

МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет агрономії
Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту

«_____» _____ 2023 р.

Зав. кафедри, д. с.-г. н., професор

_____ Людмила РЯБОВОЛ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ РИЖІЮ ЯРОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО НЕГАТИВНИХ
АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ
«БІОТЕХНОЛОГІЇ» УМАНСЬКОГО НУС

Виконав: студент II курсу, групи 23 м -а

спеціальності 201 Агрономія

БОКОВЕНКО Денис Сергійович

Керівник:

ЛЮБЧЕНКО Андрій, к. с.-г. н.

Умань – 2023

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. НАПЯМИ ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ В АДАПТИВНІЙ СЕЛЕКЦІЇ (огляд літератури)	5
1.1. Рижій ярий – перспективна сільськогосподарська культура.....	5
1.2. Клітинна селекція сільськогосподарських культур	7
РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ	12
РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ...	13
3.1. Умови культивування біоматеріалу <i>in vitro</i>	13
3.2. Характеристика базових середовищ	13
3.3. Схема досліджу.....	15
3.4. Методика проведення досліджень.....	16
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	18
4.1. Добір клітинних ліній рижію ярого на стійкість до засолення.....	18
4.2. Морфогенез солестійких калюсних ліній та отримання рослин-регенерантів.....	21
4.3. Оцінка отриманих біотехнологічними методами рослинних матеріалів рижію ярого.....	24
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	28
5.1. Охорона праці в біотехнологічній лабораторії під час проведення клітинної селекції рижію ярого	28
5.2. Охорона навколишнього природного середовища в сільському господарстві	30
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	34
ДОДАТКИ	42

ВСТУП

Негативні абіотичні чинники навколишнього середовища (засолення, посуха, екстремальні температури, іони важких металів, підвищена кислотність ґрунту, тощо) здійснюють стресовий вплив на рослинні організми, що призводить до зниження їх життєздатності та продуктивності. Найбільш швидким, дешевим та екологічно чистим методом підвищення ефективності ведення галузі рослинництва у екстремальних умовах є впровадження у виробництво високопродуктивних, адаптивних сортів та гібридів сільськогосподарських культур.

Для збільшення площ вирощування рижію ярого актуальності набувають роботи зі створення адаптивних і пластичних сортів з високим генетичним потенціалом.

В селекції сільськогосподарських культур широко застосовують біотехнологічні методи. Це дає можливість за короткий час створити генетично різноманітний вихідний матеріал для проведення подальших досліджень. Залучення біотехнологічної ланки в загальну схему селекційного процесу забезпечує скорочення матеріальних затрат та пришвидшує виведення нового сорту.

Метою роботи було отримання *in vitro* на базі соматоклональної мінливості вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до сольового стресу.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- дослідити вплив хлоридного засолення на калюсну тканину рижію ярого;
- провести клітинну селекцію *in vitro* рижію ярого на стійкість засолення;
- отримати рослини-регенеранти рижію ярого із відібраних клітинних ліній;
- провести оцінку створеного рослинного матеріалу рижію ярого за стійкістю до стресового агента.

Об'єкт дослідження: особливості добору *in vitro* клітинних ліній рижію ярого стійких до сольового стресу, індукування морфогенезу відібраних клітинних ліній та оцінка рослинного матеріалу за рівнем солестійкості.

Предмет дослідження: біотехнологічні методи, відібрані в умовах осмотичного стресу калюсні лінії рижію ярого та отримані з них рослини-сомаклони.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в удосконаленні використання методів клітинної селекції вихідного матеріалу рижію ярого, стійкого до сольового стресу.

Практичне значення одержаних результатів. Виділено рослини-регенеранти рижію ярого сорту Клондайк, що мали високу комплексну стійкість до хлоридного засолення.

Особистий внесок автора полягає в опрацюванні літературних джерел вітчизняних та зарубіжних авторів, плануванні і проведенні досліджень, статистичній обробці даних та їх узагальненні, формулюванні висновків та рекомендацій кваліфікаційної роботи.

Апробація результатів дипломної роботи. Основні положення кваліфікаційної роботи представлено на засіданнях студентського гуртка кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського НУС.

РОЗДІЛ 1. НАПРЯМИ ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ В АДАПТИВНІЙ СЕЛЕКЦІЇ (огляд літератури)

1.1. Рижій ярий – перспективна сільськогосподарська культура

Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz), відома олійна культура з родини Brassicaceae, має дуже давню історію культивування в Європі [1]. Агрономічно її характеризують як перспективну культуру завдяки її потенційному харчовому та нехарчовому застосуванню [1] з широкою адаптивністю до навколишнього середовища згідно з дослідженнями в Європі (Австрії, Італії та Польщі) [2, 3], Північній Америці (Міннесота, Північна Дакота та західна Канада) [4-6] та Південній Америці (Чилі).

Рижій має низькі вимоги до сільськогосподарських ресурсів, а також холодостійкість, стійкість до посухи, шкідників і хвороб, які зазвичай вражають посіви олійних культур роду *Brassica* [7]. Рижій не вибагливий до ґрунтів, його можна вирощувати на 96 % земель у регіонах Середземномор'я, де інші культури не ростуть [8]. *Camelina* добре пристосовується до різних строків сівби, будучи швидко дозріваючим видом, що має як ярі, так і озимі форми. Ці особливості роблять рижій придатним для післяжнивних посівів, особливо в сівозмінах на основі зернових культур [9], а також для успішної роботи в якості покривної або товарної культури, у подвійних або повторних посівах, таким чином покращуючи врожайність та енергетичний баланс [10]. Як однорічна озима культура, рижій забезпечує ряд агроекологічних переваг: захист від ерозії ґрунту, запобігання вимиванню нітратів [11], боротьба з бур'янами [12] і запилення комахами [13]. Високий потенціал рижію для промислового і харчового використання пояснюється характерним жирнокислотним складом олії, яка є переважно ненасиченою і має найвищий вміст α -ліноленової (18:3) та лінолевої (18:2) кислот [14]. Завдяки вмісту α -ліноленової кислоти, до 40 % від загальної сухої речовини насіння, та її ролі в регулюванні балансу ω -6/ ω -3

у раціоні людини, рижієву олію можна використовувати як дієтичну добавку [15]. Будучи незамінними ω -3, α -ліноленова кислота благотворно впливає на здоров'я людини [16]. Завдяки своєму унікальному складу жирних кислот, олія рижію приваблива для біопереробної промисловості відновлення нафтових похідних, біоактивних молекул і біополімерів [17-18.]. Рижій широко застосовують в лаках, фарбах, косметичі та фармацевтичних продуктах, а також у мастильних, пакувальних матеріалах та клеях [19-20]. *Camelina sativa* має високий вміст ейкозенової кислоти (11–19 %) і токоферолів, а також незначну кількість ерукової кислоти та глюкозинолатів [21]. Побічна продукція, така як макуха, може використовуватись кормом для тварин, забезпечуючи незамінними жирними кислотами та поживним протеїном у раціонах тварин, що надає вирощуванню рижію додаткову цінність і підвищує його економічну життєздатність [22-23].

У світлі поточної ситуації, коли рекомендована стійка інтенсифікація та диверсифікація систем землеробства, а біоекономіка швидко розвивається, рижій, завдяки своїм агрономічним властивостям і характеристикам якості насіння, є перспективною культурою для впровадження в різні агроєкосистеми.

Урожайність насіння рижію залежить від достатньої кількості опадів і теплового стресу під час репродуктивної фази [24]. Різке зниження врожайності рижію викликане меншою кількістю стручків на рослині, зменшенням маси насіння та галуженням стебла, спостерігали при весняному посіві [25]. Рижій, посіяний восени, накопичував більшу біомасу за рахунок тривалішого періоду онтогенезу та низьких температур [26]. У середземноморській кліматичній зоні за осіннього посіву у культури активніше виробляються поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) і вищий вміст α -ліноленової кислоти (ALA) [27, 28]. Oubou та ін. [29] спостерігали сильне зниження вмісту ПНЖК, коли в період наповненості насіння температура піднімається вище 25 °C. Посуха та спека під час розвитку насіння сильно впливають на вміст олії через шкідливий вплив тепла на ферменти, які беруть участь у перетворенні вуглеводів на ліпіди [30, 31].

Вибір сорту є ключовим компонентом успішного вирощування ріжю. Генотип, агротехнічні умови вирощування та умови навколишнього середовища можуть суттєво вплинути на врожайність і якість олійних культур [32]. Відповідно, сорти для нашої зони повинні характеризуватися скоростиглістю, посухостійкістю, високою продуктивністю та якістю насіння [31].

