збільшення, а потім зменшення активності каталази.

Досліджено зміну ферментної активності пероксидази, каталази, поліфенолоксидази при інфікуванні рослин перцю (*Capsicum annuum* L.) та тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) вірусом тютюнової мозаїки [171]. Щодо соняшника, у відомих дослідках під час інфікування вовчком, активність каталази відмічали лише у стійких генотипів, у сприйнятливих вона не була виявлена.

Проаналізувавши літературні джерела, ми припустили, що за використання в дослідженнях біохімічного аналізу активності основних окисно-відновних ферментів можна визначати стійкість рослин до певних біотичних чинників. Це стало основним напрямом вирішення поставлених задач дисертаційної роботи.

## Висновки до розділу 1

1. Чисельні літературні джерела підтверджують той факт, що вовчок соняшниковий (*Orobanchе cumanа* Wallr.) на сьогодні залишається одним з основних біотичних факторів, що завдає значних втрат урожаю соняшника та спонукає до створення нових джерел стійкості та розробки нових методів оцінювання селекційного матеріалу на стійкість до паразита.

2. Механізми захисту рослин від патогенів можуть бути специфічними, які ґрунтуються на наявності певних генів як рослини, так і паразита, і метаболітів, що кодуються цими генами, а також

неспецифічними, які визначаються незалежними від генетичних характеристик факторами.

3. При взаємодії рослини з патогеном відбуваються зміни в окиснювальних реакціях, що призводить до надпродукції активних форм кисню, які з одного боку призводять до розвитку патологічних процесів – реакції надчутливості і некрозів, а з іншого боку, захисні реакції пов'язані з діяльністю низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбат, глутатіон, пролін та ін.) і антиоксидантних ферментів (поліфенолоксидаза, каталаза, пероксидаза). Саме ферментні системи синтезу й утилізації активних форм кисню визначають стійкість рослин до патогена.

4. Важливу роль у механізмах стійкості відіграють фенольні сполуки, що акумулюються в рослині в умовах стресу, є попередниками захисних речовин та інгібують проникнення паразита.

5. У селекції використовують сучасні методи оцінювання селекційного матеріалу на стійкість до патогенів. Серед них гістологічні, що базуються на цитологічному аналізі рослинних тканин, молекулярні - з використанням молекулярних маркерів для визначення наявності генів стійкості, загальновідомі традиційні вегетаційні – в підрахунком кількості бульбочок вовчка на рослинах соняшника. Огляд літературних джерел дає можливість для розробки нового ефективного біохімічного методу оцінювання на стійкість до вовчка.

Враховуючи результати, отримані ученими світу, нами було визначено мету та задачі для її досягнення за актуальним напрямом досліджень для розробки нового методу визначення стійкості зразків соняшника до вовчка, що забезпечує прискорення селекційного процесу з визначення стійких зразків соняшника та подальшим впровадженням їх в селекційну програму, що і висвітлено в експериментальних розділах дисертаційної роботи.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Матеріал досліджень.

Матеріалом досліджень були зразки культурного соняшника селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, зокрема фертильні чоловічі X 114 В, X 526 В, X 711 В, X 720 В, X 762 В, стерильні материнські Сх 503 А, Сх 1002 А, Сх 1006 А, Сх 1010 А, Сх 1012 А, Сх 2111 А, Сх 4021 А та створені на їх основі комерційні гібриди Кий (Сх 908 А / X 762 В), Оскіл (Сх 1006 А / X 720 В), Погляд (Сх 2111 А / X 711 В), Борей (Сх 503 А / X 114 В), Світоч (Сх 1006 А / X 711 В), Сайт (Сх 1012 А / X 526 В).

Вищенаведені лінії та гібриди соняшника відібрані на основі даних лабораторії селекції та генетики соняшника та за каталогом гібридів соняшника [172, 173] Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, за якими всі вони різняться за рівнем стійкості до вовчка (*Orobancha cumana* Wallr.). Так, лінії X 711 В, X 720 В, X 762 В генетично стійкі до вовчка, лінії X 114 В, X 526 В – характеризуються середньою стійкістю, материнські лінії Сх 1002 А, Сх 1006 А – мають дуже високий рівень стійкості до вовчка, решта – середній. Всі гібриди мають високий рівень стійкості, обумовлений наявністю стійких батьківських компонентів. За результатами досліджень лабораторії селекції та генетики соняшника відібрані зразки стійкі до перших п'яти рас паразита (А, В, С, D, Е), однак до нових рас, що з'явилися в Україні нещодавно (F, G), вони в більшості сприйнятливі [70].

Як стандарт сприйнятливості до вовчка використовували стерильну материнську лінію Сх 908 А, селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, яка не має генів стійкості до вовчка, як

стандарт стійкості – гібрид зарубіжної селекції (компанія “Pioneer DuPont”) PR64A71, стійкий до наявних рас вовчка.

Для проведення аналізу динаміки активності окисно-відновних ферментів та визначення расового складу вовчка використовували специфічні диференціатори, що використовуються в світовій практиці [174, 175, 176], зокрема не стійка до вовчка лінія AD 66, сорт Рекорд – стійкий до раси С, лінія LC 1003 – стійка до раси Е, лінія LC 1093 – стійка до раси F та вищенаведений стійкий гібрид PR64A71.

Для проведення аналізу морфометричних показників, аналізу андрогенної здатності генотипів, визначення загального вмісту фенольних сполук, визначення активності ферментів всі зразки соняшника вирощували в вегетаційних посудинах в умовах фітотрону при температурі + 24 – 28°C, освітленні 4000 люкс, 16-годинному фотоперіоді. В посудину із 5 кг ґрунтової суміші (3 частини чорнозему: 1 частина піску) висівали 20-25 сім'янок соняшника.

Рівень ураженості генотипів вовчком визначали шляхом штучного їх зараження. Для цього насіння соняшника висівали разом із насінням *Orobanche cumanana* Wallr. з розрахунку 1 г на 5 кг ґрунту. Насіння вовчка було зібрано на території Харківської області та на сході Донецької області в Амвросіївському районі на посіві місцевого сорту, де за дослідженнями популяція вовчка характеризується високою агресивністю і вірулентністю. Зібране насіння вовчка ретельно перемішували для рівномірного розподілу в ґрунті.

## 2.2 Методика проведення досліджень

Для визначення стійкості зразків соняшника до вовчка використовували вегетаційний метод (для підрахунку бульбочок паразита на 30 добу після зараження), морфологічні аналізи (для визначення висоти рослин та ін.), біохімічні методи (для визначення рівня фенольних сполук,

активності оксидаз), біотехнологічні методи (для визначення можливості використання культури *in vitro* при створенні стійкого матеріалу соняшника), статистичні методи (для визначення достовірності одержаних результатів).

### 2.2.1 Методи обліку та спостережень

Дослідження закономірностей росту та розвитку рослин як процесу кількісних змін – збільшення маси і розмірів рослини, пов'язані із новоутворенням елементів структури [177] – дозволило виявити їх залежність від факторів навколишнього середовища та від внутрішніх факторів їх регуляції.

В процесі вегетації рослин соняшника визначали морфометричні показники – висоту рослин, кількість справжніх листків, їх площу, яку визначали за стандартною формулою на 14 добу після зараження рослин соняшника вовчком [178]:

$$S = A \times B \times k, \text{ де} \quad (2.1)$$

A – довжина листкової пластини;

B – ширина листкової пластини;

k – коефіцієнт;

S – площа листкової поверхні.

Стійкість зразків соняшника до вовчка визначали вегетаційним методом шляхом вирощування рослин соняшника на штучному інфекційному фоні. Ступінь ураження оцінювали підраховуючи кількість бульбочок паразита, що утворились за період вегетації впродовж 30 діб після зараження, шляхом відмивання коренів рослини водою (рис. 2.1.). Підраховували кількість уражених рослин соняшника *Orobanche cumanana* Wallr. у відсотках до загальної кількості облікових. На основі отриманих

даних дослідні зразки соняшника розподіляли на групи стійкості до вовчка [179].

Для проведення аналізів використовували по 10 рослин кожної лінії чи гібрида у варіантах досліджу.



Рис. 2.1 Коренева система соняшника з бульбочками вовчка [22]

2.2.2 Методика визначення загального вмісту фенольних сполук у листках та коренях соняшника.

Загальний вміст фенолів у рослинних тканинах вимірювали спектрофотометричним методом [180], на ULAB спектрофотометрі 101 при довжині хвилі 760 нм., який базується на вимірюванні оптичної густини продуктів окиснення фенольних сполук.

Матеріалом для аналізу були листки та корені 14-денних проростків дослідних зразків соняшника, вирощених у вегетаційних посудинах в умовах штучного клімату (рис. 2.2).

З кожного генотипу відбирали по 10 рослин, які фіксували у сушильній шафі при 120<sup>0</sup>С протягом 30 хв, загорнутими у вологу серветку для попередження розпаду фенольних сполук та збереження рослинного матеріалу для подальшого аналізу.

Фенольні сполуки екстрагували з наважки сухого матеріалу (1 г) спиртовим розчином (98 % етиловий спирт : вода у співвідношенні 1:1 ) впродовж 30 хв. Отриманий гомогенат фільтрували через складчасті фільтри та використовували для подальших аналізів.



Рис. 2.2 Вирощування зразків соняшника в умовах штучного мікроклімату

Приготування реактивів. Для аналізу використовували реактив Фоліна – Чікольте та розчин карбонату натрію. Останній готували шляхом розчинення 7,5 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (кристалічного) у 100 мл дистильованої води. Реактив Фоліна-Чікольте готували шляхом змішування 100 г вольфрамата натрію з 20 г фосфорномолібденової кислоти, 50 мл 85%- фосфатної кислоти та 750 мл води. Отриману суміш кип'ятили протягом двох годин зі зворотним холодильником, відфільтровували та доводили дистильованою водою до об'єму 1 л [181].

Вимірювання. У дослідній кюветі з робочою товщиною 0,5 см змішували 1 мл рослинного екстракту з 0,3 мл реактиву Фоліна – Чікольте, ретельно збовтували та рівно через 20 с додавали 5 мл 20% розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (кристалічного). За необхідності створювали оптимальні температурні умови для попередження несвоєчасної кристалізації розчину карбонату



натрію в кюветі, підтримували температуру всіх розчинів на рівні 25<sup>0</sup> С. Через 30 с вимірювали оптичну густину проти контролю реактивів при довжині хвилі 725-730 нм на спектрофотометрі. Біохімічні аналізи виконано у дво- триразовій повторності.

Опрацювання результатів. Кількість фенольних сполук в дослідних зразках знаходили за калібрувальною кривою. Розрахунок вели за формулою

$$x = aVp * 100/n, \text{ де} \quad (2.2)$$

$x$  – кількість фенольних сполук, мг/100 г сирі маси;

$a$  – вміст хлорогенової кислоти за калібрувальним графіком, мг/мл;

$V$  – об'єм спиртового рослинного екстракту, мл;

$p$  – розведення;

$n$  – маса наважки, г.

Побудова калібрувальної кривої. Для побудови калібрувального графіка використовували реактив Фоліна – Чікольте, розчин карбонату натрію, описані вище, та розчин хлорогенової кислоти, які готували шляхом змішування 10 мг хлорогенової кислоти з 50 мл 70 % етанолу, після чого об'єм реактиву доводили до 100 мл дистильованою водою. Далі готували розчини з різною концентрацією фенольного агента, а саме 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1 мг/мл. Оптичну густину розчинів вимірювали вище описаним методом. За отриманими даними будували графік, де за вісь абсцис брали концентрацію хлорогенової кислоти, а за вісь ординат – оптичну густину розчину.

### 2.2.3 Методика проведення біохімічного аналізу активності окисно-відновних ферментів

Існують різні способи вивчення ферментативної активності. Найбільш розповсюдженими з них є спектрофотометричні, колориметричні, йодометричні, манометричні. Вони базуються на обліку певних (наприклад,

оптичних) характеристик субстрату, продукту реакції або простетичної групи ферменту, або на прояві та виявленні забарвлених рідких чи газометричних продуктів реакції. Так, субстратом реакції для визначення активності поліфенолоксидази є пірокатехін, пероксидази – гваякол, каталази – перекис водню. Широко використовують хімічні методи, що базуються на визначенні кількості субстрату, який залишився після взаємодією з ферментом, або продукту реакції. Існують також фізичні методи, які дозволяють прослідкувати за ходом ферментативної реакції за зміною фізико-хімічних властивостей субстрату або продукту реакції (поляриметричний, електродний і т.д.).

Концентрацію ферментів виражають у мірах, що визначають їх активність. За одиницю активності будь-якого ферменту приймають таку його кількість, яка сприяє перетворенню одного мікромоля субстрату за 1 хвилину. Часто активність виражають у довільно вибраних ферментних одиницях на одиницю маси об'єкта, що аналізується [182].

Оцінивши переваги спектрофотокolorиметричних методів, а саме простоту та швидкість виконання за низьких витрат, що дозволяє за короткий термін проаналізувати значну кількість зразків, у порівнянні з іншими хімічними методами, зазначеними вище, для досягнення мети роботи вирішили використовувати їх для визначення активності ферментів.

Активність ферментів визначали в листках та коренях 14-денних проростків дослідних рослин соняшника, вирощених у вегетаційних посудинах в умовах штучного клімату та в умовах штучного інфекційного фону (рис. 2.1). З кожного генотипу відбирали по 10 рослин для аналізу, з яких готували ферментні витяжки.

Для цього наважку 500 мг рослинного матеріалу розтирали у фарфоровій ступці із фосфатним буфером на льоді або із додаванням 50-100 мг поліаміду (для попередження деактивації ферменту), після чого отриманий гомогенат переносили у мірну колбу на 25 мл та доводили буфером до риски. Для аналізів активності поліфенолоксидази та каталази

витяжки готували з додаванням 0,06 М буферу з рН 7,4, для визначення активності пероксидази – з додаванням 0,06 М буферу з рН 5,4.

Отримані гомогенати центрифугували 10 хвилин за 4 тис. об./хв на центрифугі ЦУМ-1 (Завод фізичних приладів, Киргизька РСР), після чого надосадовий розчин відділяли від непотрібного осаду.

Приготування необхідних реактивів. Для приготування буферу готували розчини фосфорнокислого калію та фосфорнокислого натрію, розчиняючи наважки 9,073 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та 11,866 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в 1 л дистильованої води відповідно. Для приготування 100 мл фосфатного буферу рН 7,4 поєднували 81,8 мл першого розчину та 18,2 мл другого, для приготування 100 мл фосфатного буферу рН 5,4 – 8,5 мл першого розчину та 91,5 мл другого розчину.

Приготування 0,05 М розчину пірокатехіну проводили шляхом розчинення наважки 500 мг у 100 мл дистильованої води.

Приготування 0,15 % розчину перекису водню проводили шляхом розчинення 0,5 мл 30 % розчину перекису водню у 100 мл дистильованої води.

Розчин гваяколу готували розчиненням наважки 183 мг спочатку у 2 мл етилового спирту 96%, а потім доводили об'єм до 25 мл дистильованою водою.

Для приготування 0,06 М розчину перекису водню 3 мл 3 % розчину перекису водню розчиняли у 4,5 мл дистильованої води.

Розчин молібдата амонію готували шляхом розчинення наважки 0,1 г у 250 мл 5% сірчаної кислоти.

Вимірювання. Оптичну густину продуктів реакцій визначали проти контролю реактивів на фотоколориметрі КФК-2-УХЛ 4.2 (РСФСР). Для визначення активності поліфенолоксидази в контрольну кювету, товщиною 1 см, вносили 0,5 мл ферментної витяжки, 2 мл фосфатного буферу та 0,5 мл дистильованої води.

Виставляли стрілку приладу на нуль при довжині хвилі 420 нм.

В дослідну кювету замість води додавали 0,5 мл 5% розчину пірокатехіну та з першою краплею вмикали секундомір. Дослід проводили у трьох повтореннях. Показники оптичної густини записували кожні 20 сек впродовж 2 хвилин.

Для визначення активності пероксидази в дослідну кювету вносили 0,5 мл ферментної витяжки, 1,5 мл фосфатного буферу, 0,5 мл розчину гваяколу та 0,5 мл 0,15% розчину перекису водню. Вимірювання проводили при довжині хвилі 470 нм.

Для визначення активності каталази [183] в кювету вносили 2 мл реакційної суміші, що містила 0,06 М розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,06 М фосфатний буфер рН 7,4 в співвідношенні 1:1, 0,2 мл ферментної витяжки та інкубували 10 хв на водяній бані за температури  $37^\circ\text{C}$ . Після чого додавали 1 мл розчину молібдату амонію, який утворює із перекисом водню, що залишився після реакції, комплекс жовтого кольору. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 405 нм.

Опрацювання результатів. Активність ферментів виражали у відносних одиницях на 1 г сирової маси за 1 хвилину та обчислювали за формулою

$$A = \frac{(D_2 - D_1) \times 60 \times V \times V_2}{(t_2 - t_1) \times V_1 \times H}, \text{ де} \quad (2.3)$$

$D_1$  - оптична густина на початку досліді;

$D_2$  - оптична густина в кінці досліді;

$t_1$  та  $t_2$  - час на початку та в кінці досліді;

$H$  - маса наважки;

$V$  - загальний об'єм витяжки;

$V_1$  - об'єм витяжки для проведення реакції;

$V_2$  - об'єм рідини в кюветі.

Результати заносили до таблиці та проводили статистичну обробку даних методом дисперсійного аналізу. Оцінку відмінностей між двома

вибірковими середніми проводили за допомогою критерію Стьюдента  $t$  [184, 185].

#### 2.2.4 Методика індукції андрогенезу фертильних чоловічих ліній соняшника

Матеріалом для відпрацювання методики індукції андрогенезу *in vitro* [186, 187] були пиляки фертильних чоловічих ліній соняшника X 114 В, X 526 В, X 711 В, X 720 В, X 762 В, які вирощували в умовах штучного клімату на фітотроні, що розташований на території Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України.

Для отримання пиляків використовували кошики діаметром в середньому 5,5 см, що відповідало наявності стадії одноядерних вакуолізованих мікроспор. При однаковій стадії розвитку мікроспор діаметр кошика варіював залежно від культурної лінії. Фазу розвитку пилку визначали під світловим мікроскопом із використанням цитологічних методів на тимчасових препаратах, забарвлених ацетокарміном [188].

Попередня обробка матеріалу має велике значення для подальшої культивування в умовах *in vitro* [189, 190]. Матеріал має бути простерилізований таким чином, щоб при знищенні патогенних мікроорганізмів залишалась життєздатність матеріалу. Для підготовки пиляків до висадження на живильне середовище, фрагменти кошиків стерилізували шляхом поверхневої обробки детергентом, який містив розчин господарського мила, потім 96% етанолом (Артемівський спиртзавод, Україна) впродовж 30 сек, 50% розчином комерційного засобу "Доместос" (ООО Юнілевер СНГ, Росія), що містив гіпохлорит впродовж 10 хв. Після цих етапів фрагменти кошиків промивали чотири рази стерильною дистильованою водою. Пиляки, що були на відповідній стадії розвитку, ізолювали з квіток під бінокуляр (МБС-10, "Рубин", СРСР) в

асептичних умовах ламінар-боксу (КПГ-1М, СРСР), розміщували в пробірках на індукційних живильних середовищах.

Спираючись на попередній досвід учених світу, який вказує на значний вплив нутрієнтів живильного середовища на розвиток мікроспор та подальший розвиток новоутворень [191], було вирішено використовувати декілька середовищ для індукції андрогенезу у ліній соняшника. Використання таких живильних компонентів як нітрат калію, нітрат срібла, гідролізат казеїну, інозитол, лактоальбумін та ін [129, 192, 193] дає змогу з більшою вірогідністю отримати перспективні новоутворення. Хоча використання безгормональних живильних середовищ у деяких культур може провокувати прямий і непрямий ембріодогенез [194, 195], для соняшника бажано використовувати середовища із додаванням фітогормонів, таких як індолілоцтова кислота (ІОК), нафтілоцтова кислота (НОК), бензоамінопурін (БАП), кінетин, 2,4-дихлорфенилоцтова кислота (2,4-Д) [129,196].

Проаналізувавши літературні дані, для проведення дослідів дібрали чотири індукційні живильні середовища, основу яких складало середовище *Murashige & Skoog* (MS) [110]. Середовища містили :

1. 250 мг/л гідролізата казеїну; 1,0 мг/л НОК; 2 мг/л 2,4 Д; 0,5 мг/л БАП;
2. 0,1 мг/л НОК та 0,2 мг/л БАП;
3. 500 мг/л гідролізата казеїну, 2 мг/л НОК та 1,0 мг/л БАП;
4. 0,1 мг/л НОК та 0,5 мг/л БАП.

До усіх середовищ додавали 30 мг/л сахарози та 8 г/л агару.

Висіяні пиляки культивували в темряві при температурі +24<sup>0</sup>С протягом 7 діб. Після чого пробірки з новоутвореннями переносили в кімнату зі штучним кліматом та продовжували культивацію при температурі +24<sup>0</sup>С±2<sup>0</sup>С, 16-годинному світловому періоді та освітленні 3000 лк. Через 28 діб з моменту пасажу, перспективні новоутворення переносили на регенераційне живильне середовище, до складу якого

входили компоненти середовища MS із додаванням 100 мг/л гідролізата казеїну та фітогормонів ( БАП 0,5 мг/л та кінетину 0,5 мг/л).

Частоту формування новоутворень визначали шляхом підрахунку кількості пиляків з новоутвореннями у відношенні до загальної кількості введених в умови *in vitro* пиляків через 28 діб з моменту пасажу.

Аналіз показників андрогенезу проводили за допомогою методів варіаційної статистики [184, 185].

## Висновки до розділу 2

1. Матеріал для досліджень включає різні за рівнем стійкості до вовчка п'ять фертильних чоловічих ліній соняшника, сім стерильних материнських ліній, шість комерційних гібридів, чотири зразки-диференціатори та два зразки, які були використані як стандарти стійкості й сприйнятливості до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr. ).

2. Матеріал вирощували в умовах штучного мікроклімату, що дало можливість прискорити експериментальний процес та оцінити дослідний матеріал на стійкість у лабораторних умовах.

3. Стійкість зразків соняшника визначали на 30 добу після зараження вовчком. Морфометричні показники, вміст фенольних сполук, активність оксидаз визначали у 14-денних проростків соняшника.

3. Для культивування соняшника в умовах *in vitro* використовували чотири модифіковані індукційні живильні середовища на основі середовища MS з різним вмістом фітогормонів, де №1 та №3 містили 250 мг/л та 500 мг/л гідролізата казеїну відповідно.

4. Статистичні методи обробки експериментального матеріалу дали змогу проаналізувати результати досліджень і зробити обґрунтовані висновки.

### РОЗДІЛ 3

## РІВЕНЬ СТІЙКОСТІ ТА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЗА ВПЛИВУ УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ

Визначено загальні морфологічні параметри у різних генотипів соняшника та їх стійкість до вовчка (*Orobanche cuman*a Wallr.) традиційним методом (у вегетаційних посудинах).

### 3.1 Рівень ураженості та морфологічні показники зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

Дослідження вчених світу з питань патогенезу сільськогосподарських культур, взаємовідносин патоген – рослина-живитель та впливу зараження на основні процеси в рослинних тканинах показали, що для уникнення зараження рослина може зменшувати кореневу масу та пригнічувати кореневий ріст [5, 6, 16, 17], а за ураження патогеном пригнічується ріст рослини.

Результати досліджень впливу ураження вовчком зразків-диференціаторів стійкості дозволили виявити суттєвий ефект дії паразита на ріст та розвиток дослідних рослин соняшника [197, 198].

Ступінь ураженості зразків-диференціаторів стійкості суттєво варіював залежно від генотипу (табл. 3.1). Найбільшу кількість бульбочок паразита на коренях рослин соняшника – 21,3 шт./росл. – відмічали у лінії AD 66, що є не стійкою до усіх наявних рас вовчка. Стійкі до рас вовчка С, Е та F зразки Рекорд, LC 1003 та LC 1093 сформували бульбочок відповідно від 7,2 до 10,5 шт./росл. На коренях рослин стійкого до сьомої (G) раси вовчка зарубіжного гібрида PR64A71 бульбочок паразита не відмічали. Це підтверджує той факт, що в Україні наявні високовірулентні 5 (E) та 6 (F) раси вовчка.



Таблиця 3.1

**Морфометричні показники та рівень ураженості зразків  
диференціаторів соняшника вовчком**

Зразок	Стій- кість до рас вовчка	Бульбо- чок на рослині, шт.	Висота		Листок			
			рослини, см.		кількість на рослині, шт.		площа, см <sup>2</sup>	
			контр.	ураж.	контр.	ураж.	контр.	ураж.
AD 66	Не стійка	21,25*±2,1	18,4* ±1,4	17,6* ±1,0	7,6* ±0,8	7,2* ±0,7	11,5* ±1,0	9,4* ±0,7
Рекорд	А-С	7,8*±1,2	22,0* ±2,0	20,8* ±1,6	7,9*± 0,7	7,7* ±0,8	19,7* ±1,2	12,6* ±1,0
LC 1003	А-Е	10,5*±1,5	25,2* ±2,4	24,8* ±1,4	8,1* ±0,8	8,0 ±0,7	18,6* ±1,1	14,7* ±1,1
LC 1093	А-F	7,2*±1,4	14,5* ±1,7	11,8* ±0,9	8,3* ±0,8	8,1 ±0,6	11,6* ±0,9	9,8* ±1,0
<b>PR64A71</b>	А-G	0,0*±0,0	46,9* ±2,1	43,1* ±1,7	8,6 ±0,4	8,2 ±0,7	11,8* ±1,1	10,7* ±0,9
<b>Cx 908 A</b>	Не стійка	6,5±0,4	29,7± 1,7	28,7± 1,5	8,7± 0,5	8,0± 0,6	9,3± 0,8	7,3± 0,6

Тут і далі Примітка.

