

**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

**ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДНОГО І ГОМОДИПЛОЇДНОГО МАТЕРІАЛУ
БУРЯКА ЦУКРОВОГО ЗА ВИКОРИСТАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ**

Виконав: студент ІІ курсу, групи 21 м-з-а
Спеціальності 201 «Агрономія»
СОБКО Артем Олександрович

Керівник – Рябовол Л. О.

Умань – 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ З ГАПЛОЇДІЇ (огляд літератури).....	
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
2.1. Походження буряка цукрового.....	
2.2. Класифікація буряка.....	
2.3. Ботанічна і біологічна характеристика буряка цукрового	
2.4. Характеристика донорного матеріалу.....	
РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	
3.1 Умови вирощування донорного матеріалу.....	
3.2 Схема досліду.....	
3.3 Характеристика середовища для культивування насіннєвих зачатків.....	
3.4. Методика проведення досліду.....	
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
4.1 Стимуляція отримання гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового при затриманні обпилення.....	
4.2 Стимуляція отримання гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового при опиленні донорного матеріалу опроміненим пилком.....	
4.3. Морфологічна характеристика структур.....	
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.	
5.1 Моделювання виробничих небезпек за біотехнологічного процесу	
5.2 Охорона навколишнього середовища при перенесені матеріалів, отриманих біотехнологічними методами,	

в ґрунтові умови вирощування.....

ВИСНОВКИ.....

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ВСТУП

Буряк цукровий вирощують для одержання коренеплодів, які є сировиною для цукрової промисловості. Із ста кілограмів коренеплодів одержують 12–15 кг. цукру, 80 кг. жому і 4–6 кг меляси. Відходи цукрового виробництва і гичку буряка цукрового використовують для годівлі тварин.

Буряк цукровий – одна з найбільш продуктивних сільськогосподарських культур нашої зони, 1 га буряка цукрового дає 100 ц сухої речовини. В Україні площі вирощування культури щорічно зростають. Валові збори коренеплодів складають понад 20 млн. т. за врожайності 25–45 т/га. Виробництво цукру поступово збільшується [1]. Одним із надійних і економічно вигідних шляхів підвищення врожайності буряка цукрового – це створення і впровадження в виробництво нових гетерозисних гібридів, які б відповідали вимогам сучасних прогресивних технологій вирощування. Головне завдання в селекції буряка цукрового – це створення високоврожайних, з підвищеною цукристістю гібридів.

Ефективно ведуть селекцію буряка цукрового ряд селекційно–дослідних установ Інституту біоенергетичних культур та цукрових буряків УААН, в Інституті фізіології рослин та генетики НАН України. Вченими створено низку гібридів потенційна врожайність яких складає 60–80 т/га, збір цукру 10–12 т/га [2].

Актуальність теми. Одна з найважливіших проблем селекційно–генетичних досліджень буряка цукрового є використання гетерозису. Для створення високо гетерозисних гібридів використовують константні лінії. Інбредну лінію перехреснозапильної культури одержують після багаторазових самозапильень. При інбридингу виникає депресія, знижується стійкість до стресових факторів. Тому великі надії і перспективи у створенні нового вихідного матеріалу буряка цукрового покладають на біотехнологію, методи якої дають змогу одержати принципово нові форми з корисним поєднанням ознак і властивостей. Найбільш ефективним у відношенні одержання

константних ліній є метод експериментальної гаплоїдії. Керування явищем гаплоїдії відкриваю перспективи не тільки для вдосконалення існуючих, але і розробки нових шляхів і методів селекції [3].

Галоїдний вихідний матеріал, отриманий біотехнологічними методами, дає змогу за короткий період створити гомозиготні лінії буряка цукрового з цінними господарськими ознаками для гетерозисної селекції.

Мета дослідження. Головною метою наших досліджень було підвищити вихід галоїдних та гомодиплоїдних форм при поєднанні методу культури *in vitro* не запліднених насіннєвих зачатків та прийомів стимулювання гаплоїдії, затримання обпилення, та обпилення донорного матеріалу опроміненим пилком.

Для досягнення цієї мети було поставлено на вирішення такі завдання:

- визначити умови стимуляції формування гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового з насіннєвих зачатків у культурі *in vitro*;
- підвищити вихід гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового шляхом використання прийому затримання опилення та гіногенезу;
- провести аналіз морфологічних та цитогенетичних особливостей рослинних матеріалів буряка цукрового, отриманих у культурі *in vitro*.

Апробація результатів дипломної роботи. Матеріали викладені у роботі доповідались на наукових студентських конференціях Уманського національного університету.

РОЗДІЛ I

СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ З ГАПЛОЇДІЇ

(огляд літератури)

Спроби використовувати гаплоїдію в селекції і насінництві було зроблено ще половину століття назад, хоча практична реалізація задумів проходила досить повільно. Факторами, які стимулювали подальший розвиток досліджень були труднощі отримання гаплоїдів в кількості необхідній для ведення селекції та переведення їх на диплоїдний рівень [4]. За допомогою гаплоїдії можна отримати із збагаченого в генетичному відношенні гібридного матеріалу гомозиготний, тобто чистолінійний матеріал без застосування багаторазових самозапилень і на його основі створювати високопродуктивні сорти і гібриди [5].

В 1964 році були отримані перші гаплоїди у вищих рослин (*Datura stramonium*), а пізніше регенеровані з пилку *Oktura sativa*. Ці досліді дали поштовх розвитку нового методу отримання гаплоїдів з гаметних клітин в культурі «*in vitro*» [6].

Гаплоїдні рослини – це рослини з одинарним набором хромосом. В природі іде постійний процес спонтанного виникнення гаплоїдів. За даними Melzer R. і Behrens H. кількість гаплоїдів у природній популяції складає від 0,001 до 0,01 % [7]. Утворення гаплоїдів відбувається при стимулюючому впливі запилення і мекторального запліднення.

Вченими було запропоновано новий метод отримання гаплоїдів у ячменю. Цей метод базується на вибірці гамет, що утворюють гібриди F₁ чи інші гетерозиготні генотипи [8, 9]. Гаплоїди утворюються в результаті запліднення і подальшої елімінації хромосом в зародку, що розвивається. Хохлов С. спробував отримати гаплоїдні калюсні клони з окремих пилкових зерен, але дослід виявився не вдалим [10]. Проте успішно був використаний метод культури «няньки». Пилкові зерна вирощувалися на фільтрувальному

папері які виділяли з пиляків. Ефективність утворення клонів з пилкових зерен коливалися від 0 до 60 %.

Chase S. працював над виділенням гаплоїдних рослин кукурудзи, схрещуванням рослин з ендоспермним маркером. Нормальні диплоїдні гібриди маркувалися по кольору, що полегшувало ідентифікацію гаплоїдів. Середній показник дослідів – 1 гаплоїд на 900 насінин [11].

Певний період впровадилися досліді по опроміненню пилку і впливу цього опромінення на частоту виходу гаплоїдних структур. Відкрито нове явище назване «імітація гібридизації», суть якого полягає в тому, що використання в гібридизації опроміненого гамма-променями життєздатного пилку викликає зміни та виявлення материнських ознак у гібридів через мутаційні втрати батьківських алелів. Доведена можливість переведення генетичної інформації від батьківської до материнської форми за допомогою життєздатного, убитого гамма-променями пилку [12, 13].

Вчені виділили гаплоїдне насіння томатів при запиленні рослин опроміненим пилом. Найефективнішою виявилась доза 6–7 рад [14].

Natarajan A. і Swaminathan M. отримували гаплоїди опромінюючи колосся м'якої пшениці за 2–3 дні до цвітіння дозою 5200 рад [15]. Таке ж опромінення через 3–4 дні після цвітіння не викликало утворення гаплоїдів.

Ефективним для отримання для гаплоїдних структур є метод затримання обпилення. Так, Smith H. одержав 20 % вихід гаплоїдів пшениці при затриманні запилення до 12 днів після адаптації [16]. Seaneu R. при запиленні на 20й день після появи приймочок виявив 3,5 гаплоїда на кожну 1000 рослин [17].

Munting A. отримав гаплоїди жита під впливом дії високих температур після перехресного запилення [18]. В останні роки для отримання гаплоїдів широкого поширення набув метод ізольованих тканин і клітин в культурі «*in vitro*» [19].

За словами вчених: «Культура «*in vitro*» – це вирощування на поживному середовищі живого матеріалу, що звільнений від кореляційної залежності материнських органів, під склом в асептичних умовах» [20].