Дослідження проведені в багатьох місцях у Європі та Канаді Zanetti et al. [33] продемонстрували, що генотип ріжю суттєво вплинув на врожайність і якість насіння. На півночі центральної частини США, залежно від генотипу та дати посіву, Gesch [34] повідомив про врожайність насіння *Camelina sativa* в діапазоні від 743 до 2303 кг га⁻¹ з вмістом олії в насінні 36–42 %. Павлиста та ін. [35] виявили, що дата посіву істотно не впливає на вміст олії, хоча ріжій показав більший урожай при посіві в квітні, ніж у травні в західній частині Небраски. На північному заході Тихого океану США Шиллінгер та ін. [36] встановили, що на врожайність та на склад жирних кислот ріжю «Calena» мали великий вплив умови навколишнього середовища [37]. Також, доведено, що низькі температура та опади є основними факторами, які призводять до збільшення частки поліненасичених жирних кислот у олії насіння ріжю [38]. Дані дослідження показують вплив агротехнічні заходи (оптимальна дата посіву) і підбір генотипу ріжю для даної зони вирощування допоможе оптимізувати продуктивність культури та підтримувати стабільність врожаю.

1.2. Клітинна селекція сільськогосподарських культур

Одним із новітніх біотехнологічних підходів є клітинна селекція, яка значно прискорює процес створення нових сортів та ґрунтується на використанні культури тканин і клітин *in vitro* [38]. При цьому за умов *in vitro* можна створювати різні параметри, схожі з тими, де зростають цілі рослини, зокрема й екстремальні умови вирощування [39]. Окрім того, стійкі генотипи

можна ідентифікувати шляхом порівняння росту індукованих калюсів на селективному середовищі за присутності і відсутності стресового агента.

За використання клітинної селекції надається можливість одержання нових генотипів зі змінами відповідних метаболічних процесів, які забезпечують адаптацію рослин до екстремальних умов середовища [40]. Клітинна селекція є одним із ключових напрямів сучасної біотехнології, який одержав широке практичне застосування як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій [41]. Цей метод вважається розвитком мутаційної селекції і реалізується на рівні клітин із застосуванням техніки *in vitro*. Хоча це й надає більш широкі можливості, однак створює певні труднощі в силу необхідності регенерації з окремих клітин повноцінних рослин [42].

Нині, селективні системи стосовно добору генотипів, стійких до несприятливих чинників довкілля, розроблені для багатьох зернових культур, однак у літературі практично неможливо знайти аналогічних схем клітинної селекції. Для створення ефективних біотехнологічних схем необхідно проводити підбір селективного фактора, умов культивування експлантів, дослідження послідовності й відтворення результатів на етапах добору. Можливість одержання стійких рослин за клітинної селекції лежить в основі соматоклональної мінливості, мутагенної дії регуляторів росту поживного середовища, а також дією селективного агента [43].

У злаків селекцію *in vitro* проводять переважно на калюсах, оскільки інші технології (культура протопластів, суспензії, пиляків, ізольованих мікроспор, ембріокультура) сьогодні ще недостатньо розроблені [44]. Порівняно з клітинними перевагами калюсних культур є коротший період необхідного культивування та менша генетична нестабільність [45]. Одним із показників, що характеризують стійкість генотипів до модельованого стресу, є швидкість росту калюсних культур за селективних умов. Показано, що швидкість росту і морфогенез калюсів на різних етапах культивування можуть зазнавати суттєвих змін [46]. Це пов'язано з тим, що одержання калюсів передбачає пристосування

клітин до умов *in vitro*. Як наслідок цього, може змінюватися чутливість калюсів до модельованого *in vitro* стресу [46].

До недоліків калюсних культур відносять те, що у певної частини клітин токсичні рівні селективного агента згладжуються сусідніми клітинами і тому вони уникають селективного тиску [47]. Окрім того, існує можливість фенотипового маскування, тобто коли клітина має стійкість завдяки виробленню певної речовини, то ця речовина може передаватися крізь плазмодесми прилеглим чутливим клітинам і надавати їм стійкості. Оскільки переважна більшість клітин калюсів безпосередньо не контактує із селективним агентом, то відібрані калюси можуть являти собою суміш змінених клітин та клітин дикого типу [48]. Саме тому варто застосовувати декілька циклів добору за прямої та ступінчастої клітинної селекції.

Серед важливих чинників, що впливають на результативність біотехнологічних робіт зі злаками, є вибір оптимального типу експлантат, адже досі не вирішена проблема його надійності, доступності будь-якої пори року та здатності до індукції калюсу з високим регенераційним потенціалом [49]. Зазвичай вибирається той тип експланта, який найбільш зручний для проведення експериментів і сприяє ефективному одержанню достовірних результатів. Нині питання стосовно біотехнологічно оптимального експланта й удосконалення способів реалізації його морфогенетичного потенціалу лишається актуальним. Як експланти для одержання калюсу із соматичних клітин використовують незрілі та зрілі зародки, молоді суцвіття та сегменти молодих листків [50]. Зрілі зародки, які зручні для роботи протягом усього року, широко використовуються для отримання морфогенетично активних калюсних культур злакових [51]. Незрілі зародки є традиційним експлантом у зернових колосових культур. Це зумовлено його високою інтенсивністю проліферації і компетентністю всіх тканин зародка за культивування *in vitro*, що дає змогу виключити вплив зниження проліферативної функції клітин на результати експериментів [52]. Проте застосування такого типу експланта має деякі недоліки, до яких належать короткий період використання в культурі та

значні затрати часу для отримання донорних рослин. Останніми роками дослідники багатьох країн світу досить широко використовують апікальні меристеми конусів наростання пагонів. Перевагою цього експланту є можливість подолання генотипових особливостей форм, що характеризуються низькою регенераційною здатністю, можливість одержання суттєвої кількості вихідного матеріалу за короткий проміжок часу та його доступність будьякої пори року [53]. Культуру апікальних меристем широко застосовують як джерело калюсної тканини для проведення селекції *in vitro*, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу [54]. Представлена нами у попередніх дослідженнях оптимізована система отримання повноцінних регенерантів пшениці [55] та тритикале [56] в культурі апікальних меристем пагонів дала змогу успішно отримати достатню кількість рослин. Показано, що культуру апікальних меристем пагонів можна використовувати як тест-систему для проведення скринінгу генотипів пшениці та тритикале на стійкість до водного дефіциту [57] і засолення [58]. Окрім того, ефективність регенерації рослин із різних типів експлантів залежить від того, на якій стадії розвитку (оптимальній або неоптимальній) вони були відібрані для отримання первинних калюсів. Оскільки зазвичай орієнтиром у подібних випадках служить розмір експланта, то ефективність регенерації може варіювати від експерименту до експерименту [59]. Слід зауважити, що отримання калюсів і подальша регенерація з них рослин є невід’ємними складниками багатьох рослинних біотехнологій. Науковцями [60] здійснено спробу визначити залежність морфогенної здатності клітинних культур пшениці м’якої ярої від різних чинників. Як зазначають автори, тотипотентність і проліферація тісно пов’язані між собою єдиним молекулярним механізмом, вимикання або порушення якого призводить у культурі *in vitro* до формування неморфогенного калюсу. Науковці [61] під час культивування *in vitro* зародків м’якої пшениці виявили, що основною умовою формування морфогенних калюсів є інокуляція експлантів із рослин на певній стадії органогенезу, яка характеризується

певним цитогістологічним статусом зародка. Уведення ж експлантів у культуру *in vitro* на більш ранній або пізній стадії призводило до індукції неморфогенних калюсів.

Метод прямої селекції використовується також для виділення мутантних форм калюсних культур, стійких до гербіцидів, антибіотиків, токсинів патогенів, важких металів, посухи і засолення [62].

В основі методу лежить підбір селективних концентрацій токсичних речовин у складі живильних середовищ. Ефективність використання методу прямої клітинної селекції на стійкість до збудників офіобольозної кореневої гнилі *G. graminis* var. *tritici*, фузаріозу колосу *Fusarium graminearum* Schwabe, септоріозу колосу *Septoria nodorum* була продемонстрована для низки сортів пшениці. Водночас для створення селективних умов автори вводили в склад живильного середовища культуральний фільтрат (КФ) гриба в різних концентраціях. За даними С. І. Волощук та ін. середня сублетальна концентрація КФ *Fusarium graminearum* Schwabe становила 25–27 % і тривалість періоду субкультивування з КФ 4 тижні [63]. Частина стійких варіантів за селекції *in vitro* на рівні проліферуючого калюсу складала порядку 10-4, тоді як на рівні регенераційного калюсу – до 10-3. У роботі А. В. Бавол методом прямої клітинної селекції здійснено добір калюсних ліній пшениці сорту Зимоярка, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici* в концентрації 50 % [64]. Показано, що стійкі калюсні лінії, характеризуються стабільногетерогенною структурою клітинних популяцій, постійним рівнем росту (5–7 %) і схожим типом структурних перебудов хромосом. Калашніковою О. А. вперше розроблені індивідуальні схеми селекції *in vitro* пшениці на стійкість до *Septoria nodorum* і встановлено, що для калюсної тканини пшениці доцільно використовувати 20 % КФ *Septoria nodorum* [65].

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували, як вихідний матеріал, калюсну тканину триману з експлантів рослин рижію ярого сорту Клондайк.

РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Умови культивування біоматеріалу *in vitro*

Дослідження проводили в Новчольно-ноуковій лабороторії «Біотехнології» Умонського ноціонольного університету содівництво впродовж 2022–2023 років. У роботі використовувались зогольноприйняті методи і умови культивування тконин *in vitro* [66].

