

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет агрономії

Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту
«_____» _____ 2025 р.
Завідувач кафедри,
доктор сільськогосподарських наук,
професор
_____ Людмила РЯБОВОЛ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

ступеня вищої освіти магістр

**ВПЛИВ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ВИХІД ГАПЛОЇДНОГО
МАТЕРІАЛУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ
ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ УНУ**

Виконав: студент ІІ курсу, групи 25 м-а
Спеціальності 201 «Агрономія»
КУЛИКОВСЬКИЙ Дмитро Віталійович

Керівник – Рябовол Л. О.

Умань – 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У СЕЛЕКЦІЇ БУРЯКА ЦУКРОВОГО (огляд літератури).....	6
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	12
2.1. Ботанічна і біологічна характеристика буряка цукрового.....	12
2.2. Характеристика донорного матеріалу, що використовується в досліді для отримання гаплоїдних структур.....	15
РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	17
3.1 Умови вирощування донорного матеріалу.....	17
3.2 Схема досліду.....	17
3.3 Характеристика середовища	19
3.4. Методика проведення досліджень.....	21
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
4.1 Підбір живильного середовища для культивування незапліднених насінневих зачатків буряка цукрового.....	23
4.2 Вплив регуляторів росту на вихід гаплоїдних рослин буряка цукрового	25
4.3. Вплив генотипу донорного матеріалу на вихід, ріст і розвиток макроструктур з незапліднених насінневих зачатків буряка цукрового.....	32
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА. ...	35

5.1 Охорона праці та моделювання виробничих небезпек за селекційного процесу.....	35
5.2 Охорона навколишнього природного середовища за використання інтенсивних технологій вирощування бурюка цукрового.....	37
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

Одна з найважливіших проблем селекційно-генетичних досліджень є використання гетерозису, найвищий прояв якого спостерігається у гібридів від схрещування генетично вирівняних форм, які створюють шляхом тривалого примусового самозапилення. Міжлінійні гібриди, отриманні від схрещування інбредних ліній з високою комбінаційною здатністю перевищують районовані сорти за продуктивністю на 20–30%.

Актуальність теми. За допомогою біотехнологічних методів із збагаченого генетичного матеріалу можна отримати гомозиготний, тобто чистолінійний селекційний матеріал, виключаючи при цьому багаторазове самозапилення. Найбільш ефективним у відношенні отримання константних ліній є метод експериментальної гаплоїдії, зацікавлення до якого все більше зростає, особливо в останній час, коли з особливою гостротою постає питання скорочення строків виведення нових гібридів.

Поєднання селекційних та біотехнологічних методів дає змогу не лише прискорити процес створення гомозиготних матеріалів, а й покращити існуючі.

У селекції буряка цукрового важливе місце займає створення гібридів з високим вмістом цукру в коренеплодах. Дослідами вчених показано, що коренеплоди з клітинами малих розмірів мають більший вміст цукру [1]. Тому селекція має бути направлена на пошук та створення матеріалів з невеликим розміром клітин.

За даними досліджень Ф. М. Парія, проведених в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, доведено, що зниження рівня плоїдності тетраплоїдної кукурудзи ($4n$) до диплоїдного рівня ($2n$) призводить до зменшення розміру клітин у порівнянні з вихідними диплоїдними формами [2].

На основі дослідів з кукурудзою можна припустити, що при переведенні тетраплоїдних форм буряка цукрового ($4n$) на диплоїдний рівень ($2n$), зменшиться розмір клітин і можливо збільшиться вміст цукру в коренеплодах.

У зв'язку з цим очевидна актуальність і необхідність проведення ціле-направлених досліджень з індукованої гаплоїдії рослин.

Мета дослідження. Метою наших досліджень було вирішення питання пов'язаних з розробкою ефективних живильних середовищ для отримання гаплоїдів буряка цукрового.

Відповідно поставленої мети вирішувались наступні завдання:

- вивчення динаміки росту насіннєвих зачатків буряка цукрового на середовищах з різним якісним та кількісним вмістом регуляторів росту рослин;
- отримання регенерації проростків безпосередньо з насіннєвих зачатків, виключаючи стадію калюсоутворення;
- розробка ефективних методів переведення отриманих гаплоїдних структур на диплоїдний чи тетраплоїдний рівень плоїдності.

Апробація результатів дипломної роботи. Матеріали оприлюднено у матеріалах доповідей на наукових студентських конференціях Уманського національного університету.

РОЗДІЛ І

ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У СЕЛЕКЦІЇ БУРЯКА ЦУКРОВОГО (огляд літератури)

Фундаментальні дослідження в галузі молекулярної біології, генетики, клітинної біології, біохімії та фізіології рослин, мікробіології і вірусології та застосування їх результатів у промисловому виробництві за останні 30 років сформували і розвинули самостійну галузь знань — біотехнологію рослин.

Біотехнологія (*Βιοτεχνολογία*, від грец. *bios* — життя, *techne* — мистецтво, майстерність і *logos* — слово, навчання) використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Біотехнологія — міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук. З розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства — ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості навколишнього середовища.

У сучасній біотехнології можна виділити три напрями:

- Клітинні технології;
- ДНК–технології;
- Трансгенез.

Клітинні технології наразі широко застосовують у селекції рослин. При отриманні гомозиготного матеріалу ефективними є два способи: культура незапліднених зародків та культура ізольованих пиляків. Застосування техніки гаплоїдизації в ранніх поколіннях після гібридизації припиняє формоутворюючий процес і дає змогу отримати чисті лінії [3]. Тому і не дивно, що явище гаплоїдії у рослин з кожним роком все більше притягує увагу селекціонерів.

Використання біотехнологічних методів у селекційній роботі дозволяє інтенсифікувати процес отримання вихідного матеріалу і скоротити терміни

створення гібридів. Гаплоїдія є одним із перспективних методів отримання гомозиготних ліній для гетерозисної селекції буряка.

Під загальною назвою «гаплоїди» розуміють рослини з одинарним набором хромосом [4].

Гаплоїди виникають спонтанно і випадково. Вони виявлені і описані у 55 видів 16 родин рослин. Кількість спонтанно сформованих гаплоїдів складає в залежності від виду від 0,001 до 0,01% [5].

Для створення гаплоїдних рослин вчені застосовували різні методи.

Чейзу вдалося виявити гаплоїдні рослини кукурудзи схрещуванням рослин з ендоспермним маркером. Нормальна диплоїдна зернівка була забарвлена, що полегшувало ідентифікацію гаплоїдів. Середній показник у досліді — один гаплоїд на 900 насінин [6].

Кіхара провів ряд дослідів із затримання запилення. Результати показали, що запізнення з запиленням збільшує відсоток утворення гаплоїдних рослин. Максимальний вихід гаплоїдів (27–37%) отримали при затриманні запилення до 8–9 днів [7].

У кукурудзи збільшення кількості гаплоїдів спостерігалось при опроміненні пилку γ - випромінюванням [8].

У дослідженнях, Кіхара і Катаяма гаплоїдні рослини отримали опромінюючи колоски озимої пшениці рентгенівським промінням під час мейозу [9].

Сіней при затримці запилення у кукурудзи до восьми днів після появи приймочок виявив 3,5 гаплоїди на кожну 1000 зернівок [10].

У низки видів рослин запилення абортивним пилком було використане для індукції отримання гаплоїдів [11].

Діанон при обробці приймочок кукурудзи малеїновим гідразидом відмітив підвищення кількості гаплоїдів. Обробка приймочок колхіцином дала негативний результат [12].

Утворення гаплоїдів у *Nicotiana tabacum* отримано за дії на рослинну високих і низьких температур і запилюючи пилком іншого виду [13].

Отже, при використанні даних методів можна отримати гаплоїдні рослини, проте їх кількість залишається незначною.

В останній час для отримання гаплоїдів все частіше використовують культуру ізольованих тканин і клітин. Цей метод вперше запропонував Чейз. Він вказав на можливість масового отримання гаплоїдів та наступною регенерацією з них дорослих рослин при культивуванні гаплоїдних тканин і клітин [14].

Вирощування ізольованих частин та органів рослин першими розпочали німецькі вчені ще у XIX ст. Х. Фьохтінг у 1878 р. вирощував у ізольованих умовах шматочки різних тканин рослин. Броун, Моріс та Сахс першими вирощували ізольовані зародки в штучних умовах. Рехінгер спостерігав калусоутворення на шматочках корення буряка та кульбаби [15].

Вперше обґрунтував ідею, та принципи вирощування ізольованих клітин, їх тотипотентність у 1902 р. Хаберландт [16].

Уайт вперше розробив склад живильного середовища, яке використовується і до сьогодні [17].

Мурасіге та Скуг розробили в 1962 р. нове живильне середовище, найвідоміше та найуживаніше вже протягом 40 років [18].

Перші гаплоїди в культурі *in vitro* були отримані в 1964 році в двох видів *Datura*. З пилку регенерували ембріоїди, що розвинулися в нормальні зелені проростки [19].