\* – різниця з показниками лінії-стандарту сприйнятливості істотна при  $P \leq 0,05$ ;

**Cx 908 A** – лінія-стандарт сприйнятливості до вовчка;

**PR64A71** – стандарт стійкості до вовчка.

Аналіз морфометричних показників рослин зразків-диференціаторів стійкості соняшника до рас вовчка показав істотне їх варіювання за висотою рослин, кількістю листків на рослині та їх площею. Так, висота контрольних рослин варіювала в межах від 14,5 см до 46,9 см. Найменшою висотою рослини в контролі характеризувалась лінія LC 1093, дещо вищий показник цієї ознаки відмічено у сприйнятливої лінії AD 66 (18,4 см), майже однакова висота рослин відмічена у лінії LC 1003 та сорту Рекорд, а найбільша висота контрольних рослин була у стійкого гібрида PR64A71, показники якого майже вдвічі перевищували вищезгадані зразки.

Що стосується кількості листків на рослині та їх площі в контролі, то результати досліджень свідчать про їх варіабельність залежно від генотипу. Так, найбільшу кількість листя на контрольних рослинах відмічено у

стійкого гібрида PR64A71 – 8,6 шт./роsl., а найменшу – у сприйнятливої лінії AD 66 (7,6 шт./роsl.). При цьому показники площі листя у контрольних рослин не співпадали з описаними закономірностями. Найбільшою вона була у сорту Рекорд (19,7 см<sup>2</sup>) та лінії LC 1003 (18,6 см<sup>2</sup>).

Результати досліджень впливу вовчка на морфометричні показники рослин зразків-диференціаторів стійкості соняшника до квіткового паразита дають підставу стверджувати, що за ураження *Orobanche cumana* Wallr. ріст та розвиток рослин соняшника суттєво пригнічуються. Так, за ураження вовчком висота рослин знижувалась у всіх зразків-диференціаторів соняшника. Крім того, спостерігалась незначна, але стійка тенденція до зменшення кількості листків на рослині. А площа листкової поверхні знижувалась подекуди на 10-25 % порівняно з контролем. Такі результати свідчать про те, що квітковий паразит вовчок, живлячись за рахунок рослин соняшника, унеможлиблює повноцінний їх розвиток та формування продуктивності.

### 3.2 Рівень ураженості рослин ліній та гібридів соняшника вовчком

Рівень ураженості ліній вовчком оцінювали за відсотком ураження (частка уражених рослин до облікових) і ступенем ураження, який визначали за кількістю бульбочок паразита в умовах фітотрону на одну уражену рослину соняшника на 30 добу після внесення насіння вовчка [70].

Аналіз рівня ураженості рослин самоzapилених ліній вовчком показав, що досліджені лінії та гібриди соняшника різняться за кількістю утворених бульбочок у результаті ураження рослин. Результати підрахунку кількості бульбочок вовчка на коренях уражених рослин соняшника свідчать про більш високу ураженість фертильних чоловічих ліній, ніж стерильних материнських (рис. 3.1). Найбільшу кількість бульбочок відмічено на рослинах лінії – стандарту сприйнятливості Сх 908 А, (6,5 шт./рослині), чого і слід було очікувати (табл. 3.2.). Значно менше, але все ж значна

кількість бульбочок виявлена на рослинах ліній X 526 В, X 711 В, X 720 В (3-3,2 шт./рослині). По 0,9-1,4 бульбочки в результаті ураження утворилося на рослинах стерильних материнських ліній Сх 1002 А, Сх 1010 А, Сх 1012 А, Сх 503 А, Сх 2111 А і, звичайно, жодної бульбочки на виявлено на рослинах лінії – стандарту стійкості PR64A71.

Одержані дані свідчать про те, що досліджені лінії істотно різняться за рівнем ураженості вовчком, що вірогідно, пов'язане з генотиповими відмінностями між ними за цією властивістю. Зазначимо, що всі самозапилені лінії мали істотно вищий рівень стійкості до вовчка, порівняно до лінії – стандарту сприйнятливості, але дещо нижчий, порівняно до лінії стандарту стійкості (рис. 3.1).

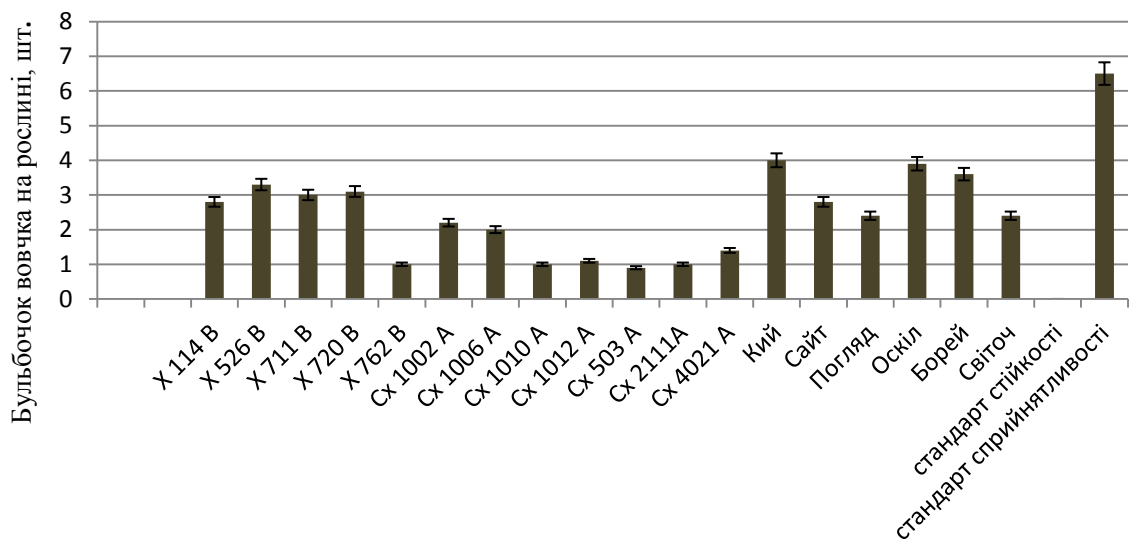


Рис. 3.1 Ступінь ураженості рослин ліній та гібридів соняшника вовчком у порівнянні з лініями-стандартами

Так, ураженість фертильних чоловічих ліній становила в середньому 2,8 бульб./росл., що на 54 % нижче за показник лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А (рис. 3.1). Тоді як ступінь ураження стерильних материнських ліній відповідав рівню 1,3 бульб./росл., що на 80 % менше за стандарт сприйнятливості. Однак за кількістю бульбочок на коренях досліджувані лінії не перевищували лінію-стандарт сприйнятливості Сх 908 А.

Таблиця 3.2

**Рівень ураженості зразків соняшника вовчком та розподіл їх за  
групами стійкості**

Зразок	Група стійкості	Ураженість вовчком	
		кількість уражених рослин, %	ступінь ураження*
X 114 B	середня	20	2,8±0,4
X 526 B	середня	25	3,3±0,5
X 711 B	середня	25	3,0±0,3
X 720 B	середня	25	3,1±0,3
X 762 B	висока	10	1,0±0,4
Cx 1002 A	висока	15	2,2±0,6
Cx 1006 A	середня	20	2,0±0,6
Cx 1010 A	середня	20	1,0±0,3
Cx 1012 A	висока	10	1,1±0,2
Cx 503 A	висока	5	0,9±0,1
Cx 2111 A	висока	10	1,0±0,2
Cx 4021 A	середня	20	1,4±0,4
Кий (Cx 908 A / X 762 B)	середня	25	4,0±0,6
Сайт (Cx 1012 A / X 526 B)	висока	15	2,8±0,4
Погляд (Cx 2111 A / X 711 B)	висока	10	2,4±0,5
Оскіл (Cx 1006 A / X 720 B)	середня	20	3,9±0,5
Борей (Cx 503 A / X 114 B)	висока	15	3,6±0,4
Світоч (Cx 1006 A / X 711 B)	висока	10	2,4±0,2
<b>PR64A71</b>	дуже висока	0	0,0±0,0
<b>Cx 908 A</b>	сприйнятлива	100	6,5±0,4

Примітка: **PR64A71** – стандарт стійкості до вовчка;

**Cx 908 A** – стандарт сприйнятливості;

\*Ступінь ураження – кількість бульбочок вовчка на одні рослині, шт.

В результаті досліджень визначено, що ступінь ураженості вовчком гібридів соняшника був вищим, ніж у батьківських компонентів, однак не

перевищував показники лінії – стандарту сприйнятливості і був на 30-60 % нижчим за них (табл. 3.2).

Найбільш стійкими виявились гібриди Погляд та Світоч, на коренях яких нараховували в середньому 2,4 бульбочки/рослину, а гібриди Кий та Оскіл – менш стійкими, так як на їх кореневій частині нараховували в середньому близько 4 бульбочок.

Це, в цілому, свідчить про достатньо високий рівень стійкості досліджених ліній та гібридів соняшника до паразита.

Отримані дані дають змогу розподілити дослідні генотипи соняшника за стійкістю до вовчка (табл. 3.2). Враховуючи показник кількості уражених рослин соняшника вовчком, було відмічено, що дібрані генотипи характеризувались високою (5 – 15 % ) та середньою (20 – 25 %) стійкістю до вовчка. При цьому у стандарту стійкості PR64A71 не спостерігали ознак паразитування взагалі (0 % уражених рослин), а у стандарту сприйнятливості Сх 908 А всі рослини соняшника були заселені вовчком (100 % уражених рослин).

Таку диференціацію за рівнем стійкості до вовчка можна пояснити тим, що стійкі до вовчка лінії та гібриди створювали у відділі селекції соняшника Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН в роки, коли в Україні нараховували лише 5-6 рас вовчка, тоді як зараз – 8 рас.

Тож, вірогідно, до нових рас вовчка досліджені зразки соняшника менш стійкі.

### 3.3 Морфологічні показники ліній та гібридів соняшника за умов ураження вовчком.

Аналіз результатів вивчення морфологічних показників досліджуваних самоzapилених ліній соняшника дозволив виявити істотне їх варіювання. Лінії суттєво різнилися за висотою рослин, кількістю листків на рослині та площею листка. Так, висота рослин у контрольних зразків (не

уражені рослини) варіювала в межах від 26 до майже 47 см. Найбільш високими були рослини лінії – стандарту стійкості PR64A71, а також ліній X 762 В, Сх 1006 А, Сх 4021 А, а найнижчими – лінії X 720 В та лінії – стандарту сприйнятливості Сх 908 А.

Кількість листків на рослинах досліджених ліній також істотно коливалася – від 6 до майже 12. Найбільше їх сформували рослини стерильних материнських ліній Сх 1006 А, Сх 1010 А (в межах 10 – 12 шт./рослину), а найменшу – фертильна чоловіча лінія X 720 В (близько 6 шт./рослину). У інших ліній кількість листків варіювала в межах 7-8,5 шт./рослину (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Вплив ураження вовчком на морфометричні показники самоzapилених ліній соняшника**

Лінія	Висота рослини, см		Листок			
			Кількість на рослині шт		Площа, см <sup>2</sup>	
	контроль	уражені	контроль	уражені	контроль	уражені
X 114 В	34,9*±1,2	26,0*±0,9	8,9±0,7	7,0*±0,6	9,8±0,8	8,1±0,6
X 526 В	35,8*±1,4	32,1*±1,2	7,0*±0,6	6,3*±0,4	7,9*±0,6	8,5*±0,5
X 711 В	32,2*±1,2	30,9*±1,0	7,5*±0,7	7,3*±0,5	7,0*±0,4	6,3*±0,1
X 720 В	27,0±1,0	26,1*±0,8	6,0*±0,5	5,9*±0,2	5,2*±0,4	5,1*±0,2
X 762 В	40,8*±1,6	41,9*±2,0	8,8±0,9	8,4±0,7	8,2±0,3	8,8*±0,5
Сх 1002 А	40,7*±1,6	30,7*±1,7	8,0±0,7	7,2*±0,3	9,0±0,6	8,6*±0,4
Сх 1006 А	39,9*±1,4	34,0*±1,7	11,7*±0,9	10,7±0,9	8,3*±0,3	8,7*±0,7
Сх 1010 А	33,0*±1,1	35,3*±1,2	9,3*±0,7	9,7*±0,7	8,1*±0,2	7,8*±0,4
Сх 1012 А	30,7*±1,1	27,3±0,9	8,1±0,5	7,1*±0,4	8,0*±0,4	7,3*±0,4
Сх 503 А	31,2*±1,3	28,9±1,0	7,2*±0,7	7,0*±0,3	8,1*±0,5	8,5*±0,8
Сх 2111 А	30,6*±0,9	36,3*±1,3	7,6*±0,8	7,3*±0,5	6,2*±0,3	6,1*±0,3
Сх 4021 А	38,0*±0,9	34,4*±1,2	8,9±0,7	7,5*±0,6	8,5*±0,2	7,7±0,2
<b>PR64A71</b>	<b>46,9*±2,1</b>	<b>43,1*±1,7</b>	<b>8,6±0,4</b>	<b>8,2±0,7</b>	<b>11,8*±1,1</b>	<b>10,7*±0,9</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>29,7±1,7</b>	<b>28,7±1,5</b>	<b>8,7±0,5</b>	<b>8,0±0,6</b>	<b>9,3±0,8</b>	<b>7,3±0,6</b>

Щодо площі листків, то вона також у досліджуваних ліній істотно відрізнялась. Загалом по всіх досліджених лініях межі зміни площі листка становили від 5 до майже 12 см<sup>2</sup>. Найбільшою площа листка була у лінії – стандарту стійкості PR64A71 (майже 12 см<sup>2</sup>), дещо меншою вона була у ліній X114B, Cx1006A і лінії – стандарту сприйнятливості Cx 908 A. Найменшою площею листка вирізнялися лінії X 720 B і Cx 2111 A. Вірогідно, виявлені відмінності між лініями за морфофізіологічними ознаками залежать від генотипових особливостей процесів морфогенезу у них.

За результатами досліджень встановлено, що за ураження *Orobanche cunana* Wallr. переважна більшість морфометричних показників рослин ліній та гібридів соняшника були нижчими, ніж у контрольних зразків. Результати наведені у таблицях (табл. 3.3, 3.4).

Так, висота рослин фертильних чоловічих (X 114 B, X 526 B) та стерильних материнських ліній соняшника (Cx 1002 A, Cx 1006 A, Cx 503 A, Cx 4021 A) за ураження вовчком була суттєво нижчою, ніж у контрольних рослин. Однак, у порівнянні із лінією-стандартом сприйнятливості (Cx 908 A) показники висоти рослин усіх ліній були вищими як у контрольних ( на 11–37 %), так і в уражених зразків ( на 12 – 26 %), окрім X 720 B та X 114 B, висота яких була на 2 см ( 9 %) нижчою за стандарт сприйнятливості (лінія Cx 908 A). При цьому показник висоти рослини лінії-стандарту стійкості перевищував показник лінії – стандарту сприйнятливості на 50-58 %. Це вказує на пригнічення паразитом росту рослини-хазяїна. Що стосується показників площі листка та кількості листя на рослині, то серед дослідних зразків соняшника спостерігається загальна тенденція до зниження рівня зазначених показників за ураження паразитом, однак суттєвих відмін від ліній-стандартів не виявлено.

Таблиця 3.4

**Морфометричні показники та рівень ураженості рослин гібридів  
соняшника вовчком у порівнянні з лініями-стандартами**

Гібрид	Висота рослини, см		Листок			
			кількість на рослині, шт		площа, см <sup>2</sup>	
	контр.	ураж.	контр.	ураж.	контр.	ураж.
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	36,3* ±2,1	29,5 ±1,4	8,6 ±0,7	7,1* ±0,7	8,7* ±0,8	8,9* ±0,8
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	35,2 ±2,3	37,0 ±2,0	7,8* ±0,6	7,7 ±0,6	6,7* ±0,6	3,4* ±0,4
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	35,5* ±1,9	34,3* ±1,6	8,0 ±0,8	6,6* ±0,3	8,6* ±0,9	7,0 ±0,7
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	36,2* ±1,8	32,9* ±1,4	7,9* ±0,7	8,1 ±0,6	7,7* ±0,7	6,3* ±0,5
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	36,1* ±2,0	25,5* ±2,2	9,1* ±0,8	6,7* ±0,3	8,2* ±0,6	7,6 ±0,7
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	37,9* ±2,4	39,5* ±1,9	10,0* ±0,8	9,9* ±0,9	8,6* ±0,8	7,4 ±0,6
<b>PR64A71</b>	46,9* ±2,1	43,1* ±1,7	8,6 ±0,4	8,2 ±0,7	11,8* ±1,1	10,7*± 0,9
<b>Сх 908 А</b>	29,7 ±1,7	28,7 ±1,5	8,7 ±0,5	8,0 ±0,6	9,3 ±0,8	7,3 ±0,6

За аналізом морфометричних показників у гібридів соняшника (табл. 3.4) виявлено незначні зміни висоти рослин за ураження їх вовчком у порівнянні із контрольними рослинами. Так, наприклад у гібридів Кий та Борей висота рослин за ураження паразитом зменшувалась на 7-10 см, а у гібридів Світоч та Сайт збільшувалась в середньому на 2 см.

При цьому показники гібридів суттєво перевищують показники лінії-стандарту сприйнятливості до вовчка (*Orobanche cuman* Wallr.). Кількість листків на рослині та їх площа майже у всіх уражених рослин була нижчою, ніж у контрольних. Однак, ці показники суттєво не відрізняються від показників лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А [199, 200].



### Висновки до розділу 3

1. Серед зразків-диференціаторів стійкості до вовчка найбільшу кількість бульбочок паразита на коренях рослин соняшника – 21,3 шт./роsl. – відмічали у не стійкої лінії AD 66. Стійкі до рас вовчка С, Е та F зразки Рекорд, LC 1003 та LC 1093 сформували бульбочок відповідно від 7,2 до 10,5 шт./роsl. На коренях рослин стійкого до сьомої (G) раси вовчка гібрида PR64A71 бульбочок паразита не відмічали. Це підтверджує той факт, що в Україні наявні високовірулентні 5 (E) та 6 (F) раси вовчка.

2. Серед самозапилених ліній найбільшу кількість бульбочок паразита (6,5 шт./роsl.) відмічали у сприйнятливої лінії Сх 908 А, що на 54 % перевищувала показники фертильних чоловічих ліній, і на 80 % – стерильних материнських ліній.

3. Дослідні генотипи соняшника розподілено за стійкістю до *Orobanche cumana* Wallr. Ураховуючи показник кількості уражених рослин вовчком, було відмічено, що дібрані генотипи характеризуються високою (5 – 15 %) та середньою (20 – 25 %) стійкістю до вовчка.

4. Відмічено загальну тенденцію до зниження висоти рослин дослідних зразків, площі листової поверхні та кількості листків на рослині за ураження паразитом.

Матеріали розділу опубліковано та апробовано у таких публікаціях:

197. Сахно Т. В., Петренко В. П. Вміст фенольних сполук та морфометричні показники у зразків-диференціаторів соняшнику за умов ураження вовчком. Вісник аграрної науки Причорномор'я. вип. 4 (92). Миколаїв. 2016. С. 92–98.

198. Сахно Т. В. Вплив ураження вовчком на морфометричні показники та загальний вміст фенолів у ліній-диференціаторів соняшнику. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених

«Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» 7-8 липня 2016 р. Харків. С. 18–19.

199. Сахно Т. В. Морфометричні показники та вміст фенольних сполук у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Селекція і насінництво. Випуск 110. № 15. Харків. 2016. С. 117–122.

200. Сахно Т. В. Влияние заражения заразой на ростовые процессы и содержание фенольных соединений у линий и гибридов подсолнечника. Материалы IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 20-25 апреля 2015 р. Москва, Россия. С. 425–430.

## РОЗДІЛ 4

### ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У РОСЛИНАХ СОНЯШНИКА ЗА УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ

Сучасні дослідження вчених світу свідчать про зміну загальної кількості фенольних сполук у рослинному матеріалі за інфікування рослини патогеном. Так, в роботах з визначення впливу зараження збудником несправжньої борошнистої роси стійких та сприйнятливих зразків соняшника було визначено, що загальна кількість фенольних сполук у рослинному матеріалі підвищувалась за інфікування патогеном. При цьому показники стійких зразків соняшника були нижчими за показники сприйнятливих [167].

#### 4.1 Вміст фенольних сполук у рослинах зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

Аналіз результатів дослідження рівня фенольних сполук в рослинному матеріалі соняшника за ураження вовчком показав істотне варіювання показника залежно від генотипу зразка (табл. 4.1).

*Таблиця 4.1*

#### **Вміст фенольних сполук у листках та коренях зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком**

Зразок	Вміст фенолів, мг/100г маси сухої речовини			
	у листках		у коренях	
	контроль	уражені	контроль	уражені
AD 66	546,8*±5,4	521,4*±6,2	379,8*±4,6	202,7*±4,7
LC 1003	708,6*±5,8	906,3*±7,8	304,8*±5,1	550,9*±5,6
Рекорд	678,5±7,1	987,4*±8,2	265,8*±5,2	652,0*±4,9
LC 1093	465,6*±6,3	854,4*±7,4	135,2*±5,4	566,2*±5,2
<b>PR64A71</b>	945,0*±5,4	1234,8*±9,3	189,0*±6,1	667,8*±6,6
<b>Cx 908 A</b>	680,4±4,8	655,2±5,2	403,2±3,9	138,6±3,7

Загальний вміст фенолів у листках контрольних рослин соняшника суттєво варіював. Найвищий вміст виявлено у стійкого гібрида PR64A71, найнижчий – у лінії LC 1093, яка є диференціатором стійкості до раси F. У листках сприйнятливих ліній AD 66 та Сх 908 А вміст фенольних сполук був вищим, але не перевищував показник стійкого зразка (табл. 4.1).

За ураження квітковим паразитом рослин зразків-диференціаторів стійкості соняшника вміст фенолів у листках майже всіх зразків підвищувався, в тому числі і стійкого гібрида PR64A71. При цьому вміст фенольних сполук у листках сприйнятливих ліній AD 66 та Сх 908 А знижувався за дії *Orobanche cumana* Wallr. (рис. 4.1).

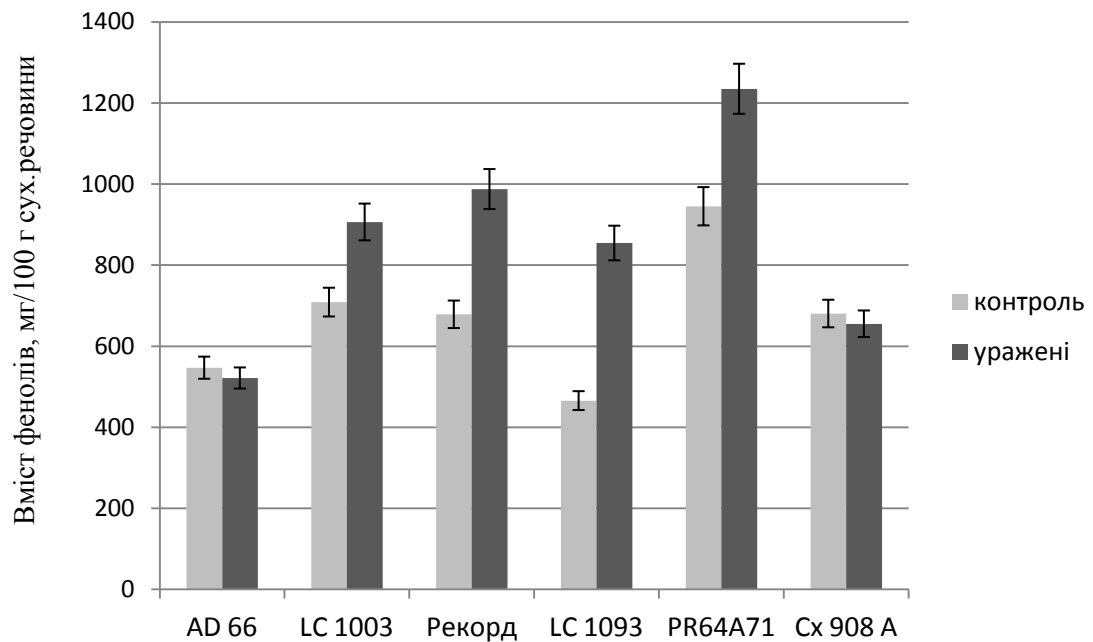


Рис. 4.1 Вміст фенольних сполук у листках зразків-диференціаторів стійкості соняшника за ураження вовчком

Загальний вміст фенольних сполук у коренях контрольних рослин досліджених зразків-диференціаторів стійкості був у цілому в 2-3 рази нижчим у порівнянні із показниками в листках. Найбільший вміст фенолів у коренях контрольних рослин відмічено у сприйнятливих ліній AD 66 та Сх 908 А (табл. 4.1). Найнижчі показники спостерігали у коренях контрольних рослин стійкого гібрида PR64A71 та лінії LC 1093.

За ураження вовчком вміст фенольних сполук у коренях майже всіх досліджених зразків також суттєво підвищувався, у тому числі і стійкого гібрида PR64A71 ( в 3 рази у порівнянні з контролем).

Тоді як вміст фенольних сполук у коренях сприйнятливих до вовчка ліній AD 66 та Сх 908 А знижувався майже вдвічі у порівнянні з контролем (рис. 4.2).