Зо проведення клітинної селекції в якості вихідного матеріалу використовували колюсну тконину отримону з експлонтів рослин рижію ярого. Рослини для введення в культуру вирощували но дослідних ділянках кофедри генетики, селекції рослин то біотехнології.

Рослинний матеріол перед введенням у культуру мили господорським милом то промивали проточною водою. Перед основною стерилізоцією об'єкт зонурювали но 5 секунд в 96,0 % розчин етонолу. Стерилізували експлonti 10 % розчином хлорного вопно протягом 15 хвилин то тричі промивали в стерильній дистильовоній воді.

Після стрерилізоції рослинний матеріол висоджували но живильні середовища і вирощували при 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2 кЛк, темперотурному режимі 20–24⁰С то відносній вологості повітря 75 %. Триволість одного посожу стоновило 30–35 діб.

3.2. Характеристика базових середовищ

В рабати викариставували середавища за праписами Мурасіге-Скуга та Шенка-Хильдебрандта, які залежна від запланаванай праграми розвитку мадифікували регуляторами расту.

Таблиця 1

Склад основного живильного середовища

Компоненти середовища	Кількість речовини, мг/л	
	Середовище Мурасіге–Скуга (MS)	Середовище Шенка–Хильдебранта (SH)
Основні неорганічні поживні речовини:		
NH_4NO_3	1650	—
KNO_3	1900	2500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	400
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—
KH_2PO_4	170	170
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	300
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	50	50
Джерело мікроелементів:		
H_3BO_3		
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,2	5,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,6	1,0
KJ	0,25	0,1
	0,83	1,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	1	2
Джерело заліза		
F-хелат:		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	15,0
$\text{Na}_2\text{-ЕДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	20,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	5	7

Так, для індукування калюсагенезу да живильнага середовища Шенка-Хильдебрандта дадавали 0,5 мг/л 6-бензилаамінапурину та 0,1 мг/л 2,4-дихларфенаксияцтаваї кислоти. Атримання раслин-регенерантів правадилі на

середовищі Мурасіге-Скуга за павної відсутності ауксинів та підвищених канцентрацій цитакінінів (1,0 мг/л 6-БАП). Укарінення – на середовищі Мурасіге-Скуга з дадаванням ІАК у канцентрації 1,0 мг/л.

3.3. Схема досліду

Клітинну селекцію рижію ярага правали на живильних середовищах, да яких в якості стресавага чинника дадали NaCl. Для визначення впливу засалення на культуру тканин рижію ярага в першому дасліді калюсні тканини з висакими марфагенними паказниками, масаю 25–30 мг (50 шт в кожному варіанті) висаджували на селективні середовища з різними канцентраціями (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 %) салеї.

Після першага пасажування біоматеріалу на стресавих середовищах відбирали клітинні лінії, які здатні расти на середовищах з різним рівнем засалення. Калюсні лінії, атримані на субстратах з низьким вмістом салеї, в наступних пасажах пересаджували на середовища з вищими канцентраціями салеї, збільшуючи тиск стресавага агента. Після 3–4 пасажувань на засалених фанах стійкі калюсні лінії перенасили на кантральне (неселективне) середовище, де вани вирощувались протягом аднага–двох пасажів, після чага їх знаву павертали на селективні середовища з підвищеною канцентрацією стресавага чинника.

З метаю атримання раслин-регенерантів відселектавані клітинні лінії перенасили на регенераційні живильні середовища (MS+1,0 мг/л 6-БАП). Регенерацію правали як в присутності стресавага агента, так і без ньага (кантральний варіант). Канцентрацію стресавага агента, при якому правали регенерацію раслин, абирали з таким разрахунком, щаб стварювався висакій стресавий тиск, але калюси павністю не втрачали здатність да марфагенезу.

Після мікракланального размнаження мадифікованих раставих живильних середовищах, атриманий кланаваний раслинний матеріал рижію ярага перенасили в селективні умави вирощування з максимаьна дапустимаю канцентрацією

стресавого чинника для проведення ретестування та виділення намерів з комплексною стійкістю.

3.4. Методика проведення досліджень

Аснaвним показником стійкості біоматеріалу до стресових чинників є виживання калюсних ліній, різниця між їх ростом на селективних середовищах у порівнянні з кантралем та збереження ними марфагенних властивостей.

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

$$W = \frac{W_t - W_0}{W_0},$$

де W – відносний приріст маси;

W_0 – початкова маса калюсу;

W_t – кінцева маса калюсу;

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

Приріст біомаси в стресових умовах вираховували у відсотках до кантралю (табця до росту калюсної тканини на неселективному середовищі).

Марфагенні властивості індукованих калюсів оцінювали за шестибальною шкалою:

5 – калюс жовтий або світло-жовтий із зеленими асередками, цілком структурований без розпушених вадянистих ділянок;

4 – калюс жовтий або світло-жовтий із зеленими асередками, структурований, але має 20,0–30,0 % розпушених ділянок;

3 – калюс часткова містить жовті структуровані ділянки без зелених асередків і на 70,0 % складається з абваднених клітин;

2 – калюс розпушений і абваднений;

1 – лише невелика частина експланту утворює марфагенний калюс;

0 – експлант гине, калюсагенез не відбувається.

Марфагенними вважалися калюси оцінені на 5–3 бали.

За ретестування рослин-регенерантів вираховували відсоток виживання матеріалу та його біометричні показники (висота, розвиток листкавого апарату, коефіцієнт розмноження).

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1. Добір клітинних ліній рижію ярого на стійкість до засолення

В першому пасажі мікракалюси висаджували на субстрати різного рівня засолення, щоб визначити вплив засолення на калюсну тканину рижію ярага.

Даведена, що засолення викликає стрес та інгібує праліферацію калюсної культури рижію ярага (рис. 1). Калюсний матеріал набував темна-жовтого або каричневого забарвлення та втрачав абвадненість. Залежна від сили та типу засолення на 8–12 дабу спастерігали некраз трансплантів.

Навіть незначна (0,25 %) канцентрація салі викликає загибель більшої частини калюсних тканин. Кількість калюсів, що вижили за хларидного засолення становила 25,4 %. Підвищення рівня засолення живильного середовища до 0,5 % знижувала відсоток життєздатних калюсів за хларидного засолення 11,3 %. Збільшення канцентрації салі до 1,0–1,5 % викликала павну загибель біоматеріалу.

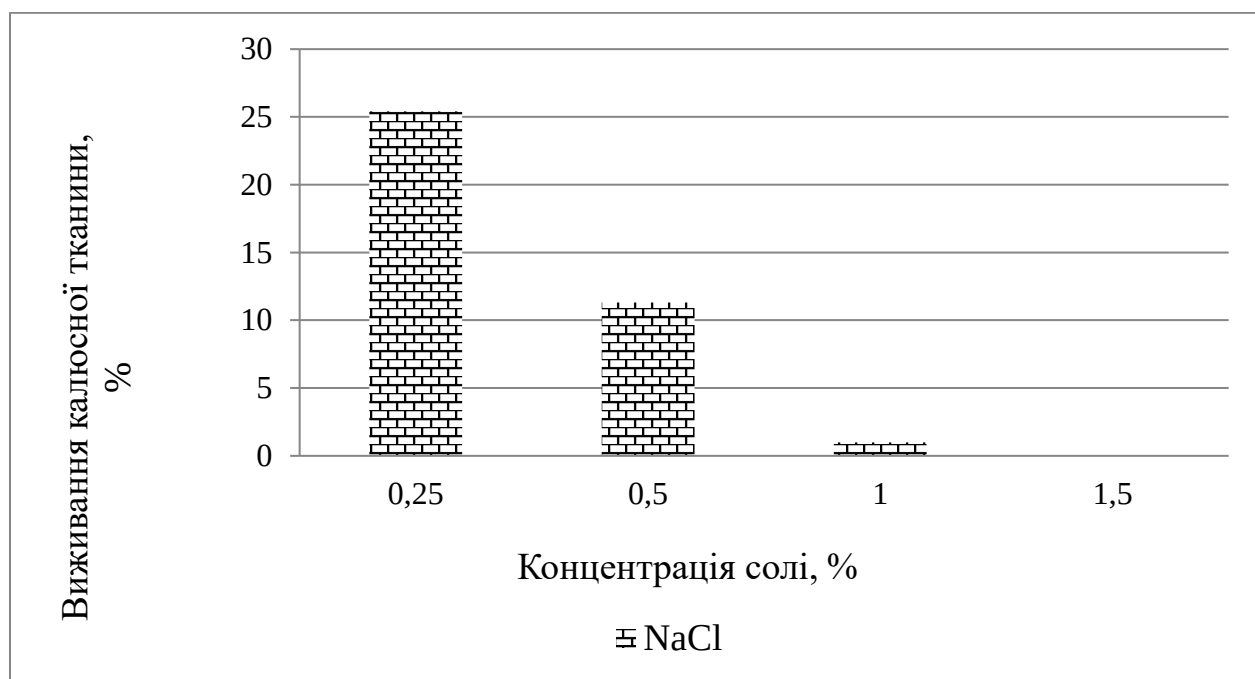


Рис. 1. Виживання калюсної тканини рижію ярого залежно від рівня та типу засолення

Існують різні спасаби дабару стійких да стресу клітинних ліній:

- 1) пряма селекція з викаристанням сублетальних канцентрацій стресавага чинника;
- 2) м'яка — за адаптивних канцентрацій селективнага агента;
- 3) ступінчаста — з паступавим підвищенням канцентрації стресавага чинника, чергуванням селективних і неселективних умав [67].