У дослідях з рисом Нізекі і Ооко гаплоїдні рослини регенерували з калусу пилку. В агаризоване середовище було добавлено 2,0 мл/л ІОК і 2,0–4,0 мл/л кінетину [20].

Фактори, що впливають на вихід гаплоїдних рослин з пиляків, показано у наукових працях багатьох вчених. До них відносяться, генотип, умови вирощування донорних рослин (поле, теплиці), склад живильного середовища, концентрація сахарози [21].

Рослини з гаплоїдним набором хромосом були отримані вченими і при культивуванні *in vitro* незапліднених зав'язей. Підкреслюється, що індукція

калюсу і регенерація рослин з калюсу також залежить від генотипу, складу і концентрації фітогормонів у середовищі, умов культивування експланту [22].

Для отримання максимального виходу гаплоїдних рослин до моменту введення в культуру *in vitro* необхідно підібрати оптимальну стадію розвитку пилку. Ця стадія неоднакова для різних видів. У пшениці найкращі результати отримуються, коли пилок знаходиться у фазі першого мітозу пилкового зерна [23].

Перші відомості про гаплоїди буряка цукрового опубліковано Леваном. Пізніше про це повідомляли інші автори, які в більшості випадків описували окремі спонтанно сформовані гаплоїди [24].

Отримання гаплоїдів в останній час у буряка здійснюється двома підходами: генетичним та біотехнологічним (культура пиляків, ізольованих насіннєвих зародків, незрілих зародків) [25].

Боземарк і Юке намагалися підвищити вихід гаплоїдів буряка, використовуючи спеціальну програму схрещувань і застосовуючи для запилення опромінений пилок. Опромінення гама-променями в цих дослідках було більш ефективне, ніж обпилення пилом диких видів буряка. Відсоток гаплоїдів серед рослин досягав 7,3% [26].

Для отримання гаплоїдів буряка цукрового широко використовується метод генетичного маркування. Для цього диплоїдні чоловічо-стерильні рослини схрещують з маркерованою формою, в якості якої застосовують буряк столовий (*Beta vulgaris* var. *Esculenta*). Серед продуктів схрещування виділяють рослини, що не мають маркерного забарвлення і з них, відбирають гаплоїди. Відсоток гаплоїдів при цьому складає близько 0,18 % [27].

Для індукції формування гаплоїдних рослин найбільш ефективним виявилось використання культури ізольованих насіннєвих зачатків і незрілих зародків, як продуцентів [28].

У працях французьких авторів вказана можливість підвищення кількості життєздатних гаплоїдів, виділених з вторинної культури індукованих насіннєвих зачатків з використанням регуляторів росту ІОК, 6-БАП і

кінетину. При цьому відмічається вплив температури і генотипу донорних рослин на результати культивування [29].

Для підвищення виходу гаплоїдів позитивний ефект здійснює холодова попередня обробка рослини-донора. Ряд вчених відмічає процентне збільшення рослин з гаплоїдним набором хромосом у культурі пиляків злаків при обробці холодом колосків (2–4°C протягом 3–15 діб). Вихід проростків збільшується до 8,8% [30, 31, 32, 33].

Значення має і період введення насіннєвих зачатків у культуру *in vitro* та умови їх культивування. Найбільший вихід індукованих зачатків (від 3,5 до 4,3) отримано в літній період (травень-листопад) і нижчий — у зимовий (листопад-лютий) [34].

Найрезультативнішим способом отримання гаплоїдів буряка цукрового виявилось культивування *in vitro* незапліднених насіннєвих зачатків. Встановлено, що середовища, що містять ІОК, 6-БАП, кінетин, найефективніші для стимуляції росту насіннєвих зародків. І звичайно ж, кількість насіннєвих зародків, що розвиваються, при інших рівних умовах залежить від генотипу рослини та її схильності до апоміксності [35].

Розроблено спосіб стимуляції гаплоїдії буряка цукрового, який пропонуємо для підвищення виходу гаплоїдних та гомозиготних матеріалів поєднувати метод культури ізольованих насіннєвих зачатків з прийомом стимулювання – запилення рослини-донору експланту пилком рослин виду *B. webbiana* L.. Застосування даного способу дозволяє підвищити вихід гаплоїдів до 7,4%, а спонтанно диплоїдизованого матеріалу – до 2,2%.

Проводилися дослідження з виявлення можливості підвищення ефективності отримання гаплоїдів буряка цукрового біотехнологічними методами при об'єднанні культури ізольованих насіннєвих зачатків та затримання запилення. Для стимулювання гаплоїдії проводили вилучення незапліднених насіннєвих зачатків у період цвітіння квітки від одного до 12 днів [36].

Отже, проаналізувавши інформацію літературних джерел можна зробити висновок, що склад живильного середовища та генотип рослини-

донора експланту є основними чинниками при отриманні гаплоїдного та гомозиготного матеріалів різних видів рослин і, зокрема, буряка цукрового.

При індукції гаплоїдів склад живильного субстрату залишається найважливішим фактором стимуляції формування структур.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Ботанічна і біологічна характеристика буряка цукрового

Буряк цукровий (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) належать до класу дводольних рослин родини лободових (*Chenopodiaceae*). Рід *Beta* об'єднує 14 диких і один культурний вид. У процесі еволюції видів роду *Beta* L. утворились три природних групи видів – секцій:

I Sect. *Pattelares* Transch. – канарські (3 види);

II Sect. *Corollinae* Transch. – гірські (6 видів);

III Sect. *Vulgaris* Transch. – звичайні (6 видів).

До останньої секції належать відібраний і сформований людиною збірний вид *Beta vulgaris* L., який об'єднує підвиди:

1. *B. cicla* – буряк листовий з 3 групами різновидностей:

а) буряк листовий салатний – *convor vulgaris*;

б) буряк черешковий салатний – *convor petiolata*;

в) буряк гібридний черешковий декоративний – *convor varsocscla*.

2. *B. crassa* – буряк коренеплідний з 3 групами різновидностей:

а) буряк столовий – *convor cruenta*;

б) буряк кормовий – *convor crasca* ;

в) буряк цукровий – *convor ssaccharifera* з однонасінною формою *c.monosperma*.

За характерними ознаками різновидностей: кількість хромосом у соматичних клітинах (плоїдність), будову суплідь (плідність) і квітки (двостатеві або стерильні). З урахуванням цих ознак І.Я. Балков запропонував таку класифікацію буряка цукрового:

var. *digamonocra* m. – буряк цукровий диплоїдний ($2n = 18$) зрослоплідний, фертильний за пилом;

var. dihoricarpa m. – буряк цукровий диплоїдний ($2n = 18$) роздільноплідний, фертильний за пилком;

var. tetragamocarpa m. – буряк цукровий тетраплоїдний ($2n = 36$) зрослоплідний, фертильний за пилком;

var. tetracharicarpa m. – буряк цукровий тетраплоїдний ($2n = 36$) роздільноплідний, фертильний за пилком.

За оптимальних умов вегетації цикл індивідуального розвитку (період від проростання зародка до утворення нового насіння) відбувається протягом двох років.

Квітки в буряка двостатеві, розташовані групами по 2, 3, 4 і більше. Запилюються перехресно. Плід – горішок. Під час досягання плоди зростаються між собою, утворюючи супліддя – клубочок. Є форми, в яких плоди не зростаються (однонасінні). У кожному горішку міститься по одній насіниці, що знаходиться в здерев'янілому квітколожі.

Насіння буряка дрібне, бурого кольору. Складається з оболонки, перисперму і зачатка. Зачаток має дві добре розвинені сім'ядолі, підсім'ядольне коліно (гіпокотиль), зародковий корінь і бруньку.

Корінь у буряка цукрового – коренеплід білого кольору, конічної форми, який за нормальних умов важить 500–1000 г окремі корені досягають 5–10 кг.

На головці кореня, що за морфологічними ознаками є справжнім стеблом, розвиваються бруньки та листя, а на другий рік життя – суцвіття. На шийці зазвичай не буває ні листя, ні корінців. Справжній корінь характеризується тим, що на ньому з двох боків у повздовжніх борозенках розміщені корінці, які засвоюють з ґрунту поживні речовини та вологу. У коренеплоді накопичується цукор.

Листки розміщуються на головці спіралью, у вигляді розетки. Листки кольором від світло- до темно-зелених. Їх поверхня гладенька або гофрована.

У перший період вегетації більш інтенсивно росте листя, а в другій – коренеплід. Вже на початку серпня вага коренів і листя вирівнюється. У кінці серпня вага коренів більша за вагу листя, одночасно збільшується і відсоток цукристості коренеплодів.

У процесі індивідуального росту і розвитку буряка цукрового виділяють 12 етапів органогенезу в індивідуальному розвитку [37].

Відношення буряка цукрового до основних умов життя — вологи, тепла, світла, ґрунту, вмісту в ньому поживних речовин — визначається їх біологічними особливостями.