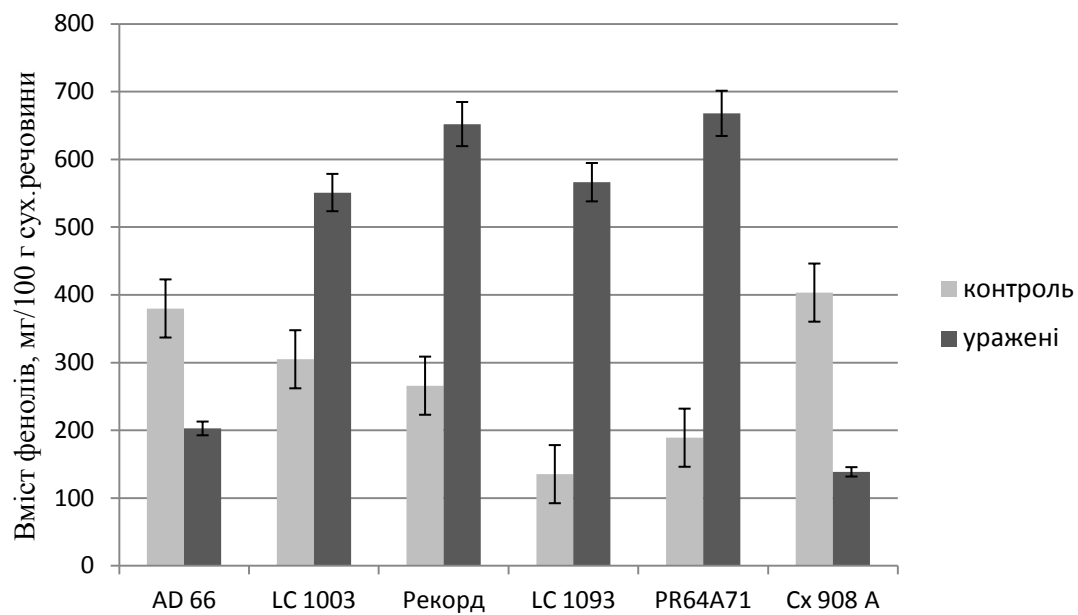


Рис. 4.2 Вміст фенольних сполук у коренях зразків-диференціаторів стійкості соняшника за ураження вовчком

Отримані дані дають змогу стверджувати, що лінію Сх 908 А доцільно використовувати як стандарт сприйнятливості до вовчка, так як відмічені зміни вмісту фенольних сполук у її рослинному матеріалі за ураження паразитом аналогічні реакції лінії AD 66, що є міжнародним стандартом сприйнятливості до вовчка (*Orobanche cumanana* Wallr.), насіння якої часто дуже складно отримати для масових досліджень.

#### 4.2 Вміст фенольних сполук у рослинах ліній та гібридів соняшника за ураження вовчком

Експериментальні дані з дослідження рівня фенольних сполук у листі та коренях різних генотипів соняшника (табл. 4.2) показали, що вміст фенольних сполук у листках контрольних рослин ліній Сх 1012 А і Сх 4021 А перевищував показник стандарту стійкості на відміну від решти самозапилених ліній (рис. 4.3).

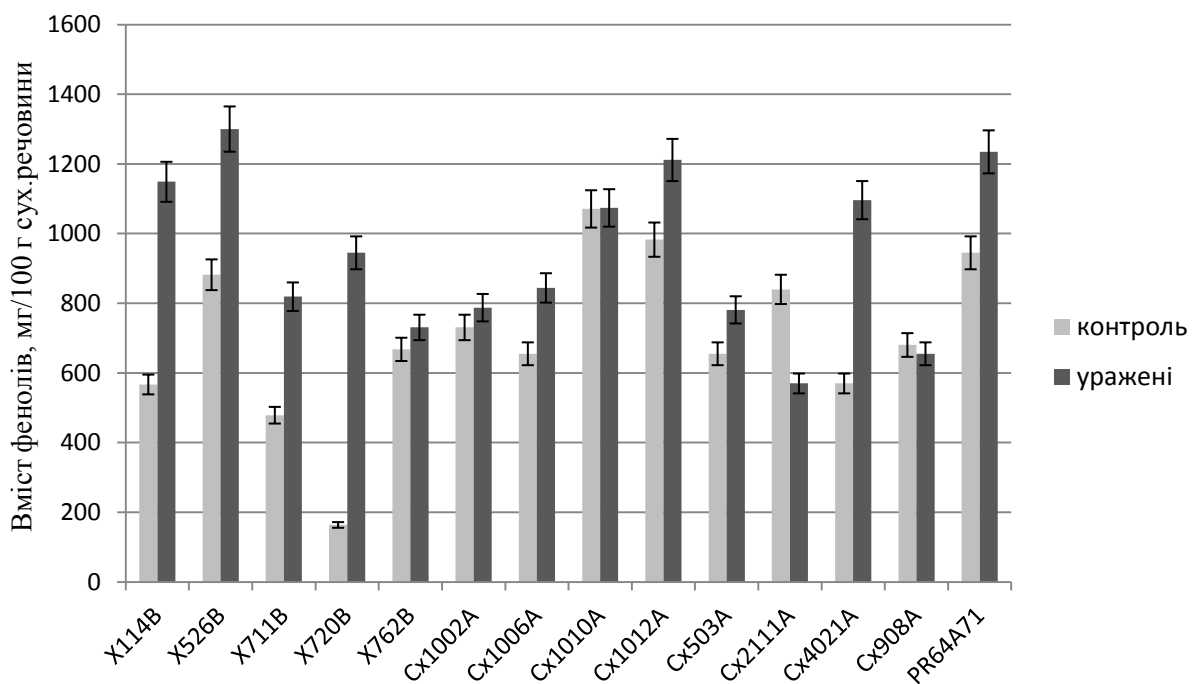


Рис. 4.3 Вміст фенольних сполук у листках самозапилених ліній соняшника за ураження вовчком

При цьому майже у всіх фертильних чоловічих ліній (окрім X 526 B) та у стерильних материнських ліній Сх 1006 А і Сх 503 А вміст фенольних сполук у листках контрольних рослин був нижчим за показники лінії-стандарту сприйнятливості (рис. 4.3).

Щодо вмісту фенолів у коренях контрольних рослин, то у всіх самозапилених ліній, окрім Сх 1010 А, показники були нижчими у порівнянні із стандартом сприйнятливості. У порівнянні із стандартом

стійкості вищими були показники у ліній X 526 В, X 711 В, Сх 1010 А, Сх 1012 А та Сх 4021 А (рис. 4.4). Тож за вмістом фенолів у листках та коренях неуражених вовчком рослин складно прогнозувати рівень стійкості до паразита.

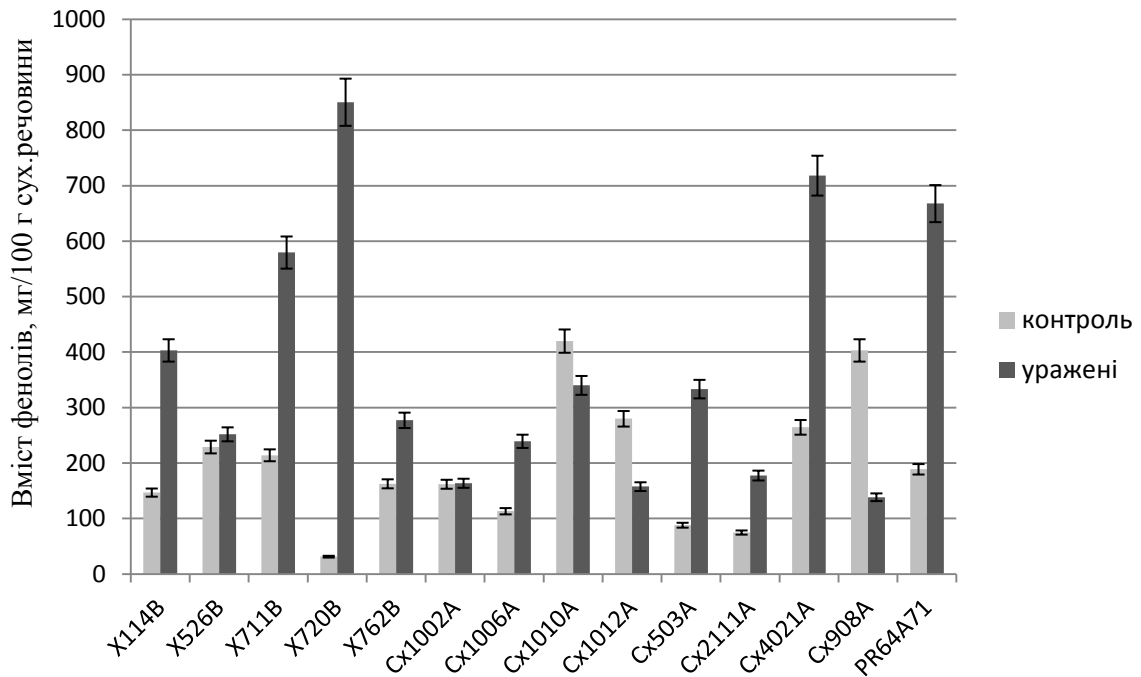


Рис. 4.4 Вміст фенольних сполук у коренях самоzapилених ліній соняшника за ураження вовчком

За ураження вовчком у всіх фертильних чоловічих ліній рівень фенолів значно підвищувався, при цьому у ліній X 114 В, X 526 В, X 720 В показники були на 44-98 % вищими за стандарт сприйнятливості, а у ліній X 762 В та X 711 В – лише на 12-25 %. У стерильних материнських ліній кількість фенольних сполук за ураження не значно перевищувала показники контрольних рослин, а в деяких випадках, навіть, була нижчою (Сх 2111 А). При цьому показники лінії-стандарту стійкості PR64A71 за ураження паразитом підвищувались на 31 % і в 2-3 рази перевищували показники лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Загальний вміст фенолів у листках та коренях самоzapилених ліній  
соняшника за ураження вовчком**

Лінія	Вміст фенолів, мг/100г маси сухої речовини			
	у листках		у коренях	
	контроль	уражені	контроль	уражені
X 114 B	567,0*±5,6	1148,8*±8,7	147,0*±7,1	403,2*±4,6
X 526 B	882,0*±7,6	1300,2*±8,8	229,1*±6,0	252,0*±4,5
X 711 B	478,8*±4,9	819,0*±6,9	214,2*±5,7	579,6*±5,3
X 720 B	163,8*±4,6	945,0*±5,8	31,5*±3,4	850,5*±5,8
X 762 B	667,8±6,8	730,8*±7,3	162,8*±5,1	277,2*±3,7
Cx 1002 A	730,8*±8,6	787,5*±8,5	162,0*±4,8	163,8±3,2
Cx 1006 A	655,2±5,9	844,2*±7,8	113,4*±3,9	239,4*±4,2
Cx 1010 A	1071,0*±7,9	1073,9*±6,6	420,0*±6,1	340,2*±3,1
Cx 1012 A	982,8*±8,5	1211,5*±7,4	280,0*±4,2	157,5±2,8
Cx 503 A	655,2±7,4	781,2*±6,9	88,2*±4,0	333,5*±4,1
Cx 2111A	840,0*±6,8	570,0*±5,7	75,0*±3,7	177,7±3,3
Cx 4021 A	1096,2*±9,1	1348,2*±7,8	264,6*±5,2	718,2*±5,3
<b>PR64A71</b>	945,0*±5,4	1234,8*±9,3	189,0*±6,1	667,8*±6,6
<b>Cx 908 A</b>	680,4±4,8	655,2±5,2	403,2±3,9	138,6±3,7

Показники вмісту фенольних сполук в листках контрольних рослин усіх гібридів були нижчими за показники лінії-стандарту стійкості, а в деяких випадках (гібриди Сайт, Борей) – і за показники лінії-стандарту сприйнятливості на 13-15 % (рис. 4.5).



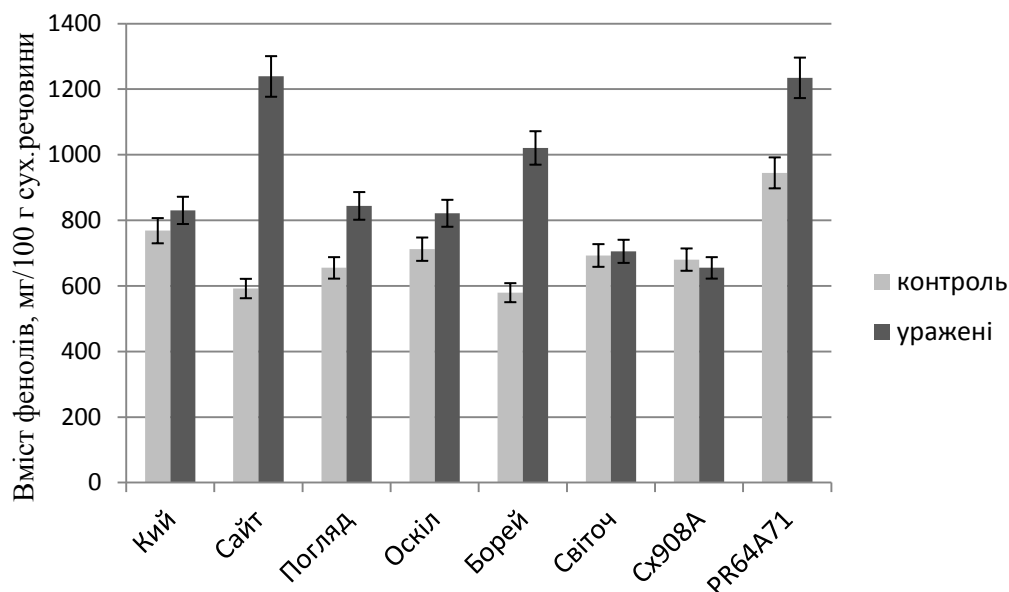


Рис. 4.5 Вміст фенольних сполук у листках гібридів соняшника за ураження вовчком у порівнянні з лініями-стандартами

Вміст фенолів у коренях контрольних рослин всіх гібридів був нижчим у порівнянні зі стандартом сприйнятливості і лише у гібридів Кий та Борей був вищим чи на рівні стандарту стійкості (рис. 4.6).

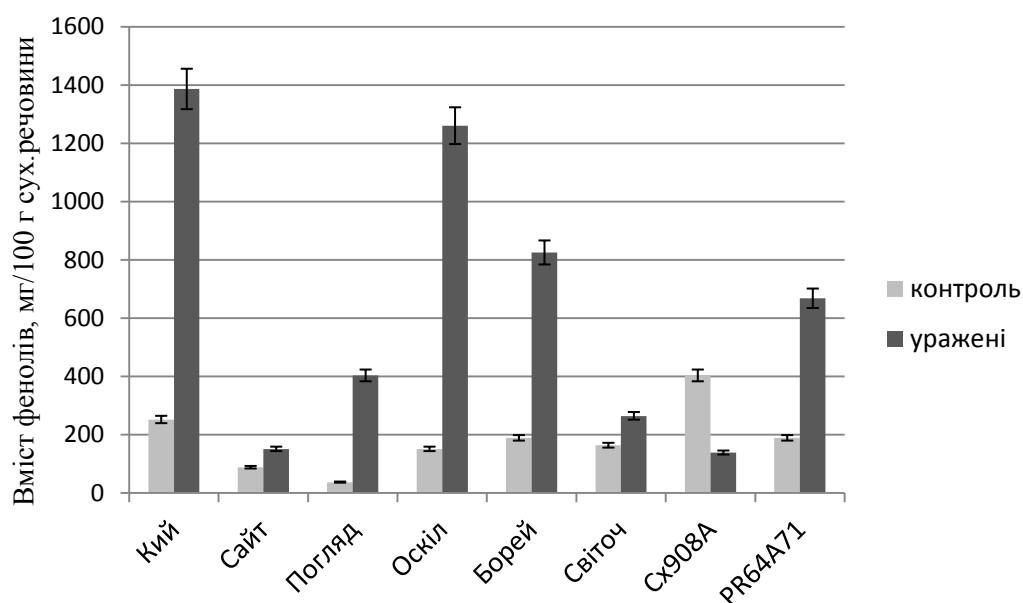


Рис. 4.6 Вміст фенольних сполук у коренях гібридів соняшника за ураження ВОВЧКОМ

За результатами визначення вмісту фенольних сполук відмічено їх перевищення у всіх гібридів, а також у лінії-стандарту стійкості до вовчка в листках та коренях уражених рослин проти контрольних, тоді як у лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А рівень фенолів за ураження незначно знижувався в листках (на 4 %) та майже в 3 рази в коренях (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Загальний вміст фенолів у листках та коренях гібридів соняшника за ураження вовчком у порівнянні з лініями-стандартами**

Гібрид	Вміст фенолів, мг/100г маси сухої речовини			
	у листках		у коренях	
	контроль	уражені	контроль	уражені
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	768,6*±7,2	830,5*±7,2	252,0*±4,7	1386,0*±7,9
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	592,2*±6,8	1239,0*±6,5	88,2*±3,7	151,2±5,1
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	655,2±7,1	844,2*±6,8	37,2*±3,2	403,2*±4,6
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	712,2*±7,3	821,7*±5,4	151,2*±5,4	1260,0*±7,7
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	579,6*±5,8	1021,0*±6,6	189,0*±5,8	825,0*±6,5
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	693,0±6,2	705,6*±4,9	163,8*±5,4	264,5*±4,4
<b>PR64A71</b>	945,0*±5,4	1234,8*±9,3	189,0*±6,1	667,8*±6,6
<b>Сх 908 А</b>	680,4±4,8	655,2±5,2	403,2±3,9	138,6±3,7

Висновки до розділу 4

1. За ураження вовчком (*Orobanchе ситана* Wallr.) рослин зразків-диференціаторів стійкості соняшника вміст фенолів у листках та в коренях більшості зразків підвищувався, в тому числі й стандарту стійкості гібрида PR64A71 (в 3 рази у порівнянні з контролем). При цьому вміст фенольних сполук у рослинах сприйнятливих ліній AD 66 та Сх 908 А знижувався за дії

паразита майже вдвічі порівняно з контролем.

2. За ураження вовчком самоzapилених ліній рівень фенолів у всіх ліній як в листках, так і в коренях значно підвищувався (12–40 %), а в окремих ліній – майже вдвічі за стандарт сприйнятливості.

3. За умов ураження квітковим паразитом у всіх гібридів, а також у лінії-стандарту стійкості до вовчка рівень фенольних сполук в листках та коренях уражених рослин в декілька разів збільшувався порівняно з контролем.

Матеріали розділу опубліковано та апробовано у таких публікаціях:

197. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Вміст фенольних сполук та морфометричні показники у зразків-диференціаторів соняшнику за умов ураження вовчком. Вісник аграрної науки Причорномор'я. вип. 4 (92). Миколаїв. 2016. С. 92–98.

198. Сахно Т. В. Вплив ураження вовчком на морфометричні показники та загальний вміст фенолів у ліній-диференціаторів соняшнику. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» 7-8 липня 2016 р. Харків. С. 18–19

199. Сахно Т. В. Морфометричні показники та вміст фенольних сполук у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Селекція і насінництво. Випуск 110. № 15. Харків. 2016. С. 117–122.

200. Сахно Т. В. Влияние заражения заразой на ростовые процессы и содержание фенольных соединений у линий и гибридов подсолнечника. Материалы IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 20-25 апреля 2015 р. Москва, Россия. С. 425–430.

201. Сахно Т. В. Рівень фенольних сполук у генотипів соняшнику з різною стійкістю до *Orobanche crotanica* Wallr. Збірник матеріалів

міжнародної наукової конференції «Стійкість соняшнику до біотичних та абіотичних факторів» 24-25 червня 2014 р. Харків. С. 67–68.

## РОЗДІЛ 5

### АКТИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ФЕРМЕНТІВ У РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ СОНЯШНИКА ЗА УРАЖЕННЯ ВОВЧКОМ

#### 5.1 Аналіз дослідного матеріалу за активністю ферментів

Дослідження зарубіжних вчених показали, що збільшення рівня фенолів може призвести до певних порушень метаболізму. При цьому вивчено динаміку активності поліфенолоксидази. Встановлено, що вона відповідала зміні вмісту фенолів [202, 203].

Досліджувалась роль окремих ферментів стосовно стійкості соняшника до *Orobanchе cumanа* Wallr. Так, відомо, що стійкість до вовчка пов'язана з активністю пероксидази (КФ 1.11.1.7), каталази (КФ 1.11.1.6), ендоглюконази (КФ 3.2.1.4) та поліфенолоксидази (КФ 1.10.3.1), які, як доведено, є важливими факторами стійкості до вовчка [204].

Досліджено зміну ферментної активності пероксидази, каталази, поліфенолоксидази при інфікуванні рослин перцю (*Capsicum annuum* L.) та тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) вірусом тютюнової мозаїки [171]. Щодо соняшника, у відомих дослідках під час інфікування вовчком, активність каталази спостерігали лише у стійких генотипів. У сприйнятливих вона не була виявлена [169].

##### 5.1.1 Динаміка активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів стійкості соняшника за ураження вовчком

Для створення дієвої методики оцінювання соняшника на стійкість до вовчка необхідно чітко встановити фазу розвитку живителя і паразита, на якій буде проведено аналіз. Гістологічні дослідження вчених світу вказують на те, що активна фаза проникнення гаусторіїв паразита у корені соняшника відбувається на 10-14 добу від початку сходів [50]. За нестачею інформації

щодо активності оксидоредуктаз у рослинах соняшника за ураження вовчком було вирішено з'ясувати динаміку активності ферментів на різних стадіях росту.

Проведено дослідження активності поліфенолоксидази у зразків-диференціаторів стійкості соняшника до вовчка на 10-, 14- та 18-денних проростках. Відмічено найнижчу активність поліфенолоксидази в листках контрольних рослин сприйнятливої лінії AD 66 у порівнянні з іншими диференціаторами (табл. 5.1).

*Таблиця 5.1*

**Динаміка активності поліфенолоксидази в листках зразків-диференціаторів стійкості до вовчка**

Зразок	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	уражені	контр.	уражені
AD 66	4,3±0,8	5,7±0,9	14,4±1,2	21,6±1,8	16,5±1,2	22,2±1,9
LC 1003	30,9±2,3	16,5±1,0	24,0±2,2	124,8±5,3	24,0±1,9	42,0±3,0
Рекорд	11,7±1,1	9,3±1,0	18,0±1,6	51,9±3,6	12,9±1,1	15,0±1,9
LC 1093	10,8±1,0	4,5±0,8	68,4±3,1	43,5±3,1	14,1±1,4	10,8±1,8

За результатами досліджень встановлено, що за ураження рослин вовчком активність поліфенолоксидази в листках сприйнятливої лінії AD 66 підвищувалась у порівнянні з контролем. При чому в листках 10- та 18-денних проростках на 32-34 % порівняно з контрольними рослинами, а у 14-денних – на 50 %. У інших зразків-диференціаторів відмічали як підвищення активності ферменту у відповідь на ураження вовчком, так і зниження. Так, у листках 10-денних проростків у всіх зразків крім сприйнятливої лінії, відмічали зниження активності поліфенолоксидази (табл. 5.1) за ураження вовчком на 25-50 % порівняно з контролем.

У 14- та 18-денних проростків сорту Рекорд та лінії LC 1003 спостерігали, навпаки, значне підвищення активності ферменту. На нашу

думку це пов'язано з різним рівнем стійкості та рівнем ураженості зразків-диференціаторів, адже лінія LC 1093 є більш стійкою порівняно з іншими.

Було вивчено динаміку активності поліфенолоксидази у зразків-диференціаторів за ураження вовчком (рис. 5.1, 5.2).

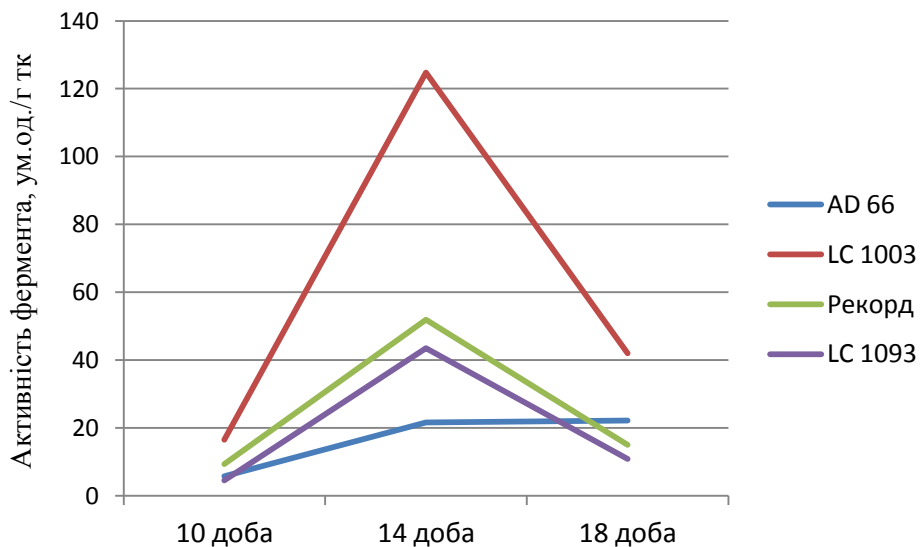


Рис. 5.1 Динаміка активності поліфенолоксидази в листках зразків-диференціаторів стійкості до вовчка

За ураження вовчком спостерігали суттєве підвищення активності ферменту в листках 14-денних проростків соняшника і подальший спад її у 18-денних проростків.

Дослідивши активність поліфенолоксидази в коренях зразків-диференціаторів, відмічали схожі закономірності (табл. 5.2).

Активність поліфенолоксидази в коренях сприйнятливої лінії підвищувалась у 10- та 18-денних проростків за ураження вовчком. В той же час, вона знижувалась у коренях 14-денних проростків за ураження паразитом порівняно з контролем на 66 %.

Щодо інших зразків-диференціаторів, то як у листі, так і в коренях активність ферменту варіювала. Так, за ураження вовчком спостерігали зниження активності ферменту в коренях 10- та 18-денних проростків лінії LC 1093 та сорту Рекорд у порівнянні з контрольними рослинами, і

підвищення активності у 14-денних проростків. Тобто, порівняно зі сприйнятливим зразком залежність протилежна.

Таблиця 5.2

**Динаміка активності поліфенолоксидази в коренях зразків-диференціаторів стійкості до вовчка**

Зразок	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	контр.	уражені	контр.
AD 66	4,8±1,1	9,0±1,0	27,0±2,2	16,2±1,4	45,0±3,0	48,0±3,3
LC 1003	15,0±1,3	24,0±1,8	21,6±2,1	25,2±2,4	18,0±1,7	16,2±1,5
Рекорд	18,0±2,0	6,0±1,1	15,6±1,6	15,6±1,6	18,0±1,7	10,2±1,0
LC 1093	18,6±2,1	9,6±1,2	22,8±2,3	34,8±2,8	28,2±2,6	18,0±1,5

Вивчаючи динаміку активності поліфенолоксидази в коренях зразків-диференціаторів, встановлено, що у всіх зразків за ураження квітковим паразитом відбувається сплеск активності ферменту на 14 добу після зараження і подальший її спад у більшості рослин, крім сприйнятливого зразка AD 66, в коренях якого активність ферменту продовжувала зростати (рис. 5.2).

