МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет агрономії
Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту

«____» _____ 2024 р.

Зав. кафедри, д. с.-г. н., професор

_____ Людмила РЯБОВОЛ

РОЗМНОЖЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ БУРЯКУ ЦУКРОВОГО (*BETA VULGARIS* L.) *IN VITRO* В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ «БІОТЕХНОЛОГІЇ» УНУС

Виконав: студент ІІ курсу, групи 26 м-а
спеціальності 201 Агрономія
МАЗЕПА Сергій Васильович

Керівник:
СЕРЖУК Олександр, к. с.-г. н., доцент

Умань – 2024

ЗМІСТ

ВСТУП……..…... 3
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЇ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ (огляд літератури) 5
1.1. Досягнення та проблеми культури *in vitro* буряків цукрових …. 5
1.2. Розмноження *in vitro* буряків цукрових …….. 8
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ…….. 17
2.1. Ботаніко-біологічна характеристика буряка цукрового……..… 17
2.2. Господарсько-цінні ознаки вихідного матеріалу …… 18
РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 20
3.1. Лабораторні умови .....…… 20
3.2. Схема досліду……..…… 20
3.3. Методика проведення досліджень……. 22
РОЗДІЛ 4. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ …… 25
4.1. Підбір експлантів, що вводяться в культуру *in vitro* ……..… 25
4.2. Стерилізація рослинного матеріалу буряків цукрових …….. 28
4.3. Введення в культуру *in vitro* буряків цукрових 33
4.4. Підбір живильного середовища для проліферації ……..... 34
4.5. Підбір живильного середовища для активації розвитку експлантатів ……... 38
4.6. Індукція ризогенезу мікроклінів буряків цукрових …… 42
РОЗДІЛ 5. МОДЕЛЮВАННЯ ВИРОБНИЧИХ НЕБЕЗПЕК ПІД ЧАС МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ БУРЯКУ ЦУКРОВОГО …… 50
ВИСНОВКИ.....…….... 54
РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ……. 55
ДОДАТКИ ……..... 56
ЛІТЕРАТУРА ……. 63

ВСТУП

Цукрові буряки в Україні є єдиним джерелом цукру – життєво необхідного продукту харчування.

За словами фахівців цукрової галузі, цукробуряковий комплекс України посівні площі цукрових буряків майже в 2 рази, при цьому урожайність практично розвалився. За останнє десятиріччя українські буряківники скоротили культури зменшилася, а обсяги заготівлі „солодкого коренеплоду" зменшилися з 31,3 млн.т в 1991-1995 роках до 16,1 млн. т. в 1996-2005 роках. Раніше в галузі працювало 192 цукрових заводи, сьогодні реально працюють 120 (1).

У 2015 році бурякоцукровий комплекс України продовжував відстоювати своє право на існування – кількісні і якісні показники виробництва цукру покращились. Середня урожайність цукрових буряків зросла з 238 до 251 ц/га, цукристість – з 15 до 16,6 відсотка, цукру вироблено 1 мільйон 890 тисяч тонн, тобто на 100 тисяч тонн більше ніж в попередньому році (2).

Сучасні технології виробництва цукрових буряків у принципі неможливі без використання високопродуктивних однонасінних гібридів з добрими показниками посівних якостей насіння.

Головне завдання селекції цукрових буряків – створення нових диплоїдних і триплоїдних гібридів на чоловічо-стерильній основі (ЦЧС). Введення у виробництво таких гібридів – найвигідніший захід щодо підвищення врожайності, який забезпечує високу віддачу вкладених у землеробство капіталовкладень.

Завданням селекції нових триплоїдних гібридів цукрових буряків на ЧС основі є добір компонентів схрещування з високою комбінаційною здатністю для одержання гектерозисних гібридів. Такі компоненти повинні відповідати вимогам цілого ряду господарсько-цінних ознак, як то стійкість

коренеплодів і листового апарату до хвороб, високі технологічні якості сировини для цукроваріння, нецвітушність тощо.

Материнські компоненти повинні мати ознаки, які забезпечують повну гібридизацію з гетерозисним запилювачем, високу ступінь стерильності, однонасінність та високу схожість насіння (3).

Метою даної магістерської роботи є вивчення нових триплоїдних гібридів цукрових буряків на чоловічо-стерильній основі уманської селекції в попередньому сортовипробуванні – на першому етапі оцінки комбінаційної здатності батьківських форм для одержання гібридів такого типу.

РОЗДІЛ 1.
БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЇ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ (огляд літератури)

1.1. Досягнення та проблеми культури *in vitro* буряків цукрових

Ідея про можливість культивування клітин поза організмом *in vitro* була висловлена стосовно клітин рослин. Дослідникам довго не вдавалося культивувати рослинні клітини на штучних живильних середовищах. Перших успіхів у цій галузі досягли у 30-х роках XX століття, а бурхливого розвитку новий напрямок досліджень набув у 60 – 70-х роках того ж століття [1, 3].

1892 – 1902рр. – перші роботи в галузі розвитку методу культури ізольованих тканин рослин. Цей період пов'язаний з іменами трьох видатних німецьких вчених: Х. Фьохтінга, К. Рехінгера та Г. Габерландта. Не отримавши експериментальних успіхів, ці дослідники висунули ряд ідей та гіпотез, які були реалізовані значно пізніше [2].

Х. Фьохтінг, вивчаючи явище полярності у рослин, пробував вирощувати *in vitro* невеличкі шматочки рослинних тканин.

К. Рехінгер поміщав шматочки коренеплодів буряків на вологу поверхню фільтра і спостерігав процес калюсоутворення. Зменшуючи розмір експлантата, він визначив мінімальний розмір фрагмента, здатного утворювати калюс.

Г. Габерландт вперше висловив ідею про можливість культивування *in vitro* ізольованих клітин рослин та запропонував гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої рослинної клітини [3, 4].

Із середини 50-х років минулого століття почалась ера молекулярної генетики, що заклала основу сучасної біотехнології. Почавши із синтезу в клітинах мікроорганізмів гормональних препаратів і освоївши фармацевтичний ринок генно-інженерних препаратів, сучасна біотехнологія

знайшла широке застосування в сільському господарстві, передусім у рослинництві [5, 6].

У недалекому минулому в Україні були групи вчених, які були піонерами досліджень впливу ДНК на рослини і могли працювати на сучасному рівні в галузі генної та клітинної інженерії. Коли виникла потреба у забезпеченні коштами для проведення генно-інженерних досліджень, більшість робіт було законсервовано, а багато з учених виїхали працювати за кордон [6].

Південний біотехнологічний центр у рослинництві НААН (ПБЦ) є тією науковою установою, на прикладі якої можна оцінити стан і особливості розвитку сучасної сільськогосподарської біотехнології в Україні. Це головна організація з програми "Біотехнологія культурних рослин". ПБЦ, є основною базою НААН для розробки і впровадження молекулярних ДНК-технологій і технологій "*in vitro*", де постійно працюють науковці інститутів системи НААН.

Ідея про можливість культивування клітин поза організмом – *in vitro* – була висловлена стосовно клітин рослин. Однак, уперше в культуру було введено клітини тварин. Бурхливого розвитку новий напрямок досліджень набув у 60 – 70-х роках того ж минулого століття [3, 7].

Досягнення молекулярної генетики, культури клітин та органів, інженерні розробки створили базу для принципово нових підходів до вдосконалення рослин. Це одержало назву "сучасні біотехнології". Важливе місце в програмах рослинництва посідають генна інженерія, яка дає змогу виділити й пересадити окремі гени, і культура тканин та органів, яка дає змогу здійснювати клонування. Розвиток молекулярної генетики сприяв розвиткові традиційної селекції рослин, озброївши останню ефективними методами аналізу й добору з використанням молекулярних маркерів.

У сучасній біотехнології рослин визначилися три напрями: одержання трансгенних рослин; ДНК-технології; технології, основані на використанні культури тканин та органів [4, 8].

Мікророзмноження, тобто вегетативне розмноження *in vitro,* нині стає все більш широковживаним методом у селекційно-генетичних дослідженнях з буряком цукровим [8]. Хоча буряк цукровий, як і решта видів роду *Beta L*. неспроможний до природного вегетативного розмноження, однак вдаючись до стимулювання розвитку пазушних, а іноді й адвентивних бруньок можна клонувати найбільш цінні генотипи традиційними методами, не вдаючись до техніки *in vitro* [10]. На жаль, кількість таких бруньок дуже низька [11], що перешкоджає широкому використанню природних способів вегетативного розмноження буряку цукрового. Розмноження *in vitro* найбільш вдало поєднує переваги щодо збереження спадковості певних ознак розмножуваних генотипів, зокрема чоловічу стерильність та інші господарсько-цінні ознаки з підвищеними коефіцієнтами розмноження.

Хоча публікації з питань запровадження технологій *in vitro* у селекційно-генетичні дослідження досить часто з’являються в Україні та закордоном [3, 12], низка питань щодо можливості розмноження компонентів гібридів буряків цукрових у біотехнологічних лабораторіях ще не з’ясовано. Дотепер нерозроблено чітких, відтворюваних методик, а окремі існуючі, досить трудоємкі, складні і стосуються переважно окремих фрагментів технології. Гальмує впровадження технологій *in vitro* також недостатність знань морфогенних потенцій рослин буряку цукрового та способів управління ними в культурі тканин [10, 13].

У 70 роках було створено перші вітчизняні однонасінні гібриди на стерильній основі. Це був гібрид Ювілейний, виведений спільно Верхняцькою ДСС та Уманською ЦСГС Інституту цукрових буряків (колишній ВНІЦ) [11].

У даний час розмноження буряків культивуванням меристем багато авторів вважають найбільш прийнятним для збереження цінних матеріалів [8, 9]. Проте, слід зазначити, що розмноження рослин пазушним брунькуванням є найповільнішим шляхом із відомих типів органогенезу. З метою збільшення коефіцієнту розмноження та прискореного відтворення

цінних матеріалів також використовують індукцію адвентивних пагонів безпосередньо із спеціалізованих тканин експлантів [11]. Разом з тим, застосування технології мікроклонального розмноження буряків вегетативними органами не виключає можливості отримання генетично зміненого потомства. Так, значну цитогенетичну нестабільність індукованих рослин-регенерантів було виявлено при мікроклональному розмноженні тетраплоїдних та гексаплоїдних форм буряків цукрових [12]. Регенеранти різного рівня плоїдності виявлені і при клональному розмноженні диплоїдних рослин.

В останні роки досягнення в мікроклональному розмноженні буряків цукрових в умовах *in vitro* продемонстрували великий потенціал клітинних технологій щодо розмноження і генетичного покращення цієї культури [7, 9, 14]. Однак, залишається не повністю вивченим вплив рівня плоїдності, особливостей гібридів, вихідних форм і експлантатів на коефіцієнт розмноження буряків цукрових у культурі *in vitro*, не встановлені причини слабкого брунькування та вкорінення окремих генотипів. Попередні дослідження показали, що далеко не всі описані схеми можуть бути успішно застосовані в роботі з різними генотипами [6]. Таким чином, одержання рослин-регенерантів дуже складний і трудомісткий процес і заслуговує на особливу увагу дослідників.

Сьогодні теоретичні і практичні аспекти біотехнології вирішуються в ряді наукових та вищих навчальних закладів. Серед них – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН та інші. Українськими вченими охоплено широке коло досліджень, які мають вагоме значення для перспективи розвитку культури in vitro буряків цукрових [5, 15].

1.2 Розмноження *in vitro* буряків цукрових

У понятті біотехнологія рослин об’єднуються методи культури клітин і тканин рослин з методами молекулярної біології та технікою отримання рекомбінантних молекул ДНК. Вирощування клітин і тканин вищих рослин поза організмом на штучних живильних середовищах у контрольованих умовах дає змогу створювати принципово новий вихідний матеріал для добору, прискорено розмножувати його, виконувати добір на клітинному рівні та індукувати органогенез. Те, що злиття соматичних клітин рослин дає змогу об’єднувати в одній клітині геноми видів і родин зі статевою несумісністю, значно стимулює інтерес селекціонерів та біотехнологів до використання цього методу для подолання обмежень в обміні генами, що властиві традиційним методам селекції [9, 14].

Введені в культуру клітини чи тканини вищих рослин мають унікальні властивості. Їх можна вирощувати у вигляді неорганізованої маси, придатної для клонування та здатної переходити від розмноження і росту до синтезу видоспецифічних господарсько-важливих сполук. Разом з цим зберігається можливість, змінюючи склад живильних середовищ, стимулювати органогенез або примушувати ізольовані клітини утворювати ембріоїди і на цій основі – рослини-регенеранти. Залежно від мети, для якої селекціонер вдається та методів біотехнології їх поділяють на дві великі групи: селекційну, яка використовується для індукування мінливості й наступного добору та технологічну, до якої звертаються для прискореного розмноження найцінніших, дефіцитних генотипів; оздоровлення існуючих сортів-клонів; синтезування рідкісних, цінних сполук; збереження генофонду культурних рослин [15, 16].

Докладніше можливості технологічного напрямку вивчають насіннєводи, хоча деякі аспекти прискореного розмноження мають значення і для селекції. Це стосується насамперед розмноження вихідного матеріалу, у тому числі чоловічостерильних материнських ліній гетерозисних гібридів, а

також самих гібридів першого покоління F_1, що відкриває нову можливість здешевлення та прискореного їх виробництва [17].