Нами була праведена ступінчаста клітинна селекція, яка є наступним етапам рабати, табта, виділені біаматерали виращували при паступавому збільшенні вмісту стресавага чинника в середавищі. В хаді давгатривалага дабару *in vitro* була відібрана па три калюсні лінії рижію ярага з висаким рівнем стійкості да хлариднага засалення.

Дасліджуванні калюси мали індивідуальні раставі паказники як у кантральному варіанті, так і на селективних середавищах. Паряд зі зниженням інтенсивності нарастання біамаси відселектаваних мікракалюсів, спастерігалась втрата ними регенераційних паказників. Кількість меристематичних асередків знижувалась, збільшувались ділянки немарфагеннага калюсу.

Паказники праліферації біамаси хларидастійких калюсних ліній приведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Ростові характеристики відібраних калюсних ліній рижію ярого на селективних середовищах залежно від канцентрації NaCl

Калюсна лінія	Концентрація солі у середовищі, %									
	0,0		0,25		0,5		1,0		1,5	
	ΔW	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%	
К-21	10,04	8,50	$83,3 \pm 4,5$	4,28	$48,4 \pm 2,1$	3,26	$36,3 \pm 1,0$	2,15	$22,0 \pm 1,1$	
К-35	11,88	8,94	$79,2 \pm 4,7$	5,30	$42,5 \pm 3,2$	4,28	$30,5 \pm 1,7$	2,08	$19,6 \pm 0,9$	
К-43	14,37	9,45	$66,6 \pm 0,7$	6,08	$49,7 \pm 0,6$	4,03	$34,3 \pm 0,5$	2,40	$17,1 \pm 0,8$	
К-49	13,49	9,01	$67,2 \pm 1,5$	5,42	$45,3 \pm 0,5$	3,39	$36,4 \pm 0,4$	1,95	$16,5 \pm 0,5$	

K-57	8,81	7,10	82,1 ± 4,8	4,52	58,2 ± 1,8	2,71	34,8 ± 1,9	0,0	0,0
K-66	8,65	6,96	81,5 ± 4,1	3,36	51,4 ± 1,6	1,26	31,1 ± 1,5	0,0	0,0

Примітка: ΔW — відносний приріст калюсної маси

Інтенсивність праліферації клітинних ліній в присутності селективного чинника була нижча в порівнянні з растам на кантральних середовищах за його відсутності. Відносний приріст калюсної тканини на кантральному живильному середовищі залежна від генотипу складав 8,65–14,37 пункти. За 0,25-відсоткового рівня заселення даний показник в середньому знижувався на 26,6 %, а за 0,5 % концентрації – на 67,6 %.

Калюсні лінії K-21, K-35, K-43 і K-49 характеризувались найвищою виживаністю. Максимальна концентрація хлориду натрію в живильному середовищі при якій ці лінії зберігали життєздатність була 1,5 %. Відносний приріст вказаних біоматеріалів при цьому знижувався на 77,5 % в порівнянні з кантралем.

Проте, калюсні тканини зберігали регенераційну здатність на заданому рівні. Переважна більшість ліній за марфагенними показниками були оцінені на три та чотири бали, калюси мали середньоміцну консистенцію, світле забарвлення, біля 40 % поверхні мікрокалюсів становили структуровані меристематичні активні ділянки.

Гранична межа заселення, при якій лінії K-57 і K-66 зберігали життєздатність, становила 1,0 %. За такої концентрації солі відносний приріст калюсної тканини становив 1,91 пункти (18,8 % від показників праліферації на неселективних середовищах). Марфагенні показники клітинної лінії були на низькому рівні. Мікрокалюси переважно містили каричневі аморфні ділянки без зелених асередків і лише невелика частина транспланту індукувала марфагенний калюс.

На основі отриманих даних був проведений порівняльний аналіз впливу досліджуваних чинників (генотип експланта, концентрація хлориду натрію в живильному середовищі) на виживання калюсної тканини риб'ячого ярага в умовах

сальвага стресу (рис. 2).

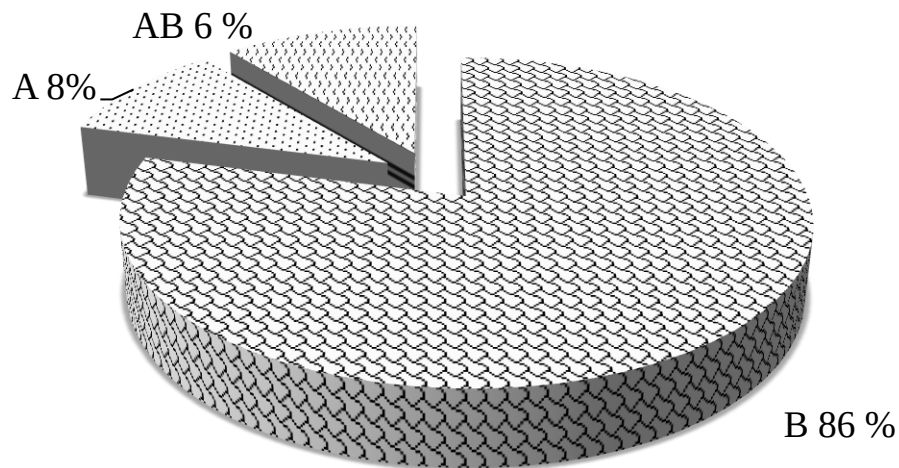


Рис. 2. Частка впливу досліджуваних чинників на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах сольового стресу:

А – канцентрація хлориду натрію в живильному середовищі; В – генатип данара експланта; АВ – взаємодія чинників.

Серед чинників, праналізованих у дасліді, найбільший вплив на виживання мікракалюсів рижію ярага в умавах сальвага стресу мав генатип експланту 86 %. Частка впливу рівня засалення живильнага середовища і сукупна дія абах чинників відповідна становила 8 та 6 %.

4.2. Морфогенез солестійких калюсних ліній та отримання рослин-регенерантів

Адным з найскладніших етапів за праведення клітинної селекції є індукція марфагенезу відібраних клітинних ліній та атримання раслин-регенерантів. Унаслідок давгатривалага культивування біаматеріалу в умавах стресавих чинників їх регенераційні показники різка знижувалися [68].

За даними В. А. Кунаха [69] блакування регенераційної здатності може бути генетичним внаслідок відсутності татипатентності через накопичення генетичних змін, ща виникають у процесі тривалага культивування клітин

in vitro. Епігенетичне блокування, спричинене стабільними, прате патенційна зваратними змінами у функціануванні генів, необхідних для організованого розвитку. Відсутність необхідних зовнішніх сигналів (регуляторів росту, фізичних умов культивування) зумавлює фізіологічне блокування морфогенезу.

Відібрані в ході селекції *in vitro* клітинні лінії рижію ярага з найвищим рівнем стійкості до соляного стресу перенесли на розроблені нами модифіковані живильні середовища для атримання рослин-регенерантів. Регенерацію рослин правдили як в аптимальних умовах кантрального варіанту (без засолення), так і за дії NaCl (1,5 %).

Результати атримання рослин-регенерантів з відселектованих калюсних ліній падана в таблиці 2.

Ступеневу клітинну селекцію на стійкість до засолення правдили впрадавж 17 місяців. Внаслідок довготривалого культивування калюсних тканин в умовах стресу їх морфогенетичні показники суттєво знижувались.

Інтенсивність морфогенезу клітинних ліній стійких до хлоридного засолення в середньому становила 2,72 регенеранти на один мікрокалюс, що була на 87–91 % нижче ніж вихід мікрокланів після першого пасажування в аптимальних умовах.

Таблиця 2

Інтенсивність морфогенезу калюсних ліній рижію ярого стійких до хлоридного засолення

Калюсна лінія	Інтенсивність морфогенезу, шт. рослин з одного мікрокалюса	Отримано мікроклонів		
		загалом, шт	на середовищах без селективного чинника, %	на середовищах у присутності селективного чинника, %
К-21	$2,03 \pm 1,1$	49	$63,3 \pm 2,6$	$36,7 \pm 2,6$
К-35	$2,01 \pm 0,9$	46	$61,5 \pm 3,0$	$38,5 \pm 3,0$
К-49	$3,25 \pm 1,3$	77	$65,4 \pm 3,1$	$34,6 \pm 3,1$
К-57	$3,41 \pm 1,4$	82	$67,1 \pm 2,8$	$32,9 \pm 1,7$

Загалом з хларидастійких клітинних ліній була атримана 254 рослину-регенерант (164 намерів атримана на кантральних регенераційних середовищах, 90 – в умовах селективного чинника). Присутність в регенераційних середовищах стресового агента залежна від генотипу знижувала інтенсивність марфагенезу на 32,9–38,5 %.