Насіння буряка цукрового активно проростає при середньодобовій температурі ґрунту $+6-8^{\circ}\text{C}$ на глибині 6–7 см. Найінтенсивніше фотосинтез буряка відбувається при $20-22^{\circ}\text{C}$. Необхідна сума активних температур у різних районах бурякосіяння становить $1800-3000^{\circ}\text{C}$. Буряк цукровий — рослина довгого дня, вимоглива до світла.

Цукристість значною мірою залежить від кількості сонячних днів у серпні – вересні. Необхідна для них сумарна сонячна радіація становить до 3 тис., а ФАР – 1,5–1,8 тис. МДж/м².

Буряк цукровий вимогливий до вологи і водночас є посухостійкою культурою. Для набубнявіння і проростання насіння необхідно води 150–170% від ваги клубочків. Транспіраційний коефіцієнт в середньому становить 397. Оптимальна вологість ґрунту для них 65–75% НВ.

Буряк цукровий вимогливий до вмісту в ґрунті поживних речовин. В середньому для утворення 1 т коренеплодів і відповідної кількості гички вони виносять з ґрунту 5–6 кг азоту, 1,5–2 кг фосфору, 6–7,5 калію. Для буряка цукрового найпридатніші структурні чорноземні суглинкові ґрунти з нейтральною або слабокислою реакцією ($\text{pH} = 6,5-7,5$). Буряк витривалий до засолення. Оптимальна щільність орного шару 1,0–1,2 г/см³ [38].

2.2 Характеристика донорного матеріалу, що використовується в досліді для отримання гаплоїдних структур

У досліді використовується біоматеріал наступних генотипі буряка цукрового:

- лінія ОТ 716 – закріплювач стерильності німецького походження. За схрещування з лініями ЧС–705, ЧС–1003 має 100 % закріплення стерильності. Відноситься до однонасінних типів. Середня урожайність – 49,3 т/га, цукристість – 18,5%, збір цукру – 9,12 т/га;

- лінія ОТ 130/5 – закріплювач стерильності уманського походження. Має високу закріплюючу здатність з лініями ЧС–2N, ЧС–35, ЧС–12. Вона дала початок О–типу і ЧС–формі гібриду Ювілейний. Вирізняється високим рівнем однонасінності. Має достатньо високу ЗКЗ. Урожайність – 46,4 т/га, цукристість – 17,7%, збір цукру – 8,21 т/га;

- лінія ОТ 130/8 – закріплювач стерильності українського походження (Умань). Має високу закріплюючу здатність. Вирізняється високим рівнем однонасінності. Має достатньо високу ЗКЗ. Урожайність – 45,3 т/га, цукристість – 18,3%, збір цукру – 8,29 т/га.

Високоцукристі тетраплоїдні форми буряка цукрового, частина яких стійка до збудників церкоспорозу:

- тетраплоїд, виділений з гібриду КВ Таня (гібрид німецької форми із високою ЗКЗ – 159 генотип;

- тетраплоїд, сербського походження 4п ММ65 СфрЮ – 237 генотип;

- тетраплоїдна форма А35N створена в Інституті молекулярної біології й генетики НАНУ шляхом переведення на тетраплоїдний рівень гібридів отриманих від схрещування кращих

інбредних ліній та наступним перезапиленням отриманих гібридів. Має високу загальну та специфічну комбінаційну здатність. Є батьківським компонентом гібридів Владівський ЧС 35, Рамгран, Авторитетний, Анічка.

РОЗДІЛ III

УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Умови вирощування донорного матеріалу

Донорні рослини вирощували на дослідній ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології.

Матеріал для проведення досліджень висаджували в квітні місяці за схемою 70×70. Знищення бур'янів та розпушування міжрядь проводили вручну.

Регулювання водного балансу забезпечували штчним поливом донорних зразків у вечірні часи доби. Оптимальний тургор клітин рослини є запорукою успішного введення матеріалу в культуру *in vitro*.

У липні місяці рослини розквітали і були донорами насіннєвих зачатків (експлатів) для введення в ізолювану культуру.

Грунтово-кліматичні умови регіону забезпечили отримання вихідного матеріалу для формування достатньої кількості квітоносних пагонів культури. Донорний матеріал вирізнявся типовістю, однорідністю та генетичною стабільністю.

Проведення цитологічного аналізу підтвердило плоїдність вихідного матеріалу зразків–донорів насіннєвих зачатків для введення в ізолювану культуру.

3.2 Схема досліду

У дослідженнях використовували шість селекційних номерів буряка цукрового. З кожного зразка брали три рослин, а з кожної рослини насіннєві зачатки для введення в ізолювану культуру брали три рази.

Експеримент вимагав три досліді з визначення оптимального живильного середовища для культивування насіннєвих зачатків з метою отримання гаплоїдних рослин. У двох дослідях вивчали вплив та співвідношення регуляторів росту (ауксинів, цитокінінів) на вихід макроструктур (дослід 1, 2). У третьому досліді вивчали вплив рівня плоідності донорного матеріалу на вихід гаплоїдних структур (дослід 3). Досліди проводилися у трьохразовій повторності.

Таблиця 3.1

Дослід 1. Вплив цитокініну (6–бензиламінопурину) на розвиток насіннєвих зачатків

№	Варіанти досліді	Повторності
1	MS+0,5мг/г 6–БАП +0,1 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3
2	MS+1,0мг/л 6–БАП +0,1 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3
3	MS+1,5мг/л 6–БАП +0,1 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3

Таблиця 3.2

Дослід 2. Вплив ауксину (2,4–дихлорфеноксиоцтової кислоти) на розвиток насіннєвих зачатків

№	Варіанти досліді	Повторності
1	MS+0,5мг/г 6–БАП +0,1 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3
2	MS+0,5мг/г 6–БАП +0,5 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3
3	MS+0,5мг/г 6–БАП +1,0 мг/л 2,4–Д	1
		2
		3

**Дослід 3. Вплив генотипу донорового матеріалу на вихід
макроструктур з насіннєвих зачатків**

№	Варіанти дослідів	Повторності
1	тетраплоїд А35N	1 2 3
2	тетраплоїд, 4п ММ65 СфрЮ – 237 генотип	1 2 3
3	тетраплоїд, виділений з гібриду КВ Таня – 159 генотип	1 2 3
4	лінія ОТ 716	1 2 3
5	лінія ОТ 130/5	1 2 3
6	лінія ОТ 130/8	1 2 3

3.3 Характеристика середовища

У досліді для одержання гаплоїдних рослин буряка цукрового незапліднені насіннєві зачатки висаджували на різні варіанти живильних середовищ. В основу живильного субстрату входили макро- і мікроелементи за прописами середовища Мурасіге – Скуга (табл. 3.5) [39].

Таблиця 3.5

Склад середовища Мурасіґа–Скуґа			
Компоненти середовища	Концентрація початкового (вихідного) розчину	Об'єм початкового розчину на 1л середовища, мл	Температура зберігання початкового розчину, °С
Основні неорганічні речовини: NH ₄ NO ₃ KNO ₃ CaCl ₂ * 2H ₂ O MgSO ₄ * 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	33000 38000 8800 7400 3400	50	+4
Джерела мікроелементів: Kl H ₃ BO ₃ MnSO ₄ * 4H ₂ O ZnSO ₄ * 7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O CuSO ₄ * 5H ₂ O CoCl ₂ * 6H ₂ O	166 1240 4460 1720 50 5 5	5	+4
Джерела заліза: FeSO ₄ * 7H ₂ O Na ₂ ЕДТА * 2H ₂ O	5560 7460	5	+4
Органічні речовини: Мезоінозит Нікотинова кислота Піридоксин – HCl Тіамін – HCl Гліцин	20000 100 100 100 400	5	–20 (по 5 мл)
Джерело вуглеводів: Сахароза	—	Додають у вигляді порошку 30г/л	

3.4. Методика проведення досліджень

За отримання гаплоїдних і дигаплоїдних матеріалів буряка цукрового в дослідженнях використовували метод ізольованих насінневих зачатків.

Вихідним матеріалом злугували генеративні квітоносні пагони, які, перед вичленуванням з них експлантів, поміщали в холодильник за температури +3–6 °С на 3–4 доби для попередньої холодової обробки біоматеріалу. Це стимулює початковий розвиток експланту в культурі *in vitro*.

Стерилізацію експлантів проводили 5,0 % розчином хлорного вапна за експозиції 15 хв з чотириразовим вимиванням дистильованою стерильною водою впродовж 10 хв.

Після стерилізації бутонів під ламінаром, з допомогою препаративної голки проводили вичленування насінневих зачатків і висаджували в пробірки на живильні середовища. Варіанти досліду відрізнялись за складом живильного субстрату, а саме концентраціями та співвідношеннями цитокінінів та ауксинів. Середовища стерилізували стандартним методом, розробленим Р.Г. Бутенко.