Важливий розділ клітинної інженерії цукрових буряка – створення змінених рослин в якості вихідного матеріалу для селекції [21]. В нашій країні ці роботи ведуться в декількох напрямках: отримання віддалених гібридів, втому числі міжвидових і міжродових: індукування гаплоїдних рослин з послідуочим подвоєнням у них числа хромосом; клональна селекція на клітинному рівні з послідуочною регенерацією рослин; соматична гібридизація рослин [22].

Буряки цукрові, як алогамна культура в малій кількості утворюють насіння при суворому самозапиленні, при цьому застосування інбридингу може ускладнити виділення і зберігання їх цінних генотипів в процесі селекції. Розробки різних прийомів вегетативного розмноження елітних рослин буряка цукрового дозволяє вирішити проблему збереження і прискореного розмноження високоефективних форм [23]. В ізолюваній культурі гаплоїдні клітини здатні до ембріонального розвитку, органогенезу, брунькування, коренеутворення.

Регенеранти із гаплоїдних клітин були отримані в більшості біовидів рослин. У 22 видів відмічена регенерація з пилкового зерна калюсу. Отримання регенерантів з клітин гаплоїдної природи є реальною можливістю [24].

Хесі вважав, що рослини-донори для культури тканин мають вирощуватися в чистому навколишньому середовищі, уникаючи забруднення листя і надмірного поливу [25].

Вчені стверджують, що дія на експлант понижених температур перед культивуванням на живильному середовищі значно підвищує вихід гаплоїдів [26].

Для отримання бажаних результатів важливим моментом є підбір складу поживного середовища – при додаванні різних співвідношень і концентрацій макро і мікро елементів [27]. На перших етапах мікроклонального розмноження

гаплоїдних матеріалів рекомендується використовувати поживне середовище Мурасіге–Скуга зі зменшеним змістом сахарози і наявністю БАП, НУК і кінетику. На такому середовищі коефіцієнт розмноження вищій, наземні органи розвивалися інтенсивніше. Перед висаджуванням рослин в ґрунт експланти переносили на рідке середовище зі зменшеним в двоє вмістом макро і мікро елементів, без нікотинової кислоти і піродиксину. Рослини на такому середовищі після пересаджування в ґрунт були більш життєздатними [28].

Ільєнко І. і Редько В. займалися введенням різних генотипів буряка цукрового в культуру *in vitro*, і показали, що відсоток виживання експланту залежить не тільки від стерилізуючого агента та складу поживного середовища, а й від генотипу [29].

В селекції буряка цукрового техніка *in vitro* широко застосовується для збереження селекційно генетичного матеріалу, прискореного розмноження цінних генотипів, гаплоїдних і дигаплоїдних форм [30].

Експериментальна гаплоїдія значно прискорює та полегшує селекційний процес буряка цукрового, а також представляє модельні системи для генетико–біологічних досліджень, оскільки отримані рослини після диплоїдизації є гомозиготними [31]. Значну частину гаплоїдних рослин у буряка цукрового Bosermak N. отримували схрещуванням одно і багатонасінних ЧС форм з тетрапіоїдними запилювачами [32].

Вчені інституту буряка цукрового в своїх дослідках використовували культуру *in vitro* незапліднених зародків вільнозапильних рослин диплоїдних буряка цукрового сортів Якош 1, Уладівський 752, Ялтушківський однонасінний і рослин диплоїдного однонасінного дикого буряка *Beta patellar* L. Видалені зачатки стерилізували і поміщали на середовище Гамборга. Кількість гаплоїдних проростків отриманих від серцевинних зародків становила 0,3–0,5 % [33].

Gibson M. в своїх дослідках описує методику отримання диплоїдних форм буряка цукрового з культури насінневих зачатків. З метою подвоєння числа хромосом у отриманих гаплоїдів в середовище додавався

колхіцин. Одержані рослини були крупнішими, з широкими листками, ніж контрольні гаплоїдні форми [34].

Вченими запропонована ефективна технологія отримання дигаплоїдного селекційного матеріалу буряка цукрового в умовах *in vitro*, яка заключається в індукції гаплоїдів із незапліднених насінневих зачатків, диплодизації їх колхіцином і формування дигаплоїдних гомозиготних ліній [35]. Показано, що основним стимулюючим фактором гаплоїдного морфогенезу є фізико–хімічна дія на жіночу генеративну тканину (рентгенівське проміння, понижені температури і гормональний склад поживного середовища).

Вченими Інституту енергетичних культур та цукрових буряків було проведено дослідження з адаптації рослинних матеріалів різної плоїдності [36]. Виявилось, що укорінені регенеранти буряку цукрового при пересаджуванні в ґрунт потерпають від зміни багатьох факторів навколишнього середовища. Тому доцільно проводити попереднє загартування рослин. Цей захід підвищує приживання матеріалу до 94,2 %. Вчені для підвищення виходу гаплоїдних структур в культурі ізольованих насінневих зачатків використовували вплив на бутони понижених температур, опромінення коренеплодів та запилення материнських рослин буряку цукрового пилом буряку столового, опромінення гамма-променями в дозі 100 рад [37]. Все це дозволило підвищити вихід гаплоїдів у 1,5–2 рази порівняно з контролем.

Невисока генетична різноманітність сучасних сортів і гібридів буряка цукрового не дозволяє методам класичної селекції значно підвищити їх продуктивність і стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища. Для подолання цієї перешкоди звернули увагу на розробку методичних прийомів отримання самоклональних форм буряка цукрового в культурі *in vitro* [38]. Отримання гаплоїдів вони проводили шляхом культивування незапліднених зачатків в культурі *in vitro*. В результаті проведених досліджень ними була розроблена техніка їх виділення, а також вивчений вплив живильного середовища на індукцію калюсогенезу.

Велике значення для розвитку експланту має склад і агрегатний стан поживного середовища. В своїх дослідженнях науковці вводили в культуру *in vitro* зародки незрілих або близьких до дозрівання плодів [39].

У стерильній культурі відмічали збільшення розмірів зародків як на твердому, так і на рідкому поживному середовищі. Проте на рідкому середовищі зародки розвивалися швидше і у проростків була збільшена коренева система, аніж на твердому, де окремі ділянки коренів темніли і в подальшому відмирали.

Хохлов С. встановив, що гаплоїди виникають шляхом розвитку з редукованої, але незаплідненої яйцеклітини, сенергід чи антиподів [40]. Такий спосіб розвитку зародка відносять до явища апоміксису і визначають його як редукований або галоїдний партеногенез. Дані форми характеризуються нерегулярністю появи і незбалансованістю чисел хромосом у батьківської особини і потомства. Вчені працювали над стимулюванням партеногенетичного розвитку насіння буряка цукрового впливом різних фізичних факторів [41]. Запилення рослин пилком, який опромінювали високими дозами радіації забезпечувало стимуляцію партеногенезу. Частина отриманих рослин мали гаплоїдний набір хромосом. Це дозволило отримати новий вихідний матеріал з цінними селекційними ознаками.

Визначено класифікував гаплоїди за їх генетичною конструкцією:

- макроклінні – розвиваються з редукованої клітини;
- андрогенні – отримують експериментально при використанні методу культури пиляків [42].

Вчені отримали масове одержання гаплоїдів при внутрішньовидовій гібридизації у буряка цукрового за рахунок спонтанної елімінації хромосом, а також культивування рослин *in vitro* [43]. Це створює унікальні можливості для вивчення рекомбінаційної здатності при внутрішньовидовій гібридизації, а також підвищення продуктивності гібридів.

Визначено напрямки використання гаплоїдів на практиці:

- створення гомозиготних ліній в селекції на гетерозис;

- прискорене створення ліній перехреснозапильних культур;
- індукування і дослідження мутагенезу;
- злиття ізольованих протопластів на гаплоїдному рівні;
- для отримання алеуплоїдів, які використовують з ціллю визначення локалізації генів, переміщення хромосом;
- дослідження самонесумісності;
- виявлення походження і родинних зв'язків культурних рослин;
- використання гаплоїдів дозволяє в 2–3 рази прискорити селекційний процес створення гетерозисних гібридів [44].

За останні роки отримані вагомі результати діяльності в цьому напрямку:

- розроблено спосіб одержання гомозиготних ліній буряка цукрового з використанням методу радіаційного мутагенезу;
- розроблено методи отримання нового вихідного матеріалу шляхом індукування гаплоїдів в культурі *in vitro*, що дозволяє створити лінії з селекційно-цінними ознаками;
- відпрацьовано технологію спонтанної диплоїдизації гаплоїдних форм буряка цукрового.