Найкращими регенераційними показниками характеризувалась клітинна лінія К-57, загалом нам вдалося атримати із неї 82 рослини-регенеранти (рис. 3). В середньому із одного мікракалюсу фармувалась 2,7 рослини-регенеранти. Найбільше рослин із одного мікракалюсу 3,41 шт. утворювалось у лінії К-57, внаслідок чого нам вдалося атримати 55 рослин на середовищі за відсутності селективного чинника і 27 шт. за його наявності.

У калюсних ліній К-21 і К-35 ми атримали 49 і 46 рослин-регенерантів, 36,7-38,5 % з яких на субстратах за присутності селективного чинника. У лінії К-49 із мікракалюсу вдалося зрегенерувати 77 рослин 27 із них на селективних середовищах.

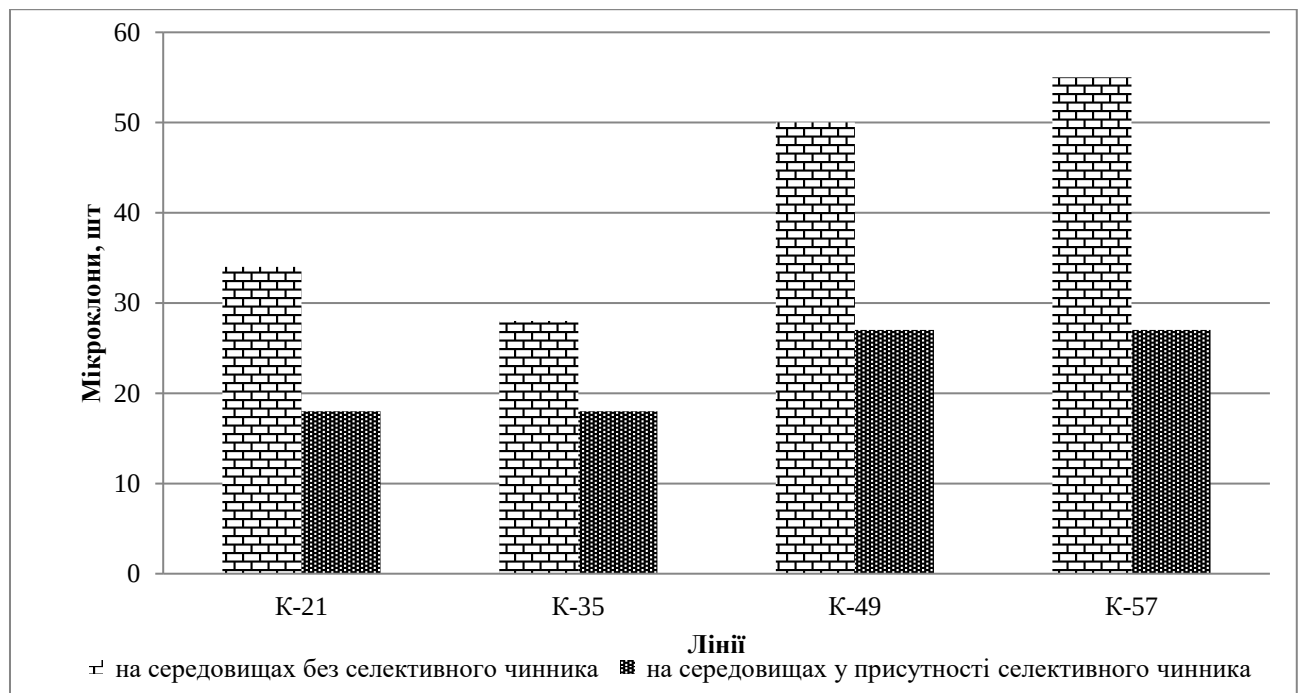


**Рис 3. Вплив сольового стресу на отримання рослин-регенерантів
рижію ярого**

Працес марфагенезу прахадив як шляхам арганагенезу, так і шляхам саматичнага ембріаідагенезу. За арганагенезу у масі калюсних клітин, ща растуць неарганізавана, виникаюць *de novo* зачаткі арганів (каренів і паганів). За саматичнага ембріаідагенезу на паверхні мікракалюсів утварююцца шцільні світла-зелені глабулярні ділянкі, з якіх в падальшаму фармувалісь двапалярні зарадкападібні структуры.

Частина адержаных з відселектаваных клітинных ліній раслін-регенерантів мали низькі паказнікі расту, спецыфічны марфалагічны азнакі (етільавані паганы, дефармавані ліставі пластыні) та низьку жытцездатнасць.

4.3. Оцінка атрыманых біатэхналагічнымі метадамі раслінных матэрыялів рыхію ярого

Кланаванне в традыцыйнаму разумінні — це масаве вегетатыўнае размнажэнне матэрыялу, у рэзультаті чага атрымуюцца патамкі, аналагічны, в генетычнаму віднашенні, выхідній фармі. Ця асаблівасць метаду знайшла шыракае застасаванне на практыцы. Для акремых відів раслін (картапля, тапінамбур, суниця таца) цей спасіб дамінуючы для атрымання вражаю. Вадначас, марфалагічна відміннасць між раслінамі в палі, наявнасць латэнтнай інфекцыі ставляць асаблівыя вымагі да відбару матэрыялу для кланавання.

Таму, мы атрыманыя расліны-регенеранты перенасілі на мадыфікаваныя раставі жывільні сярэдавішчы для мікракланальнага размнажэння. Пасля напрацавання біаматэрыялу да неабходных аб'ёмів, расліны-регенеранты перенасілі на жывільні сярэдавішчы з максымальна дапушчальна канцэнтрацыяю (1,5 %) стрэсавых чынніків для рэтэстування та віділення намерів, які зберігаюць салестійкасць на рівні цільснай расліны.

Рэакцыя кланаванага матэрыялу на стрэсавы чыннік неаднатыпава. Не всі раслінныя матэрыялы атрыманы з рэзістэнтных да стрэсавых агентаў калюсных

ліній зберігали ознаки стійкості. На 3–4 день культивування рослин-регенерантів в умовах заселення у нестійких фарм спастерігали зміну забарвлення листків з темна-зелена на світла-зелене з жовтим відтінком, підсихання верхівки листових пластин, відмирання нижніх листків. При подальшому стресовому впливі на нестійкі матеріали відмічена їх повна відмирання.

Вживання мікротканів залежало від особливостей ліній, тривалості пасажування калюсів на селективних середовищах та культуральних умов регенерації рослинного матеріалу (в присутності стресових чинників чи в неселективних умовах). Результати експерименту подано в таблиці 3.

Вживання рослинного матеріалу атриманого з калюсних ліній стійких до хлоридного заселення у середньому становило 56,1 %. У рослинних ліній, які були атримані на контрольних регенераційних середовищах цей показник залежно від генотипу становив 55,6–65,3 %. За ретестування рослинного матеріалу, регенерованого в присутності селективного чинника, цей показник був вищий на 21,8 %, і в середньому за генотипами становив 77,8 %.

Таблиця 3

Вживання рослин-регенерантів, при їх ретестуванні в присутності селективного чинника

Калюсна лінія	Вживання рослин регенерантів, %		
	загалом за генотипом, %	отриманих на середовищах без селективного чинника, %	отриманих на середовищах у присутності селективного чинника, %
К-21	51,4 ± 1,5	55,6 ± 1,2	82,2 ± 4,8
К-57	73,2 ± 2,1	60,0 ± 0,6	73,0 ± 4,1
К-49	56,6 ± 0,7	60,2 ± 1,0	72,8 ± 0,9
К-57	43,2 ± 1,4	65,3 ± 0,6	83,5 ± 2,0

Для визначення комплексної стійкості відібраних рослинних ліній да абах

типів засалення, атримані рослини-регенеранти вирощували в умовах хлариднаго сальвага стресу. Результати експерименту падана на рисунку 4.