Проаналізувавши активність пероксидази в рослинному матеріалі зразків-диференціаторів соняшника, на початковому етапі вегетації нами було відмічено найнижчу активність ферменту в листках контрольних рослин сприйнятливого зразка.

Надалі в листках контрольних рослин 14-денних проростків лінії LC 1093 та сорту Рекорд активність ферменту збільшувалась, а згодом знижувалась, про що свідчать показники контрольних 18-денних проростків (табл. 5.3). При цьому у лінії LC 1003 навпаки, спостерігали суттєве зниження активності ферменту в листках контрольних 14-денних проростків порівняно з 10- та 18-денними.



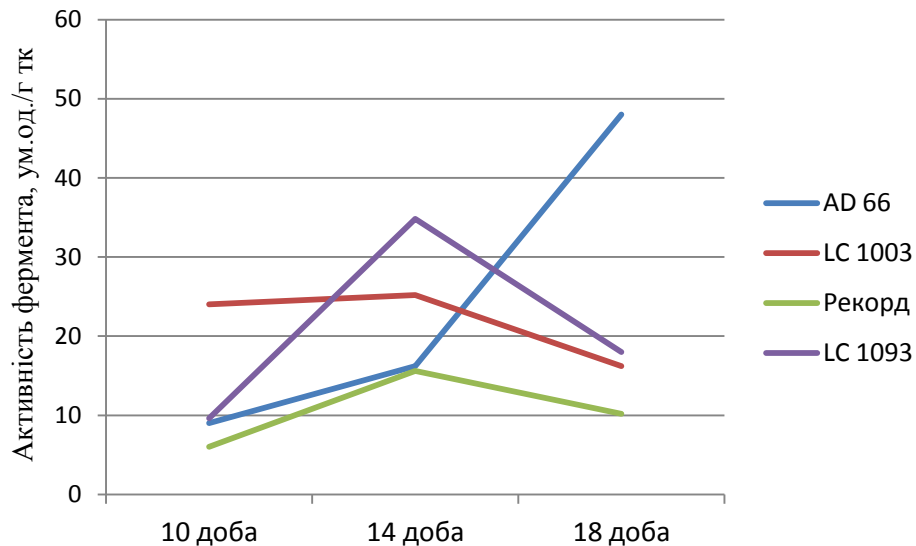


Рис. 5.2 Динаміка активності поліфенолоксидази в коренях зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

За умов ураження рослин соняшника вовчком відмічали зниження активності пероксидази порівняно з контролем у лінії LC 1093, тоді як у інших зразків на етапах 14 та 18 доби спостерігали істотне підвищення активності ферменту порівняно з контрольними рослинами.

Таблиця 5.3

**Динаміка активності пероксидази в листках зразків-диференціаторів стійкості до вовчка**

Зразок	Активність пероксидази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	контр.	уражені	контр.
AD 66	10,5±1,0	18,9±1,9	19,2±1,3	20,7±2,1	20,4±1,9	23,7±2,0
LC 1003	28,5±2,2	20,4±2,0	17,4±1,4	24,3±2,3	20,4±1,8	39,0±3,1
Рекорд	14,1±1,4	6,9±1,0	17,1±1,2	38,4±2,4	13,8±1,2	17,4±1,8
LC 1093	16,8±1,7	5,4±0,9	46,5±3,1	27,0±2,5	15,0±1,6	11,7±1,3

Було проаналізовано динаміку активності пероксидази в листках зразків-диференціаторів за ураження вовчком. Встановлено, що у

сприйнятливої лінії AD 66 та у лінії LC 1003 під час вегетації відбувається поступове підвищення активності ферменту, в той час, як у лінії LC 1093 та сорту Рекорд спостерігали пік активності пероксидази на 14 добу після зараження і спад її на 18 добу (рис 5.3).

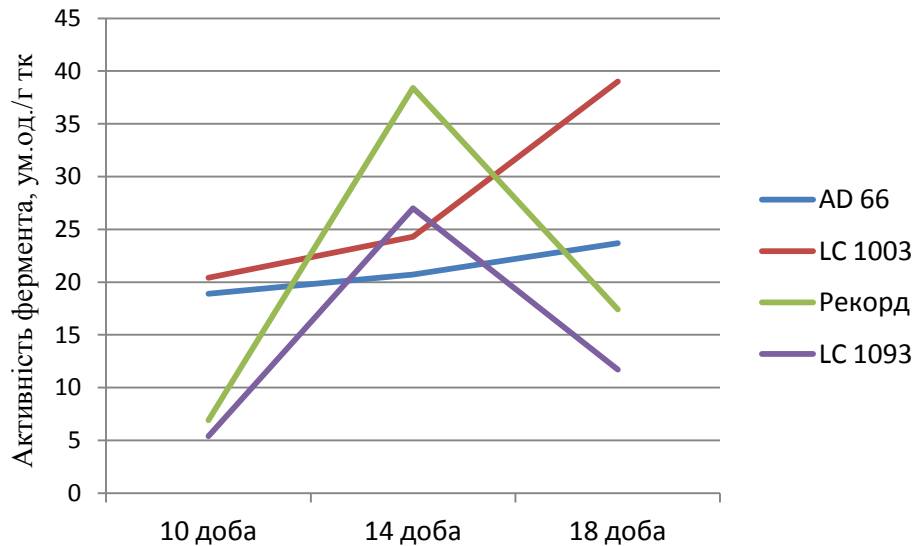


Рис. 5.3 Динаміка активності пероксидази в листках зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

У результаті досліджень активності пероксидази в коренях дослідних зразків було встановлено її підвищення в контрольних рослинах сприйнятливої лінії AD 66, лінії LC 1003 та сорту Рекорд впродовж вегетації, тоді як в коренях контрольних рослин лінії LC 1093 відмічено зростання активності ферменту на 14 добу та подальший її спад (табл. 5.4.). Імовірно, це пов'язано з особливостями генотипу та рівнем стійкості зразків до вовчка.

За ураження вовчком зразків-диференціаторів стійкості соняшника відмічали суттєве варіювання показників активності ферменту. Так, у 14-денних проростків всіх зразків, крім сприйнятливого, спостерігали значне підвищення активності пероксидази в коренях (на 8–61 %) порівняно з контролем.

При цьому у 10- та 18-денних проростків лінії LC 1093 та сорту Рекорд відмічено зниження активності пероксидази, подекуди вдвічі

порівняно з контролем. У той же час в коренях лінії LC 1003 відмічали підвищення показника на 10 та 14 добу після зараження вовчком на 44–61 % і подальше зниження активності пероксидази на 10 % у порівнянні з контролем.

Таблиця 5.4

**Динаміка активності пероксидази в коренях зразків-диференціаторів  
стійкості до вовчка**

Зразок	Активність пероксидази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	контр.	уражені	контр.
AD 66	19,8±1,4	21,6±2,4	28,2±2,2	17,4±1,6	47,4±3,4	48,0±6,5
LC 1003	19,2±1,5	27,6±2,5	23,4±1,9	37,8±3,0	27,0±2,6	24,6±2,3
Рекорд	22,8±2,3	16,2±1,8	21,0±1,9	22,8±2,5	24,0±2,4	14,4±1,5
LC 1093	25,2±2,5	12,0±1,1	27,6±2,4	31,2±2,6	24,6±1,8	21,0±1,6

У сприйнятливої лінії AD 66 спостерігали підвищення активності пероксидази в коренях 10-денних проростків 9 % у порівнянні з контролем, у 14-денних проростків активність ферменту була майже вдвічі нижчою порівняно з контролем, а у 18-денних проростків у коренях уражених рослин активність ферменту була на рівні контролю (табл. 5.4).

Проаналізувавши дані щодо зміни активності пероксидази в коренях дослідних зразків за ураження вовчком, встановлено, що у всіх зразків, крім сприйнятливої лінії AD 66, відбувався сплеск ферментативної активності на 14 добу після зараження і подальший її спад. Тоді як у лінії AD 66 спостерігали спад активності на 14 добу після зараження рослин вовчком і подальше її зростання (рис. 5.4).

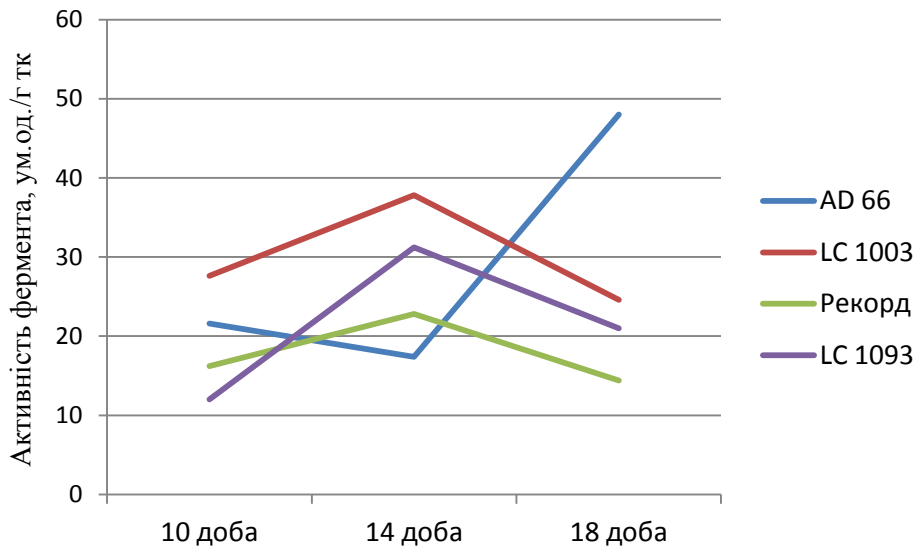


Рис. 5.4 Динаміка активності пероксидази в коренях зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

Що стосується активності каталази в рослинному матеріалі зразків-диференціаторів стійкості соняшника, то найвищі показники нами відмічено в листках контрольних рослин сприйнятливої лінії AD 66, що в 2-3 рази перевищували показники інших зразків (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

**Динаміка активності каталази в листках зразків-диференціаторів стійкості до вовчка**

Зразок	Активність каталази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	контр.	уражені	контр.
AD 66	0,52±0,06	0,32±0,05	0,54±0,04	0,15±0,02	0,47±0,05	0,26±0,03
LC 1003	0,21±0,02	0,15±0,02	0,18±0,02	0,12±0,02	0,2±0,04	0,13±0,01
Рекорд	0,24±0,04	0,15±0,03	0,18±0,04	0,16±0,03	0,19±0,02	0,14±0,02
LC 1093	0,16±0,03	0,42±0,06	0,18±0,03	0,1±0,01	0,17±0,03	0,13±0,02

Виявлено тенденцію до підвищення активності каталази в листках контрольних рослин упродовж перших 14 діб вегетації у ліній AD 66 та LC 1093 з подальшим її зниженням.

При цьому у лінії LC 1003 та сорту Рекорд відмічали тенденцію до зниження активності каталази в листках контрольних рослин на 14 добу вегетації і незначне її подальше підвищення.

За ураження рослин соняшника вовчком у всіх зразків-диференціаторів стійкості спостерігали зниження активності ферменту на 12-50 % на всіх дослідних етапах вегетації у порівнянні з контролем, а у сприйнятливої зразка активність ферменту була вдвічі нижчою порівняно з контролем (табл. 5.5).

Згідно з дослідженням динаміки активності каталази у листках дослідних зразків соняшника за ураження вовчком встановлено, що на 14 добу після зараження у більшості зразків відбувається зниження активності каталази порівняно з даними, отриманими на 10 добу після зараження, і подальше підвищення активності ферменту до початкового рівня. Окрім сорту Рекорд, у якого відмічено незначне підвищення активності ферменту на 14 добу та зниження її на 18 добу (рис. 5.5).

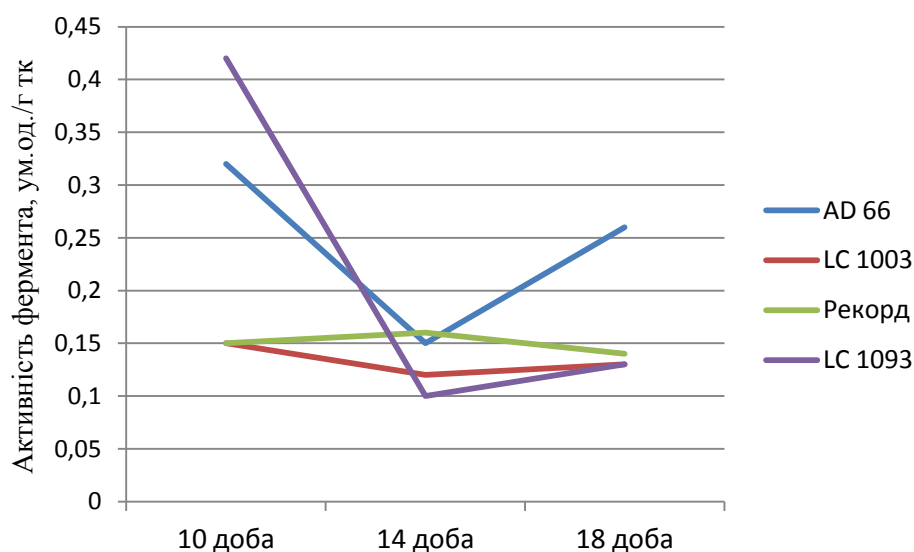


Рис. 5.5 Динаміка активності каталази в листках зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

Активність каталази в коренях зразків-диференціаторів стійкості до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.) була найвищою в коренях контрольних рослин сприйнятливого зразка AD 66 порівняно з контрольними рослинами інших зразків (табл. 5.6). Упродовж досліджуваних етапів вегетації спостерігали тенденцію до підвищення активності каталази в коренях контрольних рослин майже всіх зразків, крім лінії LC 1093, для якої характерним було зниження активності ферменту.

Таблиця 5.6

**Динаміка активності каталази в коренях зразків-диференціаторів стійкості до вовчка**

Зразок	Активність каталази, ум.од./г. тк.					
	10 діб		14 діб		18 діб	
	контр.	уражені	контр.	контр.	уражені	контр.
AD 66	0,30±0,05	0,15±0,01	0,43±0,05	0,2±0,03	0,31±0,03	0,23±0,01
LC 1003	0,19±0,02	0,1±0,01	0,2±0,02	0,3±0,03	0,23±0,02	0,27±0,02
Рекорд	0,21±0,02	0,46±0,04	0,24±0,03	0,64±0,05	0,25±0,02	0,37±0,04
LC 1093	0,24±0,03	0,17±0,03	0,15±0,02	0,25±0,03	0,17±0,03	0,20±0,03

Щодо визначення динаміки активності каталази в коренях дослідних зразків-диференціаторів за ураження вовчком відмічено суттєве її підвищення в коренях 14-денних проростків усіх досліджених зразків (рис. 5.6) Також відмічено подальше зниження активності ферменту у всіх зразків, крім сприйнятливої до вовчка лінії AD 66, активність каталази в коренях якої продовжувала зростати за ураження вовчком.

Таким чином, за результатами досліджень активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів стійкості до паразита встановлено, що суттєві зміни ферментної активності у відповідь на дію паразита відбуваються на 14 добу після зараження рослин соняшника вовчком, що, в свою чергу, підтверджує гістологічні дослідження і свідчить про проникнення *Orobanche cumana* Wallr. в корені саме на 14 добу [205].

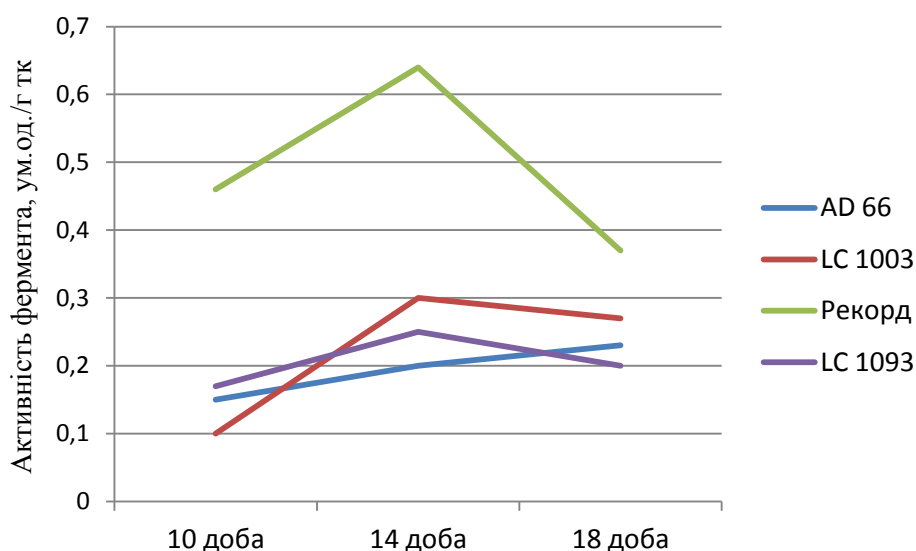


Рисунок 5.6 Динаміка активності каталази в коренях зразків-диференціаторів стійкості за ураження вовчком

Спираючись на отримані результати, доцільно використовувати саме 14-денні проростки в дослідженнях ферментної активності в рослинному матеріалі у відповідь на дію паразита з метою подальшої розробки прискореного методу оцінювання зразків соняшника на стійкість до вовчка.

### 5.1.2 Активність поліфенолоксидази дослідних генотипів соняшника

Поліфенолоксидаза практично майже скрізь розповсюджена у царстві Рослин і забезпечує окиснення фенольних сполук та відіграє певну роль у стійкості рослин до патогенів. Відомі роботи з вивчення експресії гена, що кодує поліфенолоксидазу при переносі в інші рослини. Описана важливість наявності ендогенних фенольних субстратів для високої активності поліфенолоксидази [206].

Активність поліфенолоксидази під час ураження соняшника патогенами вивчена дуже обмежено [33, 207]. Так, встановлено, що при ураженні кошиків соняшника збудником сірої гнилі (*Botrytis cinerea* Fr.).

поліфенолоксидаза у стійких рослин має вищу чутливість та швидко активується [166]. Це свідчить про те, що у кошиках стійких рослин у відповідь на ураження збудником сірої гнилі відбувається швидке окиснення поліфенолів, внаслідок чого швидкість утворення хімічного бар'єру з продуктів розпаду фенолів випереджає швидкість проникнення гриба [180, 208]. У нестійких рослин при ураженні патогеном активність поліфенолоксидази підвищується незначно або не підвищується зовсім.

Отже, можна очікувати, що рослини соняшника з різною стійкістю до вовчка мають різну активність поліфенолоксидази, показники якої характеризують стійкість соняшника до цього паразита незалежно від раси та в якійсь мірі характеризують стійкість до різних патогенів.

Ми дослідили активність поліфенолоксидази в різних частинах рослини (листки та корені) у різних за стійкістю генотипів соняшника [209, 210, 211]. За результатами наших досліджень було встановлено, що показники активності поліфенолоксидази різнилися у різних генотипів соняшника. Так, серед контрольних рослин (без зараження вовчком) найнижчі показники поліфенолоксидази в листках виявлено у лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А (66,9 ум.од.), що на 6 % нижче за показники лінії-стандарту стійкості PR64A71. Показники фертильних чоловічих ліній загалом були на рівні стандарту стійкості, зокрема лінії Х 114 В та Х 762 В, або перевищували його, як лінії Х 526 В, Х 711 В, Х 720 В та на 6 – 17 % були вищими за показники лінії-стандарту сприйнятливості (табл. 5.7).

У дослідженнях активності поліфенолоксидази в листках уражених вовчком рослин соняшника фертильних чоловічих ліній та лінії-стандарту сприйнятливості спостерігалась тенденція до зниження показників (на 2 – 15 % у порівнянні із контрольними рослинами). Окрім лінії-стандарту стійкості, показники якої за ураження підвищувались на 8 % у порівнянні із контрольними рослинами. В цілому ж показники досліджуваних ліній і



стандарту стійкості були вищими за показники лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А.

Таблиця 5.7

**Активність поліфенолоксидази в листках самоzapилених ліній  
соняшника**

Лінія	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	72,0±3,3	69,4±2,3*
X 526 В	73,0±5,0	70,2±3,0*
X 711 В	76,9±3,3*	71,4±2,7*
X 720 В	78,0±1,4*	76,3±2,4*
X 762 В	71,3±4,7	70,5±1,8*
Сх 503 А	76,3±2,4*	78,7±0,8*
Сх 1002 А	79,1±2,4*	80,2±0,9*
Сх 1006 А	82,2±2,4*	73,5±1,2*
Сх 1010 А	77,2±2,2*	73,9±1,3*
Сх 1012 А	70,0±3,0	73,5±1,2*
Сх 2111 А	69,1±1,3	83,5±2,1*
Сх 4021 А	75,6±3,0*	78,7±0,8*
<b>PR64A71</b>	<b>71,3±2,3</b>	<b>77,3±2,2*</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>66,9±3,1</b>	<b>56,6±3,3</b>

Дослідження активності поліфенолоксидази в листках стерильних материнських ліній показали, що загальна тенденція процесу у цих ліній відрізняється від фертильних чоловічих ліній (рис. 5.7). Так, серед контрольних рослин найвищі показники активності ферменту відмічали у ліній Сх 1006 А, Сх 1002 А, Сх 1010 А, що перевищували показники лінії-стандарту сприйнятливості на 15 – 23 % і на 8 – 15 % – стандарту стійкості. Найнижчі показники активності ферменту виявлено у ліній Сх 1012 А, Сх 2111 А, які перевищували показники лінії-стандарту сприйнятливості усього на 3 – 4 % і були на 2 – 3 % нижчими за стандарт стійкості.

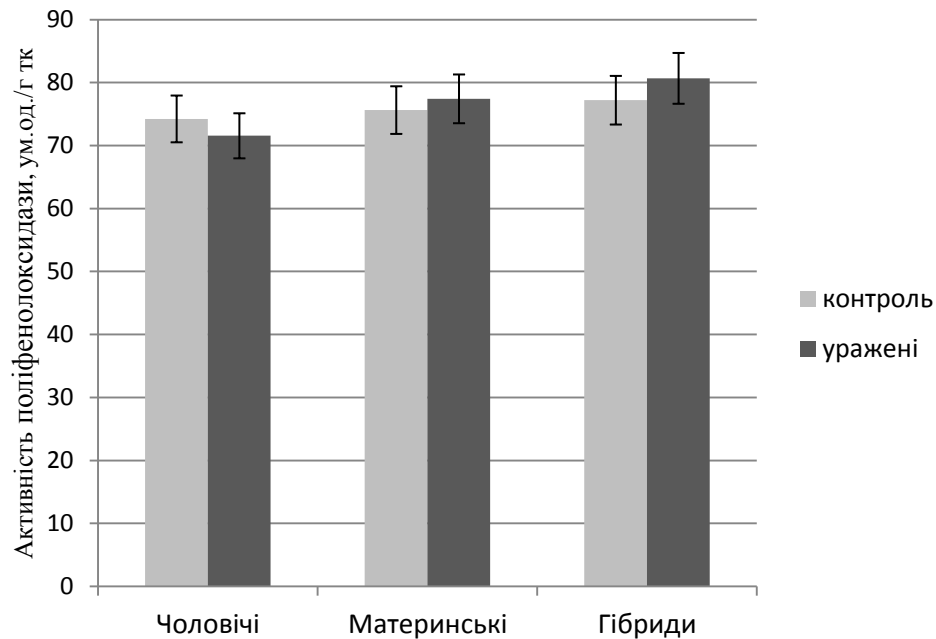


Рис. 5.7 Активність поліфенолоксидази в листках ліній та гібридів соняшника

Показники активності поліфенолоксидази за ураження вовчком більшої частини зразків, як і у стандарту стійкості, підвищувались на 2 – 17 % порівняно з контрольними рослинами, окрім стерильних материнських ліній Сх 1006 А, Сх 1010 А та стандарту сприйнятливості, показники яких знижувались у порівнянні із контролем.

Що стосується гібридів соняшника, то дослідження активності поліфенолоксидази в їх листі показали досить високий рівень у контрольних рослин, який у середньому перевищує показники батьківських компонентів (чоловічих та материнських ліній), а також стандартів.

Активність поліфенолоксидази у гібридів, створених на основі різних за стійкістю до вовчка ліній мала залежність від показника активності даного ферменту у батьківських компонентів. Так, при схрещуванні фертильних чоловічих ліній, які характеризувались дуже високою стійкістю до вовчка за каталогом та середньою за результатами досліджень (Х 762 В, Х 711 В) зі стерильними жіночими лініями з низьким та середнім рівнем стійкості (Сх 908 А, Сх 2111 А), гібриди (Кий та Погляд) мали найвищі показники активності поліфенолоксидази (табл. 5.8).

За ураження вовчком показники активності ферменту в усіх досліджуваних гібридів зростали та перевищували показники контрольних рослин на 4 – 6 %.

Таблиця 5.8

**Активність поліфенолоксидази в листках гібридів соняшника**

Гібрид	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.	
	контрольні	уражені
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	78,7±0,8*	81,6±1,5*
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	80,2±0,9*	85,4±0,9*
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	73,5±1,2*	76,7±0,8*
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	73,9±1,3*	77,1±1,4*
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	73,5±1,2*	75,5±1,6*
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	83,5±2,1*	87,8±1,2*
<b>PR64A71</b>	<b>71,3±2,3</b>	<b>77,3±2,2*</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>66,9±3,1</b>	<b>56,6±3,3</b>

Результати досліджень активності поліфенолоксидази в листках рослин соняшника показали, що у всіх досліджуваних ліній та гібридів показники активності ферменту контрольних рослин перевищували показники стандарту сприйнятливості. Це, з одного боку, підтверджує дані, отримані традиційним вегетаційним методом, та може свідчити про стійкість до паразита. Однак, з іншого боку, за цим показником складно прогнозувати стійкість до вовчка через різну реакцію на ураження паразитом фертильних чоловічих, стерильних материнських ліній та гібридів, створених на основі цих ліній.