Аналізуючи результати досліджень викладені в наведених вище працях, можна зробити висновок, що при правильному підборі генотипу, живильного середовища, умов вирощування донорських рослин та експланту можна досить ефективно отримувати та використовувати гаплоїдні та гомодиплоїдні рослини для селекційної роботи різних сільськогосподарських культур, загалом і буряка цукрового зокрема. Наші дослідження були направлені на виявлення можливості підвищення ефективності отримання гаплоїдів і гомодиплоїдів буряка цукрового біотехнологічними методами при поєднанні культури ізольованих насінневих зачатків і заходу стимулювання гаплоїдів – запилення донорських рослин опроміненим пилом.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Походження буряка цукрового

Буряки цукрові порівняно молода культурна рослина. Культура буряка на перших етапах історичного розвитку, за даними В. П. Зосимовича 1968 була поширена і країнах передньої, середньої Азії, в Середземномор'ї і Причорномор'ї. З незапам'ятних часів буряки використовувалися людиною, як овочева і лікарська рослина. Як культурну рослину її почали вирощувати в третьому тисячолітті до нашої ери. Першими вихідними видами були бур'яноподібні, низькоцукристі популяції виду *B. perennis*, які росли в країнах Середземномор'я. Перші відомості про коренеплідні форми буряка відносять до IV–V, а листяні – початку I тисячоліття до нашої ери [45].

Походження культурних форм буряка у Південній і Західній Європі пов'язана з введенням в культуру листяних форм, відібраних з місцевих популяцій *B. maritima*. Коренеплоди буряка потрапили в Європу значно пізніше. Сумісне вирощування листових і коренеплідних буряка сприяло природній їх гібридизації.

Отже, за походженням буряки цукрові є складним гібридом між акліматизованими в Європі передньоазіатськими коренеплідними та західноєвропейськими буряками. Вони виникли наприкінці XVIII на початку XIX ст. і в середині XIX ст. були поліпшені повторними схрещуваннями з буряками листовими. Одночасно проводилася селекція на цукристість. Застосовувані агротехнічні заходи також було направлено на поліпшення якості коренеплодів.

2.2. Класифікація буряка

Буряк цукровий (*Beta vulgaris saecharifera*) належить до класу Дводольних, родини Лободових (*Chenopodiaceous*), Рід *Beta* (В. П. Зосимович, 1968) об'єднує 14 диких, один культурний вид.

У процесі еволюції роду *Beta* L. утворилась три природних групи видів–секцій: канарські (3 види), гірські (6 видів), звичайні (6 видів). До останньої секції належить відібраний і сформований людиною вид *Beta vulgaris* L., яких об'єднує такі підвиди:

1. *Beta cicla* – буряки листові з трьома групами різновидностей:
 - а) буряки листові салатні – *Convar vulgaris*;
 - б) буряки черешкові салатні – *Convar patiolata*;
 - в) буряки гібридні черешкові декоративні – *Convar vavicioides*.
2. *Beta crassa* – буряки коренеплідні з трьома групами різновидностей:
 - а) буряки столові – *Convar cruenta*
 - б) буряки кормові – *Convar crassa*
 - в) буряки цукрові – *Convar saccharifera* однодомною формою *Convar monosperma*.

На сучасному етапі, як вихідний селекційний матеріал, використовуються форми буряка цукрового, які розрізняються біоморфологічними особливостями, диплоїдні багатонасінні буряки ($2n=18$); диплоїдні одностигмі (2n=18); тетраплоїдні багатонасінні ($2n=36$); тетраплоїдні одностигмі ($2n=36$); форми з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (ЦЧС) [46].

2.3 Ботанічна і біологічна характеристика буряка цукрового

За нормальних умов вегетації цикл індивідуального розвитку буряка цукрового відбувається протягом двох вегетаційних періодів. В першому вегетаційному періоді утворюються потовщенні корені (коренеплід) з прикореневою розеткою листків, а в другому на рослині з'являються квітконосні пагони, настає цвітіння і плодоутворення. Саме тому буряки цукрові відносять до дворічних рослин [46, 47].

За період вегетації (150–170 днів), що залежить від сортових особливостей умов живлення, стану рослин. На одній рослині утворюється в середньому 50–60 листків, а іноді до 90 і більше. Загальна оптимальна площа листової поверхні однієї рослини може складати за весь період 2500–3500 см.

Кожний листок складається з пластинки і черешка, найбільш бажаною є продовгувато-округла форма листка з добре помітними жилками. Листки цукрових буряка звичайно гофровані. Це сприяє збільшенню поверхні листової пластинки. Урожайні сорти більш схильні розвивати гофроване листя, цукристі – гладке. Інтенсивність забарвлення листків залежить від вмісту в них хлорофілу і змінюється в них протягом вегетаційного періоду. Молоді рослини мають салатний, зелений колір, з віком він змінюється від світло до темно-зеленого. Умови живлення, зволоження також впливають на інтенсивність забарвлення.

Коренеплід запасальний орган, де протягом вегетації прозапас відкладаються продукти фотосинтезу. Коренеплід буряка цукрового має обернено-конічну форму з куполоподібною конічною головкою. Форма коренеплоду має свої особливості залежно від сорту та умов вирощування. У коренеплоді буряка розрізняють три частини: шийку, головку і власне корінь. Головка – це верхня частина коренеплоду на якій розміщені черешки листків. Вона переходить в шийку – частину кореня яка не має ні листків, ні бокових коренів. Головною ознакою власне кореня є наявність з двох протилежних сторін повздовжніх вертикальних, або закручених по спіралі борозенок з

бічними кореннями. У нижній частині власне корінь переходить у хвостову частину.

Ріст кореня триває протягом всього вегетаційного періоду, і проникає на глибину 2–3 метри і більше. Коренева система однієї рослини буряка цукрового поширена в ґрунті об'ємом 6–7 м³. Маса коренеплоду коливається від 500–1200 г., вміст цукру в сучасних сортах та гібридах становить 16–18 %.

На другий рік життя буряки цукрові утворюють квітконосний пагін, який являє собою тип складного суцвіття у вигляді не щільного пониклого колоса.

Квітка – двостатева, п'ятірного типу, оцвітина проста, чашоподібна, складається з п'яти зелених листочків. П'ять пиляків направлені в середину квітки. Маточка складається з чашолистиків які не повністю зрослися.

Буряки належать до перехреснозапильних рослин. Однак їм властиві три типи запилення: аутогамія – самозапилення в межах квітки, гейтоногамія – запилення в межах однієї рослини, ксеногамія – запилення пишком інших рослин.

Буряки цукрові дуже пристосовані до перехресного запилення. Так, за даними ВНІЦ на одній рослині утворюється до 1 мільярду пишкових зерен, на одній квітці – 15 тисяч, на одному пиляку 3–4 тисячі. За період запилення на приймочку кожної квітки буряка потрапляє не менше 300–400 пишкових зерен. Яйцеклітина запилюється одним пишковим зерном. Тривалість цвітіння однієї квітки визначається свіжістю і діяльністю приймочки, і становить 3–6 днів. Цвітіння насінника може тривати від трьох тижнів до півтора місяця, а іноді і більше. У дощову погоду перехресне запилення уповільнюється, а самозапилення відбувається як звичайно.

В закритій квітці приймочка дозріває за 6 днів до цвітіння, коли розкриваються чашолистки і розтріскуються пиляки. Зародковий мішок повністю сформований до початку дозрівання приймочки. Яйцеклітина здатна до запліднення за 5 днів до цвітіння. Зародковий мішок зберігає життєдіяльність протягом 8–9 днів після розкривання квіток, а потім дегенерує.

Плід цукрових буряка – однонасінна коробочка, яка складається з трьох частин: оплодня – зародка і пересперму. Оплодень складається з гнізда і кришечки; гніздо – це нижня частина плоду в якій розміщується насінина. Насінина має широкоеліпсоподібну форму з загостреним виступом, який являє собою зародковий корінчик. Довжина насінини 2 мм., ширина 1,5 мм., товщина 1 мм., маса 4–6 г. Насінина складається з зовнішньої та внутрішньої оболонки, зародка, який зігнутий у вигляді кільця. В зародкові видно три майбутніх вегетативних органи: дві сім'ядолі, зародковий корінь, меристиматичний горбик або верхівка стебла. В переспермі містяться запасні поживні речовини для проростання насіння, клітини пересперму вповнені крохмалем.

Квітки буряка цукрового розташовані на квітконосних пагонах у півках приквіткових листочків групами (багатонасінних форм), найчастіше по три–чотири квітки, зрощених між собою, а також поодинокі (однонасінних буряка). З кількох квіток, що зрослися, утворюються згодом супліддя, які ще називають клубочками.

2.4 Характеристика донорного матеріалу

У досліді використовувались чоловічостерильні лінії 105 та 230 „0”. За насіннєвістю вони відносяться до однонасінних біотипів і відмічаються високою агропродуктивністю.