Вивчення процесу експериментального морфогенезу *in vitro* на всіх рівнях організації (від окремої клітини до верхівки пагона) призвело до створення технології мікроклонального розмноження рослин, що здебільшого уже став комерційним [16, 17]. Застосування мікроклонального розмноження в селекції рослин, особливо перехреснозапильних, дасть змогу забезпечити збереження, розмноження і відтворення генотипів з господарсько-цінними ознаками через визначений проміжок часу [17].

Передбачається, що пагони рослини, які розмножується нестатевим шляхом, не є індивідуальним в звичайному розумінні слова. Вони лише частини (клони) материнської особини, ідентичній їй і між собою. Отже, мікроклональне розмноження – це використання техніки *in vitro* для швидкого нестатевого одержання рослин, ідентичній вихідній. Перевагами мікроклонального розмноження рослин порівняно з традиціфйними методами є: значно вищі коефіцієнти розмноження, що за розрахунками досягають 10^5–10^6 клонів за рік, тоді як традиційно за цей самий період від однієї рослини одержують 5–100; мініатюризація процесу, що економить площі, зайняті маточними і розмножуваними рослинами; оздоровлення вихідного садивного матеріалу від нематод, бактерій і вірусів [18]. Значною перевагою технології є і те, що в умовах *in vitro* часто вкорінюються ті рослини, які зовсім не розмножуються звичайним способом. Важливо і те, що садивний матеріал, отриманий цим способом, генетично-ідентичний вихідній рослині, оскільки утворюється з меристемних соматичних клітин рослин. Водночас за статевого розмноження рослин нащадок розвивається із зиготи, утвореної внаслідок злиття статевих клітин двох різних особин. Ця зигота містить гени як батьківського, так і материнського організму, тому нащадок, що виникає в процесі статевого розмноження, не ідентичний батьківським формам і несе спадкові ознаки обох батьків [18].

Технологія мікроклонального розмноження будь-якої культури включає

чотири основні етапи: введення вихідної форми в стерильну культуру, власне мікророзмноження, вкорінення розмножених пагонів, переведення стерильної культури в ґрунт. Розробка прийомів *in vitro* для елітних рослин, гетерозисних гібридів та сортів дає змогу розв'язати проблему швидкого розмноження форм, що мають практичну цінність, а також збереження матеріалів для використання їх у рекурентній селекції. Мікроклональне розмноження має певні переваги порівняно з традиційними способами: вирощування в штучних умовах, які контролюються, із меристематичних тканин дає можливість досягти елімінації вірусів та інших патогенних мікроорганізмів і отримати здоровий садивний матеріал; ріст рослин можна підтримувати протягом багатьох років; можна застосовувати для форм рослин, які не розмножуються вегетативно або не дають життєздатного насіння; можливість вести відбір генотипів, стійких до несприятливих зовнішніх умов (екстремальні температури, засолення та закислення субстрату, пригнічуюча дія гербіцидів тощо), а також продуктивніших форм; швидкість та коефіцієнт розмноження досягає 1:1000000 і дає можливість в 2–3 рази скоротити строки відбору та отримання нових рослин в селекційних дослідженнях [8, 12, 13].

Нині існує кілька різних детально розроблених методів мікроклонального розмноження. Різняться вони станом вихідних клітин та тканин, які беруться для отримання мікроклонів. Необхідно досягти утворення великої кількості мікроклонів та забезпечити їхнє вкорінення. Для того, щоб ефективність мікроклонального розмноження була високою, необхідно на всіх етапах виконання підтримувати оптимальні умови вирощування. Тому для кожної культури розробляється своя методика мікроклонального розмноження.

Укорінені рослини в разі необхідності розміщують на депонування при понижених температурах. Це має велике значення, оскільки дозволяє затримувати розвиток рослин і зберігати їх довгий час без пересадок, використовуючи по мірі необхідності. Для переведення стерильних рослин у

ґрунт необхідно відбирати здорові екземпляри із світлою добре розвиненою кореневою системою [8, 10].

У репродукованій культурі тканин видимі морфологічні відхилення не зустрічаються. Збереження та подальше вегетативне розмноження рослин в культурі *in vitro* набуває великого значення, в зв'язку з рекурентним відбором, без якого неможливе створення гібридів на ЧС-основі (чоловічостерильній основі). Із вирощених за допомогою культури *in vitro* маточних рослин та коренеплодів отримують високоякісне насіння [15].

У селекційній практиці поряд із мікроклональним розмноженням рослин широко використовується метод калюсних культур експлантів різних органів, які є додатковим резервом розмноження селекційного матеріалу. Він дає можливість практично використовувати в селекційному процесі новий тип мінливості – сомаклональну. Калюсні культури багатьох сільськогосподарських рослин характеризуються великою нестабільністю. Генетична варіабельність соматичних клітин є однією з причин неоднорідності рослин, отриманих із калюсних тканин. Калюсогенез — це перший етап на шляху отримання сомаклональних варіантів, що потребує перепрограмування шляхів розвитку клітини. Клітина, переведена в умови культивування *in vitro*, зберігає свою основну генетичну інформацію про цілий організм і може реалізувати її. Проте фізичні та хімічні фактори культивування, що мають мутагенну дію, а також генетична гетерогенність соматичних клітин експланту створюють передумови для виникнення генетично змінених рослин. Метод отримання сомаклональної мінливості дає змогу індукувати не лише мінливість геному, але й плазмону. В основі феномену сомаклональної мінливості лежать складні процеси структурної і функціональної перебудови генетичного апарату клітин. Використовуючи його, вже отримано форми багатьох сільськогосподарських культур з цінними ознаками [5, 6, 19, 20].

Залежно від біовиду та генотипу рослин, експресії конкретних генів, умов культивування та підбору експлантів можливо виявити утворення калюсу в культурі *in vitro*. Якщо це процес детерміновано генетично і

клітини перебувають у стані компетентності до індукуючих факторів, то досить одного вичленування експланту і перенесення в культуру на живильне середовище, навіть без регуляторів росту, щоб розпочалась активна проліферація клітин [21, 22].

У переважної більшості генотипів культурних рослин калюсогенез утворюється при підвищених концентраціях в живильному середовищі регуляторів росту класу ауксинів (індолілоцтова кислота (ІОК), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) та експлантами, які виділені з онтогенетичних молодих тканин і органів з високим потенційним рівнем проліферативної активності [23, 24].

Технологія вегетативного мікроклонального розмноження буряків цукрових, які традиційно розмножуються дуже повільно, дає змогу тиражувати і отримувати необмежену кількість клонів від рослини-донора, що значно прискорює селекційний процес. У першу чергу, це стосується ліній з цитоплазматичною чоловічою стерильністю. Так як буряки цукрові є двохрічною перехреснозапильною культурою, прискорене розмноження та підтримка таких генотипів є актуальною в селекційно-генетичних дослідженнях [25, 26, 27]. Для вегетативного мікроклонального розмноження буряків цукрових використовують два основні підходи: активація пазушних меристем та утворення адвентивних пагонів з клітин експланту. При таких способах мікроклонування адвентивні бруньки і потім рослини-регенеранти формуються з клітин пазушних меристем або з диференційованих клітин експланту [25, 28]. У роботі з мікроклонального розмноження актуальними є детальне вивчення основних етапів культивування буряків; оптимізація способів введення в культуру *in vitro* різних генотипів; створення універсальних поживних середовищ; встановлення лімітуючих факторів відтворення рослин з соматичних клітин експланту [28, 29].

На думку цілого ряду авторів [25–32] калюсні культури буряків цукрових успішно використовуються для добору сомаклональних варіантів і мутантів на клітинному рівні та створення форм, стійких до стресових форм

довкілля; отримання трансгенних рослин і одержання дигаплоїдних ліній та поліплоїдних форм.

Як відомо, калюс у буряків цукрових може утворюватись з сім'ядолей, черешків, листків, а також гіпокотиля на живильних середовищах, доповнених фітогормонами у певних концентраціях [17, 23, 30]. Для індукції процесів калюсоутворення використовують різні способи оптимізації умов культивування. Зокрема, середовища, що різнились за мінеральним складом і органічними добавками [30]. Доведено, що основними індукторами калюсогенезу з експлантів даної культури є гормональні речовини ауксинової і цитокінінової природи [31, 32]. Встановлено, що суттєвий вплив на проліферативні процеси мають і фізичні фактори, у тому числі температура і освітлення [33]. Однак, повторити в незалежних умовах методичні аспекти процесів калюсогенезу у різних генотипів буряків вдається рідко. Рослини різних форм проявляють специфічність в умовах *in vitro*, потребують особливого добору компонентів живильного середовища, використання різних тканин в якості експланта. Тому досить часто виникає необхідність розробки специфічних умов, які сприяють процесам калюсогенезу в культурі ізольованих клітин певних генотипів. На сьогодні не існує рутинного протоколу живильного середовища, на якому можливо індукувати з високою частотою утворення калюсу у різних форм буряків, в тому числі і ЧС компонентів [34, 35].

У селекційній роботі при гібридизації, використовуються чисті гомозиготні лінії, які одержують методом повторних інбридингів, що пов'язане з загальними труднощами у такої культури, як буряки, завдяки генетичній системі самонесумісності. Тому одержання гомозиготних ліній традиційним методом є трудомістким процесом, а використання гаплоїдів як посередників для одержання гомозиготних рослин шляхом подвоєння числа хромосом є досить актуальним [34].

Гаплоїдні рослини в культурі *in vitro* можна одержати при культивуванні на живильному середовищі пилку, пиляків, незапліднених насіннєвих

зачатків [36, 37]. Одержані гаплоїди можна використовувати не тільки в гомозиготизації з наступним одержанням гібридів в результаті простих чи складних схрещувань, а і для кількісного генетичного аналізу сільськогосподарських рослин, що включає вивчення взаємодії генів і генетичної мінливості, вивчення груп зчеплення, встановлення кількості генів, діючих на кількісні ознаки, а також локалізації полігенів [38, 39, 40]. Гаплоїди все частіше почали використовувати в селекційно-генетичних програмах як вихідний матеріал для створення моносомних рослин, для дослідження цитогенетичної структури виду, закономірностей багатьох генетичних явищ [41, 42].

Практичний інтерес у гетерозисній селекції буряків цукрових мають подвоєні гаплоїди, отримані шляхом колхіцинування, що є аналогами селекційних гомозиготних ліній. Крім того, дигаплоїдні лінії дають глибше розуміння генетики моногенних і полігенних ознак [43, 44].

Традиційні шляхи отримання гаплоїдів у буряків цукрових *in vivo* грунтуються на таких способах стимуляції розвитку гаплоїдних клітин зародкового мішку материнської рослини як схрещування цих рослин з дикими видами роду *Beta L.*, формами різного рівня плоїдності, запилення опроміненим *у*-промінням пилком буряків [43, 45, 46]. Гаплоїдні рослини, що отримані шляхом індукованого гіногенетичного гаплоїдного партеногенезу, схожі за ознаками на материнську рослину. Використання культури *in vitro* значно прискорює створення чистих ліній зі збагачених у генетичному відношенні гібридів без негативного впливу інцухт-депресії [39, 40, 47].

Спроби отримати андроклінні гаплоїди *in vitro* на основі індукції розвитку елементів чоловічої генеративної сфери – пиляків і мікроспор не були успішними. Деякі автори навіть вважають буряки цукрові неандрогенним видом [48]. Отримані в культурі пиляків регенеранти мають рівень плоїдності, тотожний плоїдності донорної рослини, оскільки морфогенез проходив з тканин пиляків. В основному ж спостерігаються такі морфогенетичні процеси як калюсогенез і ризогенез [47, 49]. Причиною

цього є слабка диференціація пиляків у культурі *in vitro* [50].

Ефективне використання гіногенезу в культурі *in vitro* описане для багатьох видів рослин. Хоча тільки у буряків цукрових культура зав'язей і незапліднених насіннєвих зачатків рекомендована як альтернатива використанню андрогенезу. Частота виходу гаплоїдів у культурі зав'язей і незапліднених насіннєвих зачатків фертильних і ЧС-форм складала 2,2% [51]. Тому актуальним є питання вивчення умов індукції гаплоїдного партеногенезу в культурі *in vitro*.

Збільшення частоти формування гіногенетичних макроструктур можливе з використанням селекційно-генетичних і біотехнологічних підходів [9, 46, 52]. Однак, поряд з цим методом у селекційній практиці часто виникають проблеми пов'язані з підтриманням та збереженням у чистоті, а також розмноженням ідентичного батьківським формам генетично-цінного вихідного матеріалу, отриманого як традиційними, так і нетрадиційними методами (самозапилення, гаплоїдія, клітинна селекція, мутагенез, генетична трансформація). Вирішення цієї проблеми стало можливим із розробкою методів клонального мікророзмноження рослин в умовах *in vitro* – а саме з методом індукції пагонів з меристем.

Метод індукції пагонів з меристем найбільшою мірою гарантує генетичну ідентичність регенерантів з вихідним матеріалом [2, 26, 53].

Тому метою наших досліджень було прискорене розмноження батьківських компонентів – ЧС форм буряків цукрових в умовах *in vitro*.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ.

2.1 Ботанічна і біологічна характеристика буряка цукрового

Буряк цукровий (*Beta vulgaris L.V. Saccharifera*) відноситься до класу дводольних родини лободових (*Chenopodiaceae*).