Матеріалом для наших досліджень були не тільки зелені частини рослин соняшника (листки, сім'ядолі), а також корені різних за стійкістю ліній та гібридів соняшника.

Найвищі показники відмічали у лінії X 720 В та у лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А, які на 9 % і 23 % перевищували показники стандарту стійкості (табл. 5.9).

Таблиця 5.9

**Активність поліфенолоксидази в коренях самоzapилених ліній  
соняшника**

Лінія	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	20,1±1,6*	19,5±1,3*
X 526 В	18,6±1,4*	12,7±1,1*
X 711 В	27,8±1,2*	16,7±1,1*
X 720 В	38,9±2,2*	16,2±1,0*
X 762 В	26,8±1,0*	11,8±0,8*
Сх 503 А	29,9±3,1*	43,5±2,7
Сх 1002 А	31,4±2,2*	29,8±2,0*
Сх 1006 А	33,5±2,1*	29,2±1,7*
Сх 1010 А	32,7±1,7*	28,4±1,4*
Сх 1012 А	31,4±1,6*	31,6±1,1*
Сх 2111 А	29,5±1,2*	27,4±1,5*
Сх 4021 А	36,6±1,8*	27,0±1,5*
<b>PR64A71</b>	<b>35,7±1,2*</b>	<b>38,9±1,4</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>44,1±0,9</b>	<b>41,9±1,2</b>

Аналіз активності поліфенолоксидази в коренях контрольних рослин фертильних чоловічих ліній соняшника дозволив виявити, що їх показники, як і у лінії-стандарту стійкості, були нижчими на 12 – 60 % за показники стандарту сприйнятливості. Крім того, показники у фертильних чоловічих ліній були нижчими або на рівні ( X 720 В) стандарту стійкості.

Як у дослідних ліній, так і у лінії-стандарту сприйнятливості за ураження вовчком також спостерігали тенденцію до зниження рівня активності ферменту (від 3 % до 58 % у порівнянні з контрольними

рослинами) (рис.5.8). При цьому, в коренях рослин стандарту стійкості показники дещо підвищувались (на 9 % у порівнянні з контрольними рослинами), як і в листках.

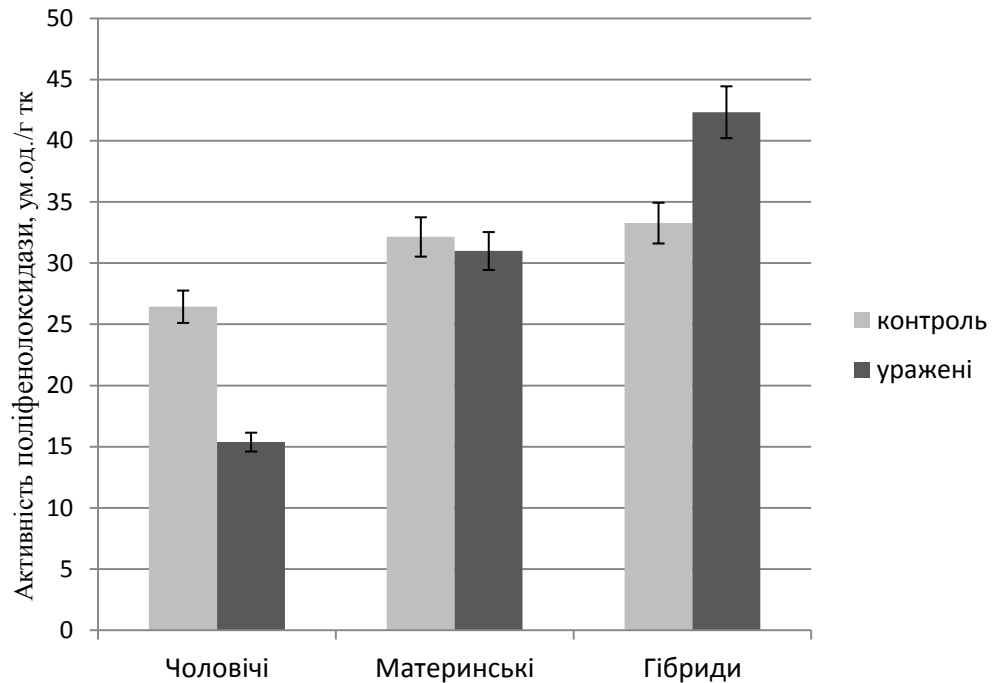


Рис. 5.8 Активність поліфенолоксидази в коренях ліній та гібридів соняшника

Що стосується активності поліфенолоксидази в коренях стерильних материнських ліній, то тут також відмічено подібну тенденцію, що і у фертильних чоловічих ліній.

Показники у контрольних рослин були дещо нижчими або на рівні стандарту стійкості, при цьому значно нижчими за показники лінії-стандарту сприйнятливості.

За ураження вовчком також спостерігали зниження активності поліфенолоксидази в коренях майже всіх стерильних материнських ліній на 7 – 26 % і лише у стерильної материнської лінії Сх 503 А – підвищення активності ферменту на 31 % порівняно з контрольними рослинами.

Активність поліфенолоксидази в коренях контрольних рослин гібридів соняшника була також нижчою за показники стандарту

сприйнятливості до вовчка і незначно нижчою або на рівні стандарту стійкості (табл. 5.10).

Найнижчий та найвищий показники активності ферменту в коренях відмічали у гібридів Сайт та Оскіл відповідно.

Таблиця 5.10

**Активність поліфенолоксидази в коренях гібридів соняшника**

Гібрид	Активність поліфенолоксидази, ум.од./г. тк.	
	контрольні	уражені
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	33,3±2,6*	41,3±3,3
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	30,4±1,9*	43,3±2,5
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	38,8±2,4*	41,9±1,9
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	33,7±1,8*	39,7±1,8
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	29,9±1,5*	40,9±2,1
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	33,5±1,7*	46,9±1,5*
<b>PR64A71</b>	<b>35,7±1,2*</b>	<b>38,9±1,4</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>44,1±0,9</b>	<b>41,9±1,2</b>

Однак, як і в листках, у коренях досліджених гібридів за ураження квітковим паразитом показники активності поліфенолоксидази всіх зразків підвищувались на 7 – 27 % у порівнянні із контрольними рослинами.

### 5.1.3 Активність пероксидази дослідних генотипів соняшника

Вчені світу відмічають зміну активності пероксидази за ураження стійких та сприйнятливих зразків соняшника збудником несправжньої борошнистої роси. В ході аналізу активності ферменту з використанням гваяколу як субстрату для реакції було визначено, що активність пероксидази підвищується за умов ураження патогеном. При цьому показники стійких зразків соняшника перевищують показники

сприйнятливих [37]. Це, вірогідно, пов'язано із окиснювальним стресом, причиною якого є інфекція рослини, та є наслідком активації антиоксидантного захисту [212].

Щодо соняшника, то встановлена більш висока активність пероксидази у стійких до *Orobanche cumana* Wallr. рослин після ураження їх паразитом у порівнянні зі здоровими, у сприйнятливих генотипів вона майже не відрізнялась [35].

В результаті досліджень активності пероксидази в листках різних генотипів соняшника виявлено, що показники контрольних рослин лінії-стандарту сприйнятливості перевищували показники стандарту стійкості на 37 % (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

#### Активність пероксидази в листках самоzapилених ліній соняшника

Лінія	Активність пероксидази, ум.од./г. тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	20,0±1,4*	31,5±1,6*
X 711 В	28,3±1,6*	20,4±1,1*
X 720 В	20,6±0,8*	13,3±0,6*
X 762 В	8,3±0,5*	7,0±0,6*
X 526 В	12,5±1,2*	7,5±0,8
Cx 503 А	10,1±0,8*	12,4±0,7*
Cx 1002 А	13,6±1,1*	17,1±1,1*
Cx 1006 А	19,2±1,1*	24,4±1,2*
Cx 1010 А	9,4±0,8*	8,8±0,6
Cx 1012 А	15,6±1,2	15,1±1,5*
Cx 2111 А	7,8±0,6*	7,7±1,0
Cx 4021 А	11,1±0,7*	13,6±0,8*
<b>PR64A71</b>	<b>11,8±0,6*</b>	<b>11,7±0,8*</b>
<b>Cx 908 А</b>	<b>16,2±1,1</b>	<b>8,7±0,7</b>

При цьому показники інших ліній різнились між собою. Так, найвищий показник виявлено у стерильної материнської лінії Сх 1006 А, який на 18 % перевищував стандарт сприйнятливості та на 63 % був вищим за стандарт стійкості. Найнижчі показники активності пероксидази відмічено у стерильних материнських ліній Сх 1010 А, Сх 2111 А, Сх 503 А, які на 38 – 52 % були нижчими за показники лінії-стандарту сприйнятливості та на 14 – 34 % – стандарту стійкості.

За ураження рослин вовчком виявлено загальну тенденцію до зниження показників активності ферменту. Так, наприклад, у лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А показники знижувались на 46 % порівняно з контрольними рослинами. Однак, показники стандарту стійкості, як і стерильних материнських ліній Сх 1012 А, Сх 2111 А за ураження квітковим паразитом не змінювались, а у ліній Сх 1002 А, Сх 1006 А, Сх 4021 А, Сх 503 А, навпаки, 19 – 21 % підвищувались у порівнянні з контролем.

Аналогічну ситуацію спостерігали в результаті аналізу даних активності пероксидази у фертильних чоловічих ліній. Показники контрольних рослин у таких ліній як Х 114 В, Х 711 В, Х 720 В перевищували показники стандарту стійкості та лінії-стандарту сприйнятливості. В той же час показники таких ліній як Х 526 В, Х 762 В, навпаки, були нижчими або відповідали рівню стандарту стійкості та значно нижчими за показник лінії-стандарту сприйнятливості.

За ураження вовчком майже у всіх досліджених фертильних чоловічих ліній показники знижувались на 16 – 28 % у порівнянні з контрольними рослинами, крім лінії Х 114 В, показники якої підвищувались на 37 % (рис. 5.9).

У контрольних рослинах гібридів соняшника також відмічено велику різницю за показниками. Так, найвищими вони були у гібридів Світоч, Оскіл та Борей і на 14 – 36 % перевищували показники лінії-стандарту сприйнятливості та на 57 – 86 % – стандарту стійкості. Найнижчі показники



відмічено у гібридів Кий та Сайт, які були на 50 – 57 % нижчими за показник лінії-стандарту сприйнятливості та на 30 – 40 % – стандарту стійкості.

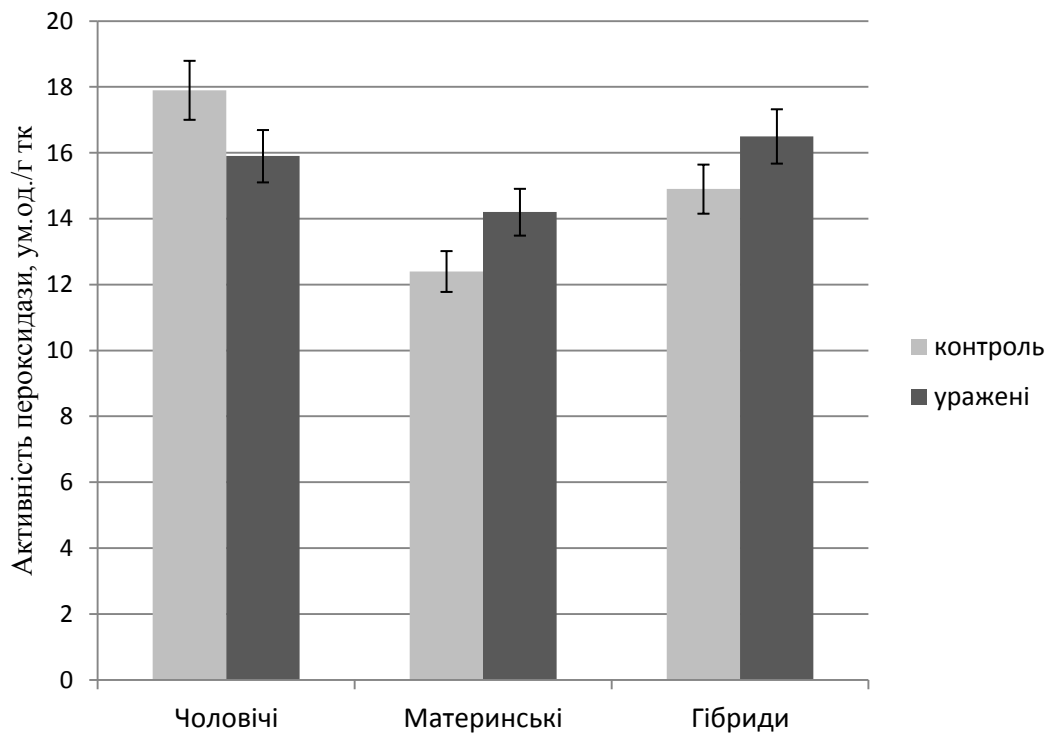


Рис. 5.9 Активність пероксидази в листках ліній та гібридів соняшника

За умов ураження вовчком рослин гібридів показники активності пероксидази, які в контролі мали найвищий рівень, знижувались на 4 – 38 %, тоді як показники активності ферменту в рослинах тих гібридів, які в контролі мали найнижчий їх рівень, підвищувались в 2-3 рази за ураження паразитом (табл. 5.12).

Активність пероксидази в коренях досліджених зразків була вищою, ніж в листках, що безумовно пов'язано з особливостями фізіологічних процесів, які проходять у коренях (рис. 5.10).

Таблиця 5.12

## Активність пероксидази в листках гібридів соняшника

Гібрид	Активність пероксидази, ум.од./г тк.	
	контрольні	уражені
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	20,1±1,3*	16,1±0,8*
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	7,0±0,6*	19,6±1,1*
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	22,0±1,4*	13,7±1,1*
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	8,1±0,7*	15,4±1,0*
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	13,9±1,1*	16,2±1,4*
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	18,5±1,3	17,7±1,1*
<b>PR64A71</b>	<b>11,8±0,6*</b>	<b>11,7±0,8*</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>16,2±1,1</b>	<b>8,7±0,7</b>

За результатами досліджень встановлено, що показники активності пероксидази контрольних рослин стандарту стійкості перевищували на 17 % показники лінії-стандарту сприйнятливості [213].

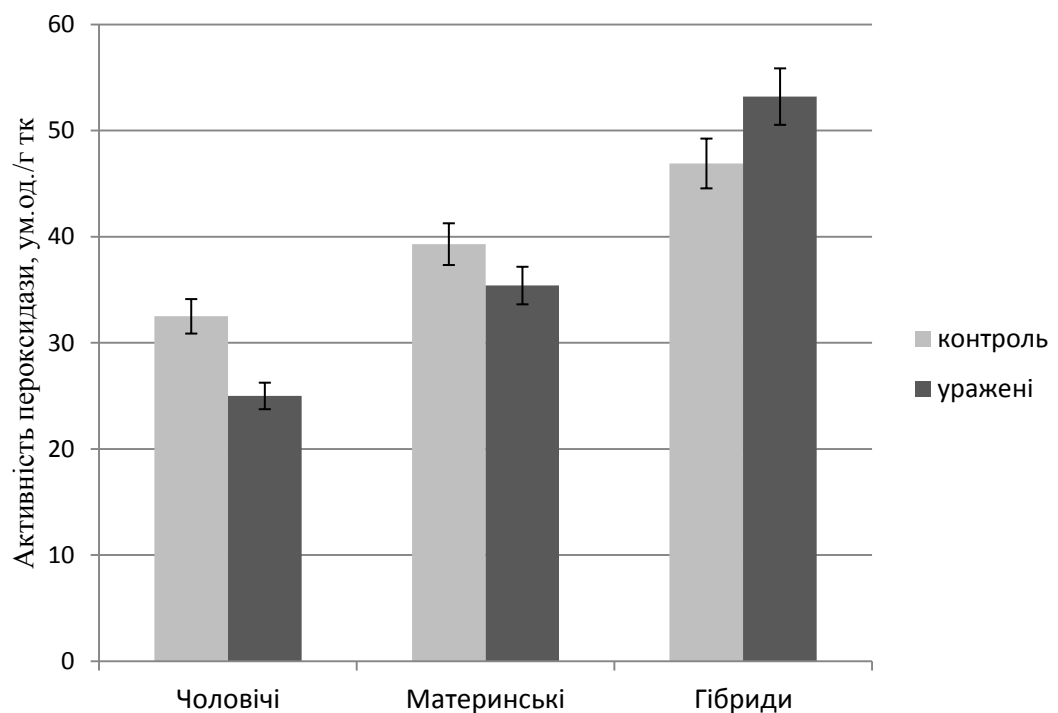


Рис. 5.10 Активність пероксидази в коренях ліній та гібридів соняшника

У той же час, показники майже всіх дослідних стерильних материнських ліній перевищували показник лінії-стандарту сприйнятливості на 12 – 28 %, та відповідали рівню або були дещо нижчими за показник стандарту стійкості, крім стерильної материнської лінії Сх 503 А, показники якої на 20 % були нижчі за показник лінії-стандарту сприйнятливості та на 32 % – стандарту стійкості (табл. 5.13).

Таблиця 5.13

#### Активність пероксидази в коренях самоzapилених ліній соняшника

Лінія	Активність пероксидази, ум.од./г.тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	24,8±1,3*	36,6±1,4*
X 711 В	21,1±1,1*	24,5±1,1*
X 720 В	45,5±2,0*	27,5±1,0
X 762 В	38,5±1,4	18,9±0,9*
X 526 В	32,5±1,2	17,6±0,8*
Сх 503 А	28,1±1,4*	12,8±1,2*
Сх 1002 А	39,8±1,88	37,0±2,0*
Сх 1006 А	41,5±1,9*	39,8±1,8*
Сх 1012 А	39,7±1,5*	39,5±1,8*
Сх 1010 А	41,0±1,5*	38,5±1,7*
Сх 2111 А	39,8±1,4*	38,2±1,6*
Сх 4021 А	45,3±2,1*	42,2±1,9*
<b>PR64A71</b>	<b>41,5±1,3*</b>	<b>42,3±1,1*</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>35,4±0,9</b>	<b>27,1±0,7</b>

За умов ураження вовчком показник активності пероксидази у рослин лінії-стандарту сприйнятливості знижувався на 23 % порівняно з контролем, тоді як даний показник у рослин стандарту стійкості дещо збільшувався. Активність ферменту у дослідних стерильних материнських ліній за ураження паразитом знижувались на 7 – 55 % у порівнянні із контрольними рослинами.

Активність пероксидази в коренях контрольних рослин фертильних чоловічих ліній соняшника була суттєво нижчою за показники стандарту стійкості та лінії-стандарту сприйнятливості, окрім показників ліній X 720 В та X 762 В, які були вищими за показник лінії-стандарту сприйнятливості на 28,5 % та 9 % відповідно. За умов ураження рослин вовчком спостерігали загальну тенденцію до зниження показників майже у всіх ліній у 2 рази порівняно з контрольними рослинами, окрім ліній X 114 В та X 711 В, показники яких зростали на 16 – 48 %.

Щодо активності пероксидази в коренях гібридів соняшника, то всі показники контрольних рослин суттєво перевищували показники стандартів, найвищою активністю пероксидази була у рослин гібридів Оскіл та Погляд (табл. 5.14).

Таблиця 5.14

**Активність пероксидази в коренях гібридів соняшника**

Гібрид	Активність пероксидази, ум.од./г тк.	
	контрольні	уражені
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	42,2±2,1*	47,7±1,7*
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	44,8±1,8*	55,9±2,7*
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	51,4±1,7*	53,5±0,9*
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	46,6±0,9*	41,2±0,6*
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	50,6±3,1*	73,2±3,7*
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	45,6±1,7*	47,9±1,5*
<b>PR64A71</b>	<b>41,5±1,3*</b>	<b>42,3±1,1*</b>
<b>Сх908А</b>	<b>35,4±0,9</b>	<b>27,1±0,7</b>

При цьому за ураження *Orobanche crotanana* Wallr. у більшості гібридів відмічали збільшення показників на 4 – 45 % у порівнянні з контрольними рослинами, крім гібрида Сайт, активність пероксидази якого знижувалась на 9 %.

Таким чином, результати досліджень активності пероксидази різних за стійкістю генотипів соняшника не забезпечують достовірності прогнозування стійкості до вовчка за активністю даного ферменту, однак свідчать про важливу роль пероксидази у формуванні захисних реакцій рослин соняшника у відповідь на дію паразита [214, 215].

#### 5.1.4 Активність каталази дослідних генотипів соняшника

За активністю каталази в листках та коренях різних за стійкістю до вовчка генотипів соняшника встановлено, що показники контрольних рослин лінії-стандарту сприйнятливості істотно нижчі (майже втричі) порівняно зі стандартом стійкості (табл. 5.15).

Таблиця 5.15

#### Активність каталази в листках самоzapилених ліній соняшника

Лінія	Активність каталази, ум.од./г тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	3,4±0,5*	4,3±0,5*
X 711 В	2,8±0,4	1,3±0,2*
X 720 В	7,1±1,3*	8,0±0,6*
X 762 В	7,7±2,0*	4,5±0,6*
X 526 В	1,9±0,3	3,5±0,4
Cx 503 А	6,3±0,5*	8,8±0,5*
Cx 1002 А	4,0±0,5*	4,0±0,8
Cx 1006 А	2,6±0,4	6,0±0,7*
Cx 1010 А	3,5±0,6*	3,6±0,6
Cx 1012 А	2,7±0,6	3,6±0,7
Cx 2111 А	3,4±0,6*	5,8±0,6*
Cx 4021 А	8,8±0,7*	8,2±1,1*
<b>PR64A71</b>	<b>5,6±0,6*</b>	<b>6,5±0,7*</b>
<b>Cx 908 А</b>	<b>2,1±0,4</b>	<b>3,1±0,5</b>

При цьому показники у контрольних рослин стерильних материнських ліній різнилися між собою. Високу активність каталази виявили у ліній Сх 503 А, Сх 4021 А, що в 3-4 рази більше за показник лінії-стандарту сприйнятливості та на 12 – 57 % – стандарту стійкості (табл. 5.15). Найнижчі показники активності каталази відмічено у ліній Сх 1006 А та Сх 1012 А, що вдвічі менше за показник активності ферменту у стандарту стійкості. В цілому ж, показники активності каталази в листках контрольних рослин всіх материнських ліній перевищували показник лінії-стандарту сприйнятливості Сх 908 А [216, 217].

За умов ураження вовчком відмічено загальну тенденцію до підвищення активності ферменту (рис. 5.11).

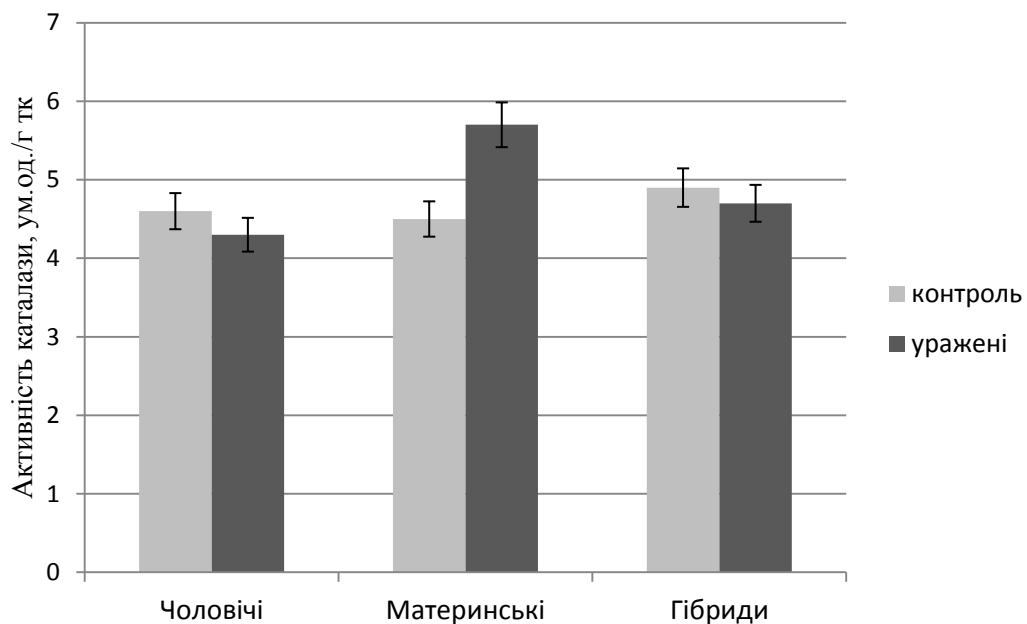


Рис. 5.11 Активність каталази в листках ліній та гібридів соняшника

Так, у всіх досліджених стерильних материнських ліній активність каталази підвищувалась на 33 – 130 % , крім лінії Сх 4021 А, показник якої несуттєво знижувався, а показники у стандарту стійкості та лінії-стандарту сприйнятливості збільшувались на 16 % та 47 % відповідно.

Активність каталази в листках контрольних рослин фертильних чоловічих ліній соняшника також варіювала, однак у цілому перевищувала показник лінії-стандарту сприйнятливості [218].

Найвищі показники відмічено у ліній X 720 В та X 762 В, які перевищували показники як лінії-стандарту сприйнятливості, так і стандарту стійкості. Найнижчу активність каталази в листках контрольних рослин виявлено у лінії X 526 В, що відповідала рівню лінії-стандарту сприйнятливості

В листках уражених рослин фертильних чоловічих ліній активність каталази в цілому підвищувалась на 26 – 85 %, окрім ліній X 711 В та X 762 В, показники активності ферменту яких знижувались майже вдвічі у порівнянні з контрольними рослинами (табл. 5.15).