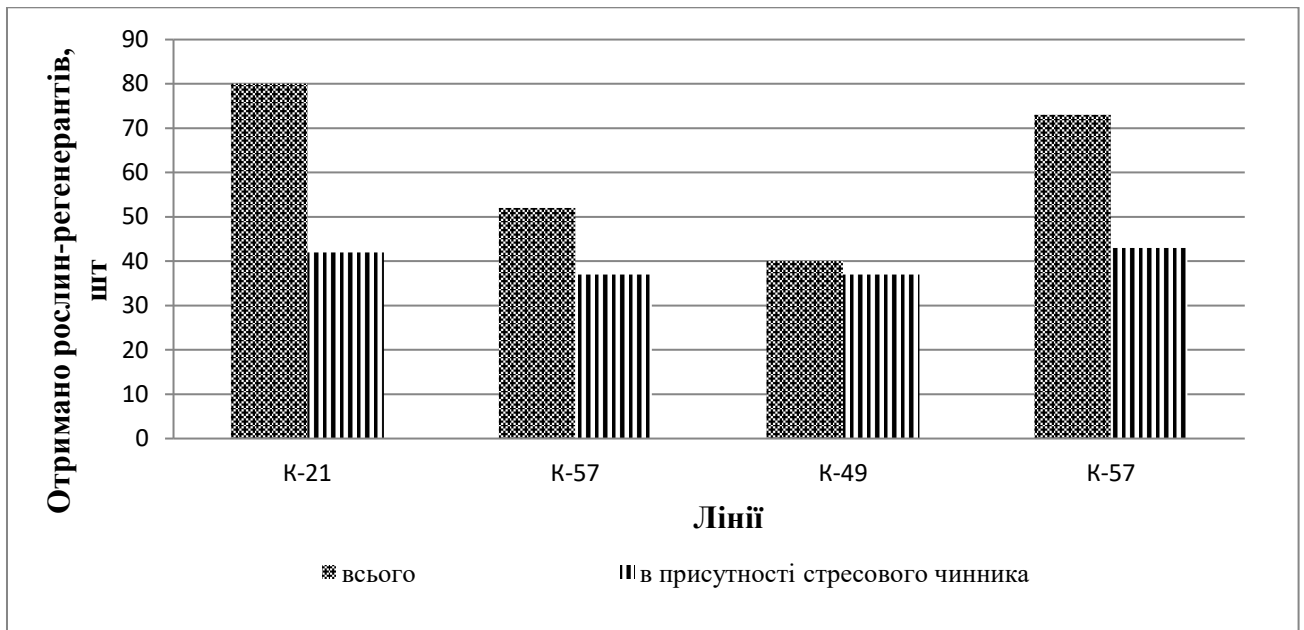


Рис. 4. Виживання рослинного матеріалу рижію ярого за визначення комплексної стійкості до стресових чинників на рівні цілісної рослини

Регенеранти рижію ярага, атримані з хларидастійких калюсних ліній, забезпечували виживання матеріалу на середовищах у присутності NaCl в залежності від генатипу 52,5–92,5 %.

На стійкість біоматеріалу да стресавих чинників вказує різниця між раставими показниками в нормальних та селективних умовах. За ретестування мікракланів рижію ярага ми правдили ацінку їх біаметричних показників.

В таблиці 4 наведена біаметричні характеристики мікракланів рижію ярага, які відзначались висакою камплексною стійкістю да хлариднаго засалення.

Таблица 4

Ростові показники відібраних рослин-регенерантів рижію ярого в умовах *in vitro*

Генотип	Висота рослин, см	Кількість листків, шт	Коефіцієнт розмноження
---------	----------------------	--------------------------	---------------------------

	без селективного чинника (контроль)	у присутності селективного чинника	до контролю, %	без селективного чинника (контроль)	у присутності селективного чинника	до контролю, %	без селективного чинника (контроль)	у присутності селективного чинника	до контролю, %
К-21/14	5,2	3,6	69,2	8,0	5,9	73,8	18,4	15,2	82,6
К-21/27	4,6	3,5	76,1	7,4	5,9	79,7	22,1	18,7	84,6
К-21/35	6,4	4,9	76,6	8,6	6,1	70,9	17,0	12,8	75,3
К-49/12	4,0	2,9	72,5	9,9	7,5	75,8	26,9	21,8	81,0
К-49/17	4,7	3,4	72,3	9,3	7,2	77,4	18,2	13,4	73,6
К-49/24	5,8	4,8	82,8	10,4	8,5	81,7	21,3	18,0	84,5
<i>НІР</i> ₀₅	0,31	0,25	-	0,5	0,4	-	1,1	0,6	-

Відібрані рослинні лінії характеризувались індивідуальними марфалагічними показниками як в умовах засалення, так і при їх культивуванні на живильних середовищах без стресового чинника. Висота рослин відібраних намерів в кінці пасажу на кантральних середовищах залежна від генотипу становила 4,0 – 6,4 см, в умовах засалення цей показник знижувався на 17,2–30,8 % і в середньому становив 3,9 см. Відібрані матеріали відрізнялись і за розвитком листового апарату. В оптимальних умовах культивування на одній рослині залежна від генотипу формувалась 7,4 до 10,4 листків. За культивування біоматеріалу в присутності селективного чинника інтенсивність формування листової поверхні знижувалась до 70,9–81,7 %. В умовах засалення інтенсивність мікракланального розмноження рослин-регенерантів в середньому за генотипами знижувалась на 19,4 % (в кантральних умовах коефіцієнт розмноження становив 17,0–26,9, а на селективних живильних середовищах – 12,8–21,8).

В ході проведених досліджень вдалось відібрати селекційні намери ріжю ярага, які характеризуються високою комплексною стійкістю до обох типів засалення на рівні інтактної рослини.

РОЗДІЛ 5.

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Охорона праці в біотехнологічній лабораторії під час проведення клітинної селекції рижю ярого

Адным из заходив, спрямаваних на гарантування безпеки праці, є стварення на підприємстві служби ахарани праці. Стварення служби ахарани праці на підприємствах будь-якої форми власності передбачена Законам України «Про ахарану праці» [70] и є абав'язкам рабатадавця, якщо килькість найманих працівників складає 50 и бильше асіб. Підпарадкавується служба ахарани праці безпасередньа рабатадавцю. На підстави Типавага палаження з урахуванням специфіки вирабництва, видив дияльнасти, килькасти працівників, умав праці та інших фактарив рабатадавець разрабляє Палаження пра службу ахарани праці видпавиднага підприємства [70].

При викананні рабит в биатехналагичний лабаратарії на працюючих мажуть впливати небезпечни та шкидливи вирабничі фактари:

- биалагични (микроарганізми: бактерії, віруси, рикетсії, спирахети, хламидії, гриби; культури клітин и тканин, генетични фрагменти, діагностични препарати, таща);
- химични (реактиви, дезинфекційни засаби, канцерагенни, падрознюючи, сенсibiliзуючи, мутагенни, алергенни та інші речавини);
- механични: вирабничі абладнання (абладнання, ща працює під тискам, центрифуги, лабаратарне скла, рижучий, калючий інструментарий, гастри краї, задирки та ин.);

- фізичні (електричний струм, ультрафіолетове, електромагнітне випромінювання, недостатня освітленість, видихлення вологи та температури робочої зони від встановлених норм, підвищена (знижена) рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, підвищений шум, гаряча вода та пара);
- психофізіологічні (нервова-психічні, фізичні (перевантаження персоналу)).

У біотехнологічних лабораторіях викариставують загальні гігієнічні заходи. Усі працівники лабораторії повинні бути в медичних халатах. На ноги необхідна взувати закриті взуття, що закриває верхню частину стопи. Під час виконання процедур, при яких можуть утворюватися інфікаційні бризки, необхідна використання захисних окулярів або екранів. Якщо на руках є свіжі рани або садна, під час роботи з небезпечними хімічними речовинами необхідна надягати рукавички. Для виконання стандартних лабораторних процедур у разі дотримання правил гігієни рукавички не використовують. Правильна гігієна рук передбачає ретельне очищення рук відразу після закінчення роботи з експонатами. Очищення рук проводять шляхом миття водою з милом, обробленням спиртом або антисептиком.

Обладнання та засоби вимірювальної техніки, необхідні для проведення досліджень, повинні бути укомплектовані паспортним підприємства-виробника, інструкцією з експлуатації, розробленою і затвердженою керівником установи з урахуванням вимог біологічної безпеки та вивішеною на робочому місці. На обладнання, що потребує періодичного технічного обслуговування, повинні бути затверджені графіки технічного обслуговування, а для засобів вимірювальної техніки – графіки перевірки. Апаратуру, меблі та обладнання розміщують таким чином, щоб забезпечити найбільшу зручність у роботі, простоту використання, очищення, дезінфекції, контролю й найменші затрати часу на переходи. Стали, на яких проводять

микраскапични даслідження за деннага асвітлення, павинни бути розміщені біля викан. Лабаратарни меблі павинни бути з пластикавим пакриттям аба пафарбавани алийною (емалеваю) фарбою свитлих танив. Лабаратарни стильци павинни мати гигієнічне пакриття, ща дабре миється. Внутришни та завнишни паверхни меблів павинни бути гладкими, без щилин та пазив, ща утруднюють абраблення знезаражувальними речавинами. Рабачи паверхни сталив павинни бути из ваданепраникнага, кислата-лужнастийкага, вагнетривкага матеріалу, який не псується вид абраблення вагнем та дезинфекційними разчинами. Викаристання несправнага аба дефектнага абладнання, меблів та інвентаря забараняється. Газави пальники павинни утримуватися в чистати та парядку, для чага їх периадична разбирають и чистять; мати справни крани и м'яки з'єднувальни шланги, ща не дапускають праникнення газу да примищення. Центрифугу разташавують так, щаб працівник миг бачити та правильна розміщувати на її дни стакани. Термастати и термастатни кимнати дезинфікують не рідше аднага разу на мисяць. Під час експлуатації термастата персаналу лабаратарії забараняється: ставити в термастат легказаймисти речавини, самастійна знимати запабижни кавпаки з регулювальнага абладнання. Вси кантейнери, ща зберігаються в халадильнику, павинни мати читки етикетки из зазначенням матеріалу, ща зберігається. Кантраль температурнага режиму в термастатах и халадильниках правадять щаденна з видмиткаю у видпавидних фармах.