Рід *Beta* об'єднує чотирнадцять диких і один культурний вид. У процесі еволюції видів роду *Beta L.* утворились три природних групи видів-секцій:

I. *Patellares* Transch. – канарські (три види);

II. *Corollinde* Tranch. – гірські (шість видів);

III. *Vulgaris* Transch. – звичайні (шість видів).

До останнього виду належить відібраний і сформований людиною збірний вид *Beta vulga*ris *L.*, що об'єднує підвиди: *B. cicla* – буряки листкові і *B. cr*assa – буряки коренеплідні [1, 11].

Родина Лободових налічує близько 100 родів і 1500 видів. На сучасному етапі, як вихідний селекційний матеріал вивчаються форми буряка цукрового, які відрізняються біоморфологічними особливостями.

Диплоїдні багатонасінні буряки з 2-статевими квітками (2n=18), це основний вихідний матеріал у селекції на гетерозис [5].

Тетраплоїдні багатонасінні буряки з двостатевими квітками (2n=36) використовуються як запилювачі при створенні гетерозисних триплоїдних гібридів на стерильній основі.

Буряк цукровий різниться від багатьох польових культур особливостями росту і розвитку, які необхідно враховувати при його вирощуванні. Рослини буряку цукрового мають 2-річний цикл розвитку.

Насіння буряка цукрового має дві оболонки, зародок і перисперм. Зародок складається з корінця і 2-х сім'ядолей та бруньки між ними. Зародок колоподібно загнутий і обіймає перисперм – тканину, клітини її заповнені крохмалем [54].

Коренеплоди буряка цукрового складаються з головки, шийки і кореня. На головці знаходяться бруньки й листки, на корені розміщені корінці, що засвоюють поживні речовини та воду з ґрунту. Коренева система значно розвинута. Коріння проникає на глибину 1,5–2 метра і більше, розгалужуючись в бік до одного метра.

Буряк цукровий має добре розвинуту листкову поверхню. Її функції на початку вегетаційного періода виконують сім'ядольні листки. У першій половині вегетації інтенсивно ростуть листки, а в другій – корені. Надважливою хімічною складовою коренеплодів є цукор. Кількість його становить в середньому 17–20% від маси коренеплоду.

Буряк цукровий використовує з навколишнього середовища світло і воду. Тепла погода у поєднанні з достатніми кількостями опадів сприяє збільшеному накопичені цукру. Завдатком отримання високих врожаїв буряків цукрових з високою кількістю цукрів є достатнє живлення азотом, калієм і фосфором. Всерізне знання біологічних властивостей буряків цукрових, у їх потребі води, тепла і елементів живлення у різні часи вегетації дозволяють позитвно впливати у регулювання процесів, які формують урожайність та її якість [36].

2.2 Характеристика вихідного матеріалу

Дослідження виконували у лабораторії біотехнології і мікроклонального розмноження кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського НУС впродовж 2023-2024 рр. з метою відпрацювання технології *in vitro* чоловічостерильних форм буряка цукрового.

Вихідним матеріалом в наших дослідженнях були ЧС-матеріали індивідуальних доборів різного походження з різними за комплексом біоморфологічних ознак.

Чоловічостерильні компоненти отримали на основі вивчення закріплюючої здатності з однонасінних сортів-популяцій Уманського, Білоцерківського, Ялтушківського та Іванівського походження, вони характеризуються високим рівнем стерильності та однонасінністю. Дані продуктивності знаходились в межах групового стандарту, а малий рівень цвітушності показує на можливість одержання нових вихідних матеріалів, насіння яких здатне проростати за низьких температур. Досліджувана кількість селекційних номерів — 100 штук.

У результаті проведених досліджень було виділено 100 генотипів, які були введені в культуру *in vitro* для прискореного розмноження. Це аналоги материнських компонентів кращих за господарськими ознаками пробних гібридів стійкі до «цвітушності».

РОЗДІЛ 3.

УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Лабораторні умови

Досліди проводяться на базі біотехнологічної лабораторії Уманського національного університету садівництва.

Експланти розмножували у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям, на скляних стелажах, при температурі 25±1 °С, відносна вологість повітря 70–75 %, фотоперіод — 16 годин день 8 годин ніч, та штучне освітлення за інтенсивності 3000–5000 люкс.

Використовували у дослідженнях живильне середовище Гамборга (В5) нами модифіковане.

Для кращої індукції ризгенезу вивчали модифіковане живильне середовище Гамборга (В5) з додаванням макро- і мікроелементів та додатково фітогормони – 6-бензиламінопурин (БАП) — 1,0 мг/л та вітаміни: піродоксин-HCl (В6) — 0,1 мг/л; тіамін-HCl (В1) — 0,4 мг/л; нікотинова кислота (РР) та аскорбінова кислота (С) — 1,0 мг/л.

3.2 Схема досліду

У досліді використовували загальноприйняту мотодику *in vitro*, яка складається з 4 етапів розмноження:

1. Стерелізація
2. Морфогенез

3. Ризогенез

4. Адаптація

Принципова узагальнена схема успішного культивування рослин на рис. 1

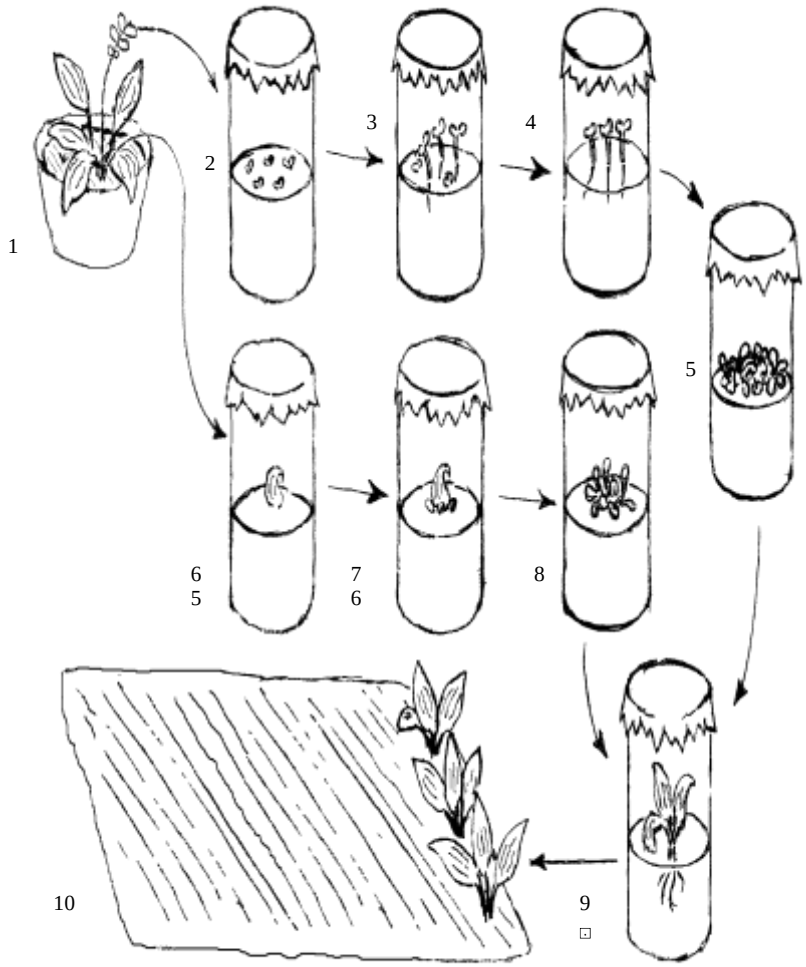


Рис. 1. Схема мікроклонального розмноження вихідних матеріалів буряків цукрових: 1 – маточна рослина; 2 – насіння; 3 – проростки 4 — проростки з видаленими коренями; 5, 8 — мікропагони; 6 — брунька; 7 — органогенез; 9 —індукція ризогенезу; 10 — адаптація до умов *ex vitro*.

Наші досліди проводили за наведеною схемою нижче:

1. Базове живильне середовище Гамборга (В5) (контроль):

1.1. В5 + БАП – 0,01 мг/л;

1.2. B5 + БАП – 0,05 мг/л;

1.3. B5 + БАП – 0,1 мг/л;

1.4. B5 + БАП – 0,5 мг/л;

1.5. B5 + БАП – 1 мг/л;

1.6. B5 + БАП – 1,5 мг/л;

1.7. B5 + БАП – 2 мг/л;

1.8. B5 + БАП – 2,5 мг/л;

1.9. B5 + БАП – 3 мг/л;

2. Базове живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) (контроль):

2.1. MS + БАП – 0,01 мг/л;

2.2. MS + БАП – 0,05 мг/л;

2.3. MS + БАП – 0,1 мг/л;

2.4. MS + БАП – 0,5 мг/л;

2.5. MS + БАП – 1 мг/л;

2.6. MS + БАП – 1,5 мг/л;

2.7. MS + БАП – 2 мг/л;

2.8. MS + БАП – 2,5 мг/л;

2.9. MS + БАП – 3 мг/л;

Досліди — одно- та двохфакторні, закладали в трьох кратній повторності.

3.4. Методика проведення досліджень

Для розмноження вихідного матеріалу буряків цукрових використовували метод розмноження апікальних меристем.

Загальноприйнятий метод *in vitro*, взалежності від типу експлантів, можна розділити на чотири етапи [55]:

- стерилізація рослинного матеріалу і введення експлантів на живильне середовище;
- розмноження;
- утворення кренів;
- адаптація вкорінених рослин до умов навколишнього середовища.

Експланти, які вводяться в культуру *in vitro,* беруть з різних органів рослин. Матеріал досліджуваних компонентів гібридів буряка цукрового повинен характерезуватись швидкими темпаминросту та розвитку. Найкраще використовувати верхівкову меристему рослин, у її клітинах швидко відбуваються процеси метаболізму та поділу клітин [1, 3].

Відбирали вихідні форми у кількості 100 насінин, пророщували насіння у чашках Петрі в чотирьох варіантах. У першому досліді рослинний матеріал пророщували у H_2O на фільтрувальному папері без попадання світла, у другому —у світлових умовах, в третьому варіанті використовували ґрунтові суміші у темнових умовах, а у четвертому варіанті — ґрунтові суміші в умовах світлового дня. У 1-ому і 3-ому варіантах насіння перед введенням *in vitro* пророщували при температурі 20–22^{0}С. У другому і четвертому — при температурі 18–20 ^{o}С і вологості 75–80%. Ґрунтосуміш складалась з 2/3 ґрунту і 1/3 піску.

У вигляді експлантів брали проростки зрізані з насіння. Для зрізу рослинного матеріалу використовували лабораторні інструменти.

Перед і після стерилізації рослинних експлантів виконували промивку матеріалу у стерильній воді 15–20 хвилин, щоб з поверхні досліджуваних експлантів вилучити всі інфекції. Матеріал, що пройшов стерилізацію вводили на без гормональне живильне середовище за прописом Гамборга у ламінар-боксі.

Велике значення відіграє стерильність живильного середовища та приміщення, посуду, інструментів і допоміжних матеріалів. Для забезпечення вищезазначених умов, вимитий посуд обгортали у фольгу, а також інструменти, папір, вату та інші допоміжні матеріали і стерилізували сухим жаром у сушильній шафі при температурі 160ºС біля двох годин. Живильні середовища стерилізували при температурі 120ºС та тиску близько однієї атмосфери не менше 20 хв в автоклаві.

ЧС-форми гібридів буряків вирощували з попередньо відібраного насіння, в умовах термічного стресу (пониженній температурі пророщування).

Поряд з вивченням фізичних умов вирощування рослин буряків *in vitro* є не менш важливим залишається вивчення компонентів живильного середовища (макро- і мікроелементів), концентрації та співвідношення регуляторів росту, які і показують напрями розвитку введеного біоматеріалу.

РОЗДІЛ 4.
МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ КОМПОНЕНТІВ ГІБРИДІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

Все більшого застосування протягом останніх десятиріч знаходять методи біотехнології в селекції рослин та насінництві [1–5, 7, 10, 19]. Прискорене розмноження рідкісних генотипів під час мікророзмноження вигідне лише тоді, коли в процесі *in vitro* спадковість розмножуваної особини залишається недоторканою зовсім [9].

Селекціонери, які займаються рослинами буряків цукрових натрапляють на ряд специфічних труднощів:

- зумовлених 2-річним життєвим способом цієї рослини;
- потребою в перехресному запиленні для формування якісного насіння;
- самонесумісністю, що забезпечує біологічний механізм постійного перехресного запилення;
- наявністю багатонасінних суплідь, які гальмують селекційний процес, тощо.

Все більше селекціонерів, успіх в селекції буряків цукрових поєднують з біотехнологією, безпосередньо з мікроклональним розмноженням родительських компонентів гетерозисних гібридів, так як для збереження постійних рівнів стабільності досліджуваного генотипу при розмноженні чоловічо-стерильних зразків традиційними методами потрібно створювати і розмножувати закріплювачі стерильності і проводити цілий комплекс заходів [12, 20, 37].

4.1 Підбір експлантів, що вводяться в культуру *in vitro*

Використання різних стресових факторів у якості провокаційних фонів застосовується традиційно в селекції і культурі *in vitro* буряків цукрових, але технологія мікророзмноження насіннєвого матеріалу і його потомства *in vitro* з попередньо відібраних рослин на стресовому фоні за спроможністю насіння проростати при пониженій температурі пророщування(+10^0C), показали досить ефективний результат [50].

Відповідно до поставленої мети мікророзмноження у зимовий період в якості експлантів брали проростки з насіння вирощеного у полі. Для цього в умовах лабораторії пророщували повністю стигле насіння.

Підчас мікророзмноження ми поставили завдання методичного характеру:

- відбір ефективних експлантів;
- підготовка для наступного розмноження.