До формування макроструктур насінневі зачатки культивували в темновому термостаті за температури 16–18°C (14 діб), після чого температуру підвищували до 22–25 °С. Відносна вологість повітря – 75 %. Структури, що утворилися (калюс, проростки) пересаджувалися для регенерації, розмноження та укорінення. Калюс культивували в темнових умовах термостату за температури 23–25 °С, проростки – за температури 22–24 °С, з інтенсивністю освітлення 3–5 клк впродовж 16–годинного фотоперіоду і відносній вологості 75–80 %.

Плоїдність структур визначали за використання цитологічного аналізу, розробленого вченими лабораторії генетики і цитології Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. Він вимагає прямого підрахунку хромосом соматичних клітин біоматеріалу.

Ідентифікацію плідності проводили за використання давлених припаратів апікальної меристеми рослин, отриманих в ізольованій культурі.

Цитологічний аналіз проводили за використання мікроскопу МБІ.

Статистичний аналіз даних проводили за використання комп'ютерних програм.

РОЗДІЛ IV

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Підбір живильного середовища для культивування незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового

Головною умовою успішної регенерації рослин буряка цукрового з незапліднених насіннєвих зачатків є оптимальний підбір концентрацій і співвідношення компонентів живильного середовища.

Для кожної культури, експланта, кінцевій меті роботи (калюсна культура, суспензійна культура, пряма регенерація, органогенез калюсу, культивування апікальних меристем, мікроклональне розмноження, укорінення і т.д.) необхідний свій специфічний склад живильного середовища, який впливає на розвиток і темп наростання вихідного матеріалу.

Всі компоненти живильного субстрату, які необхідні для розвитку експланта, можна розділити на шість груп:

- основні неорганічні поживні речовини (макроелементи);
- мікроелементи;
- джерело заліза;
- органічні доповнення (амінокислоти, вітаміни);
- регулятори росту рослин;
- джерело вуглеводів.

Середовища, розроблені Мурасіге і Скугом (MS) та Гамборгом (B5) – це найбільш вживані середовища, що використовуються, як основа при роботі з культурою тканин рослин [40, 41]. У процесі досліджень підбирають різні концентрації і співвідношення ростактивуючих

речовин. На даний час описано багато різних модифікованих складів середовищ.

Для отримання гаплоїдних рослин буряка цукрового Зубенко, Білоус, Ільєнко висаджували незапліднені насіннєві зачатки на модифіковане середовище Гамборга при додаванні 1,0 мг/л нафтилоцтової кислоти, 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину, 2,5 мг/л тіаміну, 100 мг/л мезоінозиту та 30 г/л сахарози. У результаті, в середньому за генотипами, вихід гаплоїдів склав 2,02% від загальної кількості висаджених насіннєбруньок.

Французькі дослідники в основу живильного субстрату для отримання гаплоїдних проростків з насіннєвих зачатків включали макро- і мікроелементи середовища Мурасіге і Скуга. Було опрацьовано кілька середовищ з різними концентраціями і співвідношеннями ауксинів і цитокінінів. Кращі результати (6,6% гаплоїдів) отримали при додаванні 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти, 0,2 мг/л 6-бензиламінопурину, або 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти та 0,2 мг/л кінетину.

У дослідженнях низки вчених відмічається можливість отримання гаплоїдних рослин буряка з незапліднених ізольованих насіннєвих зачатків при вирощуванні на середовищі Гамборга з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л дефоліанту “Дроп”. При цьому відмічається значення температурного фактора. Оптимальний температурний режим у досліді для культивування насіннєвих зачатків 10–12°C. Відсоток утворення проростків коливався у залежності від генотипу від 0,5 до 26,8%.

Проте у цих роботах немає повної характеристики живильного середовища. Співвідношення і концентрація окремих компонентів лишаються невідомими. До того ж, різні генотипи по різному реагують на один і той же склад середовища. Як правило, працюючи з прописами опублікованих живильних середовищ, ми не завжди отримуємо позитивний результат. А тому перед нами постало питання підбору живильного

субстрату для культивування насіннєвих зачатків та отримання гаплоїдного матеріалу буряка цукрового необхідних нам генотипів.

4.2. Вплив регуляторів росту на вихід гаплоїдних рослин буряка цукрового

Для росту і розвитку тканин буряка у культурі *in vitro* необхідна присутність у середовищі регуляторів росту.

Встановлено, що 6-бензиламінопурин (група цитокінінів) не лише активізує поділ клітин, але і є обов'язковим компонентом середовища для індукції органогенезу.

Окрім того, 6-БАП проявляє високу активність у підтриманні росту тканин та індукуванні морфогенезу. Він в 100 разів активніший, ніж кінетин і може бути використаний у більш широких межах концентрацій.

У дослідях Гамбурга доведено, що в підтриманні росту ізолюваних культур 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (група ауксинів) у 300 разів активніша за ІОК і в 270 разів за НОК.

Виходячи з цього, в наших дослідженнях варіанти середовищ вирізнялися вмістом у середовищі 6-бензиламінопурину та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (табл.4.1), а в основу живильного субстрату входили макро- і мікроелементи середовища за Мурасіге і Скугом (MS). У середовище також додавали 1,0 мг/л вітамінів за Уайтом, 0,1 мг/л гіберелової кислоти, 100 мг/л мезоінозиту та 30 г/л сахарози.

Проведені дослідження показали вплив компонентів живильного середовища 6-БАП та 2,4-Д на вихід макроструктур при культивуванні незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового. Співвідношення цитокінінів і ауксинів у середовищі, їх концентрація впливає на пряму індукцію утворення проростків з експлантів. У процесі дослідження було

встановлено, що збільшення концентрації цитокініну в середовищі від 0,5 мг/л до 1,0 мг/л підвищує вихід проростків, але зменшує вихід калюсної маси.

Таблиця 4.1

Вплив 6-БАП на розвиток насінневих зачатків буряка цукрового

Варіанти дослідів	Повторності	Кількість висаджених насіннєвих зачатків	Кількість отриманих структур					
			Всього		Калюс		Проростки	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
1. MS + 0,5мг/л 6-БАП; 0,1 мг/л 2,4-Д	1	250	25	10,0	23	9,1	2	0,9
	2	205	21	10,2	20	9,7	1	0,5
	3	175	19	11,0	17	9,7	2	1,3
	x	210	22	10,4	20	9,5	2	0,9
	Σ	630	65	10,3	60	9,5	5	0,9
2. MS + 1,0 мг/л 6-БАП; 0,1 мг/л 2,4-Д	1	225	6	2,7	3	1,3	3	1,3
	2	168	2	1,2	1	0,6	1	0,6
	3	147	6	4,0	2	1,5	4	2,5
	x	180	5	2,7	2	1,1*	3	1,6*
	Σ	540	14	2,6	6	1,1*	8	1,5*
3. MS + 1,5 мг/л 6-БАП; 0,1 мг/л 2,4-Д	1	370	5	1,4	—	—	5	1,4
	2	356	3	0,9	—	—	3	0,9
	3	300	6	1,9	—	—	6	1,9
	X	342	5	1,4*	—	—	5	1,4*
	Σ	1226	14	1,4*	—	—	14	1,4*

x – в середньому за повторностями

Σ – загальна кількість за повторностями

*– достовірно при P = 0,01

Більш високі концентрації 6-БАП інгібують процес органогенезу. Робочим діапазоном концентрації цитокініну, що стимулює розвиток

насіннєвих зачатків у проростки, слугує діапазон 0,5–1,0 мг/л. При даних концентраціях ріст-активуючої речовини в середовищі вихід проростків збільшується від 0,9% до 1,6% (в середньому за генотипами). Нижчі концентрації 6-БАП істотно не впливають на утворення і розвиток макроструктур.

Візуально, результати представлені графічно на рис. 4.1, де показано, що залежність виходу проростків з насіннєвих зачатків від вмісту в живильному середовищі 6-БАП в діапазоні концентрацій 0,5–1,5 мг/л задається кривою, яка описується рівнянням параболи з максимумом в точці 1,0 мг/л. При підвищенні в середовищі цитокініну, вихід калюсу достовірно знижується (рис.4.1).