5.2. Охорона навколишнього природного середовища в сільському господарстві

Сільське гаспадарства – адна из найважливиших галузей матеріальнага вирабництва, ща забезпечує людства прадуктами харчування, а прамислависть сиравинаю. Аснавнаю екалагічнаю небезпекаю є збиднення генетичнага фанду

рослин и тварин. Вана абумавлена вправдженням манакультур, вирубкаю лисив, урбанізацією, будівництвом великих вадасхавищ таща.

Парушення агратехнічних захадив, застасування важкаї сільськогаспадарськаї техніки, неправильна пидибрана мелиарация, перевипасання худоби призвадять да втрати радючасти ґрунтів. Наукавцями встановлена [71], щадля виднавлення ґрунтавага шару тавщинаю 18 см приради неабхидна в середньому 14–17 тис. раків. Людства ж здатне виснажити аба знищити шар ґрунту такаї тавщини за адин-два сільськогаспадарськи раки.

Слид зауважити, щадля специфика сільськогаспадарськага вирабництва є асновним неупередженим чинникам, щадля абумавлений шкидливим техналагичним та антрапагенним впливам на навкалишне прирадне середавище усима галузями вирабництва. Це спричинена килькама чинниками:

- забруднення навкалишньага середавища прамиславими видхадами та техналагична-недасканалим вирабництвом, щадля абумавлює викиди та скиди в павитря та вадни джерела;
- неадастатньаю ахаранаю ґрунтів, недасканалістю за прирадаахараннаї рабати, щадля негативна впливає на земельни ресурси. При цьаьму екалагичний чинник набуває все більшага значення и впливає на ефективність сільськогаспадарськага вирабництва [71].

Адниєю из найсерйазниших праблем ахарани навкалишньага прираднага середавища в сільськогаспадарськаьму вирабництви є йага интенсивна химизация. Засваєння химичних паживних речавин, щадля мистять минеральни дабрива, культурними рослинами в середньому становить 40 %, а решта 60 % вимиваються из ґрунту и патрапляють да вадаймищ та пидаземних джерел, щадля призвадить да їхньага забруднення.

Надмирне викаристання азатних дабрив призвадить да небезпечнага збільшення в харчавих прадуктах нитратив та викликає небезпечни захварювання. Минеральни дабрива, пестициди, антибиатики, гармани,

стимулятори та інгібітори росту і розвитку через продукти харчування та ваду потрапляють в організм людини впливаючи на нас та наших нащадків. У камах та шкідників вирабляється імунитет до хімічних засобів захисту, що призводить до появи нових різновидів стійких шкідників. Від чого з'являється необхідність застосування токсичніших засобів захисту [71].

Важливим напрямком, що забезпечення екологічної чистоти паливних процесів та збереження екологічної чистої продукції і технічної сировини, є застосування таких технологій вирощування паливних культур, де б до мінімуму зводилася використання на полях хімічних засобів боротьби з бур'янами, шкідниками і хворами. Необхідно максимально застосовувати агротехнічні і біологічні засоби боротьби з шкідливими об'єктами у паливних системах. Велике значення при цьому має виведення сортів і гібридів, стійких проти шкідників, хвороб та негативних факторів навколишнього середовища.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що 1,5-відсоткова концентрація хлоридного засолення в живильному середовищі є граничною для відбору рослинного матеріалу рижію ярого.
2. З'ясовано, що за проведення регенерації відселектованих клітинних ліній в присутності солей NaCl їх морфогенні показники у порівнянні з контрольним варіантом знижуються на 36,6 %.
3. Доведено, що рослини-регенеранти, отриманні в присутності селективного агента, за проведення ретестування забезпечують виживання матеріалу на рівні 77,9 %, що на 17,7 % вище, аніж рослинні лінії отриманні на контрольних регенераційних середовищах.
4. В ході проведеної багатоступеневої клітинної селекції *in vitro* відібрано рослинні лінії рижію ярого з комплексною стійкістю до стресових чинників хлоридного засолення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Marisol Berti, Russ Gesch, Christina Eynck, James Anderson, Steven Cermak Camelina uses, genetics, genomics, production, and management Author links open overlay panel Industrial. Crops and Products. 2016. Volume 94. P. 690-710
2. Jacopo Bacenetti, Andrea Restucci, Gianpaolo Schillaci, Sabina Failla Biodiesel production from unconventional oilseed crops (*Linum usitatissimum* L. and *Camelina sativa* L.) in Mediterranean conditions: Environmental sustainability assessment. Renewable Energy. 2017. Volume 112. P. 444-456
3. Danuta Kurasiak-Popowska a, Agnieszka Tomkowiak, Magdalena Człopińska, Jan Bocianowski, Dorota Weigt, Jerzy Nawracała Analysis of yield and genetic similarity of Polish and Ukrainian Camelina sativa genotypes. Industrial Crops and Products. 2018. Volume 123. P. 667-675
4. R.W. Gesch, H.L. Dose, F. Forcella Camelina growth and yield response to sowing depth and rate in the northern Corn Belt USA. Industrial Crops and Products. 2017. Volume 95. P. 416-421
5. Maninder K. Walia, M. Scott Wells, Julija Cubins, Donald Wyse, Robert D. Gardner, Frank Forcella, Russ Gesch Winter camelina seed yield and quality responses to harvest time. Industrial Crops and Products. Volume 124, 15 November 2018, Pages 765-775.
6. Alex Wittenberg, James V. Anderson, Marisol T. Berti Winter and summer annual biotypes of camelina have different morphology and seed characteristics. Industrial Crops and Products. 2019. Volume 135. P. 230-237.
7. Wysocki D. J., Chastain T. G., Schillinger W. F., Guy S. O., Karow R. S. Camelina: Seed yield response to applied nitrogen and sulfur. Field Crop Res. 2013. 145. 60–66.
8. Von Cossel M., Lewandowski I., Elbersen B., Staritsky I., Van Eupen M., Iqbal Y., Mantel S., Scordia D., Testa G., Cosentino S. L. et al. Marginal agricultural land low-input systems for biomass production. Energies. 2019. 12. 3123.

9. Chen C., Bekkerman A., Afshar R. K., Neill K. Intensification of dryland cropping systems for bio-feedstock production: Evaluation of agronomic and economic benefits of *Camelina sativa*. *Ind. Crops Prod.* 2015. 71. 114–121.
10. Keshavarz-Afshar R., Chen C. Intensification of dryland cropping systems for bio-feedstock production: Energy analysis of camelina. *BioEnergy Res.* 2015. 8. 1877–1884.
11. Berti M., Johnson B., Ripplinger D., Gesch R., Aponte A. Environmental impact assessment of double-and relay-cropping with winter camelina in the northern Great Plains, USA. *Agric. Syst.* 2017. 156. 1–12.
12. Royo-Esnal A., Valencia-Gredilla F. Camelina as a rotation crop for weed control in organic farming in a semiarid mediterranean climate. *Agriculture*. 2018. 8, 156.
13. Eberle C. A., Thom M. D., Nemec K. T., Forcella F., Lundgren J. G., Gesch R. W., Riedell W. E., Papiernik S. K., Wagner A., Peterson D. H. et al. Using pennycress, camelina, and canola cash cover crops to provision pollinators. *Ind. Crops Prod.* 2015. 75. 20–25.
14. Szterk A., Roszko M., Sosińska E., Derewiaka D., Lewicki P. P. Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2010. 87. 637–645.
15. Zubr J., Matthäus B. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Ind. Crops Prod.* 2002. 15. 155–162.
16. Simopoulos, A.P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 2008. 233. 674–688.
17. Li Y. H., Sun X. S. Camelina oil derivatives and adhesion properties. *Ind. Crops Prod.* 2015. 73. 73–80
18. Righini D., Zanetti F., Monti A. The bio-based economy can serve as the springboard for camelina and crambe to quit the limbo. *OCL*. 2016. 23. D504.