У досліді для отримання гаплоїдних структур використовувались біоматеріали трьох генотипів, які мали наступні характеристики:

лінія От 715 – обпилювач, закріплювач стерильності німецького походження. При схрещуванні з лініями ЧС 705 і ЧС 1003 відбувається 100 % закріплення стерильності. Відноситься до однонасінних біотипів. Лінія От 715 стійка до церкоспорозу. Середня урожайність становить 49,3 т/га; цукристість – 18,5 %; збір цукру – 9,12 т/га.

лінія От 647 – закріплювач стерильності уманського походження. Вона дала початок О-типу і ЧС-формі гібриду Ювілейний. Характеризується високим рівнем однонасінності. Урожайність становить 46,4 т/га; цукристість – 17,7 %; збір цукру – 8,21 т/га.

РОЗДІЛ 3

УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Умови вирощування донорного матеріалу

Донорні рослини вирощувались у теплиці Уманського національного університету.

Щоб отримати матеріал для проведення дослідів в лютому–квітні місяці, посів на дослідних ділянках проводили свіжозібраним насінням в липні для отримання штеклінчів. Збирали їх в жовтні і протягом 45–50 днів витримували в холодовій камері при температурі +3–4°C. В кінці грудня штеклінчи висаджують в теплицю в вазони з ґрунтовою сумішшю. Через півтора місяця рослини розквітали і використовувались донорами експлантів (насінневих зародків) для виведення в культуру «in vitro».

Регулювання температури в теплиці проводилося відповідно до фаз розвитку рослин:

Фаза розвитку	Сходи, розетка	Стеблування	Бутонізація, цвітіння	Дозрівання насіння
град/с	12–15	15–17	17–20	23–27

Для додаткового освітлення використовувались ртутні лампи ДРЛ–400, розташовані на відстані 1,2–1,4 м. від поверхні стелажів.

На рівні розетки освітленість сягала 5–6 клк. (440Вт/м²). Темлова фаза дорівнювала 6 годин на добу. Вологість повітря підтримувалась на рівні 70–80 %.

Ґрунтова суміш, що використовувалась в теплиці для вирощування буряка цукрового, складалась на 50 % з чорнозему, 40 % перегною і 10 % піску та містила: азоту – 70мг.екв.на 100г. ґрунту, фосфору – 27мг.екв.на 100г. ґрунту, і калію – 94мг.екв.на 100г. ґрунту.

3.2. Схема дослідів

Всього в роботі використовували два селекційних номери буряка цукрового. З кожного селекційного номеру брали від 3 до 5 рослин. Із кожної рослини матеріал для ведення в культуру «in vitro» брали тричі.

Експеримент вимагав проведення двох дослідів.

Перший – підвищення виходу гаплоїдів та гомодиплоїдів за рахунок виділення насіннєвих зачатків та ведення їх в ізолювану культуру в період цвітіння квітки (схема 1);

Схема 1.

№ з/ п	Варіанти дослідів	Повторності
1.	Контроль (насіннєві зачатки з бутонів)	1 2 3
2.	1–3 день цвітіння квітки	1 2 3
3.	4–6 день цвітіння квітки	1 2 3
4.	7–9 день цвітіння квітки	1 2 3
5.	10–12 день цвітіння квітки	1 2 3

другий – стимуляція гаплоїдії шляхом поєднання прийому опилення опроміненим пилком рослини–донору експланту та методу культури «*in vitro*» насіннєвих зачатків (схема 2).

Дослід проводили в трьохкратній повторності.

Схема 2.

№ з/ п	Варіанти досліду	Повторно сті
1.	Контроль (насіннєві зачатки з бутонів)	1 2 3
2.	Насіннєві зачатки із рослин після запилення їх опроміненим пилком	1 2 3

3.3 Характеристика середовища для культивування насіннєвих зачатків

Для культивування насіннєвих зачатків буряка цукрового в дослідах використовували середовище, в основу якого входили макро– і мікроелементи за прописом Мурасіге і Скуга (таблиця 3.1) при додаванні слідуючих компонентів [36]:

Імг/л 6–бензиламінопурину;

0,1 мг/л 2,4–дихлорфеноксоцтової кислоти;

0,01 мг/г гіберелінові кислоти;

30 г/л сахарози;

20г/л глюкози.

рН середовища 5,8

Таблиця 3.1.

Середовище Мурасіге –Скуга

Компоненти середовища	Концентрація вихідного розчину, мг/л	Об'єм початкового розчину, мг/л середовища	Температура зберігання початкового розчину, °С
Основні неорганічні речовини: NHNO_3 KNO_3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4	33000 38000 8800 7400 3400	50	+4
Джерела мікроелементів: KI H_3BO_3 $\text{Mn SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	166 1240 4460 1720 50 5 5	5	+4
Джерела заліза: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 7$	5560 7460	5	+4
Органічні речовини: Мезоінозін Нікотинова кислота Піридоксин– Тіамін–HCl Гліцин	20000 100 100 100 400	5	–20 (по 5мл)
Джерело вуглеводів: Сахароза Глюкоза	– –	30 20	– –

3.4 Методика проведення досліджень

Для отримання гаплоїдів та гомодиплоїдів буряка цукрового в наших дослідках використовується метод культури *in vitro* ізольованих насіннєвих зачатків. Вихідний матеріал перед культивуванням піддавали холодовій обробці, витримуючи його 3–5 днів при температурі +3–+5 С (в холодильнику).

Перед введенням насіннєвих зачатків в стерильну культуру бутони стерилізували 5 %-ним розчином хлораміну при експозиції 15хв, з послідовним трьохкратним промиванням стерильною дистильованою водою протягом 15хв в стерильному боксі.

Після стерилізації бутонів під ламінаром за допомогою препаративної голки виділяли насіннєві зачатки та висаджували в пробірки на живильні середовища.

Склад поживного середовища для культивування насіннєвих зачатків подано в розділі 3.3 (табл. 3.1).

Середовище стерилізували стандартним методом, розробленим Бутенко [37].

Для підвищення виходу гаплоїдних та гомодиплоїдних рослин поряд з культуральними методами використовували один з прийомів стимулювання гаплоїдії – вилучення насіннєвого зачатка після розкриття бутонів (до 12 діб) (1 дослід), та обпилення донорного матеріалу опроміненим пилом (2 дослід).

Насіннєві зачатки до появи макроструктур культивували в темповому термостаті при початковій температурі +16–18°C (2 тижні), а потім температуру підвищували до +23–25°C. Відносна вологість повітря підтримувалась в межах 75 %.

Сформовані структури (калюс, проростки) пересаджували на середовище для регенерації або розмноження, брунькування і укорінення.

Культивування калюсу здійснювали в темповому термостаті при температурі +24–25 °С, проростків – при 16-го динному фотоперіоді, з

інтенсивністю освітлення 3–5кЛк, температурі +22–24 °С і відносній вологості 75–80 %.

Плоїдність отриманих структур визначали за допомогою цитологічного методу досліджень, розробленого в лабораторії генетики і цитології Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. Він зводиться до прямого підрахунку хромосом в соматичних клітинах апікальної меристеми.

Методика включає наступні процеси:

- 1) занурення об'єктів в 0,03 %-ний розчин оксихіноліну на 1–2 години при температурі +2–4 °С;
- 2) фіксація матеріалу і мацерація в змішаному розчині 96 %-ного етилового спирту і концентрованої соляної кислоти у співвідношенні 2 : 1 – 5–15хв;
- 3) промивання в дистильованій воді 5хв (в воді можна залишати 2 доби);
- 4) фарбування ацетокарміном або ацетоорсеїном і приготування давлених препаратів.

Підрахунок хромосом проводили за допомогою мікроскопа МБІ.

Математичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерних програм.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Стимуляція отримання гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового при затриманні обпилення

Низький вихід гаплоїдних рослин буряка цукрового, при застосуванні генетичних та культуральних методів їх отримання, вимагає розробку прийомів підвищення відсоткового виходу гаплоїдних структур. Тому гостро постає питання стимуляції гаплоїдії.

З метою вирішення даного питання ми провели дослідження по розробці методів, що підвищують вихід рослин буряка цукрового з гаплоїдним набором хромосом.

Наші дослідження були направлені на вивчення можливості підвищення виходу гаплоїдів буряка цукрового при об'єднанні культури ізолюваних насіннєвих зачатків і прийому стимулювання гаплоїдії – затримання опилення.

В даному випадку термін «затримання опилення» застосовується умовно тому, що за цим методом запилення фактично не проводиться.

В наших дослідках насіннєві зачатки виділяють після відкриття квітки через певну кількість днів цвітіння рослини під ізолятором (без запилення). Підвищення виходу гаплоїдних рослин при використанні цього методу ми пов'язуємо з повним розвитком насіннєвого зачатка, що вже готовий до запліднення, розвитку і формування насінини.