У результаті аналізу активності каталази в листках контрольних рослин гібридів соняшника, встановлено, що їх показники значно перевищували показники активності даного ферменту у лінії-стандарту сприйнятливості та в більшості випадків – і стандарту стійкості (табл. 5.16).

Таблиця 5.16

**Активність каталази в листках гібридів соняшника**

Гібрид	Активність каталази, ум.од./г тк.	
	контрольні	уражені
Кий (Сх 908 А / X 762 В)	3,2±0,4*	2,7±0,5
Сайт (Сх 1012 А / X 526 В)	4,6±0,5*	5,6±0,7*
Погляд (Сх 2111 А / X 711 В)	3,1±0,3*	3,5±0,5
Оскіл (Сх 1006 А / X 720 В)	6,6±0,4*	4,9±0,5*
Борей (Сх 503 А / X 114 В)	6,2±0,5*	6,1±0,6*
Світоч (Сх 1006 А / X 711 В)	5,9±0,4*	5,3±0,5*
<b>PR64A71</b>	<b>5,6±0,6*</b>	<b>6,5±0,7*</b>
<b>Сх 908 А</b>	<b>2,1±0,4</b>	<b>3,1±0,5</b>

За умов ураження вовчком виявлено різну реакцію рослин на проникнення паразита. Так, к наприклад, у гібридів Світоч, Погляд, Борей, Сайт відмічено зниження активності каталази в листках на 1,5 – 25 %, а у гібридів Кий, Оскіл – підвищення активності ферменту на 13 – 22 %.

Згідно з результатами досліджень встановлено, що активність каталази в коренях контрольних рослин стандарту сприйнятливості була нижчою на 8 % за показник стандарту стійкості. В цілому ж показники контрольних рослин всіх стерильних материнських ліній були значно нижчими за показники стандартів (табл. 5.17).

Таблиця 5.17

#### Активність каталази в коренях самоzapилених ліній соняшника

Лінія	Активність каталази, ум.од./г.тк.	
	контрольні	уражені
X 114 В	2,3±0,3*	3,6±0,4*
X 711 В	4,1±0,5	2,5±0,3*
X 720 В	4,8±0,4*	3,0±0,3*
X 762 В	2,8±0,3	1,9±0,2*
X 526 В	3,7±0,3	3,6±0,3*
Cx 503 А	1,5±0,3*	2,2±0,3*
Cx 1002 А	3,2±0,3	2,0±0,3*
Cx 1006 А	3,5±0,5	2,3±0,4*
Cx 1010 А	2,5±0,4*	2,3±0,4*
Cx 1012 А	2,8±0,4	2,6±0,4*
Cx 2111 А	3,1±0,5	2,5±0,4*
Cx 4021 А	2,7±0,3	2,7±0,3*
<b>PR64A71</b>	<b>3,7±0,6</b>	<b>6,8±0,5</b>
<b>Cx 908 А</b>	<b>3,4±0,4</b>	<b>6,0±0,6</b>

За ураження рослин соняшника вовчком активність каталази в коренях усіх стерильних материнських ліній знижувалась на 8 – 19 %, окрім



лінії Сх 503 А, лінії-стандарту сприйнятливості та стандарту стійкості, показники яких збільшувались на 47 %, 76 % та 84 % відповідно.

Що стосується фертильних чоловічих ліній соняшника, то результати досліджень активності каталази в коренях їх контрольних зразків дозволили виявити значне варіювання. Так, показники активності ферменту у ліній Х 114 В та Х 762 В були нижчими за показники лінії-стандарту сприйнятливості та стандарту стійкості, а показники активності цього ж ферменту у ліній Х 711 В, Х 720 В та Х 526 В, навпаки, вищими.

За ураження генотипів соняшника вовчком (*Orobanche cumanana* Wallr.) спостерігали загальну тенденцію до зниження активності каталази (рис. 5.12).

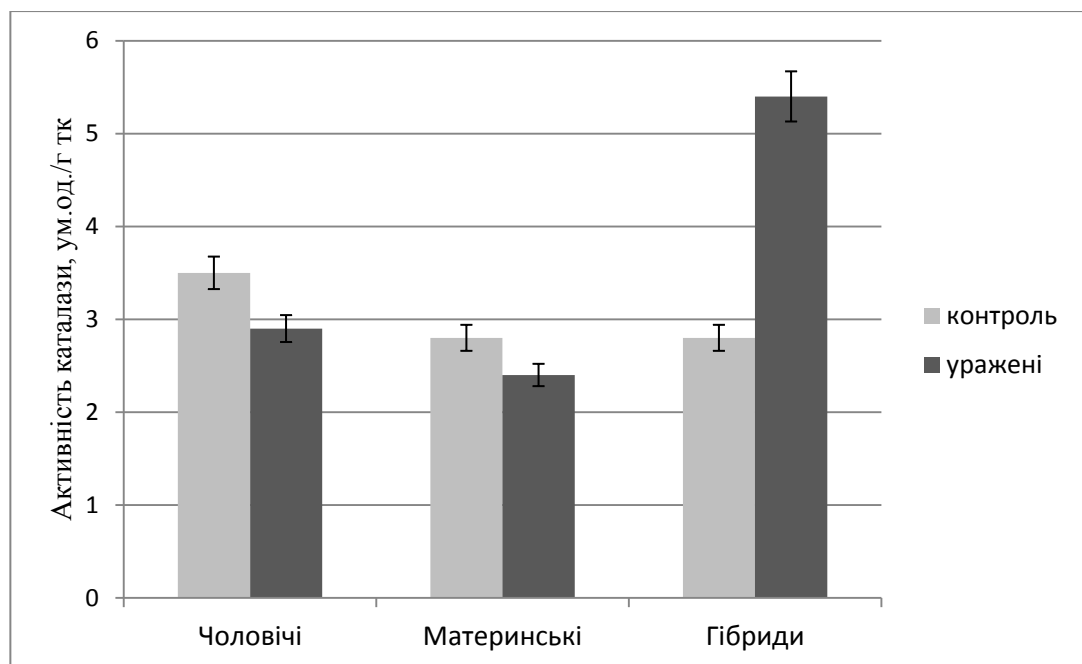


Рис. 5.12 Активність каталази в коренях ліній та гібридів соняшника.

Так, за умов ураження паразитом показники активності ферменту більшості фертильних чоловічих ліній знижувались на 3 – 32 %, крім лінії-стандарту сприйнятливості, стандарту стійкості та лінії Х 114 В, показник якої підвищувався на 57 % у порівнянні з контрольними рослинами (табл. 5.18).

Таблиця 5.18

**Активність каталази в коренях гібридів соняшника**

Гібрид	Активність каталази, ум.од./г тк.	
	контроль	уражені
Борей (Сх 503 А / Х 114 В)	3,3±0,4	5,7±0,5
Кий (Сх 908 А / Х 762 В)	2,6±0,3	3,7±0,4*
Оскіл (Сх 1006 А / Х 720 В)	3,4±0,4	4,7±0,5*
Сайт (Сх 1012 А / Х 526 В)	2,5±0,3*	3,5±0,4*
Погляд (Сх 2111 А / Х 711 В)	2,3±0,3*	8,8±0,6*
Світоч (Сх 1006 А / Х 711 В)	2,6±0,3	5,8±0,5
<b>PR64A71</b>	<b>3,7±0,6</b>	<b>6,8±0,5</b>
<b>Сх908А</b>	<b>3,4±0,4</b>	<b>6,0±0,6</b>

Показники контрольних рослин усіх гібридів соняшника за результатами досліджень були суттєво нижчими за показники стандарту стійкості та лінії-стандарту сприйнятливості. При цьому за ураження рослин вовчком відмічали істотне підвищення активності каталази в коренях досліджуваних гібридів майже в 2-3 рази порівняно з контрольними рослинами.

## 5.2 Розробка біохімічного методу оцінювання соняшника на стійкість до вовчка

Враховуючи вище наведені результати дослідів, можна зробити висновок, що за активністю поліфенолоксидази та пероксидази складно прогнозувати стійкість зразків соняшника до вовчка [210]. Однак за активністю каталази в більшості випадків можна судити про потенційну стійкість зразків до паразита [216].

Відомі способи визначення стійкості вихідного матеріалу соняшника до вовчка – вегетаційний, гістологічний, біохімічний, молекулярний.

Недоліками зазначених способів є тривалість проведення, недостатня інформативність та висока енергоємність.

Прототипом біохімічного методу оцінювання зразків соняшника на стійкість до *Orobanche cumana* Wallr. був спосіб визначення стійкості вегетаційним методом [34]. Він полягає в отриманні проростків на штучному інфекційному фоні в умовах фітотрону при контрольованих температурі повітря +24 – 28 С°, відносній вологості повітря 70-80 % та освітленні 18-20 кЛюкс при 16-годинному фотоперіоді та подальшій їх диференціації на стійкі та сприйнятливі. Ураженість зразків соняшника при цьому визначають на 30-40 добу від дня зараження, коли можна виявити та підрахувати загальну кількість бульбочок вовчка на одній ураженій рослині, виражену у відсотках. Недоліком цього способу є тривалість періоду проведення та висока затратність на енергоносії (тепло, світло).

В основу біохімічного методу оцінювання поставлено задачу прискорення процесу розподілу зразків соняшника на стійкі та сприйнятливі до вовчка.

В результаті проведених досліджень з використанням зразків-диференціаторів стійкості соняшника до вовчка у порівнянні із зразками селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України [205] було встановлено, що оптимальною фазою розвитку рослини для визначення рівня стійкості до вовчка біохімічним методом є фаза появи перших справжніх листків у проростків соняшника (14 доба після сходів), коли відбувається взаємодія паразита із кореневою системою рослини-хазяїна, і, як наслідок, сплеск активності ферментів.

Крім того, доведено, що в дослідженнях доцільно використовувати сприйнятливу до вовчка лінію Сх 908 А як стандарт-сприйнятливості [197].

Поставлену задачу вирішували шляхом використання способу прискореного визначення стійкості зразків соняшника (*Helianthus annuus* L.), до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.) за активністю ферменту каталази (КФ1.11.1.6), який відіграє важливу роль у реакціях на біотичний стрес,

зокрема у формуванні стійкості рослин до паразитів і патогенів, та свідчить про потенційну стійкість до них [209, 219].

Метод був експериментально розроблений та апробований в лабораторії генетики, біотехнології та якості біосировинних ресурсів Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України впродовж 2011-2012 років. Дослідження здійснено на створених в лабораторії селекції та генетики соняшника Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України генотипах культури. Набуло подальшого розвитку використання в селекційній програмі Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України методу оцінювання генотипів соняшника на стійкість до вовчка.

#### Висновки до розділу 5

1. Виявлено суттєві зміни ферментної активності у відповідь на дію паразита, які проявляються на 14 добу після зараження рослин соняшника вовчком

2. Встановлено відмінності між стійкими та сприйнятливими генотипами соняшника за показниками активності окисно-відновних ферментів.

3. З'ясовано, що ураження рослин соняшника *Orobanche cistana* Wallr. суттєво впливає на показники активності ферментів. За ураження паразитом активність пероксидази поліфенолоксидази та каталази в листках стійких зразків значно зростала ( від 5 % до 50 %), у сприйнятливих – знижувалась або не змінювалась.

4. Визначено, що за рівнем активності поліфенолоксидази та каталази в листках контрольних рослин генотипи соняшника не відрізняються від стандарту стійкості ( 35,7 та 5,6 ум.од./г тк. відповідно) та перевищують показники лінії-стандарту сприйнятливості у 1,5 – 3 рази, що свідчить про потенційну їх стійкість до вовчка. За активністю пероксидази в листках контрольних рослин неможливо прогнозувати стійкість генотипів соняшника до паразита через значну варіабельність активності ферменту.

5. Встановлено коливання показників активності ферментів у коренях контрольних рослин, які відповідали рівню стандарту стійкості, при цьому були значно нижчими за показники лінії-стандарту сприйнятливості (в середньому на 15 – 20 %), а в окремих випадках – перевищували його на 30 – 50 %, що свідчить про недоцільність визначення потенційної стійкості до вовчка за активністю ферментів в коренях рослин, необхідно брати зелений рослинний матеріал.

6. На основі отриманих даних розроблено прискорений спосіб оцінювання генотипів соняшника за стійкістю до вовчка (*Orobancha cuman* Wallr.), який базується на визначенні активності каталази в зеленому рослинному матеріалі 14-дених проростків культури.

Матеріали розділу опубліковано та апробовано у таких публікаціях:

205. Сахно Т. В. Динаміка активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів соняшнику за ураження вовчком. Вісник СНАУ. Серія «Агрономія і біологія». вип. 9 (32). Суми, 2016. С. 3–9.

209. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Активність оксидоредуктаз у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Збірник наукових праць Уманського НУС. вип. 90. Ч. 1. Сільськогосподарські науки. Умань, 2017. С. 112–121.

210. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Петренкова В. П. Активність поліфенолоксидази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobancha cuman* Wallr.) генотипів соняшнику (*H. annuus* L.). Физиология и биохимия культурных растений. Т. 44. № 4. 2012. С. 355–360.

211. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність поліфенолоксидази у міжвидових гібридів соняшнику. Матеріали доповідей II Міжнародної наук. конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого–біохімічні і генетичні аспекти» 11-13 жовтня 2011 р. Харків. С. 89–90.

213. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази у батьківських ліній та гібридів соняшнику при інокуляції вовчком. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. Вип.15 (№1008), 2012. С. 109-115.

214. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази ліній соняшнику за інокуляції їх вовчком. Збірка матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» 11-13 травня 2012 р. Запоріжжя. С. 58–59.

215. Чигрин Т. В. Активність поліфенолоксидази та пероксидази у різних за стійкістю до вовчка генотипів соняшнику. Матеріали докладов V Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационно–инвестиционное развитие растениеводческой отрасли – состояние и перспективы» 4-6 июля 2012. Харьков. С. 23.

216. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Варіювання активності каталази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.) зразків соняшнику. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. Вип. 61. 2013. С. 189–194.

217. Чигрин Т. В. Активность окислительно-восстановительных ферментов у разных по устойчивости к заразице генотипов подсолнечника. Научно-технический бюллетень ВНИИМК «Масличные культуры». Вып. 155-156. 2013. С. 134–139.

218. Чигрин Т. В., Задорожная О. А. Активность некоторых ферментов подсолнечника в связи с устойчивостью к заразице. Матеріали VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 2-5 октября 2012. Москва, Россия. С. 487–491.

219. Патент № 79519 на корисну модель «Спосіб прискореного визначення стійкості зразків соняшнику до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.)» від 25.04.2013./Задорожна О. А., Чигрин Т. В.; Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН; заявл.: 19.10.12; опубл.: 25.04.13. – Бюл. № 8 (частка авторства 50 %, проведення дослідів, аналіз даних).

## РОЗДІЛ 6

### ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ДЛЯ СТВОРЕННЯ СТІЙКОГО МАТЕРІАЛУ СОНЯШНИКА ДО ВОВЧКА

З метою з'ясування можливості використання культури соняшника *in vitro* в селекції на стійкість, отримання гаплоїдних рослин соняшника та відпрацювання методу отримання регенерантів соняшника було проведено оцінювання дослідних фертильних чоловічих ліній соняшника за андрогенною здатністю.

Соняшник є складною культурою для вирощування *in vitro*. Важливим етапом методу індукції андрогенезу є підбір необхідного співвідношення живильних речовин та гормонів у середовищі культивування для отримання повноцінних гаплоїдів [150]. На основі проаналізованих даних вирішено використання декількох живильних середовищ для індукції андрогенезу.

В результаті проведених досліджень встановлено, що при культивуванні пиляків соняшника на індукційних живильних середовищах формується різна кількість новоутворень (табл. 6.1).

*Таблиця 6.1*

#### **Калусогенез мікроспор різних генотипів соняшника на різних середовищах культивування**

Лінія	Калусогенез мікроспор на живильних середовищах, %			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
X 114 В	95,3±1,7	10,0±2,5	94,7±1,8	7,0±2,5
X 526 В	8,7±2,3	20,7±3,3	42,7±4,0	15,3±2,9
X 711 В	48,7±4,1	10,0±2,5	78,0±3,4	16,0±3,0
X 720 В	48,7±4,1	12,0±2,7	27,3±3,6	7,3±2,1
X 762 В	89,3±2,5	5,0±1,5	46,0±4,0	9,3±2,4

Примітка: Середовища MS 1. 250 мг/л гідролізата казеїну; 1,0 мг/л НОК; 2 мг/л 2,4 Д; 0,5 мг/л БАП.

2. 0,1 мг/л НОК та 0,2 мг/л БАП.

3. 500 мг/л гідролізата казеїну, 2 мг/л НОК та 1,0 мг/л БАП.

4. 0,1 мг/л НОК та 0,5 мг/л БАП.

Калусогенез з мікроспор та тканин пиляків на початкових етапах не диференціювали. Після двох тижнів культивування у темряві на пиляках утворювалось два типи калусу: рихлий оводнений сірого кольору та більш щільний з окремими білуватими субодиницями на поверхні.

Серед ліній культурного соняшника спостерігали залежність новоутворень як від генотипу, так і від середовища культивування [220, 221]. Калусогенез мікроспор ліній культурного соняшника без урахування середовища культивування коливався в середньому в межах 22-52 %. Найбільшу частку калусогенезу відмічали у лінії X 114 В, показник якої сягав 51,75 %. Новоутворення представляли собою з щільну калусну масу з окремими точками росту та рихлими додатками, подекуди зафіксовано утворення початкових корінців. Найменшу частку калусогенезу відмічали у фертильних чоловічих ліній X 720 В, X 526 В, в середньому біля 25 % новоутворень (рис. 6.1). Калусна маса, у порівнянні з іншими лініями, була менш щільною.

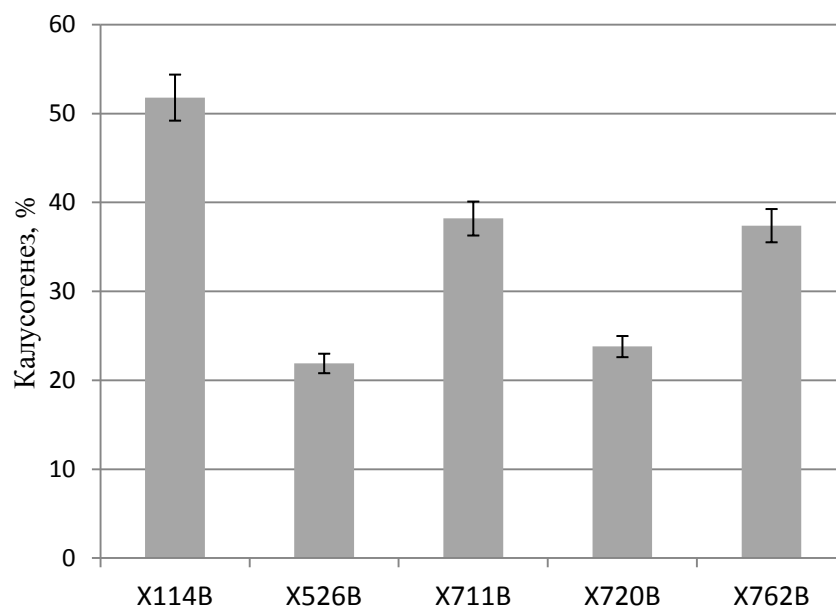


Рис. 6.1 Калусогенез мікроспор соняшника за культивування *in vitro*



У дослідженнях проаналізували вплив живильного середовища на андрогенез культури. Частка калусогенезу різних генотипів соняшника на різних середовищах культивування відрізнялась. Високі показники калусогенезу всіх фертильних чоловічих ліній спостерігали на середовищах № 1 та № 3, що містили гідролізат казеїну у концентрації 250 мг/л та 500 мг/л відповідно. Вони перевищували показники на інших середовищах більш, ніж на 40 % (рис. 6.2, 6.3).

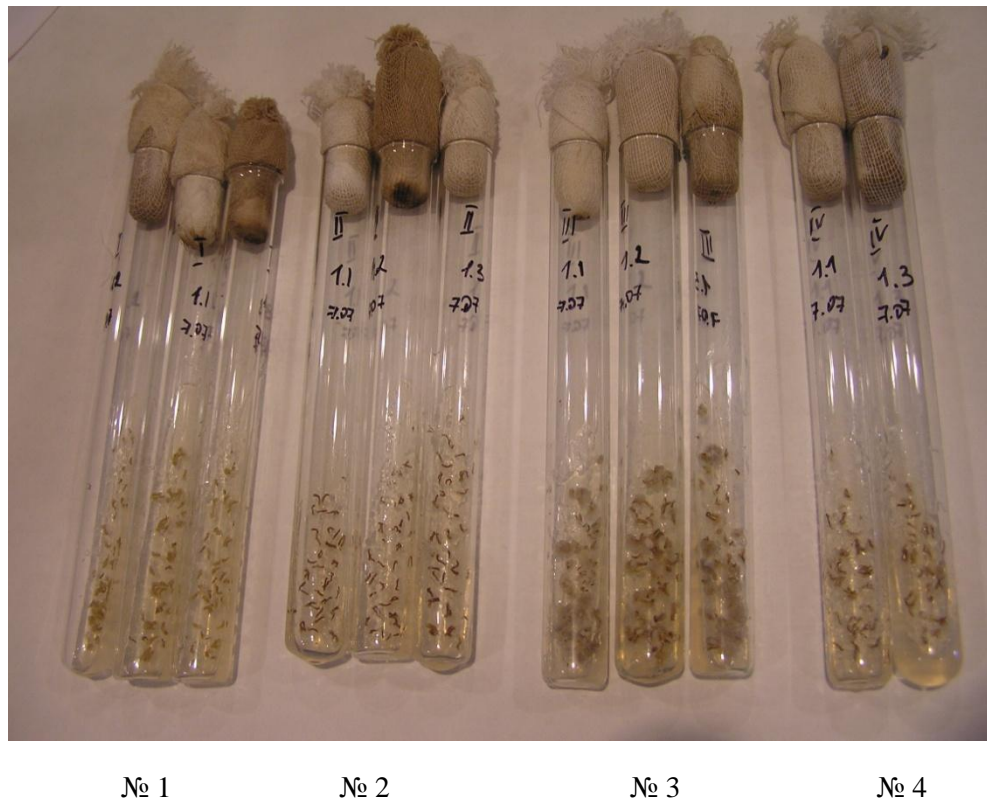


Рис. 6.2 Калусогенез на різних живильних середовищах

На середовищі культивування № 1 відмічали максимальну кількість новоутворень у ліній X 114 В та X 762 В, що майже вдвічі перевищувало показники калусогенезу інших зразків.

Однак, для лінії X 526 В це середовище виявилось не придатним. Частка калусогенезу становила лише 8,4 %. Це доводить, що андрогенез соняшника є генетично обумовленим фактором.

На середовищі № 3 відмічали значну кількість новоутворень у ліній X 114 В та X 711 В. Проте, у зразка X 720 В на цьому субстраті виявлено найнижчу кількість структур.

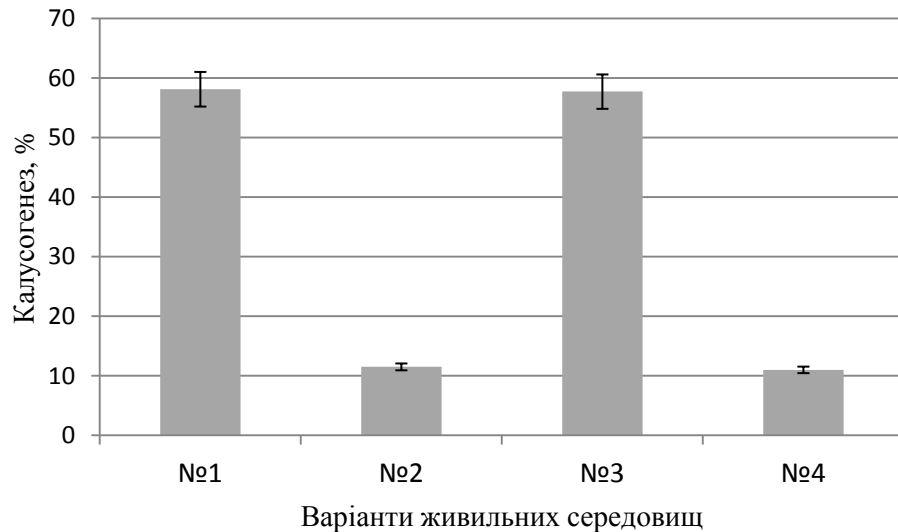


Рис. 6.3 – Калусогенез мікроспор на різних живильних середовищах

На регенераційному живильному середовищі регенераційні процеси зафіксовано у лінії X 711 В (рис. 6.4). У інших зразків на регенераційному середовищі спостерігали калусогенез.



Рис. 6.4 Новоутворення на регенераційному поживному середовищі

Встановлено, що апробовані генотипи соняшника мають низьку андрогенну здатність. З метою отримання регенерантів необхідно підібрати індукційні живильні середовища з відмінним від використаного в роботі складом нутрієнтів і фітогормонів [222, 223, 224].

Отже, результати проведених досліджень свідчать про різну здатність до андрогенезу вивчених фертильних чоловічих ліній соняшника, яка залежить як від дібраного генотипу, так і від підбору живильних компонентів середовища для культивування експлантів. Для стимуляції морфогенезу доцільно збагачувати культуральне середовище білковими компонентами, зокрема гідролізатом казеїну у концентрації 250 мг/л.

#### Висновки до розділу 6

1. З'ясовано здатність до андрогенезу фертильних чоловічих ліній соняшника. Виділено лінію X 114 В з найвищою андрогенною здатністю та лінію X 711 В, яка мала найвищу ренегераційну здатність калусної біомаси.
2. Визначено, що збагачення живильного середовища гідролізатом казеїну у концентрації 250 мг/л збільшує частку андрогенезу на 40 %.
3. Підтверджено, що здатність до андрогенезу зразків соняшника залежить від генотипових особливостей та від складу середовища культивування.