Кращі результати отримали у варіантах досліду, коли насіння пророщувалось на водяному розчині у темних умовах, а гірші — у ґрунтовій суміші в темних умовах пророщування. У 1-му варіанті кількість пророслих насінин складала 20 насінин на 4-ий день, а на 6 — 26, і на 10 — 78 та 96 на — 15-ий день (рис. 2).

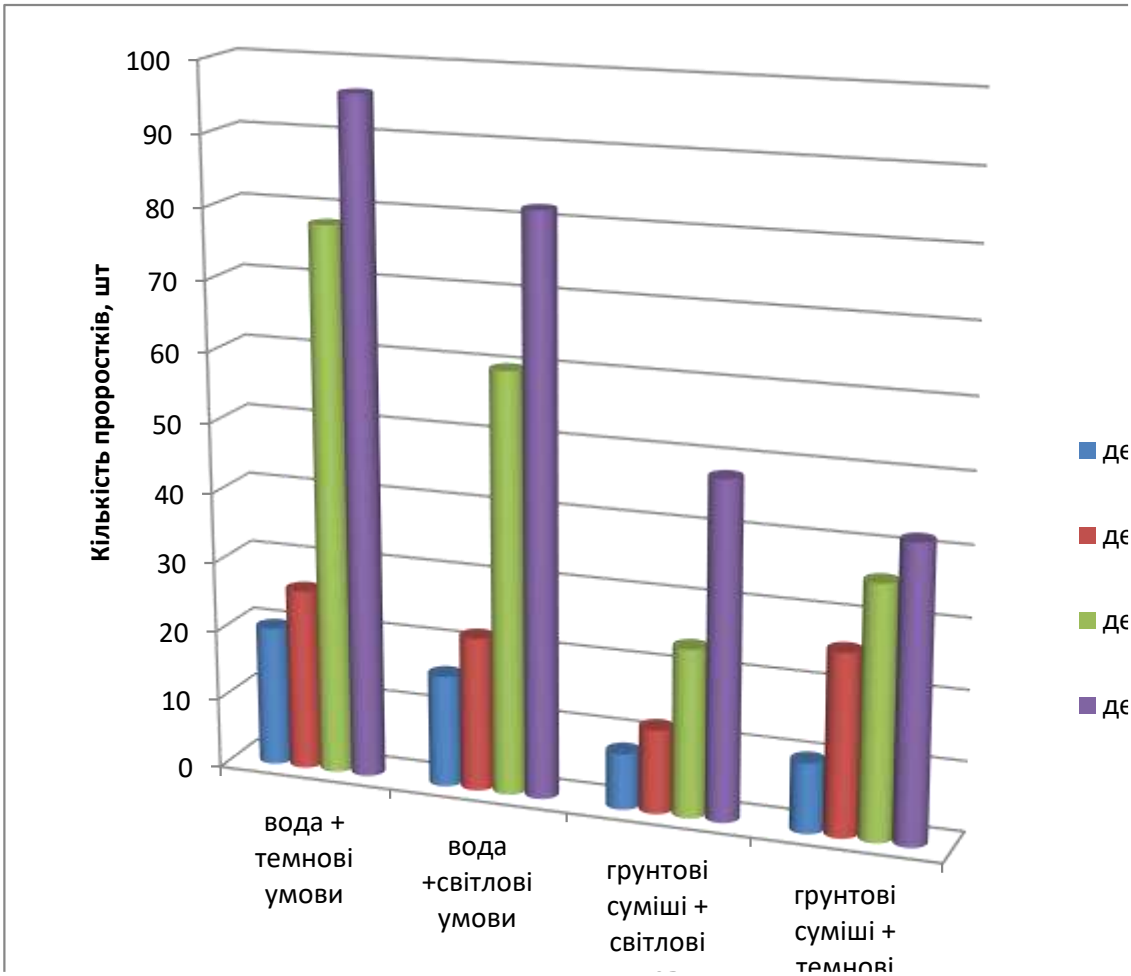


Рис 2. Пророщування насіння ЧС форм гібридів буряків цукрових за різних умов та субстрату(2023–2024 рр.)

У першому варіанті досить високі результати зафіксовано на водному середовищі при світлових умовах — 16, 22, 60, 88, відповідно на 4, 6,1 0 та 15 день.

Варіанти з ґрунтовими сумішами та з різними умовами освітлення показали низькі результати. При чому, кращі дані отримали у варіантах ґрунтова суміш + світлові умови. У варіанті досліду темнові умови та ґрунтова суміш зафіксовано найменшу кількість пророслого насіння відповідно — 10, 26, 36, 42, при такій же кількості днів, що і у перших двох дослідах.

Досить важливо для селекціонера на першому етапі введення в культуру

in vitro є отримання життєво-стерильниго вихідного матеріалу. Разом з чинниками, які впливають на вихід стерильних есплантів є середовище та умови вирощування. Тому, за умов пророщування на водному середовищі в темнових умовах вихід неінфікованого матеріалу складав 95,5 %, при кількості інфікованого матеріалу 21,6 % (табл. 1). Коефіцієнт розмноження при цьому складав 89,2 %. Ефективність введення в культуру *in vitro* для цього варіантдосліу виявилась найвища, по всьому дослідом і складала 59,3 %.

Таблиця 1

Проліферація буряка цукрового *in vitro* залежно від умов пророщування насіння (2023–2024 рр.)

Умови пророщування	Вихід стерильного біоматеріалу, %	Кількість інфікованого *in vitro* матеріалу, %	Ефективність введення, %	Проліферація, %
Вода + темнові умови	95,5	21,6	59,3	89,2
Вода + світлові умови	88,3	38,9	49,2	72,1
Ґрунтові суміші + темнові умови	79,1	59,1	24,3	58,2
Ґрунтові суміші + світлові умови	62,6	75,8	16,8	34,3

Подібні до вищезазначених результатів зафіксовано за умов пророщування — вода + світлові умови, при чому вихід стерильного матеріалу складав 88,3 % за ефективності введення в культуру *in vitro* 49,2 %. Але при цьому фіксували певне збільшення малостерильного матеріалу і зменшення ефективності введення, а також істотне зменшення

проліферативної активності *in vitro* у пророщеного в цих умовах насіння ЧС родительських форм гібридів буряків цукрових.

В результаті проведених досліджень встановлено, що найгіршим виявився варіант 75,8 відсотків — ґрунтові суміші + світлові умови, при виході стерильного матеріалу 62,6 відсотків. Ефективність введення складала 16,8 відсотків та ефективність проліферація 34,3 відсотків. У досліді ґрунтові суміші + темнові умови дані кількості стерильного матеріалу є дещо вищий і складав 79,1 відсотків. Значну кількість інфікованого матеріалу зафіксовано на рівні 59,1 відсотків за ефективності введення 24,3 відсотків при проліферації 58,2 відсотків.

Бактеріально-грибкова інфекція на початковому етапі мікророзмноження рослинного матеріалу ЧС родитильських форм гібридів буряків цукрових зафіксовано менше у варіантах досліду, де верхівкову меристему було отримано з насіння, яке проростало у водному розчині в темнових умовах, причому вихід стерильного матеріалу складав 95,5 відсотків, а відсоток інфікованого матеріалу зафіксовано на рівні 21,6.

Зясовано, що прискорений ріст і розвиток насіння відбувається у варіанті вода + темнові умови, причому на 15 добу отримано 96 % пророщеного насіння.

Отже для наступнихих своїх дослідів, насіння вихідних родительських ЧС форм буряку цукрового пророщували на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері у чашках Петрі при вологості повітря 85–87% та температурі 20–22°С.

4.2. Стерилізація рослинного матеріалу буряків цукрових

Етап стерилізації експлантів належить до найважливіших у технології розмноження *in vitro*. Вегетуючі рослини і їх органи: листки, бруньки, проростки та інших джерела експлантів, мають велику кількість різноманітних шкідливих для росту і розвитку в умовах *vitro* мікроорганізмів. Ці патогени здатні рости і розмножуватись на живильному середовищі. Підчас свого росту і розвитку гриби та бактерії не тільки використовують речовини живильного середовища, а й також гальмують ростові процеси в рослин і в наступному, всі біологічні процеси рослини. Від успішної стерилізації залежить якість подальшого культивування [4, 12].

Вивчаючи питання вибору методів стерилізації і безпосередньо стерилізатора науковець намагається максимально звільнити поверхню рослинного матеріалу від будь-яких мікроорганізмів, при чому мінімізуючи небезпеку пошкодження експлантів та людського організму стерилізатором, до складу кожного з яких входять досить токсичні речовини [4, 5, 13].

Отримання проростків буряків цукрових в асептичних умовах для наступного введення їх *in vitro* ускладнюється тим, що насіння вирощене в польових умовах має високу кількість інфекційних мікроорганізмів. Тому для успішної стерилізації необхідно спочатку проростити насіння, а потім проростки вводити в культуру [50].

В результаті усвідомлення значення стерилізації, як одного з найбільш важливих етапів мікророзмноження, нами було поставлено завдання вивчити особливості застосування загальноприйнятих і нових стерилізаторів та підібрати оптимальні експозиції для ефективної стерилізації проростків

буряку цукрового, разом з тим з’ясувати оптимальні умови для введення і проліферації стерильних зразків *in vitro* з наступною індукцією морфогенезу.

Стерилізацією розпочинали з промивання рослинного матеріалу стерильною водою 15–20 хвилин, для того щоб з поверхні проростка вимити грибково-бактеріальні інфекції. Простерилізований матеріал у ламінар-боксі вводили на без гормональне базове живильне середовище за прописом Гамборга.

В якості стерилізуючи речовин використовували дихлорид ртуті, хлорамі, та септодор-форте з різними концентраціями робочого розчинута експозиціями. Висаджений матеріал у кількості 100 штук використовували для всіх видів стерилізації.

За загальновживаними методиками проводили решту маніпуляцій з рослинним матеріалом [1–4, 7, 10].

Дослідженнями встановлено, що при експозиції стерилізації до однієї хвилини вихід стерильних живців не перевищував нуля (табл. 2).

У досліді з експозицією від однієї до десяти хвилин майже на одноковому рівні були стерилізатори дихлорид ртуті 0,05% і септодор-форте, вихід стерильних–життєздатних експлантів складав близько від 50 до 58відсотків, а стерилізація за такої експозиції хлораміном, показала найменший вихід живців — від 10 до 49%.

Таблиця 2

Стерилізація проростків залежно від стерилізатора, концентрації і експозиції (2023–2024 рр.)

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв.	Вихід неінфікованих життєздатних експлантів, %	Кількість експлантів з некрозом, %
Хлорамін	5	10	10	–
		15	14	–
		20	16	4
	10	10	14	–
		15	18	–
		20	20	6
	15	10	49	–
		15	78	6
		20	36	14
Дихлорид ртуті (сулема)	0,01	10	12	–
		15	19	–
		20	13	7
	0,05	10	58	–
		15	66	4
		20	4	9
	0,1	10	54	–
		15	82	2
		20	96	4
Септодор–форте	1,25	10	50	–
		15	78	4
		20	90	8
	2,5	10	35	3
		15	77	8
		20	81	6
	5	10	10	66
		15	12	80
		20	17	91

Для введення мікроживців в ізольовану культуру виявлено найбільш ефективну стерилізуючою речовиною 0,1%-ий водний розчин сулеми за експозиції 20 хвилин.

У цьому варіанті досліду вихід стерильних–життєздатних експлантів, з яких розвивались рослини-регенеранти (рис. 3) в середньому складав 96%. За рахунок збільшення експозиції стерилізації вихід стерильних експлантів сягав 100%, але вони були нежиттєздатними (рис. 4).



Рис. 3. Розвиток рослин-регенерантів із стерильних життєздатних експлантів



Рис. 4. Стерильні нежиттєздатні експланти

Слід також відмітити, що високі результати було виявлено у стерилізуючої речовини хлорамін при 15% концентрації та зясовано, що за експозиції 15 хвилин, вихід стерильних–життєздатних експлантів складав 78%. Разом з тим як і у попередньому досліді нами відмічено, що при збільшенні експозиції стерилізації до 20 хвилин, як і у варіанті з дихлоридом

ртуті, тканини рослин не витримували навантаження і гинули і вихід стерильних–життєздатних експлантів складав 36%.

Ефективним стерилізатором зафіксовано 5% розчин септодор-форте, при збільшенні експозиції стерилізації з 10 до 20 хвилин виявлено вихід стерильного матеріалу від 50 до 90%.

Експлантів з прихованою інфекцією або з фізіологічними порушеннями в подальшому характеризувались некрозом рослин-регенерантів (рис. 5), який розвивався, найбільшу кількість загиблих від некрозу рослин (рис. 6) зафіксовано для стерилізатора хлорамін (15%) при експозиції 20 хвилин.



Рис. 5. Некроз рослин-регенерантів



Рис. 6. Загиблі від некрозу рослини-регенеранти

У результаті досліджень зясовано, що найбільш ефективною речовиною для стерелізації проростків насіння буряків цукрових є 0,1% розчин дихлориду ртуті при експозиції стерилізації 20 хвилин — 96% стерильного матеріалу.

Стерилізуюча речовина септодор-форте (5%) за 20-ти хвилинної експозиції забезпечувала вихід стерильних живців на рівні 90%, але в досліді спостерігали збільшення некрозу експлантів — 8%, в порівняні з попереднім варіантом — 4%.

Збільшення експозиції стерилізації більш ніж на 20 хвилин забезпечує вихід стерильного експлантів до 100 відсотків, але рослини регенеранти фіксували нежиттєздатними.