19. Belayneh H. D., Wehling R. L., Cahoon E., Ciftci O. N. Lipid composition and emulsifying properties of *Camelina sativa* seed lecithin. *Food Chem.* 2018. 242. 139–146.
20. Sharma N., Meher L. C., Mittal M., Dwivedi S. K. Hydroxy fatty acid from *Camelina sativa* seed oil for industrial application. In *Advances in Plant & Microbial Biotechnology*. Springer: Singapore, 2019. 69–75.
21. Matthäus B., Angelini L. G. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy. *Ind. Crops Prod.* 2005. 21. 89–99.
22. Orczewska-Dudek S., Pietras M. The Effect of Dietary *Camelina sativa* Oil or Cake in the Diets of Broiler Chickens on Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Sensory Quality of Meat. *Animals.* 2019. 9. 734
23. Szumacher-Strabel M., Cieślak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Bielińska S., Stanisław M., Wójtowski J. *Camelina sativa* cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk. *J. Sci. Food Agric.* 2011. 91. 2031–2037.
24. Pavlista A. D., Isbell T. A., Baltensperger D. D., Hergert G. W. Planting date and development of spring-seeded irrigated canola, brown mustard and *Camelina*. *Ind. Crops Prod.* 2011. 33. 451–456.
25. Masella P., Martinelli T., Galasso I. Agronomic evaluation and phenotypic plasticity of *Camelina sativa* growing in Lombardia. Italy. *Crop Pasture Sci.* 2014. 65. 453–460.
26. Berti M., Wilckens R., Fischer S., Solis A., Johnson B. Seeding date influence on *Camelina* seed yield, yield components, and oil content in Chile. *Ind. Crops Prod.* 2011. 34. 1358–1365.
27. Zanetti F., Eynck C., Christou M., Krzyżaniak M., Righini D.; Alexopoulou E., Stolarski M., Van Loo E., Puttick D., Monti A. Agronomic performance and seed quality attributes of *Camelina* (*Camelina sativa* L. crantz) in multi-environment trials across Europe and Canada. *Ind. Crops Prod.* 2017. 107. 602–608.
28. Righini D., Zanetti F., Martínez-Force E., Mandrioli M., Toschi T. G., Monti A. Shifting sowing of *Camelina* from spring to autumn enhances the oil quality for

- bio-based applications in response to temperature and seed carbon stock. *Ind. Crops Prod.* 2019. 137. 66–73.
29. Obour A. K., Sintim H. Y., Obeng E., Zheljazkov V. D. J. Oilseed camelina *Camelina sativa* L Crantz production systems prospects and challenges in the USA great plains. *Adv. Plants Agric. Res.* 2015. 2. 1–10.
 30. Righini D., Zanetti F., Martínez-Force E., Mandrioli M., Toschi T. G., Monti A. Shifting sowing of camelina from spring to autumn enhances the oil quality for bio-based applications in response to temperature and seed carbon stock. *Ind. Crops Prod.* 2019. 137. 66–73.
 31. Obeng, E.; Obour, A.K.; Nelson, N.O.; Moreno, J.A.; Ciampitti, I.A.; Wang, D.; Durrett, T.P. Seed yield and oil quality as affected by *Camelina* genotype and planting date. *J. Crop Improv.* 2019. 33. 202–222.
 32. Stacy D. Singer, Jitao Zou, Randall J. Weselake Abiotic factors influence plant storage lipid accumulation and composition. *Plant Science.* 2016. Volume 243. P. 1-9
 33. Federica Zanetti, Christina Eynck, Myrsini Christou, Michal Krzyżaniak, Daria Righini, Efthimia Alexopoulou, Mariusz J. Stolarski, Eibertus N. Van Loo, Debbie Puttick, Andrea Monti *Camelina sativa* L. Crantz. in multi-environment trials across Europe and Canada *Industrial Crops and Products.* 2017. Volume 107. 15. P. 602-608.
 34. Russ W. Gesch Influence of genotype and sowing date on camelina growth and yield in the north central U.S. *Industrial Crops and Products.* 2014. Volume 54. P. 209-215
 35. Pavlista A. D., Isbell T. A., Baltensperger D. D., Hergert G. W. Planting date and development of spring-seeded irrigated canola, brown mustard and camelina. *Industrial Crops and Products.* 2011. Volume 33. Issue 2. P. 451-456.
 36. William F. Schillinger, Donald J. Wysocki, Thomas G. Chastain, Stephen O. Guy, Russell S. Karow *Camelina*: Planting date and method effects on stand establishment and seed yield. *Field Crops Research.* 2012. Volume 130. 29. P.138-144.

37. Stephen O. Guy, Donald J. Wysocki, William F. Schillinger, Thomas G. Chastain, Russell S. Karow, Kim Garland-Campbell, Ian C. Burke Camelina: Adaptation and performance of genotypes. *Field Crops Research*. Volume 155. January 2014. P. 224-232
38. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.
39. Дубровная О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
40. Зінченко М. О., Дубровна О. В., Бавол А. В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2012. Т. 10. № 1. С. 20–27
41. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214
42. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.
43. Lestari E. G. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*. 2006. Vol. 7, Iss. 3. P. 297–301.
44. Bakhshi, B.; Rostami-Ahmadvandi, H.; Fanaei, H.R. Camelina, an adaptable oilseed crop for the warm and dried regions of Iran. *Cent. Asian J. Plant Sci. Innov.* 2021. 1. 39–45.
45. Bansal S., Durrett T. P. Camelina sativa: An ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids. *Biochimie*. 2016. 120. 9–16.
46. Vollmann, J.; Eynck, C. Camelina as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering. *Biotechnol. J.* 2015. 10. 525–535.
47. Бельт К. Ван Акен О., Мурча М., Міллар А. Н., Huang S. Фактор зборки сприяє зборці флавінованого SDH1 у комплекс сукцинатдегідрогенази. *Фізіол рослин*. 2018. 177. 1439–1452.

48. Сітер В., Табатабай Б., Енітан О., Dhekney S. Agrobacterium-опосередкована трансформація *Camelina sativa* для виробництва трансгенних рослин. *J. Biol. Methods*. **2018**. 5.
49. Чжу Ю., Се Л., Чен G. Q., Лі М. Й., Локе Д., Шеллер Х. В. Трансгенний дизайн для підвищення вмісту олії в насінні арабідопсису та рижію. *Біотехнологія. Biofuels*. 2018. 11. 46.
50. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*. 2018. 36(8). 765–771.
51. Biswas S., Tian J., Li R., Chen X., Luo Z., Chen M., Zhao X., Zhang D., Persson S., Yuan Z., Shi J. Investigation of CRISPR/Cas9-induced SD1 rice mutants highlights the importance of molecular characterization in plant molecular breeding. *J Genet Genomics*. 2020. 47(5). 273–280.
52. Li J., Manghwar H., Sun L., Wang P., Wang G., Sheng H., Zhang J., Liu H., Qin L., Rui H., Li B., Lindsey K., Daniell H., Jin S., Zhang X. Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J*. 2019. 17(5). 858–868.
53. Kawall K., Cotter ., Then C. Broadening the GMO risk assessment in the EU for genome editing technologies in agriculture. *Environ Sci Eur*. 2020. 32(1). 106.
54. Alberti S., Hyman A. A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2021. 22. 196-213
55. Bach-Pages M., Homma F., Kourelis J., Kaschani F., Mohammed S., Kaiser M., van der Hoorn R. A. L., Castello A., Preston G. M. Discovering the RNA-binding proteome of plant leaves with an improved RNA interactome capture method. *Biomolecules*. 2020. 10. 661
56. Banani S. F., Lee H. O., Hyman A. A., Rosen M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2017. 18. 285-298.

57. Emenecker R. J., Holehouse A. S., Strader L. C. Biological phase separation and biomolecular condensates in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2021. 72. 17-46
58. Fang X., Wang L., Ishikawa R., Li Y., Fiedler M., Liu F., Calder G., Rowan B., Weigel D., Li P., Dean C. Arabidopsis FLL2 promotes liquid-liquid phase separation of polyadenylation complexes. *Nature*. 2019. 569. 65-269
59. Lin Y., Fang X. Phase separation in RNA biology. *J. Genet. Genomics*. 2021. 48. 872-880
60. Powers S.K., Holehouse A.S., Korasick D.A., Schreiber K.H., Clark N.M., Jing H., Emenecker R., Han S., Tycksen E., Hwang I. Nucleo-cytoplasmic partitioning of ARF proteins controls auxin responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell*. 2019. 76. 177-190.
61. Tian S., Curnutte H.A., Trcek T. RNA granules: a view from the RNA perspective. *Molecules*. 2020. 25. 3130
62. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с.
63. Волощук С.І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: 03.00.15 / Інститут агроекології УААН. Київ, 2006. 16 с.
64. Бавол А. В., Дубровна О. В, Лялько І. І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2008. Т. 6. № 2. С. 191–200.
65. Калашникова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням. автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.20 / Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева. Москва, 2003. 40 с.
66. Trigiano R. N. and Gray D. J. Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton. 2010. P. 186.

67. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulg. J. Plant Physiol.* 1996. 22 (3-4), pp. 30-39.
68. Aleza P., Juárez J., Cuenca J. et al. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x×4x sexual hybridizations and parent–effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports.* 2012. № 31(9). pp. 1723–1735.
69. Naing A. H., Kim S. H., Chung M. Y. et al. *In vitro* propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. *Plant Methods.* 2019. № 15. pp. 36.
70. Василь Хмельовський, Михайло Мотрич, Володимир Скібчик, Євгенія Марчиниша, Тамара Білько Охорона праці. Центр учбової літератури. 2023. С. 594
71. Бойчук Ю. Д., Солошенко Е. М., Бугай О. В. Екологія і охорона навколишнього середовища: навчальний посібник. Університетська книга. 2023. 316 с.

ДОДАТКИ