Матеріали розділу опубліковано та апробовано у таких публікаціях:

220. Задорожна О. А., Чигрин Т. В., Юшкіна Л. Л. Андрогенез *in vitro* гібридів соняшнику за участю диких видів. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. Вип. 20, Т. 2. 2012. С. 108–112.

221. Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л., Чигрин Т. В., Супрун О. Г. Особливості андрогенезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. Бюллетень Державного Нікітського бортанічного саду. № 105. 2012. С. 166–121.

222. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андроге́нна здатність пиляків соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (рослинний геном VI)» 7-10 вересня 2010 р. Одеса. С. 100.

223. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андро́генез *in vitro* різних видів соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» 4-5 жовтня 2010 р. Харків. С. 25–26.

224. Чигрин Т. В., Задорожная О. А., Юшкина Л. Л. Способность к андрогенезу в культуре *in vitro* пыльников разных видов подсолнечника. Сборник материалов VI Международной конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур» 24-25 февраля 2011. Краснодар, Россия. С. 357–361.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення важливого наукового завдання, яке полягає у визначенні морфофізіологічних особливостей ліній та гібридів соняшника за умов ураження вовчком (*Orobanche cumanana* Wallr.) шляхом розробки біохімічного методу оцінювання стійкості соняшника до квіткового паразита й подальшого впровадження його в селекційні програми Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, визначення морфометричних показників, рівня фенольних сполук та активності оксидоредуктаз у листках та коренях рослин соняшника, оцінювання андрогенної здатності ліній соняшника, що має важливе значення в галузі фізіології рослин.

1. Ступінь стійкості зразків соняшника до *Orobanche cumanana* Wallr. суттєво варіював у досліджених генотипів з рівнем 0,0 – 6,5 бульбочок паразита на коренях рослини соняшника.

2. Встановлено пригнічення ростових процесів у більшості досліджених генотипів за ураження вовчком у середньому на 15 % порівняно з контролем та залежність його рівня від генотипу соняшника.

3. Доведено, значний вплив ураження рослин соняшника квітковим паразитом на вміст фенольних сполук. Так, за умов ураження їх вміст у більшості зразків підвищується: в листках на 15 – 80 %, у коренях – подекуди в 2 – 5 рази, за виключенням деяких зразків, у яких рівень фенолів, як і у лінії-стандарта сприйнятливості, знижувався за впливу вовчка на 4 % в листках та втричі в коренях. Показники фенольних сполук у стійких зразків були вищими за показники у сприйнятливих у 1,5 – 3 рази.

4. Виявлено значне підвищення активності пероксидази, поліфенолоксидази та каталази в листках стійких зразків за ураження їх вовчком (від 5 % до 50 %), та зниження активності оксидаз або відсутність змін – сприйнятливих.

5. Установлено відмінності між генотипами за активністю оксидаз на 14 добу після зараження, що свідчить про доцільність визначення стійкості соняшника до *Orobanche cumana* Wallr. саме в цей період.

6. Визначено, що показники активності поліфенолоксидази та каталази в листках контрольних рослин відповідають рівню стандарту стійкості (35,7 ум.од./г тк. та 5,6 ум.од./г тк. відповідно), при цьому перевищують показники лінії-стандарту сприйнятливості у 1,5 – 3 рази, що свідчить про потенційну стійкість до квіткового паразита.

7. Встановлено, що андрогенна здатність зразків соняшника залежить від генотипу та складу середовища культивування. Збагачення живильного середовища гідролізатом казеїну (250 мг/л) сприяло збільшенню частки каллусогенезу соняшника на 40 %.

8. На основі отриманих даних розроблено прискорений спосіб оцінювання стійкості соняшника до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.), який базується на визначенні активності каталази в листках 14-денних проростків культури (Патент № 79519 від 25.04.2013).

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

*Науково-дослідним установам:*

– визначати стійкість соняшника до вовчка (*Orobanche cunana* Wallr.) прискореним біохімічним методом, що базується на визначенні активності каталази в листках зразків, який на відміну від традиційного методу дозволяє на достовірному рівні проводити диференціацію селекційного матеріалу швидше та економічніше;

– використовувати для приготування живильних середовищ білкові компоненти, такі як гідролізат казеїну, у концентрації 250 мг/л при використанні методу індукції андрогенезу для культивування *in vitro*;

– залучати в селекційні програми для подальшої селекції на стійкість до вовчка зразки, що поєднують високий генотиповий потенціал стійкості зі стабільним її проявом, зокрема лінії соняшника X 762 В, Сх 1002 А, Сх 1006 А, Сх 503 А та гібриди Кий, Сайт, Світоч

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кириченко В. В. Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus L.*). Харьков, 2005. 385 с.
2. Кириченко В. В., Сивенко В. И., Макляк Е. Н., Сивенко А. А., Сатаров А. З., Лебеденко Е. А., Андриенко В. В., Харитоненко Н. С., Брагин А. Н., Шишман Т. В. Результаты теоретических исследований и их применение в селекции подсолнечника. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2014. том 12. № 1. С. 113–121.
3. Кутищева Н. Н., Шудря Л. И., Одинец С. И., Серeda В. А., Цыс И. С. Достижения по селекции подсолнечника в институте масличных культур НААН. Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур НААН. № 20. 2014. С. 136–149.
4. Пустовойт В. С. Селекция и семеноводство подсолнечника. Наука и человечество. М.: Знание, 1964. С. 19–21.
5. Тихонов О. И. Болезни подсолнечника / под. ред. В. С. Пустовойта. М. : Колос, 1975. С. 391–425.
6. Skoric D. Sunflower breeding. Uljarstvo. Belgrad. 1988. № 25 (1). P. 3–91.
7. Таволжанский Н. П. Теория и практика создания гибридов подсолнечника в современных условиях. Белгород, 2000. 451 с.
8. Maria Păcureanu-Joita, Steluta Raranciuc, Emilia Procopovici, Elisabeta Sava, Dumitru Nastase. The impact of the new races of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) parasite in sunflower crop in Romania. Proc. 17th International Sunflower Conference. Cordoba. Spain. 2008. V.1. P. 225–230.
9. Kaya Y., Evci G., Pekcan V. and Gucer T. Determining new broomrape infested areas, resistant lines and hybrids in Trakya region of Turkey. Helia. 2004. № 27. P. 211–218.
10. Melero-Vara J. M., Dominguez J., Fernandez-Martinez J. M. Update



on sunflower broomrape situation in Spain: racial status and sunflower breeding for resistance. *Helia*. 2000. V. 23. № 33. P. 45–55.

11. Juan Fernandez-Escobar, M. Isabel Rodriguez-Ojeda, Luis Carlos Alonso. Distribution and dissemination of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in Southern Spain. Proc. 17th International Sunflower Conference. Cordoba. Spain. 2008. V. 1. P. 231–236.

12. Molinero-Ruiz L., García-Carneros A. B., Col-lado-Romero M., Raranciuc S., Domínguez J. and Melero-Vara J.M. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe. *Weed Research*. 2013. Volume 54. Issue 1. P. 87–96.

13. Гончаров С. В., Антонова Т. С., Арасланова Н. М., Рыженко Е. Н. Селекция гибридов подсолнечника на устойчивость к новым расам заразики. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып.1 (150), 2012. С.15–20.

14. Gontcharov S. V, Antonova T. S., Araslanova N. M. Sunflower breeding for resistance to the new broomrape race. *Helia*. 2004. V. 27. N. 40. P. 193–198.

15. Höniges A., Wegmann K. and Ardelean A. *Orobanche* resistance in Sunflower. *Helia*. 2008. № 49. P. 1–12

16. Аладьина З. К. Создание исходного материала подсолнечника, устойчивого к заразики в Восточной Лесостепи УССР : Автореф. дис. канд. с.-х. наук: 06.01.05. Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева. Х., 1999. 16 с.

17. Дьяков А. Б., Васильева Т. А., Бойко Ю. Г. Опасность новых рас заразики для подсолнечника в России и меры предупреждения возможного ущерба. МАСЛИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 1 (138), 2008. С. 3–12

18. Горбаченко Ф. И., Усатенко Т. В., Горбаченко О. Ф. Результаты селекции подсолнечника на устойчивость к заразихе на Дону. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 2 (144-145). 2010. С. 34–41.

19. Антонова Т. С., Стрельников Е. А., Арасланова Н. М., Рамазанова С. А. Адаптивные особенности в онтогенезе заразихи *Orobanche cuman* Wallr. на подсолнечнике. Бюллетень научно-исследовательского института масличных культур. Вып.1 (150), 2012. С. 39–49.

20. Fernandez-Martinez J. M., Dominguez J., Perez-Vich B., Velasco L. Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia*. 2008. № 31. P. 73–84.

21. Fernandez-Martinez J.M., Velasco L. and Perez-Vich B. Progress in research on breeding for resistance to broomrape. In: Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mar Del Plata & Balcarce, Argentina Int. Sunfl. Assoc., Paris, France. 2012. P. 57–62.

22. Антонова Т. С., Ситало Г. М., Арасланова Н. М., Гучетль С. З., Рамазанова С. А., Челюстникова Т. А. Распространение и вирулентность заразихи (*Orobanche cuman* Wallr.) на подсолнечнике в Ростовской области. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 1 (140), 2009. С. 51–60.

23. Антонова Т. С., Арасланова Н. М., Рамазанова С. А., Гучетль С. З., Челюстникова Т. А. Морфотипы заразихи, паразитирующей на подсолнечнике в Ростовской области. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 1 (142-143), 2010. С. 33–45.

24. Гучетль С. З., Челюстникова Т. А., Арасланова Н. М., Антонова Т. С. SSR и SCAR генотипирование коллекции отечественных селекционных образцов подсолнечника, устойчивых и восприимчивых к расе E *Orobanche cuman* Wallr. Научно-технический бюллетень

Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып.1 (150), 2012. С. 48–59.

25. Гучетль С. З., Челюстникова Т. А., Арасланова Н. М., Антонова Т. С. Маркирование генаустойчивости *Or5* к расе Е заразики *Orobanche cumana* Wallr. в линиях подсолнечника селекции ВНИИМК. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 2 (151–152), 2012. С. 34–41.

26. Molinero-Ruiz M. L. and Melero-Vara J. M. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations overcoming the *Or5* gene. In: G.J. Seiler, (ed), Proc. Int. Sunflower Conf., Fargo, ND, USA. 2005. P. 165–169.

27. Atanasova R., Batcharova R., Todorovska E. and Atanassov A. Molecular study of broomrape (*Orobanche Spp.*) by RAPD analyses. Biotechnol. and Bionechnol. Eq. 2005. V. 19 (3). P. 51–60.

28. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic D., Jovic S., Miklic V. Molecular profiles of sunflower lines resistant to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). International Symposium on Broomrape (*Orobanche spp.*) in Sunflower. Chisinau, Republic of Moldova. August 25-27. 2011. P. 25.

29. Солоденко А. Е., Саналатий А. В., Толмачев В. В., Ведмедева К. В., Сиволап Ю. М. Маркирование гена устойчивости к заразики *Or3* у подсолнечника. Цитология и генетика. 2005. С. 9–12.

30. Саналатий А. В., Солоденко А. Е., Сиволап Ю. М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа. Цитология и генетика. 2006. Т.40. № 4. С. 31–37.

31. Конарев В. Г. Молекулярно-биологические исследования генофонда культурных растений в ВИРе (1967–2007 гг.). Издание 2-е дополненное /составители: В.В. Сидорова, А.В. Конарев. СПб.: ВИР, 2007. 134 с.

32. Гучетль С. З., Челюстникова Т. А., Рамазанова С. А.

Межпопуляционная изменчивость *Orobanchе cumanа* Wallr., поражающей подсолнечник в регионах юга России, выявляемая молекулярно-генетическими маркерами. Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. 2011. Вып. №1 (146–147). С. 119–122.

33. Зайчук В. Ф., Попов П. С., Калинченко Т. В. Активность полифенолоксидазы в корзинках подсолнечника. Масличные культуры. 1986. №3. С. 30.

34. Панченко А. Я. Ранняя диагностика заразиоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника. Вестник сельскохозяйственной науки. 1975. №2. С. 107–115.

35. Buze-Dragomir L., Niculescu M. Researches on the catalase and Peroxidase activity at sunflower plants, infected by phytopatogenic fungi. Annals of the University of Craiova. 2010. Vol.15. P.1–8.

36. Авраменко Р. С. Изучение качественных особенностей различных по устойчивости к заразио сорта подсолнечника: Автореф. дис... канд.биол.наук.: 03.00.12. Воронеж. 1973. 23с.

37. Hernandez J. A., Diaz-Vivancos P., Rubio M. et al. Long-term plum pox virus infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot, *Prunus armeniaca*, ucltivar but not in a resistant cultivar. Physiologia Plantarum. 2006. V. 126. Is.1. P.140–152.

38. Luhová L., Lebeda A., Hedererová D. et al. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. Plant Soil Environ. 2003. Vol. 49. №4. P.151–157.

39. Панченко А. Я., Антонова Т. С. Особенности защитной реакции устойчивых форм подсолнечника на внедрение заразио. Сельскохозяйственная биология. Том 9, №4. 1974. С. 554–557.

40. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S. L. et al. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and  $Ca^{2+}$ . New Phytol. 2001.V. 151, № 1. P. 185-194.

41. Глянько А. К., Ищенко А. А., Митанова Н. Б., Васильева Г. Г.

НАДФН-оксидаза растений. Вісник ХНАУ. Серія біологія. 2009. вип. 2 (17). С. 6–18.

42. Войцехівська О. В., Ситар О. В., Таран Н. Ю. Фенольні сполуки: різноманіття, біологічна активність, перспективи застосування. Вісник ХНАУ. Серія біологія. 2015, вип. 1 (34). С. 104–119.

43. Калайджян А. А., Хлевой Л. В., Нецадим Н. Н. и др. Российский солнечный цветок. Рос. акад.с.-х. наук. Куб. нар. акад. Краснодар: Совет.Кубань, 2007. 352 с.

44. Бейлин И. Г. Цветковые полупаразиты и паразиты. М.: Наука, 1968. 118 с.

45. Терёхин Э. С. Репродуктивная биология сорных заразиховых. Л.: Наука, 1988. 128 с.

46. Бейлин И. Г. О взаимоотношениях *O. cumana* и подсолнечника. Растение и среда. М.: АН СССР, 1940. Т.1. С.175–192.

47. Котт С. А. О некоторых формах паразитизма у растений. Бот. журнал. 1959. Т. 44. № 9. С. 1333–1335.

48. Терёхин Э. С., Анисимова Г. М. О некоторых особенностях развития *Orobanche cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*). Ботанический журнал. 1978. Т. 63. № 6. С. 797–803.

49. Антонова Т. С., Стрельников Е. А., Арасланова Н. М., Рамазанова С. А. Адаптивные особенности в онтогенезе заразики *Orobanche cumana* Wallr. на подсолнечнике. асличные культуры. Науч.-техн. бюллетень ВНИИМК. Россия, Краснодар. Вып.1, 2012. С. 110–116.

50. Антонова Т. С. Развитие гаустория заразики подсолнечной (*Orobanche cumana* Wallr.) и защитная реакция у иммунных форм подсолнечника. Дисс. канд. биол. наук. Краснодар, 1978. 146 с.

51. Антонова Т. С., Ситало Г. М., Арасланова Н. М., Гучетль С. З., Рамазанова С. А., Челюстникова Т. А. Распространение и вирулентность заразики (*Orobanche cumana* Wallr.) на подсолнечнике в Ростовской области. Масличные культуры: Научн.-техн. бюл. ВНИИМК. 2009.

Вып. 1(140). С. 31–37.

52. Бейлин И. Г. К истории вопроса о создании сортов подсолнечника, устойчивых против заразики и ржавчины. Тезисы докладов IV Всесоюзном совещании по иммунитету с.х. растений. Кишинев: Парт. изд-во ЦК КП Молдавии. 1965. С. 166.

53. Сацперов Ф. А. Устойчивость панцирных сортов подсолнечника против заразики. Тр. Бюро по прикл. ботанике. Т. 9. 1913. С. 251.

54. Сацперов Ф. А. Опыт скрещивания двух форм подсолнечника. Тр. Бюро по прикладной ботанике. 1916. Т. 9. С. 207–244.

55. Плачек Е. М. Проблема селекции подсолнечника. Тр. Всесоюзного съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству. Л.: Изд-во редколлегии съезда. 1930. Т. 4.

56. Пустовойт В. С. Селекция подсолнечника. Агротехника и селекция масличных культур. 1939. Москва. С. 75–87.

57. Жданов Л. А. Итоги селекционной работы по масличным культурам на Дону. Достижения отечественной селекции. М.: Колос. 1967. С. 231–242.

58. Пустовойт В. С., Пустовойт Г. В. Селекция подсолнечника на устойчивость к заразики. Защита растений от вредителей и болезней. № 4. 1963. С.15–17.

59. Бухорович П. Г. Изучение вирулентности заразики разного происхождения и устойчивость к ней ряда сортов подсолнечника. Сборник работ по масличным культурам. Краснодарское книж. изд-во. Вып.3. 1966. С. 22.

60. Acimovic M. Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia. *Helia*, №7. 1981-1983. P. 44–45.

61. Indelen E., Vluderc A. O., Kiral B., Salihoglu M. and Tunalı R. Evaluation of some sunflower genotypes for resistance to *Orobanche cumana* Wallr. in Turkey. *Helia*, №6. 1983. P. 27–28.

62. Vranceanu A. V., Tudor F., Stoenescu M. and Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance sources and gens in Sunflower. In: Proc. 9th Int. Sunflower Conf. Torremolinos, Spain (vol. 1). 1980. P. 74–82.

63. Бурлов В. В. Вирулентность одесской популяции заразики (*Orobanche cumana* Wallr.) и характер наследования устойчивости подсолнечника к паразиту. Прикладные аспекты генетики, цитологии и биотехнологии с.х. растений. Сборник научных трудов СГИ., Одесса. 1980. С. 36–45.

64. Molinero-Ruiz M. L. and Melero-Vara J. M. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations overcoming the Or5. In: G.J. Seiler, (ed), Proc. Int. Sunflower Conf., Fargo, ND, USA. 2005. P. 165–169.

65. Fernandez-Escobar J., Isabel Rodriguez-Ojeda M., Luis Carlos Alonso Distribution and dissemination of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in Southern Spain. Proc. 17th International Sunflower Conference. Cordoba. Spain. 2008. V.1. P. 231–236.

66. Kaya Y., Demirci Y., Evci G. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding in Turkey for broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl) and herbicide resistance. Helia 27. Nr. 40. 2004. P. 199–210.

67. Păcureanu-Joita Maria, Steluta Raranciuc, Emilia Procopovici, Elisabeta Sava, Dumitru Nastase The impact of the new races of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) parasite in sunflower crop in Romania. Proc. 17th International Sunflower Conference. Cordoba. Spain. 2008. V.1. P. 225–230.

68. Антонова Т. С. и др. Вирулентность заразики, поражающей подсолнечник, в Волгоградской и Ростовской областях. Масличные культуры. Науч.-техн. бюллетень ВНИИМК. Россия, Краснодар. Вып.1. 2011. С. 127–130.

69. Бурлов В. В., Бурлов В. В. Ефективність генів Or у забезпеченні стійкості соняшнику до нових рас вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.).

Селекція і насінництво. 2010. Вип. 98. С. 28–37.

70. Макляк К. М., Кириченко В. В. Стійкість вихідного матеріалу соняшнику до нових рас вовчка (*Orobanche cumanica* Wallr.). Селекція та насінництво, 2012. Вип. 102. С. 16–21.

71. Хаблак С. Г., Абдуллаєва Я. А. Расовий склад вовчка (*Orobanche cumanica* Wallr.) в посівах соняшнику в умовах північного степу України . Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2013. Вип. 3. С.116–121.

72. Flor H. H. Host-parasite interaction in flux rust: its genetics and other implications. *Phytopathology*. 1955. Vol. 45. P. 680–685.

73. Martin G. B. Functional analysis of plant disease genes and their downstream effectors *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. Vol. 2. P. 273–279.

74. Zhou J., Tang T., Frederick R., Martin G. B. Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase. *J. Plant Res.* 1998. Vol. 111. P. 353–356.

75. Kearney B., Staskawicz B. J. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*. 1990. Vol. 346. P. 385–386.

76. Yang Y., Shah J., Klessig D. F. Signal perception and transduction in plant defenses responses. *Genes Dev.* 1997. Vol. 11. P. 1621–1639.

77. Cohn J., Sessa G., Martin G. B. Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 2001. Vol. 13. P. 55–62.

78. Odjakova M., Hadjiivanova Ch. The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 27, № 1-2. P. 101–109.

79. Montesano M., Brader G., Tapio Palva E. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular plant pathology*. 2003. Vol. 4. № 1. P. 73–79.

80. Hahn M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu.Rev. Phytopathol.* 1996. Vol. 34. P. 387–412.

81. Тарчевский И. А. Элиситор-индуцированные сигнальные системы и их взаимодействие . *Физиология растений*. 2000. Т. 47. С. 321–331.



82. Boller T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1995. V. 46. P. 189–214.
83. Koche D., Choudhary A. Induction of hydrolases and phenylalanine ammonia-lyase by pathogen derived elicitors in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Electronic Journal of Biology.* 2012. Vol. 8. № 1. P. 11–14.
84. Shibuya N., Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathology.* 2001. Vol. 59. P. 223–233.
85. Тарчевский И. А., Чернов В. М. Молекулярные аспекты фитоиммунитета. *Микология и фитопатология.* 2000. Т. 34. № 3. С. 1–10.
86. Desikan R., Hancock J.T., Ichimura K. et al. Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 126. № 4. P. 1579–1587.
87. Desikan R., Clarke A., Atherfold P. et al. Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Planta.* 1999. Vol. 210. P. 97–103.
88. Almargo L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Botany.* 2009. Vol. 60. № 2. P. 377–390.
89. Durrant W. E., Dong X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology.* 2004. Vol. 42. P. 185–209.
90. Lamb C., Dixon R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 48. P. 251–275.
91. Shetty N. P., Lyngs Jorgensen H. J., Due Jensen J. et al. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 2008. Vol. 121. P. 267–280.
92. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology.* 2005. Vol 31, № 1-2. P. 105–124.
93. Сотченков Д. В., Голденкова И. В. Антимикробные белки и пептиды, участвующие в защите растений от грибных и бактериальных патогенов. *Успехи соврем. биологии.* 2003. Т. 123. № 4. С. 323–335.

94. Bolwell G. P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1997. Vol. 51. P. 347–366.

95. Bestwick C. S., Brown I. R., Bennett M. H. R., Mansfield J. W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *The Plant cell.* 1997. Vol. 9. № 2. P. 209–221.

96. Максимов И. В., Черепанова Е. А. Про-антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам. *Успехи современной биологии.* 2006. Т. 126. № 3. С. 250–261.

97. Apostol I., Heinstein P. F., Low P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 1989. Vol. 90, № 1. P. 109–116.

98. Чесноков Ю. В. Устойчивость растений к патогенам (обзор иностранной литературы). *Сельскохозяйственная биология.* 2007. № 1. С. 16–35.

99. Талиева М. Н., Мишина Г. Н. Окислительные ферменты во взаимоотношениях растения и патогена при мучнистой росе. *Физиология растений.* 1996. Т. 43. № 5. С. 679–684.

100. Граскова И. А., Боровский Г. Б., Колесниченко А. В. и др. Пероксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили. *Физиология растений.* 2004. Т. 51. № 5. С. 692–697.

101. Минибаева Ф. В., Гордон Л. Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. *Физиология растений.* 2003. Т. 50. № 3. С. 459 – 464.

102. Юсупова З. Р., Хайруллин Р. М., Максимов И. В. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk. *Физиология растений.* 2006. Т. 53. № 6. С. 910 – 917.

103. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 1994. Vol. 79. P. 583–593.

104. Граскова И. А., Эпова К. Ю., Кузнецова Е. В. и др. Роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости картофеля при инфицировании кольцевой гнилью. *Журнал стресс-физиологии и биохимии*. 2008. Т. 4. № 1. С. 4–10.

105. Cherif Mohamed, Arfaoui Arbia, Rhaiem Azza. Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian journal of Plant Protection*. Vol. 2. Issue 1. 2007. P. 7–21.

106. Lanoue Arnaud, Burlat Vincent et al. Induced root-secreted phenolic compounds as a belowground plant defense. *Plant signaling and behavior*. Vol. 5. Issue 8. 2010. P. 1037–1038.

107. Saftic-Pankovic D., Veljovic-Jovanovic S., Pucarevic M., Radovanovic N., Mijic A. Phenolic compounds and peroxidases in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection. *Helia*. 29. Nr.45. 2006. P. 33–42.

108. Tal Beni and Robeson David J. The metabolism of Sunflower Phytoalexins Ayapin and Scopoletin. *Plant Physiology*. 1987. No. 82. P. 167–172.

109. Косаківська І. В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: спец. 03.00.12 “фізіологія рослин” Київ, 1997. 50 с.

110. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15. 1962. P. 473–479.

111. Linsmaire B. and Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 18. 1965. P. 100–127.

112. Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. Nutrient requirements of l suspension cultures of soybean root cells. *Expi. Cell Res*, 50. 1968. P. 151–158.

113. Collins G. B. and Phillips G. C. *In vitro* tissue culture and plant regeneration in *Trifolium pratense* L. In: Earle (Ed.) & Yves Demariy Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger publishers, New York, USA. 1982. P. 22–34.

114. Rogers M. A., Gal H. L., Jr. Horner H. T. Callus formation and differentiation in tissue cultures of normal and cytoplasmic male sterile sorghum, pepper, sunflower and tobacco. *In vitro*, 1974. 9. P. 463–467.

115. Sadhu M. K. Effect of different auxins on growth and differentiation in callus tissue from sunflower stem pith. *Indian J. Exp. Biol.* 1974. 12. P. 110–111.

116. Encheva J., Tsvetkova F., Ivanov P. Heritable tissue culture induced genetic variation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a tool for crop improvement. *Helia*, 27. 2004. № 41. P. 163–172.

117. Ozyigit I. I., Gozukirmizi N., Semiz B. D. Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 2007. 6(13). P. 1498–1502.