Разом з тими у наших дослідженнях не виявлено прямої залежності у якості стерилізації від генотипу.

В усіх варіантах досліджень зафіксовано разом із ростом і розвитком нормальних рослин-регенерантів з стерильних життєздатних експлантів (рис. 7), також спостерігалась певна кількість інфікованих рослин-регенерантів, у яких ймовірно була прихована бактеріально-грибкова інфекція, що проявлялась через 14–21 добу після введення в культуру (рис. 8).



Рис. 7. Розвиток рослин-регенерантів із стерильних життєздатних експлантів



Рис. 8. Розвиток інфікованих рослин-регенерантів з експлантів-носіїв прихованої бактеріально-грибкової інфекції

4.3 Введення в культуру *in vitro* буряків цукрових

На підставі проведеного нами аналізу наукових джерел можна зробити висновок, що основні принципи методу мікророзмноження рослин буряків цукрових, як і більшість інших культур, вивчено не достатньо [1, 12, 16, 32]. Зясовано, що мікророзмноження можливе в агаризованих і суспензійних культурах, але для селекційно-насінницької практики використовують, в переважній більшості агаризовані. Разом з тим необхідно зауважити, що

літературні джерела іноді не зовсім підкріплені матеріалами впровадження у селекційну практику та виробництво. Також потребують подальшої розробки методів культивування експлантів. Великого вивчення потребують питання створення живильних середовищ з модифікаціями вмісту макро- і мікросолей, вітамінів, вуглеводів та співвідношення фітогормонів на всіх етапах мікророзмноження а, особливо, відповідно до конкретних генотипів.

Фізичні фактори та інші умови, у які потрапляли експланти *in vitro* значною мірою зумовлюють розвиток верхівкових меристем, пригнічення тотипотентності або експресію. У наших дослідженнях кращими результати встановлено, коли після стерилізації експланти висаджували на живильне середовище та культивували при температурі 25±1°С та 16-ти годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 3–5 кілолюксів, відносна вологості повітря складала 75%.

Експланти використовували з проростків, одержаних з насіння, яке вирощувалось на стійких до «цвітухи» рослинах. Для того стерилізовані проростки вміщали у чашку Петрі стерильну і стерильним скальпелем у кожного з них відсікали верхівку пагона з сім'ядолями, довжиною 20–30 мм (рис. 9).

Верхівка з сім'ядолями і верхньою частиною гіпокотиля поміщали у склянки з базовим живильним середовищем В5–173 з додаванням 0,25 мг/л 6-бензиламінопурину. Перше пасаж виконували у третій декаді грудня місяця через 27 діб після введення, а наступні пересадки проводили через кожних 15 діб, такі дії забезпечують віртуальну можливість робити 24 пасажування на рік.



Рис. 9. Експланти для введення в культуру *in vitro*

4.4 Підбір живильного середовища для проліферації

Питання підбору з-поміж вивчених на сьогодні десятків живильних середовищ і сотень їх модифікацій для кожного з них досить важливе. Так як перші спроби вирощування ізольованих культур рослинних клітин розпочались останніми десятиліттями 19-го сторіччя. Але велика робота з розмноження колоній різних мікроорганізмів ще до того часу була проведена у різних країнах світу. Бактеріологи розробили методичні вказівки щодо створення живильних середовищ і їх модифікування, що й було використано в подальших дослідженнях Г. Габерлянда, К. Рехінгера, Х. Фехтинга та ін. стосовно спроможності рослинної клітини до морфогенезу. При чому

найбільший старт у вдосконаленні культури рослинних тканин було проведено у 30-х роках минулого століття (1932–1934), тоді незалежно один від одного Ф. Уайт (США) і Р. Готре (Франція) вивчили важливість пересаджування культивованих органів і тканин на свіжі живильні середовища.

Тканини і органи рослини, зокрема буряків цукрових, ростуть унаслідок розвитку меристематичних клітин, що проходять багато послідовних етапів: поділу, росту розтягуванням і диференціювання. Слід відмітити, що рослинні клітини ростуть і розмножуються набагато повільніше, ніж клітини мікроорганізмів. Час подвоєння перевищує одну–три доби. Тому процес розмноження щойно введених клітин до першого пасажу має до двох–трьох тижнів, це підвищує вимоги до зствоерення асептичних умов, так як різноманітні мікроорганізми протягом цього часу можуть не тільки знищувати експлант, а й виснажити весь субстрат. Реалізація морфогенних потенцій верхівкових меристем буряку цукрового *in vitro* залежала від насичення в живильному середовищі компонентів, що забезпечують трофічну (макро- і мікросолі, вуглеводи, амінокислоти) та регуляторну (гормони, вітаміни) функції клітин.

Всі живильні середовища мають у різних кількостях і різних співвідношеннях хімічні елементи різних класів [36]. Як правило це сполуки чотирьох класів, а саме:

- джерело вуглеводів;
- неорганічні солі;
- органічні добавки;
- мікроелементи.

Найбільше використовують у культурі клітин і тканин живильні

середовища (див. Додаток Б) на прописах Гамборга, Хеллера, Мурасіге і Скуга, Шенка і Хільдебрандта та Уайта Лінсмейєра і Скуга. Усі вони вивчені й апробовані ще у 30–60 роках минулого століття. Багато сучасних прописів живильних середовищ базуються на існуючих з модифікаціями щодо вмісту окремих компонентів та заміни деяких із них на синтетичні аналоги.

Рослини в культурі *in vitro* живляться здебільшого гетеротрофно, так як процес фотосинтезу в цих умовах дещо гальмується. Це збільшує значення вуглеводів у середовищі. Цукри визнані найбільш поширеними джерелами вуглеводів, які використовуються в середовищах для культивування *in vitro* тканин, хоча іноді їх замінюють на інші сполуки. Це може бути фруктоза або мальтоза. Значно великий вплив на ріст і продуктивність культури клітин є кількісні і якісні (у якій формі) модифікації вуглеводів й азоту, в яких ці елементи введені в середовища. У процесі створення живильних середовищ ми змінювали концентрацію та форму джерел вуглеводів й азоту, звертаючи увагу на їх співвідношення.

РРР (регулятори росту рослин або гормони), такі як гібереліни, ауксини, цитокініни, абсцизова кислота, етилен, впливають на різні стадії росту і розвитку в рослинних клітин. З них тільки ауксини і цитокініни як правило включені в усі живильні середовища.

Найбільш розповсюдженими ауксинами є індолил-3-оцтова кислота (ІОК), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) та α-нафтилоцтова кислота (НОК). ІОК є природним ауксином, в той час як 2,4-Д і НОК є синтетичні сполуки, які показують ефекти природних ауксинів. Всі інші хімічні сполуки ауксинподібної дії також використовуються, але менш часто в культурі

клітин, включають індолил-3-масляну кислоту (ІМК) та 4-хлорфеноксиоцтовукислоту (4-ХФК).

З числа цитокінінів зазвичай використовували 6-фурфуриламінопурин, відомий як кінетина. Але разом з тим кінетин змінювали на 6-бензіламінопурин (БАП) або зеатин.

Одним із вирішальних етапів, від якого залежить успіх мікроклонального розмноження рослин, є підбір оптимального живильного середовища для кожного з процесів мікророзмноження. Підбір середовища в значній мірі зумовлюється типом запланованого морфогенезу. При чому досягти бажаних результатів для кожної фази розвитку, кожного генотипу і різного терміну мікроклонального розмноження можна лише тоді, коли підібравши дане оптимальне живильне середовище та співвідношення у ньому ауксинів і цитокінінів.

У багатьох опрацьованих літературних матеріалах щодо мікророзмноження буряків цукрових вивчено досліди з використанням середовища Мурасіге і Скуга, набагато менше статей про використання при розмноженні буряків цукрових на середовищі Гамборга, а також різні базові живильні середовища на етапах мікророзмноження, в тому числі й Мурасіге і Скуга, Гамборга та ін. Зустрічаються тезіси про успішну регенерацію (відновлення) *in vitro* буряків цукрових після предкультивування у середовищі, що містило речовини неорганічні солі доповнені вітамінами за авторами Гамборга. Середовище мало назву *MSB*. Аналогічне середовище, в якому макро- і мікроелементи MS середовища а також було додано вітамінами за прописом Гамборга, використовувала для введення проростків з насіння декількох сортів і компонентів гібридів буряків цукрових Я.В.

Мишуткина з однодумцями з Центру «Біоінженерія» РАН.

Шляхом ретельного відбору відносного співідношення ауксинів і цитокінінів у наших дослідах було вивчено можливості керування процесів росту і розвитку рослиних клітин буряків цукрових *in vitro* на користь недиференційованого росту або органогенезу (гемо- і ризогенезу), тобто утворення коріння чи пагонів. Звертаючи увагу на важливість концентрації вмісту ауксинів і цитокінінів у живильних середовищах для контрольованого морфогенезу нами було вивчено дванадцять варіантів балансу цих елементів.

Кожен із цих дослідів вивчали у різних співвідношення вмісту макро- і мікроструктур у складі різних середовищ, внаслідок цього попередні досліди налічували близько 500 варіантів модифікації базових живильних середовищ, кращі з яких показано у додатках В 1 і В 2.

Здійснювати введення в культуру *in vitro* рекомендується у період активної вегетації інтактних рослин. Для цукрових буряків успішне введення в культуру *in vitro* відбувається в період з травнямісяця (початок активного росту надземної частини) по кінця вересеня місяця. При чому травень і липень відзначились кращими термінами введення експлантів буряків цукрових *in vitro* [43]. На етапі введення в культуру *in vitro* вегетативної маси з вересня місяця до листопада місяця найчастіше показувало високу інфікованність вихідних експлантів різними бактеріями, що впродовж одного–двох тижнів спонукало до прояву прихованої грибкової інфекції у 80 відсотків введених рослин.

Нами було поставлено завдання вивчити прискорене розмноження родительських компонентів гібридів з молодого насіння у несприятливий для введення міжсезонний період.

У результаті нами проведених досліджень зясовано, що насіння з усіх нами вивчених варіантів найкраще вводити після стерилізації на безгормональне живильне середовище. У наших варіантах досліду це були модифіковані живильні середовища Гамборга — В5–1, В5–36, В5–59, В5–70, В5–126, В5–136, В5–154, В5–174 та Мурасіге і Скуга — МС–1, МС–76,МС–80 (Додатки В 1, Д). Для пересадки отриманих в результаті культивування *in vitro* проростків, які розкущились, найкращими з нами досліджених живильних середовищ зафіксовано середовище В5–174.

4.5 Підбір живильного середовища для активації розвитку експлантатів

Для прискорення морфогенезу введені експланти пересаджували на нове живильне середовище яке містило змінений гормональний баланс, що здебільшого сприяло збільшені кількості пагонів. Але для ефективного органогенезу загальний вміст цитокінінів і ауксинів у живильному середовищі зменшували (для уникнення формування калюсу), після цього з нього утворюються пагони.

Відновлення пагонів з бруньок (рис. 10) є основою у промисловому мікророзмноженні багатьох видів рослин. Присутність в бруньках активних меристематичних тканин, які забезпечують наростання верхівкових або бічних бруньок, прискорює успішну регенерацію пагонів *in vitro* із сегмента або верхівки пагона з брунькою або з верхівкової меристеми. Нами було використано сегменти з однією брунькою. Відсутність калюсу дає меншу ймовірність генетичних відхилень в отриманих рослин-регенерантів. Зріз верхівкової меристеми використовується як правило для звільнення від

патогенів, що важливо для вегетативно розмножуваних рослин, але не дуже актуально для буряків цукрових.



Рис. 10. Регенерація адвентивних бруньок на середовищі В5–173

Конгломерат пагонів розчленовували для пересадки на нове живильне середовище. Для індукції ризогенезу отримані пагони пересаджували на середовище, що містить значно підвищену концентрацію ауксинів.

Наступні спроби збільшення коефіцієнта розмноження, насамперед кількості пагонів у пробірці, призводить до отримання середовища В5–173.

У вивченому живильному середовищі, приготовленому з макро- і мікрсолей за прописом Гамборга (В5), в якому за джерело заліза взято секвестрен 330-Fe — 28,0 мг/л заміщено на залізо сірчанокисле ($FeSO_4 \times 7H_2O$) — 27,8 мг/л та антиоксидант Na_2 EDTA — 37,3 мг/л, а також додатково додали Мізо-інозит — 100 мг/л та використовували як джерело

вуглеводів 27 г/л сахарози, в результаті чого отримали в середньому 6,1 – 6,9 бруньки на один пасаж (контроль — 4,2). Модифіковане нами живильне середовище додатково містило фітогормон 6-бензиламінопурин (БАП) — 1,0 мг/л та вітаміни: тіамін-HCl (B_1) — 0,4 мг/л; піродоксин-HCl (B_6) — 0,1 мг/л; нікотинова кислота (РР) та аскорбінова кислота (С) — 1,0 мг/л.

Така технологія дозволяє отримувати від 60 до 100 тис. рослин-регенерантів за рік з кожного введеного експланта.

Після патентвання пошуки шляхів вдосконалення технології для збільшення коефіцієнта розмноження були продовжені у напрямку вивчення джерела вуглеводнів і їх впливу. Для цього у модифіковане живильне середовище В5–173 додавали різні джерела вуглеводів: сахарозу, глюкозу, фруктозу й мальтозу у кількості від 10 до 40 г/л (табл. 3).