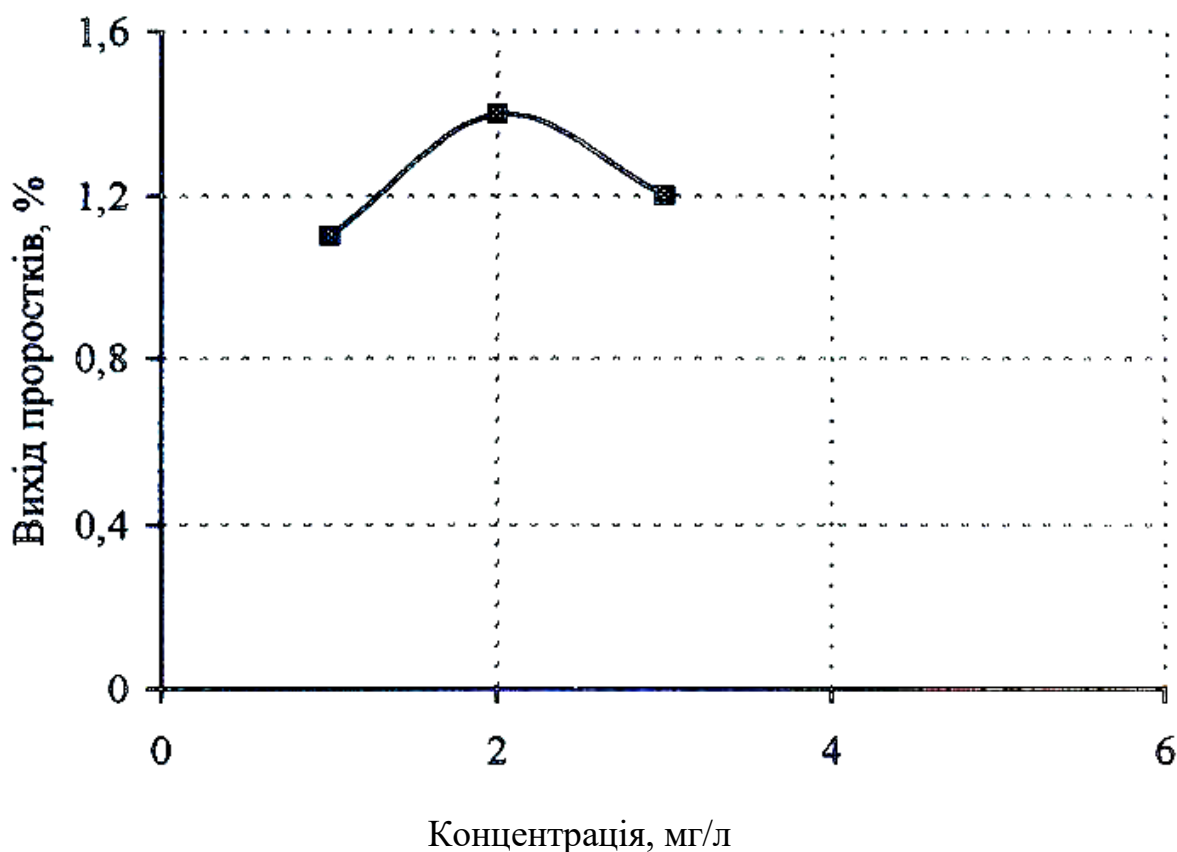


Рис. 4.1 Вихід проростків, отриманих у процесі культивування незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового на живильних середовищах, залежно від концентрації 6-БАП у субстраті

У проведених дослідах вміст 2,4-Д у живильному середовищі коливався від 0,1мг/л до 1,0 мг/л (табл. 4.2).

Встановлено, що в цьому інтервалі концентрацій вплив ауксину на утворення проростків негативний. При збільшенні вмісту 2,4-Д у середовищі вихід проростків знижується до 0 (рис.4.2).

Таблиця 4.2

Вплив 2,4-Д на розвиток насіннєвих зачатків буряка цукрового

Варіанти дослідів	Повторності	Кількість висаджених насіннєвих зачатків	Кількість отриманих структур					
			всього		калюс		проростки	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
1.MS+ 0,5мг/л 6-БАП; 0,1 мг/л 2,4-Д	1	500	58	11,6	4	10,8	4	0,8
	2	615	51	8,3	47	7,6	4	0,7
	3	601	73	12,2	6	11,0	7	1,2
	x	572	61	10,7	6	9,8	5	0,9
	Σ	1716	182	10,6	167	9,7	5	0,9
2.MS+0,5 мг/л 6-БАП; 0,5 мг/л 2,4-Д	1	540	139	25,8	38	25,6	1	0,2
	2	589	118	20,0	18	20,0	—	—
	3	500	176	35,2	74	34,8	2	0,4
	x	543	144	26,5*	43	26,3*	1	0,2*
	Σ	1629	433	26,6*	430	26,4*	3	0,2*
3.MS+0,5 мг/л 6-БАП; 1,0 мг/л 2,4-Д	1	620	268	43,2	268	43,2	—	—
	2	754	292	38,8	92	38,8	—	—
	3	705	356	47,6	56	47,6	—	—
	x	693	293	43,2*	93	43,2*	—	—
	Σ	2079	916	44,1*	16	44,1*	—	—

x – в середньому за повторностями

Σ – загальна кількість за повторностями

* – достовірно при $P = 0,01$

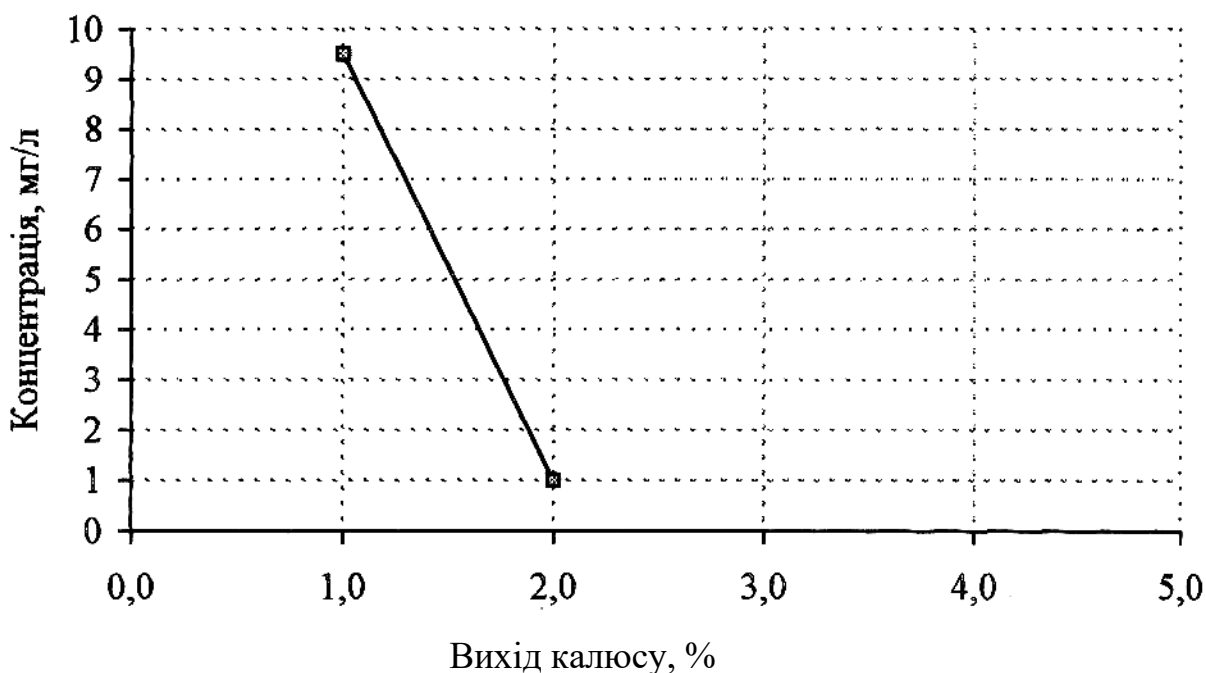


Рис. 4.2 Вихід калюсу, отриманого в процесі культивування незапліднених насінневих зачатків буряка цукрового на живильних середовищах, в залежності від концентрації 6-БАП в субстраті

Проведений аналіз показав, що для індукції розвитку насінневих зачатків в проростки, оптимальним варіантом середовища є середовище, яке містить 0,1 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л 6-БАП.

Отже, використовуючи модифіковане середовище для культивування насінневих зачатків (в даному випадку середовище MS), змінюючи концентрації та типи регуляторів росту, можна визначити шлях розвитку експланту в культурі *in vitro*. Середовища, що містять високі концентрації ауксинів, сприяють формуванню калюсу. Введення цитокінінів в однаковому співвідношенні з ауксинами також сприяє формуванню калюсної тканини. Лише зниження концентрації ауксинів і підвищення вмісту цитокінінів стимулює індукцію утворення проростків з насінневих зачатків буряка цукрового.