Насіннєві зачатки, виділені із бутонів, недорозвинені, тому що у них не повністю завершені процеси мегагаметогенезу. Це і може впливати на низький відсотковий вихід гаплоїдних рослин.

Для стимуляції гаплоїдії проводили виділення незапліднених насіннєвих зачатків в період цвітіння квітки від 1 до 12 днів.

Рослину–донор розміщували під ізолятор і фіксували початок цвітіння бутонів кожної гілки. Спостереження показали, що в день, в середньому, розкривалося 5–6 квіток при температурі навколишнього середовища 24–26°C.

Введення незапліднених зачатків в культуру *in vitro* починали з верхньої частини гілки. У кожную пробірку висаджували по 5–6 штук насіннєвих зачатків і фіксували період цвітіння квітки.

У контрольному варіанті висаджували насіннєві зачатки із бутонів. У даному експерименті (таблиця 4.1) гаплоїдних матеріалів було отримано 0,7 % від загальної кількості висаджених експлантів, диплоїдних форм – 0,8 %, а калюс формували 1,1 % насіннєбруньок.

Таблиця 4.1.

**Вихід гаплоїдних структур при культивуванні насіннєвих зачатків,
виділених з бутонів (контроль)**

.Варіанти досліду	Пов– тор– нос– ті	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Контроль	1	150	3	2,0	3	2,0	–	–	–	–
	2	170	3	1,8	1	0,6	1	0,6	1	0,6
	3	125	4	3,2	1	0,8	2	1,6	1	0,8
	x	148	3,3	2,7	2	1,1	1	0,7	0,6	0,7

x – середній показник за повторностями

Насіннєві зачатки, виділені на 1–3 день після розкриття бутонів, масового органогенезу не дали, проте результати були одержані достовірно вищі, аніж у контрольному варіанті. Калюсні структури, в середньому за повторностями, сформувало 9 % експлантів, гаплоїдні проростки лише 1,0 % експлантів від загальної кількості висаджених насіннєвих зачатків, а кількість диплоїдних форм залишалась на рівні контрольного варіанту – (табл. 4.2).

Таблиця 4.2.

**Вихід гаплоїдних структур при культивуванні насіннєвих зачатків,
виділених з квіток в період цвітіння (1–3 день)**

.Варіанти дослідів	Повторності	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1–3 день	1	230	26	11,0	26	11,0	—	—	—	—
після	2	321	30	9,3	24	7,5	4	1,2	2	0,6
початку	3	393	44	11,2	35	8,9	6	1,5	3	0,8
цвітіння	x	315	33	10,5	28	9,1	3,3	0,9	1,6	0,7

х – середній показник за повторностями.

Насіннєві зачатки, виділені на 4–6 день після початку цвітіння, утворювали у всіх повторностях розпушений органогенний калюс. Відсоток калюсних структур, у середньому за повторностями, склав 46,8 % від загальної кількості висаджених насіннєвих зачатків. У даному варіанті ми спостерігали появу гаплоїдних і гомодиплоїдних рослин, проте їх відсоток залишався низьким – 2,6 та 1,7 % відповідно (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

**Вихід гаплоїдних структур при культивуванні насіннєвих зачатків,
виділених на 4–6 день цвітіння квітки**

.Варіанти дослідів	Повторності	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
4–6 день після початку цвітіння	1	280	174	62,1	17 1	61,0	—	—	3	1,1
	2	354	172	48,6	15 4	43,5	13	3,7	5	1,4

	3	447	199	44,5	17 0	38,0		4,2	10	2,2
	x	360	182	50,6	16 5	47,5	11	2,6	6	1,7

x – середній показник за повторностями.

Насіннєві зачатки, які ми вилучали на 7–9 день після розкриття квітки, формували і калюс, і проростки. У даному варіанті спостерігалось різке зростання виходу гаплоїдних проростків, де їх кількість вже сягала 16,2 % від загальної кількості висаджених насіннєбруньок, а кількість диплоїдних форм у порівнянні з попереднім варіантом збільшилась більше ніж у два рази. Відсоток калюсоутворення залишався відносно, на тому самому рівні, що і в попередньому варіанті (45,9 %) (табл. 4.4).

Таблиця 4.4.

**Вихід гаплоїдних структур при культивуванні насіннєвих зачатків,
виділених на 7–9 день цвітіння квітки**

.Варіанти досліду	Пов– тор– нос– ті	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
7–9 день	1	300	22,5	75,0	162	54,0	51	17,0	12	4,0
після	2	380	216	56,8	146	38,4	54	14,2	16	4,2
початку	3	453	307	81,2	206	45,5	79	17,4	22	4,9
цвітіння	x	378	249	65,9	171	45,9	61	16,2	17	4,3

x – середній показник за повторностями.

Достовірно нижчу частоту утворення гаплоїдних структур (3,6 %) в порівнянні з попереднім варіантом давали насіннєві зачатки, виділені з квіток, період цвітіння яких складав 10–12 днів (табл. 4.5). Вихід диплоїдів складав 3,5 %.

Отже, об'єднання методу культури ізолюваних насіннєвих зачатків із заходом стимулювання гаплоїдії через вилучення насіннєвих зачатків з квіток у період цвітіння підвищує вихід гаплоїдних і гомодиплоїдних структур буряка цукрового. Виділення насіннєвих зачатків на 7–9 день після розкриття квітки дозволяє одержувати до 16,2 % рослин з гаплоїдним набором хромосом та 4,3 % з диплоїдним.

Таблиця 4.5.

**Вихід гаплоїдних структур при культивуванні насіннєвих зачатків,
виділених на 10–12 день цвітіння квітки**

.Варіанти дослідую	Повторності	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
10–12 день після початку цвітіння	1	300	104	34,7	96	32,0	3	1,0	5	1,7
	2	368	170	46,2	136	36,9	18	4,8	16	4,3
	3	334	162	48,5	134	40,1	14	5,1	14	4,2
	х	334	147	44,0	122	36,3	13	3,6	12	3,6

х – середній показник за повторностями.

Для спрощення добору отриманих з насіннєвих зачатків гаплоїдних та спонтанно диплоїдизованих гомодиплоїдних матеріалів ефективним маркером слугував ген забарвлення гіпокотеля *R*. Згідно закону про розщеплення гетерозигот та успадкування генів у нащадках, рослини з диплоїдним набором хромосом і рецесивною ознакою (біле забарвлення гіпокотеля), що контролюється геном *r* — це спонтанно диплоїдизовані гаплоїди (гомодиплоїди).

При даному способі стимуляції гаплоїдії кількість гомодиплоїдів становила 2,2 % (у контрольному варіанті 0,2 %).

4.2. Стимуляція отримання гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового при опиленні донорного матеріалу опроміненим пилом

Для стимулювання утворення гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового проводили запилення донорських рослин опроміненим пилом буряка столового.

Для цього пилок буряка столового (*Beta vulgaris* van. *esculenta*) опромінювали гамма променями. Доза опромінення 100 крад. Вона є летальною для пилку даного виду рослин. Такий пилок не здатен до запліднення, але надає гормональний вплив на яйцеклітину і центральне ядро зародкового мішка, стимулюючи їх розвиток. Опромінення проводили в Інституті фізики АН України під керівництвом Шахова А. П.. У досліді був використаний саме червоний буряк, так як у випадку недостатньої дози опромінення і запилення рослин цукрового буряка життєздатним пилом столового буряка (випадкове перезапилення), ми могли б спостерігати пурпурове забарвлення у листків у проростків.

Підготовленим таким чином пилок запилювали дослідні рослини цукрового буряка в період цвітіння, попередньо відмітивши розкриті квітки. Інтервал запилення – дві доби. Запилення проводили три рази. Ці рослини служили донорами насіннєвих зачатків для культурного етапу роботи.

Введення насіннєвих зачатків в культуру *in vitro*, їх культивування проводили за методикою описаною в розділі 3.

У контрольному варіанті висаджували насіннєві зачатки з нерозкритих бутонів. В процесі досліджень було отримано наступні результати (табл. 4.6):

- у контрольному варіанті кількість гаплоїдних структур, в середньому за повторностями, склала 11,3 %, із них 1,1 % – проростки;

- в експериментальному варіанті ми отримали достовірно вищий процент гаплоїдних утворень: 17,6 % висаджених насіннєвих зачатків регенерувало калюсну тканину, 9,2 % – гаплоїдні проростки цукрового буряка, а 2,2 % експлантів формувало диплоїдний матеріал;

– калюс формувався через 4–6 тижнів культивування насіннєвих зачатків на живильному середовищі, проростки через 2–3 тижні. Проаналізувавши забарвлення гіпокотила диплоїдних форм встановили, що 1,1 % рослин з білим гіпокотилем є спонтанно диплоїдизовані гаплоїди – гомодиплоїди.