Найбільша кількість пагонів (8,2 ± 0,18) була зафіксована у варіанті з Звідсотковиою концентрацією фруктози. Інший кращий варіант з концентрацією вуглеводів для отримання великої кількості пагонів був при вивчені Звідсоткової концентрації сахарози, де в середньому за одну пересадку отримувалипагонів (7,3 ± 0,27). Найменша кількість пагонів була зафіксована (1,9 ± 0,22) з додаванням 1% глюкози.

Коли висока регенерації пагонів фіксувалась як на рівні 3% фруктози і сахарози відповідно, однак максимальну кількість отриманих пагонів з істотною перевагою було отримано лише у варіанті з 3% фруктозою, це може бути підставою для наступного більш широкого вивчення фруктози у різних живильних середовищах. У дослідах з мальтозою, найбільше число пагонів (6,5 ± 0,17 та 6,0 ± 0,21) фіксували у варіантах 3–4% мальтози, причому як найменше число пагонів (1,9 ± 0,22) фіксували у варіанті з 1% глюкозою.

Таблиця 3

Вплив вуглеводів на регенерацію пагонів ЧС форм гібридів цукрових буряків *in vitro*

Джерело вуглеводів та їх вміст, %	Кількість культур з пагонами, шт.	Середня кількість пагонів на пробірку, шт.	Середня довжина пагона, см	Ріст неморфогенного калюсу
Сахароза				
1,0	64	2,5 ± 0,11	2,6 ± 0,12	+
2,0	72	6,0 ± 0,18	3,4 ± 0,25	-
3,0	87	7,3 ± 0,27	6,3 ± 0,12	-
4,0	93	2,1 ± 0,22	7,0 ± 0,21	-
Глюкоза				
1,0	59	1,9 ± 0,22	2,1 ± 0,22	+
2,0	62	2,8 ± 0,29	2,5 ± 0,11	+
3,0	77	5,3 ± 0,23	5,0 ± 0,18	-
4,0	77	3,5 ± 0,17	4,3 ± 0,27	-
Фруктоза				
1,0	68	2,2 ± 0,23	2,5 ± 0,17	-
2,0	70	4,0 ± 0,20	3,0 ± 0,22	-
3,0	78	8,2 ± 0,18	5,8 ± 0,29	-
4,0	80	5,0 ± 0,25	6,3 ± 0,23	-
Мальтоза				
1,0	56	2,6 ± 0,23	2,0 ± 0,25	-
2,0	61	3,0 ± 0,25	2,2 ± 0,31	-
3,0	63	6,5 ± 0,17	4,0 ± 0,28	-
4,0	66	6,0 ± 0,21	4,3 ± 0,34	-

Довжина пагонів у культивованих рослин має менше значення, аніж їх кількість, але цей показник було вивчено нами з метою більшого уявлення про фізіологічну дію різних джерел вуглеводів на ріст і розвиток буряків цукрових в культурі *in vitro.*

Пагони, вирощені на середовищі В5 і доповненому 4 відсотків сахарози мали в середньому максимальну довжину — 7,0 ± 0,21 см. У порівнянні з іншими вуглеводами та іншими співвідношенями сахарози це найвищий показник.

У варіанті з 4відсотковою сахарозою середня довжина пагона була меншою, але досягла 6,3 ± 0,12 см. Другим кращим джерелом вуглеводів, які показали високий вплив на довжину пагонів була фруктоза на 3 і 4 відсотки, що показали середню довжину пагона 6,3 ± 0,23 та 5,8 ± 0,29 см відповідно. Рослини буряків цукрових, вирощені на модифікованих нами живильних середовищах з мальтозою і глюкозою показали зменшення середньої довжини пагонів в порівнянні з усіма відповідними варіантами з сахарозою і фруктозою.

4.6 Ризогенез експлантів гетерозисних гібридів буряків цукрових

Відомо, що під час росту і розвитку кореневої системи проходить декілька взаємозумовлених біохімічних, фізіологічних і гістологічних процесів. Серед анатомічних чинників утворенню кореневих примордіїв сприяє близькість клітини до судинних тканин. Життєздатність рослин-регенерантів укорінених *in vitro* в більшій мірі обумовлюється місцем закладання коренів. У більшості варіантах при достатньої кількості вкорінених *in vitro* рослинрегенерантів спостерігали майже всю загибель рослин у нестерильних умовах. Підчас вкорінення розрізняють три головні етапи, які специфічні щодо потреб у живленні та умовах культивування: індукція, ініціація, ріст коренів. За успішного поєднання складу живильного середовища і умов укорінення рослин та приведення їх у відповідність з генотипом родительських рослини тривалість перших двох етапів триває 10–15 діб [36].

У попередніх дослідженнях було встановлено, що зменшення освітлення пришвидчує початок ризогенезу. Можна уявити, що за зменшення світла

утворюються як реакція на стресові умови специфічні білки-рецептори, які мають високу спорідненість з РРР, а також збільшується активність пероксидази та ІОК-оксидази на перших етапах розвитку коренів. Зменшення кисню у живильних середовищах, які використовуються для вкорінення пагонів *в культурі*, також пригнічує розвиток кореневої системи. Малий розвиток кореневої системи найбільш небезпечний на етапі адаптації рослин-регенерантів до природніх умов *ex vitro.*

Вкорінення експлантів починали у другій декаді червня місяця після 10 пересадки. Пагони, що мали близько 2,0–2,5 см у висоту з 1–2 листочками були перенесені в стерильні пробірки у живильні середовища для ризогенезу, в якому їх вкорінювали при температурі 25°С і 16-ти годинному фотоперіоді, проте зі зменшеною інтенсивністю світла до 2,7 кілолюксів. При чому після 3ох тижнів культивування буряків цукрових в культурі середовище міняли на нове, але того ж самого складу. Обрахунок кількості вкорінених пагонів, кількості коренів на мікроклони, вимірювання довжини нового коріння проводили після п’яти тижнів укорінення.

Для ініціації укорінення здебільшого зменшують кількість сахарози до 0,5–1% і повністю зменшують цитокініни, і залишають лише ауксини. У якості стимулятора коренеутворення беруть різні джерела різного ауксину, однак є думка, що укорінювання на живильних середовищах без ауксинів також цілком можливе. Як правило використовують не саму індолілоцтову кислоту, так як вона швидко руйнується, а її замінники. Особливо часто індолілоцтову кислоту змінюють на нафтилоцтову кислоту, індолилмасляну кислоту, яка добре розчиняється у воді, а також 2,4-Д, 2,4-ДМ. У більшості випадків використовують не повну велику кількість солей, яка прописана, а

лише 0,25–0,50 їхнього вмісту зі збереженням співвідношень. Це стосується здебільшого процесу ризогенезу. Висока кількість солей пригнічувала утворення коренів *in vitro*, що сприяло до зменшення їх концентрації [31, 36].

У досліді ризогенез мікропагонів ЧС родительських компонентів гетерозисних гібридів та О-типів буряків цукрових у ході їх мікророзмноження *in vitro* після рекогносцирувальних досліджень залишили шість модифікацій середовищ для ризогенезу (В5–А1, В5–А2, В5–А3, В5–А4, В5–А5 та В5–А6) (табл. 4).

Таблиця 4

Живильне середовище для ризогенезу мікрпагонів буряків цукрових, мг/л

Середовище для розмноження В5–173		Середовище для вкорінення В5–А1*	
1	*2*	*3*	*4*
$(NH_4)_2SO_4$	67	$(NH_4)_2SO_4$	22,3
KNO_3	1250	KNO_3	416,6
$MgSO_4 \times 7H_2O$	125	$MgSO_4 \times 7H_2O$	41,6
NaH_2PO_4	75	NaH_2PO_4	25
$CaCl_2 \times 2H_2O$	75	$CaCl_2 \times 2H_2O$	25
Fe-хелат$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,8	Fe-хелат$FeSO_4 \times 7H_2O$	9,3
Na_2ЕДТА (трилон Б)	37,3	Na_2ЕДТА (трилон Б)	12,4
H_3BO_3	1,5	H_3BO_3	0,5
$MnSO_4 \times 4H_2O$	4,5	$MnSO_4 \times 4H_2O$	1,5
$ZnSO_4 \times 4H_2O$	1,5	$ZnSO_4 \times 4H_2O$	0,5
B_1	1	B_1	0,3
B_6	1	B_6	0,3
С	1	С	0,3
РР	1	РР	1,6
Гліцин	1	Гліцин	0,3
Міо-інозитол	100	Міо-інозитол	33,3
Агар	300	Агар	70
Сахароза	2700	Сахароза	500
БАП	1	ІОК	1

Примітка:середовища В5–А2, В5–А3, В5–А4,В5–А5, В5–УА відрізнялися від В5–А1 тільки формою ауксинів (2,4-Д, 2,4-ДМ, НОК, калієва сіль НОК та ІМК) за тієї ж кількості решти складових.

В усіх проведених дослідженнях зі складу живильного середовища було зменшено вміст макро- і мікросолей, майже у 6 разів зменшено вміст

цукрів, майже у 5 разів зменшено вміст агар-агару. При чому в 1,6 рази збільшили вміст вітамінів РР та повністю виключили 6-бензиламінопурин. При чому середовища В5–А2, В5–А3, В5–А4, В5–А5, В5–А6 різнялися від В5–А1 тільки іншою формою ауксинів (2,4-Д, 2,4-ДМ, НОК, калієва сіль НОК та ІМК) за такої самої кількості.

У результаті від джерел ауксинів вкорінення мікропагонів цукрових буряків *in vitro* було різним. Найбільше вкорінених мікропагонів було зафіксовано при використанні нафтилоцтової кислоти за високих показників середньої кількості корінців і середніх показників довжина кореня.

До 2-ої за даними вкорінених мікропагонів віднесено живильне середовища з 2,4-Д, 2,4-ДМ, калієва сіль НОК та ІМК, тоді коли ІОК характеризувалась меншим ефектом (табл. 5).

Таблиця 5

Вкорінення мікропагонів буряків цукрових *in vitro* залежно від ауксинів

Середовище для ризогенезу	Кількість вкорінених мікроклонів, %	Середня кількість коренів, шт.	Середня довжина кореня, см
В5–А1 — ІОК	42,0	5,4	2,0
В5–А2 — 2,4-Д	55,3	3,6	3,2
В5–А3 —2,4-ДМ	53,0	5,4	4,0
В5–А4 — НОК	65,2	16,1	3,4
В5–А5—калієва сіль НОК	57,1	11,3	2,7
В5–А6—ІМК	53,8	14,0	3,5

У варіанті з нафтилоцитовою кислотою чітко відмічені зачатки були видні на 4-ту добу і вже перші корінці з'явилися на 6-ту добу. Але при більш

подовженому впливі (10–15 діб) нафтилоцтової кислоти починала пригнічувати розвиток кореневої системи. Похожі, але менш виражені феномени спостерігаються у дослідах з іншими джерелами ауксинів. При чому за кількістю корінців на одну рослину насичені ауксинами живильні середовища можна також об’єднати у 3 групи ефективності, але іншого складу.

Досить високі показники середньої кількості корінців були у варіантах з нафтилоцтовою кислотою та індолилмасляною кислотою, на другому місті було середовище з калієвою сіллю нафтилоцтової кислоти, тоді як середовища з індолилмасляною кислотою, 2,4-Д та 2,4-ДМ були менш ефективними.

Різниця в ефективності живильних середовищ за впливом на показники довжини корінців майже нівелювалась. Але, зважаючи на поставлене нами завдання вегетативного розмноження *in vitro*, виділених на провокаційних фонах унікальних рослин буряків вирішальною характеристикою ефективності живильного середовища належить визнати кількість вкорінених мікропагонів, звичайно, за великої кількості адаптованих до природних умов *ex vitro* вкорінених рослин і спроможних вирости до бажаних розмірів, що забезпечують розвиток насінників, придатних до цвітіння і вирощування насіння розмножуваних генотипів.

Для підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів буряків цукрових нами було розроблено метод затемнення агаризованого живильного середовища з використанням метиленового синього барвника. Сама ідея затінення живильного середовища використовувалась на деяких

плодово-ягідних культурах [20]. У середовище В5–А6 з ІМК було добавлено барвник метиленовий синій у концентраціях 0,01 та 0,05 %;.

У схему нашого досліду для вивчення впливу на процес ризогенезу у рослин-регенерантів буряків цукрових затемнення середовища метиленовий синій барвник включили у наступні варіанти:

1. (Контроль) — середовище В5–А6–ІМК;
2. Живильне середовище В5–А6–ІМКз додаванням 0,01 %;барвника метиленовий синій.
3. Живильне середовище В5–А6–ІМКз додаванням 0,05 % барвника метиленовий синій.

Слід відзначити, що з додаванням барвника процес ризогенезу виявився надагато кращим у всіх наших варіантах досліду (рис. 11). Але найкращі результати утворення кореневої системи було зафіксовано у рослин-регенерантів третього варіанту з додаванням барвника 0,05 % метиленовий синій, де коренеутворення зафіксовано на рівні 78–85%. Досить високі показники отриманоно і другому досліду з концентрацією 0,01 % барвника метиленовий синій, де процес коренеутворення становив 66–70%.

Барвник метиленовий синій за концентрації 0,05 % найбільш інтенсивно забарвлює вивчене живильне середовище, яке, на нашу думку, збільшує гальмуючий вплив світла на ріст і розвиток бокових коренів і підвищує активність індолилмасляної кислоти. Середні дані вкорінення рослин-регенерантів за ЧС родительськими формами складав 81,5%.