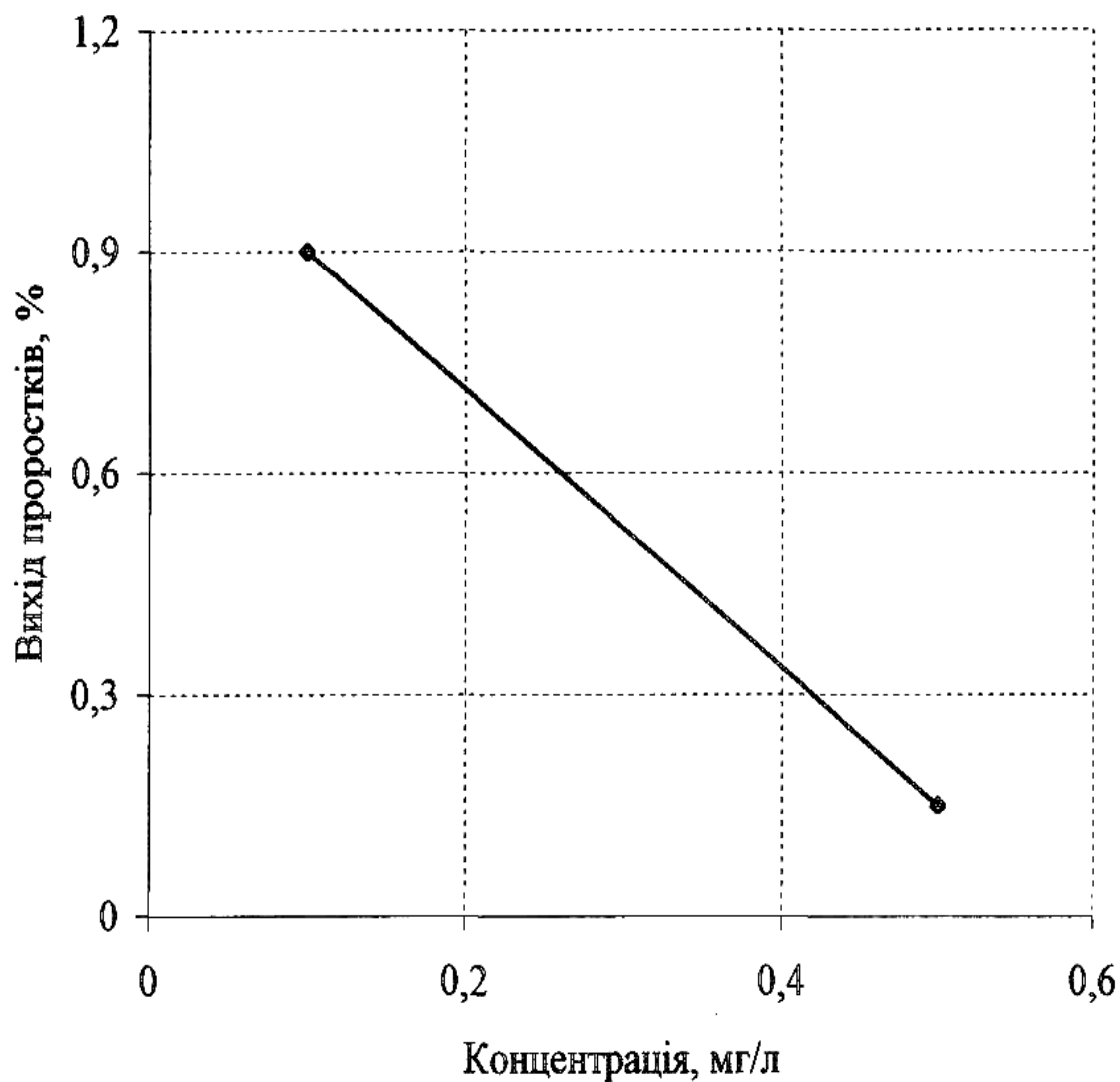


Рис. 4.3 Вихід проростків отриманих у процесі культивування незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового на живильних середовищах, залежно від концентрації 2,4-Д в середовищі

Присутність у живильному субстраті 2,4-Д в діапазоні концентрацій 0,1–1,0 мг/л стимулює калюсогенез. Це описується прямопропорційною залежністю (рис. 4.3) При збільшенні концентрації ауксину від 0,1 до 1,0 мг/л достовірно збільшується вихід калюсу з насіннєвих зачатків від 9,8 до 43,2%

(в середньому за генотипами). Ймовірно, оптимум концентрації 2,4-Д для калюсогенезу лежить вище значень, що аналізуються.

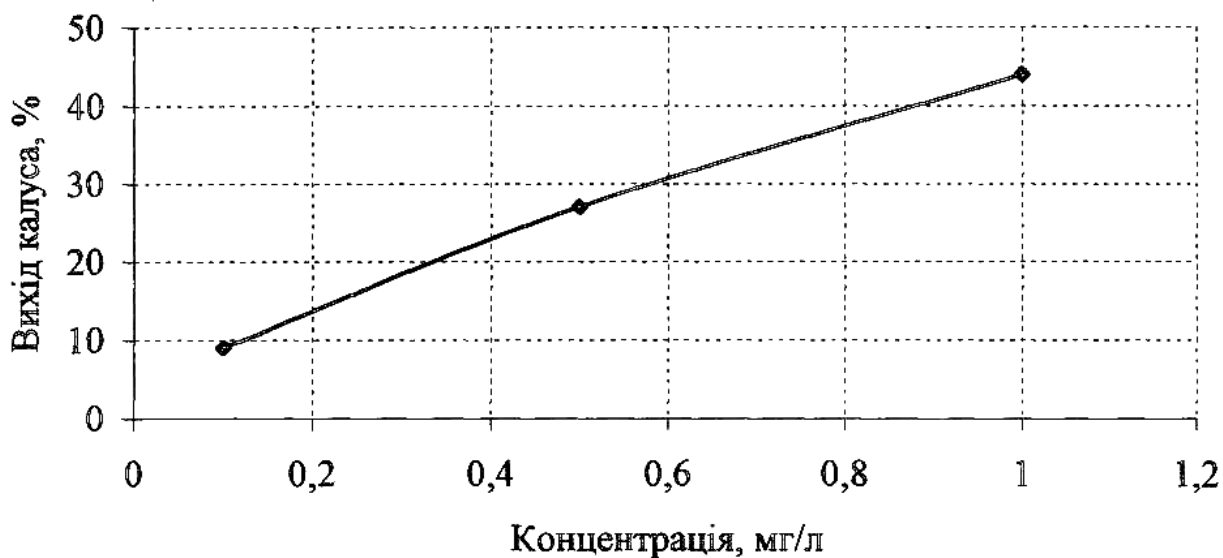


Рис. 4.4 Вихід калюсу отриманого в процесі культивування незапліднених насінневих зачатків буряка цукрового на живильних середовищах, залежно від концентрації 2,4-Д в середовищі

Слід також відмітити значення мезоінозиту в середовищі. За даними літератури, його присутність у живильному субстраті підвищує відсотковий вихід макроструктур. Концентрація даного елемента в нашому середовищі складала 100 мг/л, хоча вивчалися середовища з концентраціями мезоінозиту 75, 100, 125 мг/л. Проте в діапазоні, що вивчався, речовина істотно не впливала на регенерацію проростків, або калюсу з насінневих зачатків. Вищий вміст мезоінозиту в поживному середовищі не вивчався.

В якості джерела вуглецю в наших експериментах використовувалася сахароза. У більшості середовищ цей вуглевод застосовується в концентраціях 20–40 г/л. Дослідження з вивчення вмісту вуглеводів для окремих видів тканин проводив Готре. Встановлено, що для більшості тканин найкращим джерелом вуглецю є саме сахароза. Її присутність в середовищі,

як і іншого вуглеводу, також впливає на осмотичний тиск, що пов'язано з інтенсивністю росту і розвитку вихідного матеріалу.

У наших дослідженнях використовувалися в середовищах різні концентрації сахарози (20, 30, 40 г/л). Візуальні спостереження показали, що кращим варіантом був варіант з вмістом сахарози 30 г/л. У даному випадку спостерігався більш швидкий розвиток проростків, отриманих у процесі культивування незапліднених насіннєвих зачатків.

В якості гелеутворюючої речовини для приготування середовища використовували агар-агар, його вміст у живильному субстраті складав 8,0%. Кислотність середовища підтримувалась у межах рН 5,8.

Підібране модифіковане середовище було апробоване на польовому і тепличному матеріалі і забезпечило отримання гаплоїдних рослин буряка цукрового різних генотипів.

Отже, проведений аналіз показав, що для регенерації рослин буряка цукрового з незапліднених насіннєвих зачатків може використовуватися модифіковане агаризоване середовище наступного складу: макро- і мікроелементи за Мурасіге – Скугу, 5 мг/л Fe-хелат, 1,0 мг/л вітамінів за Уайтом, 1,0 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л гіберелової кислоти, 100 мг/л мезоінозиту, 30 г/л сахарози та 8 г/л агар-агару; рН середовища 5,8.

4.3. Вплив генотипу донорного матеріалу на вихід, ріст і розвиток макроструктур з незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового

Для розвитку насіннєвих зачатків в ізольованій культурі велике значення має склад живильного середовища, умови культивування, генотип рослин–донора експлантів.

У наших дослідженнях вивчали вплив генотипу донорного матеріалу на вихід, ріст і розвиток макроструктур з насіннєвих зачатків, при використанні

ідентичних середовищ і умов культивування. Донорами насінневих зачатків слугували диплоїдні і тетраплоїдні форми буряка цукрового.

У процесі культивування незапліднених насінневих зачатків різних селекційних номерів буряка цукрового було отримано проростки і калюсну масу. Загалом на живильні середовища було висаджено 3330 насінневих зачатків (табл. 4.5).