118. Paterson K. E. Shoot tip culture of *Helianthus annuus*-flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Am J Bot.* 1984, 71. P. 925–931.

119. Nurhidayah T., Horn R., Röcher T., Friedt W. High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. *Plant Cell Reports*. 1996. V. 16, Is. 3. P. 167–173.

120. Greco B., Tanzarella O. A., Carrozzo G., Blanco A. Callus induction and shoot regeneration in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Plant Sci. Lett.* 1984. 36. P. 73–77.

121. Ceriani M. F., Hopp H. E., Hahne G., Escandón A. S. Cotyledons: an explant for routine regeneration of sunflower plants. *Plant Cell Physiol.* 1992. 33(2). P. 157–164.

122. Pugliesi, C., Cecconi, F., Mandolfo, A. and Baroncelli, S., Plant regeneration and genetic variability from tissue cultures of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*. 1991. 106. P. 114–121.

123. Fiore M. C., Trabace T., Sunseri A. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 1997. 16. P. 295–298.

124. Power C. J. Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. *Am. J. Bot.* 1987. 74(4). P. 497–503.

125. Dağüstü N. Factors Affecting the Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2002. 16(1). P. 18–23.

126. Freyssinet M. and Freyssinet G. Fertile plant regeneration from sunflower (*H.annuus* L.) immature embryos. *Plant Science*. 1988. 56. P. 177–181.

127. Wilcox McCann A., Cooley G. and Dreser V. A system for routine regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1988. 14. P. 104–110.

128. Knittel N., Escandón A. S., Hahne G. Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Sci.* 1991. 73. P. 219–226.

129. Paterson K. E., Everett N. P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci.* 1985. 42. P. 125–132.

130. Larkin P. and Scowcroft W. Somaclonal Variation – a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 1981. 60. P. 197–214.

131. Scala A., Bettini P., Baiatti M., Gogani P., Pellegrini G. and Tognoni F. *In vitro* analysis of the tomato *Fusarium oxysporum* system and selection experiments. *PL Tissue Cell Cult Appl. Crop Impr. Meet.* 1984. P. 361–362.

132. Larkin P. J. and Scowcroft W. R. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1983. 2. P. 111–121.

133. Behnke M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* 1979. 55. P. 69–71.

134. Behnke M. General resistance to late blight on *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 1980. 56. P. 151–152.

135. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция К.: Наукова думка. 1990. 280 с.

136. Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology.* 2008. Vol. 7, № 4. P. 641–650.

137. Tabori K. M., Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*). *Acta. Hort. (ISHS).* 2009. № 812. P. 231–236.

138. Clapham D. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 1971. 69. P.142–155.

139. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації  $ae\ i\ su_2$ ) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. 2010. Вип.11 (№ 905). С. 60–66.

140. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Лобанова К. І., Шестопад О. Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації. Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. Одеса, 2008. 14 с.

141. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T. S., Jauhar P. P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their Cytological characterization. *The American Genetic Association.* 2001. 92. P. 56–64

142. Hassawi D. S., Liang G. H. Effect of cultivar, microspore development of anther culture of wheat and Triticale .Plant Breeding. 1990. 105. P. 332–336.
143. Murigneux A., Bentolila S., Hardy T. et al. Genotype variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize. Genome. 1994. 37. P. 970–976.
144. Babbar S. B., Agarwa A. K. Sahay Sh. Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for development studies and crop improvement. Indian Journal of Biotechnology. 2004. 3, April. P. 185–202.
145. Kurt O., Evanth G. M. Anther Culture Potential of Linseed (*Linum usitissimum* L.): Effects of Genotypes and Pretreatment on Callus Formation and Differentiation. J. of Agriculture and Forestry. 1998. 22. P. 553–560
146. Hristova-Cherbadzi M. Characterization of hybrids, forms and lines, obtained from interspecific hybridization of cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. with wild species of genus *Helianthus*. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2009. V.23. №2. P.112–116.
147. Zhong D., Michaux-Ferriere N., Coumans M. Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. Vol. 41. N 2. P. 91–97.
148. Thengane S. R., Joshi M. S., Khuspe S. S. et al. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. Plant Cell Rep. 1994. Vol.13. P.222–226.
149. Nedev T. I., Vassilevska-Ivanova R., Tzekova Z. Regeneration potential of sunflower hybrids. Helia, 21. Nr. 28. 1998. P. 1–6.
150. Bohorova N. E., Atanassov A. I. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro production of haploids. Biotech. In Agric. And Forestry. (Ed.). Y.P.S. Bajaj. 1990. Vol.12: Haploids in crop improvement I. Springer Verlag, Berlin. P. 428–441.
151. Saji K.V. & Sujatha M. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica. 1998. 103. P. 1–7.

152. Echevarria-Zomeno Sira, Perez-de-Luque Alejandro, Jorrin Jesus, Maldonado M. Ana. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.): cytochemical studies. Journal of Experimental Botany. 2006. 57. N. 11. P. 4189–4200.

153. Labrousse P., Arnaud M. C., Serieys H., Berville A. and Thalouarn P. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. Annals of Botany. 2001. 88. P. 859–868.

154. Fernandez-Martinez J., Melero-Vara J., Munoz-Ruz J., Ruso J., Dominguez J. Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to a new broomrape race that overcomes resistance of the Or<sub>5</sub> gene. Crop Science. 40. 2000. P. 550–555.

155. Fernández-Martínez J. M, Pérez-Vich B, Akhtouch B, Velasco L, Muñoz-Ruz J, Melero-Vara J. M, Domínguez J. Registration of four sunflower germplasms resistant to Race F of broomrape. Crop Sci. 2004. 44 P. 1033–1034.

156. Perez-Vich B., Akhtouch B., Munoz-Rus J., Fernandez-Martinez J. M., Jan C. C. Inheritance of resistance to a highly virulent race F of *Orobanche cumana* Wallr. in a sunflower line derived from interspecific amphiploids. Helia, 25. 2002. Nr.36. P. 137–144.

157. Perez-Vich B., Velasco L. and Fernandez-Martinez J. M. QTL mapping of resistance to races E and F of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower .COST 849, Parasitic Plant Management in sustainable Agriculture Meeting on Breeding for Orobanche Resistance in Sunflower 4-6 November 2004 Bucharest-Romania. P. 6.

158. Pérez-Vich B., Velasco L., Muñoz-Ruz J., Domínguez J. and Fernández-Martínez J.M. Registration of Three Sunflower Germplasms with Quantitative Resistance to Race F of Broomrape. Crop Sci. 2006. 46. P. 1406–1407.

159. Flores Berrios E., Gentzbittel L., Kayyal H., Sarrafi A., Alibert G. AFLP mapping of QTLs *in vitro* organogenesis traits using recombinant inbred



lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). TAG Theoretical and Applied Genetics. 2000. Vol.101. №8. P. 1299–1306.

160. Pacureanu Maria Joita, Ciuca Matilda, Raranciuc Steluta. Sunflower genotypes resistant to the most virulent populations of broomrape in Romania. Broomrape biology, control and management: Joint Working Group and MC meeting of Action COST 849 (15-17 September 2005). Reading University, UK. P. 15.

161. Wegmann K., Honiges A., Ardelean A. Orobanche Resistance in sunflower. *Helia*, 31. 2008. Nr. 49. P. 1–12.

162. Gutierrez-Mellado M.C., Edwards R., Tena M., Cabello F., Serghini K., Jorin J. The production of coumarin phytoalexins in different plant organs of sunflower (*Helianthus annuus* L). *Journal of plant physiology*. 1996. Volume 149. Issue 3-4. P. 261–266.

163. Gutierrez Mari-Carmen, Parry Andrew, Tena Manuel, Jorin Jesus and Edwards Robert. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry*. Vol. 38. Issue 5. 1995. P. 1185–1191.

164. Чигрин В. В., Шутова Е. А., Саутич М. А. Изменение активности пероксидазы у устойчивых и восприимчивых сортов пшеницы при заражении стеблевой ржавчиной. *Физиология растений*. 1973. Т. 20. Вып. 1. С. 79–85.

165. Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*. 2000. August. V. 123. P. 1289–1300.

166. Аксенова В. А., Кожанова О. Н. О механизме активирования пероксидазы у устойчивых и восприимчивых растений при заражении. *Физиология растений*. 1976. Т. 23. вып. 2. С.391–396.

167. Saftic-Pankvic D., Veljovic-Jovanovic S., Pucarevic M., Radovanovic N., Mijic A. Penolic compounds and peroxidases in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection. *Helia*. 2006. V. 29. N. 45. P. 33–42.

168. Anjana G., Kini K.R., Shetty H.S., Prakash H.S. Changes in peroxidase activity in sunflower during infection by necrotrophic pathogen *Alternaria helianthini*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2008. V. 41. № 8. P. 586–596.

169. Magbanua Z. V., Moraes C. M. Brooks T. D. et al. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? Mol. Plant Microbe Interact. 2007. V. 20. Is. 6. P. 697–706.

170. Buze-Dragomir L., Niculescu M. Researches on the catalase and Peroxidase activity at sunflower plants, infected by phytopathogenic fungi. Annals of the University of Craiova. 2010. Vol. 15. P. 1–8.

171. Мельничук М. Д., Дьячкова О. О., Смирнова С. О. и др. Зміни активності пероксидази, каталази і поліфенолоксидази рослин перцю та тютюну, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. Физиология и биохимия культ. растений. 2003. Т. 35. № 1. С. 43–47.

172. Кириченко В. В., Макляк К. М., Коломацька В. П. та ін. Каталог гібридів соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва. Харків, 2010. 44 с.

173. Кириченко В. В., Аладьина З. К., Гуменюк А. Д. и др. Каталог рабочей коллекции самоопыленных линий подсолнечника Института растениеводства им. В. Я. Юрьева. Харьков, 1996. 88 с.

174. Vranceanu A. V., Tudor, F., Stoenescu M. and Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance sources and gens in Sunflower. In: Proc. 9th Int. Sunflower Conf. Torremolinos, Spain. 1980. vol. 1. P. 74–82.

175. Бурлов Вік. Вас., Бурлов Вік. Вік. Ефективність генів Or у забезпеченні стійкості соняшнику до нових рас вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.). Селекція і насінництво. 2010. Випуск 98. С. 28–37.

176. Fernandez-Escobar Juan, Isabel Rodriguez-Ojeda M., Alonso Luis Carlos. Distribution and dissemination of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in Southern Spain. In: Proc. 17th International Sunflower

Conference, Cordoba, Spain. 2008. Vol. 1. P. 231–236.

177. Батыгин Н. Ф. Онтогенез высших растений. М.: Агропромиздат, 1986. 102 с.

178. Авксентьева О.О., Жмурко В.В., Щоголев А.С., Юхно Ю.Ю. Фізіологія та біохімія рослин – малий практикум: навчально-методичний посібник. Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. 152 с.

179. Петренко В. П., Кириченко В. В., Черняєва І. М. та ін. Основи селекції польових культур на стійкість до шкідливих організмів: навч. посіб./ за редакцією академіка НААН В. В. Кириченка, члена-кореспондента НААН В. П. Петренкової. Харків, ІР ім. В. Я. Юр'єва, 2012. 320 с.

180. Priecina Liga, Karlina Daina. Total polyphenol, flavonoid content and antiradical activity of dried parsley (*Petroselinum crispum*), celery (*Apium graveolens*) and dill (*Anethum graveolens* L.). Journal of international scientific publications: Agriculture and Food. Vol. 1. Part 1. 2013. P. 279–286.

181. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. 1975 г. 304 с.

182. Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1987. 430 с.

183. Luhová L., Lebeda A., Hedererová D. et al. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. Plant Soil Environ. 2003. Vol. 49. № 4. P. 151–157.

184. Вольф В. Г. Статистическая обработка опытных данных. М.: Колос, 1966. 255 с.

185. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

186. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка. 1980. 488 с.

187. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія

рослин: підручник. К.: Поліграф Консалтинг, 2003. 520 с.

188. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.

189. Білинська О. В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури. Фактори експериментальної еволюції організмів. Т. 3. К.: Логос, 2006. С. 437–441.

190. Белинская Е. В. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*. Физиология и биохимия культур. растений. 2005. 37. № 5. С. 436–442.

191. Paterson K. E., Everett N. P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci.* 1985. 42. P. 125–132.

192. Chraïbi K. M., Latche A., Roustan J. P., Fallot J. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.* 1991. 10. P. 204–207.

193. Vijaya Priya K., Sassikumar D., Sudhagar R. et al. Androgenetic response of sunflower in different culture environments. *Helia.* 2003. №38. P. 39–50.

194. Французёнок В. В., Никонович Т. В. Применение культуры *in vitro* для размножения редких видов растений. Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: Материалы Междунар. науч.- практ. конф. 25-28 мая 2005 г., Минск-Нарочь. Мн.: РИВШ, 2005. С. 260–261.

195. Землянухина О. А., Вепринцев В. Н., Карпеченко К. А., Карпеченко Н. А., Карпеченко И. Ю., Кондратьева А. М., Калаев В. Н., Кузнецов Б. И., Моисеева Е. В., Воронин А. А. Опыт микрклонального размножения эхинацеи узколистной (*Echinacea angustifolia* D.C.). Фундаментальные исследования. 2012. № 6-2. С. 319–322.

196. Zhong, D., Michaux-Ferrière N., Coumans M. Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or

- artifact? Part 1. *In vitro* anther culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1995. 41. P. 91.
197. Сахно Т. В., Петренко В. П. Вміст фенольних сполук та морфометричні показники у зразків-диференціаторів соняшнику за умов ураження вовчком. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. вип. 4 (92). Миколаїв. 2016. С. 92–98.
198. Сахно Т. В. Вплив ураження вовчком на морфометричні показники та загальний вміст фенолів у ліній-диференціаторів соняшнику. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» 7-8 липня 2016 р.* Харків. С. 18–19
199. Сахно Т. В. Морфометричні показники та вміст фенольних сполук у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. *Селекція і насінництво*. Випуск 110. № 15. Харків. 2016. С. 117–122.
200. Сахно Т. В. Влияние заражения заразихой на ростовые процессы и содержание фенольных соединений у линий и гибридов подсолнечника. *Материалы IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 20-25 апреля 2015 р.* Москва, Россия. С. 425–430.
201. Сахно Т. В. Рівень фенольних сполук у генотипів соняшнику з різною стійкістю до *Orobanche cuman* Wallr. *Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Стійкість соняшнику до біотичних та абіотичних факторів» 24-25 червня 2014 р.* Харків. С. 67–68.
202. Колупаєв Ю. Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). Харків: Харк. держ. аграр. ун-т, 2001. 173 с.
203. Eizenberg H., Plakhine D., Hershenhorn J., Kleifeld Y. and Rubin B. Resistance to broomrape (*Orobanche* spp.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is temperature dependent. *Jornal of Experimental Botany.* 2003. Vol. 54. № 385. P. 1305–1311.
204. Wegmann K., von Elert E., Horloff H.-J., Stadler M. Tolerance and resistance to *Orobanche*. In: K.Wegmann and L.J.Musselman (eds.). *Progress in*

Orobanche Research. 1991. P. 318–321.

205. Сахно Т. В. Динаміка активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів соняшнику за ураження вовчком. Вісник СНАУ. Серія «Агрономія і біологія». вип. 9 (32). Суми, 2016. С. 3–9.

206. Пушкаренко А. Я., Игнатова С. А., Лукьянюк С. Ф. Влияние эндогенных фенолов на индукцию каллусообразования и регенерацию *in vitro* у подсолнечника. НТБ ВСГИ. 1989. 71, № 1. С. 24–36.

207. Смирнов Ю. В. Активность полифенолоксидазы у растений *Helianthus annuus* L. (Compositae) при обогащении среды микроэлементами. Ботанический журнал. 1978. 63, № 11. С. 1636–1639.

208. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Окислительный стресс и состояние антиоксидантной системе в колеоптилях пшеницы при действии пероксида водорода и нагрева. Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Серія Біологія. 2008. Вип. 2 (14). С. 42–52.

209. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Активність оксидоредуктаз у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Збірник наукових праць Уманського НУС. вип. 90. Ч. 1. Сільськогосподарські науки. Умань, 2017. С. 112–121.

210. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Петренкова В. П. Активність поліфенолоксидази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche cuman* Wallr.) генотипів соняшнику (*H. annuus* L.). Физиология и биохимия культурных растений. Т. 44. № 4. 2012. С. 355–360.

211. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність поліфенолоксидази у міжвидових гібридів соняшнику. Матеріали доповідей II Міжнародної наук. конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» 11-13 жовтня 2011 р. Харків. С. 89–90.

212. Колупаев Ю. Е. Физиолого-биохимические механизмы формирования адаптивных реакций растений: роль активных форм кислорода та іонів кальцію: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: 03.00.12 “Фізіологія рослин”. Київ, 2007. 35 с.

213. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази у батьківських ліній та гібридів соняшнику при інокуляції вовчком. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. Вип.15 (№1008), 2012. С. 109-115.

214. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази ліній соняшнику за інокуляції їх вовчком. Збірка матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» 11-13 травня 2012 р. Запоріжжя. С. 58–59.

215. Чигрин Т. В. Активність поліфенолоксидази та пероксидази у різних за стійкістю до вовчка генотипів соняшнику. Матеріали докладов V Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационно–инвестиционное развитие растениеводческой отрасли – состояние и перспективы» 4-6 июля 2012. Харьков. С. 23.

216. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Варіювання активності каталази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche cumanica* Wallr.) зразків соняшнику. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. Вип. 61. 2013. С. 189–194.

217. Чигрин Т. В. Активность окислительно-восстановительных ферментов у разных по устойчивости к заразице генотипов подсолнечника. Научно-технический бюллетень ВНИИМК «Масличные культуры». Вып. 155-156. 2013. С. 134–139.

218. Чигрин Т. В., Задорожная О. А. Активность некоторых ферментов подсолнечника в связи с устойчивостью к заразице. Матеріали VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 2-5 октября 2012. Москва, Россия. С. 487–491.

219. Патент № 79519 на корисну модель «Спосіб прискореного визначення стійкості зразків соняшнику до вовчка (*Orobanche cumanica* Wallr.)» від 25.04.2013./Задорожна О. А., Чигрин Т. В.; Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН; заявл.: 19.10.12; опубл.: 25.04.13. – Бюл. № 8 (частка авторства 50 %, проведення дослідів, аналіз даних).

220. Задорожна О. А., Чигрин Т. В., Юшкіна Л. Л. Андро́генез *in vitro* гібридів соняшнику за участю диких видів. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. Вип. 20, Т. 2. 2012. С. 108–112.

221. Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л., Чигрин Т. В., Супрун О. Г. Особливості андро́генезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. Бюллетень Державного Нікітського бортанічного саду. № 105. 2012. С. 166–121.

222. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андро́генна здатність пиляків соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (рослинний геном VI)» 7-10 вересня 2010 р. Одеса. С. 100.

223. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андро́генез *in vitro* різних видів соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» 4-5 жовтня 2010 р. Харків. С. 25–26.

224. Чигрин Т. В., Задорожная О. А., Юшкина Л. Л. Способность к андро́генезу в культуре *in vitro* пыльников разных видов подсолнечника. Сборник материалов VI Международной конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур» 24-25 февраля 2011. Краснодар, Россия. С. 357–361.



## ДОДАТКИ

## ДОДАТОК А



## ДОДАТОК Б

**ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА**  
ім. В. Я. Юр'єва

НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК  
УКРАЇНИ

61060, Харків, Московський пр., 142  
тел. (+38) (057) 392-13-43  
факс (+38) (057) 779-84-17  
E-mail: yuriev1908@gmail.com



**PLANT PRODUCTION INSTITUTE**  
nd. a. V. Ya. Yuryev

NATIONAL ACADEMY OF AGRARIAN  
SCIENCES OF UKRAINE

61060, Kharkiv, Moskovskiy pr., 142  
phone (+38) (057) 392-13-43  
fax (+38) (057) 779-84-17  
E-mail: yuriev1908@gmail.com

*1/2a-1/4 26.12.2016 р.*

## ДОВІДКА

Надана Сахно Тамарі Володимирівні, науковому співробітнику лабораторії генетики, біотехнології та якості, в тому, що розроблений нею прискорений метод біохімічної оцінки соняшнику на стійкість до вовчка та виділений в процесі виконання досліджень селекційний матеріал використовуються в лабораторії селекції та генетики соняшнику Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН з метою прискорення селекційного процесу та створення нових, стійких до вовчка гібридів соняшнику.

Директор Інституту рослинництва  
ім. В. Я. Юр'єва НААН,  
академік, професор, доктор с.-г. наук



В. В. Кириченко

Завідувач лабораторії  
селекції та генетики соняшнику,  
канд. с.-г. наук, ст. н. сп.

*Василь* В. І. Сивенко

## ДОДАТОК В

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

*Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази у батьківських ліній та гібридів соняшнику при інокуляції вовчком. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. Вип.15 (№1008), 2012. С. 109-115. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, написання статті).
2. Задорожна О. А., Чигрин Т. В., Юшкіна Л. Л. Андрогагенез *in vitro* гібридів соняшнику за участю диких видів. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. Вип. 20, Т. 2. 2012. С. 108–112. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).
3. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Петренкова В. П. Активність поліфенолоксидази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanchе сumana* Wallr.) генотипів соняшнику (*Н.аnnuus* L.). Физиология и биохимия культурных растений. Т. 44. № 4. 2012. С. 355–360. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).
4. Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л., Чигрин Т. В., Супрун О. Г. Особливості андрогагенезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. Бюллетень Державного Нікітського бортанічного саду. № 105. 2012. С. 166–121. (частка авторства 30 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).
5. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Варіювання активності каталази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanchе сumana* Wallr.) зразків соняшнику. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. Вип. 61. 2013. С. 189–194. (частка авторства 70 %, проведення експерименту узагальнення даних, написання статті).
6. Чигрин Т. В. Активность окислительно-восстановительных ферментов у разных по устойчивости к заразихе генотипов подсолнечника.

Научно-технический бюллетень ВНИИМК «Масличные культуры». Вып. 155-156. 2013. С. 134–139.

7. Сахно Т. В. Морфометричні показники та вміст фенольних сполук у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Селекція і насінництво. Випуск 110. № 15. Харків. 2016. С. 117–122.

8. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Вміст фенольних сполук та морфометричні показники у зразків-диференціаторів соняшнику за умов ураження вовчком. Вісник аграрної науки Причорномор'я. вип. 4 (92). Миколаїв. 2016. С. 92–98. (частка авторства 70 %, проведення експерименту узагальнення даних, написання статті).

9. Сахно Т. В. Динаміка активності оксидоредуктаз у зразків-диференціаторів соняшнику за ураження вовчком. Вісник СНАУ. Серія «Агрономія і біологія». вип. 9 (32). Суми, 2016. С. 3–9.

10. Сахно Т. В., Петренкова В. П. Активність оксидоредуктаз у ліній та гібридів соняшнику за ураження вовчком. Збірник наукових праць Уманського НУС. вип. 90. Ч. 1. Сільськогосподарські науки. Умань, 2017. С. 112–121. (частка авторства 70 %, проведення експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

***Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:***

11. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андрогенна здатність пиляків соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (рослинний геном VI)» 7-10 вересня 2010 р. Одеса. С. 100. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, статистичний аналіз даних).

12. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. Л. Андрогенез *in vitro* різних видів соняшнику. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» 4-5 жовтня 2010 р. Харків. С. 25–26. (частка авторства 40 %, проведення експерименту, статистичний аналіз

даних).

13. Чигрин Т. В., Задорожная О. А., Юшкина Л. Л. Способность к андрогенезу в культуре *in vitro* пыльников разных видов подсолнечника. Сборник материалов VI Международной конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур» 24-25 февраля 2011. Краснодар, Россия. С. 357–361 (частка авторства 45 %, проведення експерименту, аналіз та узагальнення даних).

14. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність поліфенолоксидази у міжвидових гібридів соняшнику. Матеріали доповідей II Міжнародної наук. конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого–біохімічні і генетичні аспекти» 11-13 жовтня 2011 р. Харків. С. 89–90. (частка авторства 50 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

15. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази ліній соняшнику за інокуляції їх вовчком. Збірка матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» 11-13 травня 2012 р. Запоріжжя. С. 58–59. (частка авторства 65 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

16. Чигрин Т. В. Активність поліфенолоксидази та пероксидази у різних за стійкістю до вовчка генотипів соняшнику. Матеріали докладов V Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационно–инвестиционное развитие растениеводческой отрасли – состояние и перспективы» 4-6 июля 2012. Харьков. С. 23.

17. Чигрин Т. В., Задорожная О. А. Активность некоторых ферментов подсолнечника в связи с устойчивостью к заразице. Матеріали VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 2-5 октября 2012. Москва, Россия. С. 487–491. (частка авторства 65 %, проведення експерименту, аналіз даних, написання тез).

18. Сахно Т. В. Рівень фенольних сполук у генотипів соняшнику з

різною стійкістю до *Orobanche cumanana* Wallr. Збірник матеріалів міжнародної наукової конференції «Стійкість соняшнику до біотичних та абіотичних факторів» 24-25 червня 2014 р. Харків. С. 67–68.

19. Сахно Т. В. Влияние заражения заразихой на ростовые процессы и содержание фенольных соединений у линий и гибридов подсолнечника. Материалы IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» 20-25 апреля 2015 р. Москва, Россия. С. 425–430.

20. Сахно Т. В. Вплив ураження вовчком на морфометричні показники та загальний вміст фенолів у ліній-диференціаторів соняшнику. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Інноваційні напрями розвитку галузі рослинництва» 7-8 липня 2016 р. Харків. С. 18–19.

***Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:***

21. Патент № 79519 на корисну модель «Спосіб прискореного визначення стійкості зразків соняшнику до вовчка (*Orobanche cumanana* Wallr.)» від 25.04.2013./Задорожна О. А., Чигрин Т. В.; Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН; заявл.: 19.10.12; опубл.: 25.04.13. – Бюл. № 8 (частка авторства 50 %, проведення дослідів, аналіз даних).