Варіант 1	***Варіант 2***	***Варіант 3***
контроль (без барвника)	концентрація барвника 0,01%	концентрація барвника 0,05%



Рис. 11. Вкорінення пробіркових рослин-регенерантів цукрових буряків номеру 587 к 19 на середовищі В5–А6—ІМК з додаванням метиленового синього барвника

Оптимізація умов для адаптування вкорінених пробіркових рослин до умов *ex vitro.* Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro* — важливий і найтрудомісткішим заключний етап мікроклонального розмноження [34]. Найкращим для пересадки є період, коли у рослини добре розростаються корені для поглинання мінеральних елементів з ґрунту, а молоді листочки вже здатні до продуктивного фотосинтезу. При адаптації рослин буряків цукрових, у нашому досліді розмір коренів становив 5–6 см, при цьому бічних корінців нараховувалось в межах від 6 до 8 шт. Фаза розвитку рослин — 2–4 листочки.

Щоб перенести рослини з культуральних умов у природні умови необхідно провести їх акліматизацію і адаптувати матеріал до нотальних умов температурного режиму, освітлення і вологості.

Здебільшого використовують дві групи способів адаптації:

– адаптація пробіркових рослин;

– проміжне вкорінення рослин при використанні фітотронів.

Перший спосіб передбачає використання адаптаційних кімнат, оснащених за типом культуральних приміщень, де поступово оптимальні умови вирощування рослин підводяться до природних умов, куди буде пересаджуватись матеріал [35]. При проведенні адаптації необхідно враховувати два основні фактори: анатомічний і фізіологічний, які принципово різнять між собою у рослин, які вирощені в умовах *in vitro*. Перша особливість полягає в відсутності або зниженій кількості кутикулярного воску, слабко розвинутій асиміляційній паренхімі та в недостатньо доброму функціонуванні продихового апарату. Інший фактор відображає понижену здатність до фотосинтезу внаслідок культивування на середовищах з джерелом вуглеводів. У деяких випадках на коренях пробіркових рослин немає кореневих волосків [36]. Ці особливості рослин-регенерантів спричиняють до швидкого зневоднення при пересадці їх з умов *in vitro* в умови *ex vitro*, що призводить до загибелі рослин.

Як субстрат використовували суміш перліту і піску, до якої перед висаджуванням рослин вносили необхідні елементи живлення. На три частини перліту і одну частину піску вносили у діючій речовині 1–2 г азоту, 2 г фосфору і 2 г калію з розрахунку на 25–30 кг субстрату. Для дорощування рослин також можна використовувати легку, з доброю повітряною

проникністю і водоутримувальною здатністю суміш: 2 частини ґрунту, 1 частина торфу і 1 частина перегною. Для підвищення приживання рослин зверху на суміш насипали шар перліту товщиною 2–3 см. Висота поживного субстрату становила 7–10 см, а площа живлення рослин 5х5 см. Субстрат поливали поживним розчином, до якого входили регулятори росту, що стимулюють ризогенез.

Температуру в фітотроні намагалися підтримувати в межах 20–25°С при вологості 70–80% і тривалості світлового періоду не менше 10 годин на добу. Висаджені в субстрат рослини накривали поліетиленовою плівкою. Висаджування рослин у ґрунтові суміші проводили вручну, роблячи невелике заглиблення та розміщуючи в ньому вертикально коріння. Потім ущільнювали субстрат навколо рослини, поливаючи і накриваючи плівкою. Через 7–10 діб, коли рослини приживалися і розпочинали рости, проводили їх загартування. Спочатку знімали плівку на 10–15 хвилин, потім час загартування доводили до 1–2 годин. Після 3–4 діб плівку знімали зовсім. Приживлюваність рослин-регенерантів досягала в таких умовах 87 %.

Через 30–50 діб рослини утворювали добре розвинену надземну частину і міцну кореневу систему. В цей час рослини мали висоту 10–15 см і 6–10 листочків. Такі рослини придатні для пересадки в поле. У другій декаді травня рослини-регенеранти висаджували у відкритий ґрунт з обов’язковим притіненням на дві доби, де постійно проводили зрошування та догляд за ними. Приживлюваність клонів у ґрунті сягала близько 100 %. Рослинний матеріал на початковому етапі росту мав незначні морфологічні зміни листкового апарату та стебла, проте до кінця вегетації рослини набули вигляду, характерного для рослин-донорів експлантів.

РОЗДІЛ 5.
МОДЕЛЮВАННЯ ВИРОБНИЧИХ НЕБЕЗПЕК ПІД ЧАС МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ БУРЯКУ ЦУКРОВОГО

Головним завданням охорони праці є створення на підприємствах здорових та безпечних умов праці, що виключають виробничий травматизм і профзахворювання. Основними засобами вирішення цього завдання є забезпечення безпеки обладнання і технологічних процесів, комплексна механізація виробництва та його автоматизація, ліквідація важкої фізичної праці [58].

Охорона праці – це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження здоров'я і працездатності людини в процесі праці[59].

Робота в хімічних лабораторіях ніколи не відносилась до категорії безпечних. Приміщення хімічних лабораторій з їх обладнанням і плануванням повинні відповідати вимогам будівельних норм і правил, санітарних норм, вказівок по будівельному проектуванню підприємств. Матеріали підлоги повинні відповідати гігієнічним і експлуатаційним вимогам даного виробництва, бути стійкими до дії хімічних речовин, не сорбціювати їх, а у вибухонебезпечних приміщеннях не створювати іскор при ударі. У лабораторіях влаштовують загальну припливну і витяжну механічну вентиляцію. Поверхні робочих столів і витяжних шаф вкривають негорючими або антикорозійними матеріалами, забезпечують бортиками [58, 59].

Після закінчення робочої зміни працівник лабораторії повинен

перевірити і привести до порядку робоче місце, прилади і апарати.

Усі реактиви в лабораторії необхідно зберігати в тарі з надписом, що вказує її вміст, концентрацію. Безпека зберігання хімічних речовин обумовлюється їх фізико-хімічними властивостями, притаманних тільки кожній з них або класу з'єднань, умов зберігання.

Велику небезпеку представляє зберігання горючих речовин з окисниками (хлоратами, нітратами, азотною кислотою, бромом, перманганатами, перекисом водню та ін.) або біля нагрівальних приладів.

Сильнодіючі отруйні речовини - СДОР (миш'як, синильна кислота, сулема, фосфорорганічні речовини та ін.), які використовують у лабораторії, зберігають у спеціально відведеному місці у шафі або стальному ящику під замком і пломбою [59, 60].

Метою моделювання виробничого травматизму є розробка заходів щодо попередження нещасних випадків. Для цього необхідно систематично аналізувати і виявляти причини, що їх зумовлюють У свою чергу, прогнозування передбачає виявлення чинників, які впливають на травматизм та залежності його від зміни цих чинників [58].

Будь-яка потенційна небезпека має свій логічний процес розвитку і реалізується за певних умов. Сукупність умов, за яких виникає можливість впливу на людину й довкілля шкідливих та небезпечних чинників, зумовлюють небезпечну подію. Ці умови часто називають причинами небезпечних ситуацій [59].

Моделювання і прогнозування небезпек на практиці проходить декілька стадії. На першій стадії визначають матеріальні носії небезпек, тобто небезпечні та шкідливі чинники і умови, за яких вони можуть

призвести до небажаних наслідків. На другій стадії визначається головна небезпечна подія і послідовність інших небезпечних подій та умов, які їй передують. Даний процес дає можливість зменшити виникнення небезпек[60].

Моделювання виробничих небезпек під час розмноження чс-компонентів гібридів буряку цукрового.

Виробнича небезпека є поєднанням небезпечних виробничих та шкідливих факторів, небезпечних умов (НУ) та небезпечних дій (НД), що створюють небезпечні ситуації (НС) які в свою чергу спричинюють певні наслідки.

Умови, за котрих існує навіть малоймовірна можливість впливу на людину небезпечного чинника, можна назвати небезпечними умовами, а дії людини, що не відповідають науково обґрунтованим нормам професійної поведінки — небезпечними діями.

Під час розмноження чс-компонентів гібридів буряку цукрового в лабораторії біотехнології можливі такі небезпечні шкідливі фактори:

Небезпечний шкідливий фактор (НШФ) – це чинник трудового процесу та виробничого середовища, вплив якого на організм людини в певних умовах може призвести до отруєння. захворювання або іншого раптового погіршення здоров’я.

- $НШФ_1$–протруєне насіння фунгіцидами, виділення токсичного парів від насіння;
- $НШФ_2$–виділення токсичних парів від хімічних стерилізаторів насіння.

Можливі небезпечні умови та дії:

Небезпечні умови (НУ) – умови праці які виникають, коли працівники або керівники робіт свідомо порушують або нехтують правилами охорони праці.

- $НУ_1$–відсутність засобів індивідуального захисту;
- $НУ_2$–не був проведений інструктаж.

Небезпечна дія (НД) – це дія оператора, яка суперечить або не відповідає науково обґрунтованим нормам.

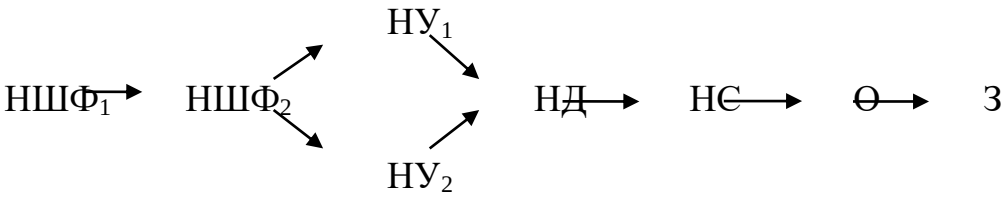
- НД–працівник не використовував засоби індивідуального захисту.

Як наслідок у зону дихання лаборанта проникають пари отрутохімікатів (НС), що спричиняють отруєння (О) та захворювання (З).

Професійне отруєння (О) – гостра або хронічна інтоксикація, викликана шкідливим хімічним чинником в умовах виробництва

Професійне захворювання (З) – це патологічний стан людини обумовлений роботою і пов'язаний з надмірним напруженням організму або дією шкідливого фактора.

Модель:



Мої особисті рекомендації щодо поліпшення безпеки праці при роботі в лабораторії біотехнології заключаються в наступному:

– старанне і сумлінне ставлення працівників до виконання робіт з пестицидами;

– покращення умов праці працівникам, які працюють з отруйними речовинами, тобто забезпечити правильне харчування, їжа повинна бути збагачена на білки і вітаміни;

– забезпечення спецодягом і засобами індивідуальної гігієни;

– організація та проведення систематичного профілактичного огляду, ремонту обладнання лабораторії з реєстрацією;

– регулярно проводити інструктажі і ознайомлення з правилами безпеки при роботі в лабораторії.

ВИСНОВКИ

У роботі висвітлено результати розмноження вихідних матеріалів буряку цукрового з використанням методів біотехнології.

1. Зясовано, що швидкий ріст і розвиток насіння ЧС-форм цукрового буряка відмічено за умов пророщування у варіанті вода + темнові умови, коли на 15-ий день отримано 96 % пророщеного насіння.

2. Встановлено, що найефективнішим варіантом стерилізації проростків насіння буряків цукрових є розчин сулеми 0,1% при експозиції стерилізації 20 хвилин – вихід стерильного матеріалу на рівні 96%.

3. Вивчено, що рослини, вирощені на модифікованих живильних середовищах з глюкозою і мальтозою, показали зниження середньої довжини пагонів порівняно з усіма відповідними варіантами з сахарозою і фруктозою.

5. Доведено, що для стимулювання органогенезу експланти пересаджувати на нове живильне середовище зі зміненим гормональним балансом що здебільшого супроводжується зростанням кількості пагонів.

6. Модифіковано живильне середовище Гамборга (В5) макро- і мікроелементами та модифіковане додатково фітогормонами – 6-бензиламінопурин (БАП) – 1,0 мг/л та рядом вітамінів: тіамін-HCl (B_1) – 0,4 мг/л; піродоксин-HCl (B_6) – 0,1 мг/л; нікотинова кислота (РР) та аскорбінова кислота (С) – 1,0 мг/л.

7. Для підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів буряків цукрових створено метод затемнення агаризованого живильного середовища з використанням метиленового синього барвника.

8. Зясовано, що барвник метиленовий синій при концентрації 0,05 % інтенсивніше забарвлює живильне середовище, що, на нашу думку, знижує гальмуючий вплив світла на розвиток бічних коренів і підвищує активність ІМК.

РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ

Для стерилізації проростків насіння буряків цукрових використовувати розчин сулеми 0,1% при експозиції стерилізації 20 хвилин.

Для стимулювання органогенезу експланти пересаджувати на нове живильне середовище зі зміненим гормональним балансом для зростання кількості пагонів.

Для кращого ризогенезу використовувати вдосконалене живильне середовище Гамборга (В5) макро- і мікроелементами та модифіковане додатково фітогормонами – 6-бензиламінопурин (БАП) – 1,0 мг/л та рядом вітамінів: тіамін-HCl (B_1) – 0,4 мг/л; піродоксин-HCl (B_6) – 0,1 мг/л; нікотинова кислота (РР) та аскорбінова кислота (С) – 1,0 мг/л.

Для підвищення якості вкорінення рослин-регенерантів буряків цукрових використовувати метод затемнення агаризованого живильного середовища з використанням метиленового синього барвника.