Таблиця 4.3

Вихід гаплоїдних матеріалів при культивуванні насінневих зачатків різних генотипів буряка цукрового у культу *in vitro*

№ п/п	Селекційний матеріал буряка цукрового	Кільсть висаджених насінневих зачатків, шт	Отримано гаплоїдних структур	
			Всього, %	Проростки, %
1	лінія Т-237	740	6,4±0,3	3,8±0,3
2	лінія Т-159	670	12,7±1,1	5,1±0,6
3	лінія А35N	690	17,2±1,9	0,0
4	лінія О-тип 130/8	420	0,0	0,0
5	лінія О-тип 130/5	490	0,0	0,0
6	лінія О-тип 716	320	3,4±0,5	2,4±0,9
х – за генотипами		555	6,7±0,4	1,9±0,3

Експланти ліній О-тип 130/8 та О-тип 130/5 не утворювали структури. З насінневих зачатків лінії О-тип 716 було отримано 3,4±0,5 % гаплоїдних структур і 2,4±0,9 % проростків. При культивуванні тетраплоїдів Т-237 та Т-159 вихід гаплоїдних структур та проростків складав відповідно 6,4±0,3 % і 3,8±0,3 % та 12,7±1,1 % і 5,1±0,6 %. Кращі результати було отримано при культивуванні селекційного матеріалу

A34N. Але даний генотип після перенесення утворених калюсних структур на середовища для регенерації не формував рослин-регенерантів.

Отже, в процесі досліджень встановлено, що високий вихід макроструктур спостерігається з експлантів виділених з тетраплоїдних форм буряка цукрового, нижчий – з насіннєвих зачатків диплоїдних форм. Індукція формування проростків та органогенного калюсом тканини є генетично обумовленим фактор.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1 Охорона праці та моделювання виробничих небезпек за селекційного процесу

Охорона праці – це комплекс законодавчих актів, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і профілактичних заходів спрямованих на облаштування безпечних умов праці для людини [42].

Трудове законодавство ґрунтується на законодавчих актах, зокрема, Конституції України, Законом України «Про охорону праці» і Кодексом закону про працю.

За сучасних умовах вирощування сільськогосподарських культур застосовують новітні інтенсивні технології, що передбачають багатопланові технологічні операції за використання різноманітної техніки. Це потребує суворого виконання всіх вимог безпеки праці за виконання технологічних процесів.

У процесі діяльності, людина, при застосування необхідних знарядь (інструментів, машини, комбайни тощо) впливає на предмет праці за умов виробничого середовища. Залежно від виробничого процесу на людину можуть впливати різні небезпеки і шкідливі чинники і ситуації.

Перед початком всіх операцій і виконання робіт з вирощування пшениці, фахівцям необхідно проаналізувати ймовірні небезпеки, що можуть виникнути в результаті виробничого процесу та провести організаційні заходи із запобігання їх виникнення.

Умови, за яких існує ймовірність впливу на людину небезпечного чинника, можна назвати небезпечними умовами (НУ), а дії людини, що не відповідають професійним нормам поведінки, – небезпечними діями (НД).

Здійснюючи такі дії (НД), фахівець перебуває в обставинах: мети, причин, часу, місця та способу дії. Випадкове поєднання у певний момент часу небезпечних умов і небезпечних обставин створює можливість отримання випадкової події – тобто небезпечної ситуації (НС). Після небезпечної ситуації з високим рівнем ймовірності виникають аварії (А) та/або травми (Т).

Небезпечні умови (НУ) – умови загрози дії виробничих небезпечних факторів на людський організм.

Небезпечна дія (НД) – дія, з ймовірністю впливу на людський організм виробничого небезпечного чинника.

Аварія (А) – вихід із ладу чи пошкодження обладнання, що створює небезпеку для життя і здоров'я людей або забруднення навколишнього природного середовища.

Травма (Т) – ушкодження людського організму небезпечним фактором, а сукупність травм, які часто мають місце на виробництві, називається травматизмом [3].

Цей процес можна представити наступним чином:

$$\text{НУ} \text{ --- } > \text{НС} \text{ --- } > \text{А чи Т};$$
$$\text{НД} \text{ --- } > \text{НС} \text{ --- } > \text{А чи Т};$$
$$\text{Н У} \text{ --- } > \text{НД} \text{ --- } > \text{НС} \text{ --- } > \text{А чи Т}.$$

За сукупності низки небезпечних умов (НУ₁, НУ₂, НУ₃...) і небезпечних дій (НД₁, НД₂, НД₃ ...) може створитися небезпечна ситуація (НС):

$$\text{НС} = \text{НУ}_1 + \text{НУ}_2 + \text{НУ}_3 + \text{НД}_1 + \text{НД}_2 + \text{НД}_3$$

Приклад небезпечної ситуації, що може мати місце в біотехнологічній лабораторії:

небезпечна умова (НУ) – високий температурний режим повітря;

небезпечна дія (НД) – проведення посівних робіт на сівалці;
небезпечна ситуація (НС) – робота з хімічними речовинами за посіву культури;
отруєння (О) – отруєння випарами шкідливих хімічних препаратів.

Схема наведеного випадку:

Н У --- > Н Д --- > Н С --- > О

Отже, для створення безпечних умов праці необхідно:

- проводити первинний і повторний інструктажі з охорони праці;
- для працюючих на полі облаштовувати вагончики і спеціально визначені місця відпочинку. Створювати умови для періодичного відпочинку;
- проводити контроль із забезпечення працівників спецодягом та засобами індивідуального захисту;
- рекомендувати працівникам раз на рік проходити медогляд;
- дотримуватися санітарно-гігієнічних норм праці;
- проводити постійний контроль за дотриманням положень з охорони праці та техніки безпеки.

5.2 Охорона навколишнього природного середовища за використання інтенсивних технологій вирощування буряка цукрового

Політика України щодо екології спрямована на збереження неживої та живої природи та навколишнього середовища, захист життя і здоров'я населення від негативної дії, зумовленої забрудненням природного середовища, збалансування гармонійної взаємодії природного чинника і суспільства на раціоналізацію охорони, використання та відтворення природних ресурсів [43, 44].

Закон України «Про охорону навколишнього природного середовища» затверджує правові, економічні й соціальні основи збереження навколишнього природного середовища нинішньому і майбутньому поколінню.

Збільшення виробництва цукру є одним з основних питань на вирішення АПК України. У його вирішенні визначна роль відводиться буряку цукровому – основній технічній культурі. В екологічно чистій сировині мають потребу харчова промисловість, тваринництво, птахівництво, мікробіологічна, медична та інші галузі виробництва. Інтенсивні технології, що дозволяють отримувати високі врожаї культури поєднує окрім інших агротехнічні, біологічні та хімічні засоби захисту від бур'янів, шкідників і хвороб. Проте зростаючі потреби людства в продовольстві змусили ще за екстенсивного ведення господарства отримати розораність угідь в Україні до найвищих у світі 80–96 %, що зазвичай, є одним із основних чинників загальної екологічної кризи та ерозії ґрунтів. В Україні понад 10,0 млн. га орних земель непридатних із-за водної, та 5,0 млн. га – за вітрової ерозії. Процеси ерозій набули катастрофічних масштабів. Щорічні втрати ґрунту становлять біля 500 млн. т, зокрема, близько 20 млн.т гумусу, з якими виноситься половина внесених азотних і третина фосфорних добрив.

У результаті таких руйнувань родючі ґрунти втрачають агрономічну цінну будову та структуру.

Недоліком інтенсивної технології вирощування буряку цукрового є те, що інтенсифікація досягається за технічного переобтяження, застосування підвищених норм мінеральних добрив та значної кількості пестицидів. Ці технології необхідно зорієнтувати на використання біологічних і природних чинників інтенсифікації в результаті чого інтенсивні технології безпосередньо не матимуть негативного впливу на екологію і насамперед на ґрунт.

За інтенсифікації землеробства може забруднюватись ґрунт залишками добрив, гербіцидів, отрутохімікатів тощо. Токсичні речовини у ґрунті можуть накопичуватись у продовольстві, кормах і ґрунтових водах.

Для удосконалення інтенсивних систем вирощування необхідно використовувати інтегровані системи та захист рослин. Зокрема, на посівах застосовувати біологічні методи боротьби з хворобами і шкідниками. Пестициди використовувати лише в екстремальних ситуаціях, коли загроза посівам є на межі економічних порогів шкодочинності та/або перевищує їх. Для цього необхідно покращити методику прогнозування і підвищити її рівень достовірності. Норми пестицидів необхідно регламентувати за їх внесення та в готовій продукції.