Таблиця 4.6.

Вихід структур при культивуванні насіннєвих зачатків запилених опроміненим пилком

.Варіанти дослідів	Пов – тор- нос– ті	Кількість висаджених насіннєвих зачатків, шт.	Кількість сформованих структур							
			всього		калюс		проростки			
							гаплоїдні		диплоїдні	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Контроль	1	430	74	17,1	68	16,8	4	0,9	2	0,4
	2	208	11	5,3	7	3,4	3	1,4	1	0,5
	3	185	11	5,9	10	5,4	1	0,5	–	–
	x	274	32	11,7	28	10,2	3	1,1	1	0,4
Насіннєві зачатки із рослин після запилення опроміненим пилком	1	845	271	32,1	164	19,4	85	10,1	22	2,6
	2	621	166	27,2	100	16,1	59	9,5	10	1,6
	3	715	200	33,2	124	17,6	58	8,1	18	2,5
	x	727	213	29,3	129	17,6	64	9,2	17	2,2
<i>HIP₀₁</i>				1,2		0,7		0,3		0,2

x – середній показник за повторностями;

Застосування прийомів стимулювання гаплоїдів при культивуванні насіннєвих зачатків в культурі *in vitro* не викликало змін морфологічних ознак структур (проростків, калюсу). Даний спосіб стимуляції отримання гаплоїдів і гомодиплоїдів, запилення рослин–донорів насіннєвих зачатків опроміненим

пилком, дозволив отримати достовірно вищий процентний вихід макроструктур. Проте необхідно мати спеціальне обладнання для опромінення пилку гамма променями.

Отже, аналіз результатів досліджень показав, що об'єднання культури ізольованих насіннєвих зачатків і прийомів стимулювання гаплоїдів запилення рослин опроміненим пилком і виділення насіннєвих зачатків в період цвітіння квітки, достовірно підвищує вихід гаплоїдних та гомодиплоїдних структур буряка цукрового і є ефективним прийомом отримання чистолінійного гомозиготного матеріалу для ведення гетерозисної селекції.

4.3. Морфологічна характеристика структур

У процесі культивування незапліднених насіннєвих зачатків буряка цукрового в культурі *in vitro* формувалися макроструктури, різні за морфологічними ознаками. Їх умовно можна розділити на кілька типів:

- проростки з нормально розвинутим первинним корінцем, гіпокотилем та сім'ядолями. Вони проростають без тривалого періоду спокою в нормальні рослини;
- проростки з нормально розвинутим первинним корінцем, гіпокотилем та сім'ядолями, але виникає проблема з укоріненням; первинний корінець не розвинутий, гіпокотиль розрісся, ущільнений, вкорочений, сім'ядолі ущільнені, подовжені або мілкі. Необхідне пересаджування на свіже середовище для стимуляції росту і розвитку проростків;
- добре розвинутий корінь і сім'ядолі, розвиток гіпокотиля не спостерігається. При тривалому культивуванні на листках з'являються некрозні плями і рослина гине, або (іноді) утворює калюсну тканину;
- гіпокотиль розрісся, ущільнений, розвиток первинного коріння і сім'ядоль не спостерігається. Даний тип формує калюс або (рідко) проростки;
- калюс ущільнений або розпушений, коричневий або темно-зелений. При розрізі має яскраво-зелене забарвлення. При перенесенні на середовище для морфогенезу утворює проростки або вторинний калюс, на якому спостерігається стебловий морфогенез. Іноді спостерігається морфогенез без пересадки калюсу на регенераційні середовища. Ризогенез калюсної маси зустрічається рідко;
- калюс з обмеженою морфогенетичною здатністю.

Перші три типи структур складали 61,3 % від загальної кількості утворень. З них, в основному, і були отримані гаплоїдні рослини.

Серед рослин регенерантів зустрічалися альбіносі рослини, але їх кількість була незначною.

Проростки, що утворилися в процесі культивування насіннєвих зачатків, переносили на середовища для розмноження та укорінення. У даному випадку використовувалися середовища, розроблені в лабораторії біотехнології Інституту цукрових буряка (табл. 4. 7).

Таблиця 4. 7

**Склад живильного середовища для розмноження та укорінення
рослин буряка цукрового**

Компоненти поживного середовища	Кількість компонентів на 1 л середовища для	
	розмноження	укорінення
Макроелементи по В5, мл/л	100,0	50,0
Мікроелементи по В5, мл/л	100,0	50,0
Fe–хелат, мл/л	2,0	1,0
В–аланін, мг л	5,0	5,0
А–глутамінова кислота, мг/л	2,0	2,0
Аскорбінова кислота, мг/л	1,0	1,5
6–БАП, мг/л	5,0	3,0
Кінетин, мг/л	0,2	0,2
А–нафтилоцтова кислота, мг/л	0,2	–
Гіберелова кислота, мг/л	–	1,0
Мезоінозит, мг/л	0,1	0,1
Вітаміни, мг/л	100,0	80,0
Тіамін, мг/л	1,0	–
Піродоксин, мг/л	1,0	–
Нікотинова кислота, мг/л	5,0	–
Сахароза, г/л	30,0	20,0
Агар–агар, г/л	8,0	8,0
рН середовища	5,8	5,8–6,0

Калюс переносили на середовища для морфогенезу. Для отримання регенерантів буряка цукрових з калюсної тканини, було проаналізовано

близько 20 субстратів, що різнилися вмістом мінеральних солей, співвідношенням та концентрацією ауксинів, цитокінінів та вітамінів.

Як показали досліди, реакція калюсу на різні склади середовищ залежить від генотипу рослин. Так при перенесенні його на середовище, що включало макро– і мікроелементи за MS ,0,5 мг/л 6–БАП, 0,5 мг/л ІОК, 0,4 мг/л тіаміну, 3 % сахарози, утворювався вторинний калюс. Процес органогенезу у всіх генотипах спостерігався рідко.

Ущільнення тканин, а потім некроз калюсної маси відмічено при культивуванні клітин калюсу на живильному субстраті, що містив макро– і мікроелементи за Ленцмаєром і Скугом, 0,2 мг/л тіаміну, 0,4 мг/л піридоксину 0,3 мг/л 6–БАП та 2 % сахарози.

У деяких генотипів при перенесенні калюсу на живильні середовища з макро– і мікроелементами за Гамборгом (0,5 мг/л 6–БАП, 0,5 мг/л кінетину, 1,0 мг/л НОК, 2 % сахарози) спостерігався ризогенез калюсної тканини, що негативно впливало на наростання калюсу і регенерацію рослин.

Найбільш вдалою для морфогенезу калюсу різних генотипів буряка цукрового виявилось 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 по Уайту, 3 % сахарози. Відсоток регенерації в середньому за генотипами, складав 22,4 %. Цей варіант середовища використовувався в експерименті з метою органогенезу калюсної тканини (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Склад живильного середовища для регенерації рослин буряка цукрового з калюсу

Компоненти живильного середовища	Кількість компонентів на 1 л середовища
Макроелементи по МС, мл/л	50,0
Мікроелементи по МС, мл/л	1,0
Fe–хелат, мл/л	5,0
6–БАП, мг/л	1,0
Кінетин, мг/л	0,5
α –нафтилоцтова кислота, мг/л	0,2
Аскорбінова кислота, мг/л	3,0
Мезоінозит, мг/л	80,0

Вітаміни, мг/л	1,0
Сахароза, г/л	30,0
Агар–агар, г/л	8,0
pH середовища	5,7–5,8

Плоїдність всіх отриманих проростків визначали за допомогою цитологічного аналізу. Результати досліджень показали, що рослини, отримані безпосередньо з насіннєвих зачатків, мають гаплоїдну природу, хоча трапляються і диплоїдні варіанти (2–3 %). Рівень плоїдності рослин, що регенеруються з калюсу коливався. Поряд з гаплоїдами, були отримані проростки різної плоїдності (ди-, три-, тетраплоїди, анеуплоїди) (5–7 %). Спостерігається також поява химер (0,5 %). У однієї рослини могли спостерігатися, як гаплоїдні, так диплоїдні і тетраплоїдні клітини. Переважали клітини з вищим рівнем плоїдності. Це явище має місце внаслідок спонтанної поліплоїдизації в клітинах калюсу.

Після розмноження і укорінення гаплоїдного матеріалу на живильних середовищах, рослини цукрових буряка переносили в перліт для отримання штеклінгів, а потім після холодової обробки висаджували в теплицю для диплоїдизації гаплоїдів і отримання насіння.