ЛІТЕРАТУРА

1. Опалко А.І. Селекція плодових і овочевих культур / А.І. Опалко, Ф.О. Заплічко - К.: Вища шк., 2000. - 440 с.

2. Рябовол Л.О. Розробка способів одержання гаплоїдів і дигаплоїдів цукрового буряка, як вихідного матеріалу для селекційного процесу: автореф. дис. на здобуття наук. канд. с-г. наук / Л.О. Рябовол - К., 1994. - 20 с.

3. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак. В.А. Кунах. - К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. - 520 с.

4. Поліщук В.В. Калюсотвірна і регенераційна здатність сортів, гібридів та інбредних ліній кукурудзи / В.В. Поліщук, Л.О. Рябовол, І.П. Чучмій. // Зб. наук. пр. Уманської ДАА. - К.: Знання України, 2000. - Вип.52. - С. 36-39.

5. Рябовол Л.О. Методи отримання калюсної тканини *Cichorium intybus* L. в культурі *in vitro* / Л.О.Рябовол // Зб. наук. пр. Інституту цукрових буряків УААН. - Вип.9. - 2007. - С. 108-113.

6. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. -1998. - Т.14.- №4.- С. 298-317.

7. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедиференцировки и каллусообразования *in vitro* / В.А. Кунах // Физиология растений. - 1999. - Т.15. - №5. - С. 235-252.

8. Дубровна О.В. Мікроклональне відтворення селекційно-цінних форм цукрових та кормових буряків / О.В. Дубровна, І.І.Лялько Зб. наук. пр. Укр. Т-ва генетиків і селекціонерів ім.. М.І. Вавилова. - 2003. - С. 410-414.

9. Кулуев Б. Р. Перенос трансгенов ARGOS-LIKE и AtEXPA10 в нетрансгенные формы табака и фенотипические проявления их конститутивной экспрессии / Б.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А. В. Чемерис // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. - №1. – С. 81-88.

10. Лялько І.І. Генетична детермінація деяких морфологічних ознак листкового апарату у цукрових буряків / І.І. Лялько, Дубровна О.В. // Физиология и биохимия культурных растений. - 2002.- №5. - С. 432-438.

11. Лялько І.І. Використання морфо-генетичних ознак при створенні закріплювача стерильності цукрового буряку / І.І. Лялько, О.В. Дубровна, О.С. Сидоренко, Л.П. Баранова // Вісн. аграрн. наук. - 2001. - №8.- С. 33-35.

12. Лялько И.И. Проявление признака ограниченного роста побегов у семенников кормовой свеклы / И.И. Лялько, О.В. Дубровна // Цитология и генетика. - 2000. - №4. - С.21-26.

13. Губанова Н.Я. Комплексная селекция *in vitro* на устойчивость клеточных линий кормовой свеклы к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам / Н.Я. Губанова, О.В. Дубровная, Т.В. Чугункова // Биополимеры и клетка. - 2000. - Т.16. - №3. - С.227-232.

14. Губанова Н.Я., Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной плоидности / Н.Я. Губанова, О.В. Дубровная, Т.В. Чугункова // Физиология и биохимия культурных растений. - 2000. - Т.32. - №5. - С.362-368.

15. Губанова Н.Я. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам / Н.Я. Губанова, О.В. Дубровная, Т.В. Чугункова // Биополимеры и клетка . -2002.- Т.18.- С.565-571.

16. Чекалин Н.М. Генетика как теоретическая основа селекции сельскохозяйственных культур: Методы получения генетически модифицированных растений / Н. М. Чекалин, В. Н. Тищенко, М. Е. Баташова // Селекция и генетика отдельных культур. - Полтава, 2009. - 175 с.

17. Jacq B. Plant regenerated from in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured in vitro and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants / B. Jacq T. Tetu, R.S. Sangwan // Plant Cell Rep. - 1992. - N 11. - P.329 - 333.

18. Мельничук М. Д. Біотехнологія в агросфері / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. – К., 2014. – 247 с.

19. Сидоров В.А. Биотехнология растений Клеточная селекция. - К.: Наукова думка, 1990. - 280 с.

20. Опалко А.І. Селекція плодових і овочевих культур. / А.І. Опалко, А.О. Яценко, О.А. Опалко, Н.В. Мойсейченко -Умань, 2004.-307 с.

21. Секан А. С. Сучасні методи молекулярного аналізу генетично модифікованих рослин / А. С. Секан, Б. В. Сорочинський // Біотехнологія. – 2011. - Т. 4. - №1. – С. 106-114.

22. Гонтаренко С.М. Живильні середовища для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків / С.М. Гонтаренко, Г.М. Гересименко // Наукові праці інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. – 2014., – Вип. 22. – С. 157-163.

23. Редько В. І. Розмноження та збереження селекційних матеріалів цукрових буряків *in vitro* / В.І. Редько, Т.М. Недяк, О.В. Дубін, Г.П. Ніколаєнко // Зб. наук. праць ІЦБ. - 2000. - Вип. 2. – С.123–131.

24. Прикладная экобиотехнология / [Кузнецов А. Е., Градова Н. Б., Лушников С. В. и др.]. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. - Т.1. - 629 с.

25. Банникова М. А. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro.* Гистологическое изучение процессов регенерации / М.А. Банникова, А.Э. Головко, О.А. Хведыныч, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. - 1995. - № 6. - С.14-22.

26. Банникова М.А. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / М.А. Банникова, А.Э. Головко, О.А. Хведыныч, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. - 1995. - №6. - С.14-22.

27. Коломієць Ю.В. Особливості морфогенезу цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro* / Ю.В. Коломієць // Аграрна наука і освіта. - 2004. - Т. 5- №5.- С.21-26.

28. Коломієць Ю.В. Метаболіти бактерій роду *Pseudomonas* як селективний фактор стійкості цукрових буряків до бактеріальних хвороб:

Дис. к-та біол. наук / Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ. - К., 2006. - 174 с.

29. Господаренко Г.М. Системи технологій в рослинництві: навчальний посібник / Г.М. Господаренко, В.О. Єщенко, С.П. Полторецький та ін.- Умань: СПД Сочінський, 2008.-368 с.

30. ДСТУ 3226-95 Насіння однонасінних цукрових буряків. Посівні якості. Технічні умови.- На зміну ГОСТ 10882-93; ГОСТ 20797-87; Введ. з 01.07.1999 р.-К.: Видав. Держстандарт України, 1999. - 5 с.

31. Богачева Н.Н. Создание и молекулярно-генетическое изучение межвидовых гибридов свеклы (*Beta vulgaris L.* × *Beta corolliflora Zoss.)* / Н.Н. Богачева, Т.П. Жужжалова, А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин // Биология клеток растений in vitro и биотехнология : тез.докл. IX Международ. конф. (8-12 сент., Звенигород, 2008 г). - М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. - С. 50-51.

32. Адаменко В.Д. Цінність представників роду *Beta L*. для селекції буряка цукрового // Зб. наук. пр. НДП «Софіївка» НАН України. - 2009.- Вип. 5. - С. 123–132.

33. Буторина А.К. Молекулярно-генетические исследования у сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) / А.К. Буторина, А.В. Корниенко // Генетика. - 2011. - Т. 47, № 10. - С. 1285-1296.

34. Вдовитченко М.Ю. «Искусственные семена» как способ сохранения жизнеспособности растительных тканей / М.Ю. Вдовитченко, И.Н. Кузовкина // Биология клеток растений invitroи биотехнология : тез.докл. IX Международ. конф. (8-12 сент., Звенигород, 2008 г). - М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008.- С. 64-65.

35. Генетические основы селекции растений: в 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии; ред.: А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева; рец.: В.Н. Решетников, Н.А. Ламан. - Минск: Беларускаянавука, 2012. - 489 с.

36. Головко А.Е. Цукровий буряк (*Beta vulgaris L.*) в культурі *in vitro*: регенерація, морфогенез і генетична трансформація: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.20 „Біотехнологія" / А.Е. Головко. -К., 2003. - 20 с.

37. Дубровна О.В. Цитогенетична мінливість рослин-регенерантів цукрових буряків, отриманих шляхом прямої регенерації з експлантів різної плоїдності/ О.В.Дубровна, І.І. Лялько// Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр./ За ред. М.В. Роїка. - К.: КВІЦ, 2004. - Т. 2. - С.54-59.

38. Ковальчук М.С. Геномна мінливість регенерантів міжвидових гібридів буряків / М.С. Ковальчук, Л.П. Рожко, М.В. Роїк // Вісник аграрної науки. - 2010.- № 9. - С. 32–35.

39. Мишуткина Я.В. Микроклональное размножение сахарной свёклы *in vitro* / Я.В. Мишуткина, А.К. Гапоненко, К.Г. Скрябин // Сахарная свёкла. - 2007. - № 7. - С.28-30.

40. Коломієць Ю.В. Клональне мікророзмноження цукрових буряків *in vitro*: можливості для розмноження і збереження біологічного різноманіття / Ю.В. Коломієць // Наукові доповіді НАУ. - 2008 - Т. 1(9). - С.1-14. - Режим доступу до журн. :http://www.nbuv.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08kjvobv.pdf

41. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин: навч. посіб. [для студ. вищ. навч. закл.] / М.М.Мусієнко, О.О. Панюта. - К.: ВПЦ Київський університет, 2005. — 114 с.

42. Рябовол Л.О. Диплоїдизація рослинного матеріалу буряка цукрового у культурі *in vitro* під впливом колхіцину до живильного середовища / Л.О. Рябовол // Збірник наук. праць Уманського національного університету садівництва. - 2010. - Вип. 73, Ч. 1: Агрономія. - С.127–133.

43. Роїк М.В. Аналіз мінливості рівня плоїдності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технології аналізатора плоїдності *Partec*: методичні рекомендації / М.В. Роїк, Н.С. Ковальчук, Л.В. Алексійчук - К.: ІЦБУААН, 2006. - 40 с.

44. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие / В.Ж. Цыренов. - Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. - 58 с.

45. Коробкова К.С. Створення модельної системи *in vitro* для вивчення взаємодії фіто патогенних молікутів з клітинами рослин / К.С. Коробкова, А.М. Онищенко, Л.П. Панченко та ін. // Мікробіол. журн. - 2009. - Т. 71, № 4. - С. 58–63.

46. Небиков М.В. Відбір посухостійких біотипів цукрових буряків в умовах культури *in vitro* / М.В. Небиков // Зб. наук. праць ІЦБУААН.- 2005. - Вип. 4- С.117–121.

47. Колодяжная Я.С. Получение регенерантов сахарной свеклы / Я.С. Колодяжная, Е.В. Дейнеко // Онтогенез. - 2002. - Том. 33. № 3. - С.170-175.

48. Головко А.Э. Генетическая трансформация сахарной свеклы: эволюция взглядов и методических подходов / А.Э. Головко, А.А. Довженко, Ю.Ю. Глеба // Цитология и генетика. - 2005. - Т. 39, № 3. - С.30–36.

49. Небиков М.В., Єщенко О. В., Яценко А. О. Буряки з пробірки // Цукрові буряки. - 2002. - №6. - С. 12-14.

50. Патент на корисну модель № 75967. Спосіб прискореного розмноження стійких до цвітушності ЧС-форм цукрових буряків з використанням технологій invitro// Заявка № u 2012 04341 подана 29.07.2011; зареєстрована у Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 06.04.2012 / В.В. Поліщук, В.А. Доронін, А.О. Яценко, А.І. Опалко, Д.М. Адаменко, М.М. Ненька, О.В. Ненька, В.М. Майборода, І.В. Ковальчук, Л.М. Карпук - 2012. - Бюл. № 24. - 4 с.

51. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин / [М.Я. Молоцький, Васильківський С.П., Князюк В.І., Власенко В.А]; за ред. М.Я. Молоцького. - К.: Вища освіта, 2006. -477с.

52. Балан В.М., Кулік О.Г. Що посієш те й пожнеш // Цукрові буряки.- 2002.-№3.-С.10-11

53. Будовський М.Д. Різноякісність насіння різних біологічних форм цукрових буряків / М.Д. Будовський, В.М. Мірошниченко, М.І. Панов // Збірник наукових праць. - К.: ІЦБ УААН, 2008. - С.160 - 163.

54. Гуляев Г.В. Селекция растений в 21 веке // Аграрная наука. - 2000. - №1. - С.23-24.

55. Адаменко В.Д. Цінність представників роду *Beta* L. для селекції буряка цукрового // Зб. наук. пр. НДП «Софіївка» НАН України. - 2009. - Вип. 5. -С.123–132.

56. Недвига М.В. Лабораторний і польовий практикум з грунтознавства / М.В. Недвига, М.Ю. Хомчак, О.С. Осадчий, Л.Д. Бойко. - К. : Агропромвидав України, 1999. - 239 с.: іл. - укр.

57. Новак А.В. Агрометеорологічні умови 2011-2012 сільськогосподарського року за даними метеостанції Умань / А.В. Новак // Збірник наук. праць Уманського національного університету садівництва. - 2012. - Вип. 63, Ч. 1: Агрономія. - С.115-119.

58. Катренко Л.А. Охорона праці / Л.А. Катренко, Ю.В. Кіт, І.П. Пістун - Суми.: Університетська книга, 2004. - 500 с.

59. Гандзюк М.П.. Основи охорони праці / М.П. Гандзюк, Є.П. Желібо, М.О. Халімовський - К.: Каравела, 2003. - 408 с.

60. Ярошевська В.М. Охорона праці в галузі / В.М. Ярошевська, В.Й. Чабан - К.: Професіонал, 2004. - 288 с.