Отже, використання інтенсивної технології за вирощування буряку цукрового повинно забезпечувати не лише отримання високих врожаїв та екологічно чистої продукції, а й не погіршувати екологічну ситуацію природного навколишнього середовища. Для цього необхідно використовувати технології мінімізації обробітку ґрунту, застосовувати комбіновані агрегати, впроваджувати високопроцентні мінеральні добрива та високоефективні низько токсичні пестициди з мінімальним періодом розпаду, впроваджувати елементи біологізації технологічного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Найпростішим шляхом отримання «чистих ліній» буряка цукрового є подвоєння кількості хромосом у гаплоїдів, а найрезультативнішим шляхом отримання останніх — культивування *in vitro* незапліднених насіннєвих зачатків. Головною умовою успішної регенерації рослин буряка цукрового з незапліднених насіннєвих зачатків є правильний підбір концентрацій і співвідношення компонентів живильного середовища.

2. У результаті проведених досліджень встановлено, що для регенерації рослин буряка цукрового з незапліднених насіннєвих зачатків доцільно використовувати модифіковане живильне середовище наступного складу: макро- і мікроелементи за Мурасіге – Скугом, 5,0 мг/л Fe–хелат, 1,0 мг/л вітамінів за Уайтом, 1,0 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л гіберелової кислоти, 100,0 мг/л мезоінозиту, 30,0 г/л сахарози та 8,0 г/л агар–агару; рН середовища 5,8.

3. Доведено, що збільшення концентрації цитокініну в середовищі від 0,5 мг/л до 1,0 мг/л підвищує вихід проростків, але зменшує вихід калюсної маси.

4. Для морфогенезу калюсу різних генотипів буряка цукрового є модифіковане середовище Мурасіге і Скуга при додаванні 1,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кінетину, 0,2 мг/л α-НОК, 1,0 мг/л вітамінів за Уайтом та 3% сахарози. Відсоток регенерації в середньому за генотипами, складав 22,4%.

5. Підтверджено, що вихід макроструктур з насіннєвих зачатків та утворення проростків і органогенного калюсу генетично обумовлений фактор.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Васильківський С. П., Кочмарський В. С. Селекція і насінництво польових культур: підручник. Біла Церква, 2016. 376 с.
2. Чугункова Т. В., Парій Ф. М., Дубровна О. В., Лялько І. І. Генетичні і цитогенетичні основи гетерозису у рослин. Київ: Логос, 2006. 260 с.
3. Яценко А. О., Небиков М. В., Ещенко О. В. Буряки з пробірки. Буряки цукрові, 2002 . № 6. С.17.
4. Ніцше В., Венцель Г. Гаплоїди в селекції рослин. Київ. 1980. 128 с.
5. Хохлов С. С. Класифікація гаплоїдів. Гаплоїдія і селекція. Київ 1976. С. 78.
6. Chase S. S. Bruding diploid spesies. Jn.: Kasha K. J. Haploids in higer plants. Univers. Gnelph. 1974. P. 211–230.
7. Kihara H. Formation of haploids by means of delayed pollination in *Triticum monococcum*. Bot Mag. Tokyo. 1940. № 54. P. 178–185.
8. Редько В. І., Іщенко І. І. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженню буряка цукрового. ІЦБК: 1997. С. 12.
9. Kihara H., Katayama J. Uber das Vorcomen von haploiden Pflanzen bci *Triticum monococcum*. Kwagaku, 1932. № 2. S. 408–410.
10. Seaney R. R. Studies on morpology in maise. Doctor diss. Connell Univ., 1955.
11. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
12. Deanon J. R. Greatnient of sweet corn sillks with maleic hydrozide and cochieine as a means of increasing the frequency of monoploids. Philipp. Agr. 1997. № 41. P. 364–377.

13. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv.* 2015. 33. P. 812–829.
14. Kiszczak W, Burian M, Kowalska U, Górecka K, Podwyszyńska M. Production of Homozygous Red Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) Plants by Ovule Culture. *Methods Mol Biol.* 2021. P. 301–312.
15. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2003. С. 223–240.
16. Haberlan A. Studies of a haploid plant. “*Hereditas*”. 1939. № 25. P. 204–210.
17. White F. R. The cultivation of animal and plant cells. New York. 1954. 239 p.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. V. 15, № 3. P. 473–497.
19. Blakeslee A., Berger F., Belling J. Mutation in haploid *Datura*. *Heredity*, 1927. P. 193–199.
20. Niizeki H., Oono K. Rice plant obtained by anther culture. II-nd Intern. Confer. Plant Tissue Cultures. Strasbourg, 1970. P. 243–245.
21. Sheng H., Gao P., Yang C., Quilichini T. D., Kochian L. V., Datla R., Xiang D. Advances in Genome Editing Through Haploid Induction Systems. *Int J Mol Sci.* 2025. 26(10). P. 4779.
22. Белоус В. Є., Ільєнко І. І., Редько В. І., Бабяж І. А., Чемерис Л. Н., Олейник Н. А. Використання методів культури ізольованих насіннєвих зачатків і зародків для отримання гаплоїдів цукрових буряків. Київ: ВНИС, 1998. С. 140–148.
23. Рябовол Л. О., Парій Ф. М. Вплив рівня плідності донорного матеріалу цукрових буряків на вихід, ріст і розвиток

- макроструктур з насіннєвих зачатків. Збірник наукових праць «Вісник примор'я». Одеса, 2002. С. 28–31.
24. Levan A. Ahaploid sugar beet after colchicine theatment. «Hereditas». 1945. № 31. P. 399–410.
 25. Рябовол Л. О. Стимуляція гаплоїдії буряка цукрового при використанні біотехнологічних методів. Збірник наукових праць присвячений сторіччю з Дня народження С. С. Рубіна. Умань.: УДАУ, 2000. С. 210–213.
 26. Bosemark N. O., Yuce S. Haploids and hornozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. “Hereditas”. 1971. № 69. P. 193–204.
 27. Лялько І. І., Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Шевцов І. А. Характер спадковості нових маркерних ознак цукрового буряку. Доповіді НАН України. 1999. № 3. С. 201–205.
 28. Славова І. В. Ускорено розмноження на захарно цвекла. Физиология и растения, 1980. Т. 4. № 1. С. 35–39.
 29. Рябовол Л. О., Манько А. С. Вплив генотипу на вихід гаплоїдних матеріалів буряка цукрового. Збірник наукових праць присвячених сторіччю з Дня народження С. С. Рубіна. Умань: УДАУ. 2000. С. 207–209.
 30. Lv J., Kelliher T. Recent Advances in Engineering of In Vivo Haploid Induction Systems. Methods Mol Biol. 2023. P. 365–383.
 31. Круглова Н. М., Дубровна О. В. Морфогенез андроклінних калюсів злаків *in vitro*. Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2011. Т. 43, № 1. С. 15–26.
 32. Білинська О. В., Дульнев П. Г. Особливості морфогенезу в культурі *in vitro* пиляків ярого ячменю на поживних середовищах з хімічно модифікованими крохмаллями. Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2012. Т. 44, № 1. С. 440–449.
 33. Льошина Л. Г., Булко О. В. Культивування *in vitro*, ростові параметри та оцінювання здатності до глікозидів культури клітин *Digitalis purpurea* L. Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2011. Т. 43, № 1. С. 164–171.

34. Кунах В. А. Механізми та деякі закономірності соматональної мінливості рослин. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2003. № 1. С. 101–106.
35. Gurel S, Pazuki A, Aflaki F, Gurel E. Production of Doubled Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plants Through Gynogenesis. Methods Mol Biol. 2021;2289. P. 313–323.
36. Рябовол Л. О. Стимуляція гаплоїдії буряка цукрового при опиленні донорних рослин пилом *Beta wibbiana* L. Збірник наукових праць УДАУ. 2009. Вип. 70. Ч. 1. С. 127–133.
37. Присяжнюк О. І., Присяжнюк Л. М., Мельник С. І., Гринів С. М. Буряки цукрові – селекція, насінництво та технологія вирощування: монографія. Вінниця: ТОВ «ТВОРИ», 2022. 310 с.
38. Губенко В. Ф., Бориско В. А., Марковецький К. А. Довідник буряководи. Київ: Урожай, 1999. 240 с.
39. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с.
40. Рябовол Л. О. Стимуляція розвитку генеративних пагонів рослин цикорію коренеплідного в культурі *in vitro*. Методичні рекомендації. Умань: УДАУ, 2007. 21 с.
41. Квасько О. Ю., Матвєєва Н. А. Вплив складу поживного середовища на коренеутворення рослин *Cidorium intybus* L. та *C. endiviqa* L. *in vitro*./ Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2012. Т. 44, № 3. С. 248–254.
42. Гадзюк М. П., Жлібо Е. П., Халімовський М. О. Основи охорони праці : Підручник для студентів вищих навчальних закладів / за редакцією М. П. Гадзюка. Київ: Каровська, 2003. 408 с.

43. Мороз П. І., Косенко І. С. Економічні основи природокористування / за редакцією П. І. Мороза: Навчальний посібник, Умань. УДАА, 2001. 456 с.
44. Екологічні основи збалансованого природокористування у агросфері : навчальний посібник / за ред. С. П. Сонька та Н. В. Максименко. Харків: ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2015. 568 с.