Таким чином, виділені типи структур, що можуть формуватися при розвитку насіннєвих зачатків у культурі *in vitro*. Вказані шляхи їх перетворення при культивуванні на різних живильних середовищах. Слід відмітити і те, що для збільшення виходу гаплоїдів необхідно отримувати регенерацію проростків безпосередньо з насіннєвих зачатків, минаючи стадію калюсоутворення, так як рослини, отримані з калюсу, не завжди мають гаплоїдну природу.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1 Моделювання виробничих небезпек за біотехнологічного процесу

Охорону праці не можна розглядати окремо від конкретного виробництва. Вона тісно пов'язана з науковою організацією виробництва, економікою, технічною естетикою і багатьма іншими науками. Поліпшення умов праці є одним з резервів росту її продуктивності виробництва а також подальшого росту самої людини [48]. Досліди з отримання гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового закладались у лабораторії біотехнології УНУ. Як відомо, умови лабораторії біотехнології є шкідливими для здоров'я людини, так як низка фізичних і хімічних факторів впливають на нього.

Зазвичай, відхилення від нормативних значень температури повітря робочої зони лише на 1°C знижує продуктивність праці на 1 %. Якщо врахувати, що під час роботи на людину діє кілька шкідливих виробничих факторів, то їх ліквідація або нормалізація має величезні резерви у підвищенні продуктивності праці.

Температурний режим в культуральних кімнатах становить 24–27°C при вологості повітря 75–80 %, що є високими параметрами щодо задовільних умов праці.

Для стерилізації приміщень та ламінарів використовують бактерицидні ультрафіолетові лампи; їх робота викликає високу іонізацію повітря в приміщенні. У зв'язку з тим, що вплив ультрафіолетового проміння та іонізованого повітря на організм шкідливий, стерилізацію приміщень ультрафіолетовими лампами проводять за 1,5–2 години до роботи.

Стерилізація посуду, середовищ та інструментів проводиться в автоклавах. Прилад працює під тиском 1,2–1,5атм. Для роботи з даним приладом необхідно мати допуск та пройти інструктаж по техніці безпеки.

Поряд з фізичними стерилізаторами використовують і хімічні. Стерилізацію циліндрів, піпеток, колб, що використовуються для приготування середовища, замочують в розчині 4–6 % хлораміну або 2–10 % пергідролі, тому роботу з цими препаратами необхідно проводити під витяжними шафами.

Матеріал перед введенням стерилізують 0,1 %-ним розчином сулеми. Даний стерилізатор відносять до особливо токсичних речовин, так як до його складу входить ртуть.

Основою всіх живильних середовищ для вирощування рослин є суміші мінеральних солей, макро- і мікроелементів. У мікродозах використовують такі речовини як борна кислота, сірчаноокислий цинк, сірчаноокисла мідь, хлористий кобальт. Ці речовини вимагають обережного поводження при роботі з ними, так як вони відносяться до високотоксичних речовин.

Працювати з наведеними вище речовинами потрібно під витяжними шафами в гумових рукавичках, марлевих пов'язках або респіраторх, дотримуючись правил безпечної роботи з високотоксичними речовинами.

Під ламінар-боксами біотехнолог проводить роботу з введення та пасажування рослинного матеріалу в ізольованій культурі. Ці роботи проводяться при використанні спиртівки, тому необхідно звертати увагу на заходи безпеки та охорону праці при роботі з легкозаймистими речовинами та вогнем.

Наявність вогнегасника в лабораторії та проведення інструктажу з пожежної безпеки є обов'язковою умовою роботи даного підрозділу.

Проблема поліпшення умов праці безпосередньо пов'язана з санітарно-побутовим та медичним обслуговуванням працівників, організацією відпочинку, харчування тощо. Все це сприяє відновленню сил, зниженню напруженості і приводить до збереження працездатності. Люди, що працюють в лабораторії біотехнології, повинні два рази на рік проходити медичний огляд та забезпечуватися спеціальним харчуванням.

Лише поєднання глибоких знань з охорони праці з високою професійною підготовкою спеціалістів-біотехнологів, високою трудовою дисципліною і

відповідальністю за доручену справу дасть можливість службовим особам, відповідальним за стан охорони праці, досягти високих результатів.

Отже, для створення безпечних умов праці в біотехнологічній лабораторії необхідно:

- вчасно проводити інструктажі з працівниками;
- дотримуватися санітарно–гігієнічних норм;
- забезпечувати працівників повноцінним харчуванням у зв'язку зі шкідливими умовами праці та створювати сприятливі умови для відпочинку;
- контроль з боку фахівців за дотриманням правил технічної безпеки і охорони праці працівниками.

5.2 Охорона навколишнього середовища при перенесені матеріалів, отриманих біотехнологічними методами, в ґрунтові умови вирощування

Як відомо, головним критерієм виробництва сьогодні, поряд з економічною ефективністю, є ступінь його екологізації, забезпечення найсприятливіших умов науково–технічного прогресу, оптимальні екологічні умови для нинішнього та наступного покоління людства [49, 50]. Відповідно до цього в Україні діє система державного контролю за станом природного середовища. Держава здійснює екологічну політику, що спрямована на забезпечення чистоти навколишнього середовища, збереження генетичного фонду живої природи (Конституція України 1996р.; ст.79).

Охорона навколишнього середовища, раціональне використання природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки життєдіяльності України обов'язкова умова її сталого економічного та соціального розвитку. З цією метою Україна здійснює на своїй території екологічну політику, спрямовану на збереження безпечного для існування живої та неживої природи

навколишнього середовища, захист життя та здоров'я населення від негативного впливу зумовленого забрудненням навколишнього природного середовища.

Порушення законодавства України про охорону навколишнього природного середовища тягне за собою встановлену цим законом та іншим законодавством України дисциплінарну, адміністративну, цивільну та кримінальну відповідальність.

Застосування заходів відповідальності не звільняє від компенсації шкоди, заподіяної забрудненням НПС і погіршення якості природних ресурсів [50].

Після культивування рослин буряка цукрового на поживних середовищах отриманий донорний матеріал висаджують у відкритий ґрунт, тобто в польові умови. Агротехніка вирощування висаджених рослин буряка цукрового така ж як і агротехніка догляду за посівами буряка цукрового.

Завдяки інтенсивній консультативній роботі по вирощуванню буряка цукрового з'являється можливість швидкого впровадження нових результатів дослідницької діяльності у практику. Одночасно можна гарантувати досягнення високих виробничо-технологічних результатів навіть при найсуворішому дотриманні екологічних вимог.

Внаслідок багаторазового механічного обробітку ґранту, а також вивезення коренеплодів і побічної продукції (бурякової гички), буряки цукрові завжди вважаються культурою, яка призводить до великих втрат гумусу.

Покращити екологічну ситуацію можна за допомогою біологізації землеробства, тобто удосконаленням сівозмін, введенням сидеральних культур в сівозміну, застосуванням бактеріальних препаратів, відповідного обробітку ґрунту, встановлення оптимальних норм і співвідношень органічних і мінеральних добрив, хімічної меліорації з використанням відходів цукрових заводів дефекату, застосуванням

пестицидів лише нового покоління і тільки при перевищенні економічного порогу шкодочинності.

Введення в сівозміну сидеральних культур викликає суттєві зміни в мікробіологічних процесах. Інтенсивність мінералізації знижується, а гуміфікація – підвищується.

Збирання буряка цукрового є дуже енергонасиченим процесом, який включає в себе велику кількість техніки на полі. В зв'язку з цим ґрунт занадто ущільнюється, що є негативним фактором для культурних рослин і мікроорганізмів, які населяють ґрунт. Зменшити негативний вплив техніки на ґрунт можна завдяки використанню нових закордонних бурякозбиральних комбайнів, які за один прохід виконують всі операції по збиранню і очистці коренеплодів, подрібнюють гичку і розкидають по полю. Таким чином, після збирання коренеплодів таким комбайном ґрунт травмується менше, а гичка подрібнюється і рівномірно розкидається по поверхні поля і слугує органічним добривом для послідувочої культури.

Використовуючи дефекат, можна підвищити буферність ґрунту, знизити його активну і потенціальну кислотність, стабілізувати хімічні процеси на рівні, в екологічному відношенні, близькому до оптимального і одночасно збільшити вміст органічної речовини в ґрунті.

Важливим кроком до покращення екологічної ситуації є застосування нового покоління високоефективних пестицидів. Хімічні препарати необхідно застосовувати лише тоді, коли чисельність шкідників перевищує економічний поріг шкодочинності, коли вже неможливо використати біологічний, агротехнічний, механічний та інші методи боротьби зі шкідниками, хворобами та бур'янами.

Враховуючи велике значення природоохоронних заходів, їх виконанню повинна приділятися постійна увага. Дотримуючись таких умов вирощування буряка цукрового можна отримати екологічно безпечну продукцію з найменшим негативним впливом на навколишнє середовище.

ВИСНОВКИ

Метод гаплоїдії – один з перспективних напрямків створення гомозиготних ліній буряка цукрового, так як отримання гаплоїдних рослин і послідовне переведення їх на диплоїдний рівень дозволяють протягом короткого часу отримати гомозиготний селекційний матеріал для ведення селекції на гетерозис.

1. Поєднали біотехнологічний метод з прийомами стимулювання гаплоїдії, шляхом затримання опилення та опилення рослини – донору експланту опроміненим пилком дозволяє підвищити вихід гаплоїдних та гомодиплоїдних форм буряка цукрового.

2. Встановлено, що при використанні культури *in vitro* незапліднених насіннєвих зачатків та виділених насіннєбруньок на 7–9 день цвітіння квітки підвищує вихід гаплоїдних матеріалів буряка цукрового досяг 17 %, а гомодиплоїдних форм до 2,2 %.

3. Стимулювання гаплоїдії опиленням рослини–донора експланту опроміненим пилком дозволив підвищити вихід гаплоїдних форм до 9,2 %, а гомодиплоїдних до 1,1 %.

Розроблені біотехнологічні методи є ефективними для підвищення виходу гомодиплоїдних рослин та отримання гомозиготних ліній буряка цукрового. Вони рекомендуються виробництву до включення в технологічну схему створення вихідних селекційних матеріалів і на їх основі високопродуктивних гетерозисних гібридів даної культури.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бахмат М. І., Ігнатєв М. О. Вітніцький І. А. технологія вирощування, заготівлі, зберігання і переробки буряка цукрового: Навчальний посібник. Кам'янець-Подільський: Абетка Нова, 2003. 296 с.
2. Зозуля О. Л. Мамалига В. С. Селекція і насінництво польових культур. Київ: Урожай, 1993. 416 с.
3. Aflaki F., Pazuki A., Gurel S., Stevanato S., Biancardi E., Gurel E. Doubled haploid sugar beet: an integrated view of factors influencing the processes of gynogenesis and chromosome doubling. *Int Sugar J.* 2017. 119. P. 884–895.
4. Ніцше В., Венцель Г. Гаплоїди в селекції рослин. Київ. 1980. 128 с.
5. 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.
6. Blakeslee A., Berger F., Belling J. Mutation in haploid *Datura*. *A J Heredity.* 1927, 18. P. 193–199.
7. Melzer R., Behrens H.O. Wutzung von inzuehte fun die. Zurkerru benzuchlung. Font schrsftsberichte fur die jadwirtschaft und nakrurgagueterwirtschafte. 1980 BOT 18. № 4. P. 1–14.
8. Lange W. Crosses beturen *Hordeum vulgare* L. and *H bulbosum* L. J. Production morphology and meiosis of hybrids and dihaploids. *Enphytica*, 1971, 20. P. 14–29.
9. Subramanyam N. C., Kasha K. J. Seleective chromosomal etimination during haploid formtion in darley following interspecific hybridization. *Chromosoma (Berl.)*, 1973, 42. P. 111–125.
10. Рябовол Л. О., Парій Ф. М. Вплив рівня плідності донорного матеріалу цукрових буряків на вихід, ріст і розвиток макроструктур з

- насі́ннєвих зачатків. Збірник наукових праць «Вісник примор'я». Одеса, 2002. С. 28–31.
11. Chase S. S. Bruding diploid spesies. Jn.: Kasha K. J. Haploids in higer plants. Univers. Gnelph. 1974. P. 211–230.
 12. Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed.* 1990. P. 177–183.
 13. Chen J. F. Cui L., Malik A. A., Mbira K. G. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 2011. № 3. P. 311–319.
 14. Ferrie A.M.R., Caswell K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011. V. 104. № 3. P. 301–309.
 15. Natarijan A. T., Swaminathan M. S. Haploidy induced by radiations in wheat. – «Experuentia», 1958. 14. № 9. P. 336
 16. Smith H. H. Haploidy in cincorn. jour, ogr. Res. 1946. 73. P. 291–301.
 17. Seaney R. R. Studies on morpology in maise. Doctor diss. Connell Univ., 1955.
 18. Munting A. Characteristics of two haploid twins in Vactulis glomerata. *Hereditas.* 1943, 29. P. 134–140.
 19. Gurel S, Gurel E, Kaya Z (2002) Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Turk J Biol.* 2002. 26. P. 163–170.
 20. Рябовол Л.О., Рябовол Я.С. Підвищення виходу гаплоїдних матеріалів цукрових буряків при використанні генетичних прийомів стимуляції. Матеріали всеукраїнської наукової конференції молодих вчених. Умань, 2008. С. 34–35.
 21. Chen H. Q., Liu H. Y., Wang K., Zhang S. X., Ye X. G. Development and innovation of haploid induction technologies in plants. *Yi Chuan.* 2020. 42(5). P. 466–482.

- 22.Рябовол Л. О. Закономірності спонтанної диплоїдизації гаплоїдного матеріалу цукрових буряків в культурі *in vitro*. Збірник наукових праць. Умань, 2007. Вип. № 65. С. 146–151.
- 23.Славова И. В. Ускорено розмноження на сахарно цвекла. Физиология и растения, 1980. Т. 4. № 1. С. 35–39.
- 24.Рябовол Л.О., Манько А.О., Сливченко О.А. Вплив генотипу на вихід гаплоїдних матеріалів цукрових буряків. Збірник наукових праць. Умань: УСГА, 2000. С. 207–210.
- 25.Рябовол Л.О. Стимуляція гаплоїдії цукрових буряків при використанні біотехнологічних методів. Збірник наукових праць. Умань: УСГА, 2000. С. 210–213.
26. Zhuzhzhhalova T. P., Kolesnikova E. O., Vasilchenko E. N., Cherkasova N. N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii. 2020. P. 40–47.
- 27.Rode A., Hartmann C., Benslimane A., Picard E., Quetier F. Gametoclonal variation detected in the nuclear ribosomal DNA from doubled haploid lines of a spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Cesar). Theor. Appl. Genet. 1987. V. 74, № 1. P. 31–37.
- 28.Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
- 29.Редько В. І., Іщенко І. І. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженню буряка цукрового. ІЦБК: 1997. С. 12.
- 30.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.
- 31.Lv J., Kelliher T. Recent Advances in Engineering of In Vivo Haploid Induction Systems. Methods Mol Biol. 2023. P. 365–383.
- 32.Bosermak N. O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. «Hereditas». 1971. 69. P. 193–204.

- 33.Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2003. С. 223–240.
- 34.Gibson Margarets Dihaploid plant production from ovule cultures of sugar beet. Proc. N.D. Acad Sci. 1987, 41. P. 11.
- 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.Яценко А. О., Небиков М. В., Ещенко О. В. Буряки з пробірки. Буряки цукрові, 2002 . № 6. С.17.
- 37.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.
- 38.Kolesnikova E. O., Donskikh E. I., Berdnikov R. V. Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets.Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii. 2021. 25(8). P. 812–821.
- 39.Kiszcza 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.
- 40.Хохлов С. С. Причини виникнення гаплоїдів. Гаплоїдія і селекція 1976. С. 37.
- 41.Bruun L. Histological and semiquantitative approaches to *in vitro* cellular responses of ovules, embryo and endosperm in sugar beet, *Beta vulgaris* L. Sex. Plant Reprod. 1991. P. 64–72.
- 42.Хохлов С. С. Класифікація гаплоїдів. Гаплоїдія і селекція. Київ 1976. С. 78.
- 43.Goska M., Jassem B., Jazdzewska E. Embryo development from sugar beet ovules in *in vitro* culture. In: Int. Inst. Sugar Beet Research, 53th Winter Congress, Brussels, Feb. 1990. P. 145–154.
- 44.Суханов В. М. Отримання гаплоїдів із генетичних клітин. Гаплоїдія і селекція. Київ, 1988. С. 76.

- 45.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.
- 46.Зубенко В. Ф., Шаповал М. П., Нориця Е. І. Буряки цукрові. Київ: Урожай, 1983 р. 144 с.
- 47.Зубенко В. Ф. Біотехнологічні методи в селекції цукрового буряка. Київ, 1989. 43 с.
- 48.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.
- 49.Мороз П. І., Косенко І. С. Економічні основи природокористування / за редакцією П. І. Мороза: Навчальний посібник, Умань. УДАА, 2001. 456 с.
- 50.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.