

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА

НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЇ В СЕЛЕКЦІЇ ТА НАСІННИЦТВІ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН: ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ І ПРАКТИЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ

За редакцією Т. В. Івченко



УДК: 631.527:635.1/7:631.147

Рекомендовано до друку вченою радою Інституту овочівництва і баштанництва НААН
протокол № 14 від 3 листопада 2021 р.

Рецензенти: В. І. Файт, доктр біологічних наук, заступник директора з наукової роботи
Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннізнавства та
сортівивчення, член-кореспондент НААН

Г. С. Балашова, доктор с.-г. наук, зав. відділом біотехнології, овочевих
культур та картоплі Інституту зрошувального землеробства НААН, професор

С. І. Кондратенко, доктор с.-г. наук, зав. відділом селекції і насінництва
овочевих і баштанних культур Інституту овочівництва і баштанництва НААН

Відповідальні за випуск: Л.А. Терьохіна, О.Д. Вітанов

**“Наукове обґрунтування ефективності методів біотехнології в селекції та
насінництві овочевих рослин: теоретичні основи і практичні результати ”: монографія
за редакцією Т. В. Івченко. Київ: Аграрна наука, 2021. - 200 с.**

Колективом лабораторії генетики, генетичних ресурсів і біотехнології Інституту овочівництва і баштанництва НААН (Т. В. Івченко, Г. В. Мозговська, Т. М. Мірошніченко) обґрунтовано теоретичні аспекти прискорення селекційного процесу застосуванням клітинних технологій *in vitro* та використанням молекулярно-генетичних маркерів; представлено результати практичного вирішення проблеми інтенсифікації селекційного процесу та насінництва сортів і гібридів традиційних (помідор, цибуля ріпчаста, морква, баклажан, кавун, гарбуз, часник) і нішевих (якон, батат) овочевих культур за використання біотехнологічної ланки. Висвітлено питання щодо використання методів ізольованих тканин *in vitro* для подолання таксономічних бар'єрів несумісності та створення джерел стійкості до некротрофних патогенів. Зосереджено увагу на сучасних експериментальних підходах до збереження та розмноження генофонду овочевих культур *ex situ* й аналізу ефективності створення нових ліній методами біотехнології. Представлено стандартизовані методи розмноження генотипів овочевих рослин у культурі *in vitro* й особливості використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації генотипів сільськогосподарських культур.

Для наукових співробітників у галузі сільськогосподарської біотехнології, селекції та насінництва, здобувачів з підготовки третього рівня вищої освіти за спеціальністю 201

«Агрономія», спеціалістів сільського господарства, які цікавляться сучасними
біотехнологіями.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕДМОВА	6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	8
Глава 1. Ботаніко-біологічні особливості овочевих культур (Т. В. Івченко).....	9
Глава 2. Використання клонального мікророзмноження для прискорення селекції та насінництва сортів і гібридів овочевих і баштанних культур (Т. В. Івченко).....	17
2.1 Оптимізація способів прискореного розмноження генотипів овочевих рослин в культурі <i>in vitro</i>	22
2.1.1 Клональне мікророзмноження часнику (<i>Allium sativum</i> L.).....	23
2.1.2 Розмноження інбредних ліній цибулі ріпчастої в культурі <i>in vitro</i>	32
2.1.3 Клональне мікророзмноження цінних селекційних зразків для гетерозисної селекції моркви	36
2.2 Стандартизація методу розмноження генотипів овочевих рослин в культурі <i>in vitro</i>	40
Глава 3. Застосування методів біотехнології у зберіганні генетичних ресурсів овочевих рослин (Т. М. Мірошніченко).....	47
3.1 Способи відновлення схожості насіння колекційних зразків рослин родини Solanaceae Gals. (помідора, перцю, баклажана) в культурі <i>in vitro</i>	54
3.2 Розробка способів розмноження стерильних форм помідора в культурі <i>in vitro</i>	57
3.2.1 Визначення оптимального режиму стерилізації та строків введення первинних експлантатів в культуру <i>in vitro</i>	59
3.2.2 Ефективність клонального мікророзмноження різних експлантатів стерильних форм помідора в культурі <i>in vitro</i>	60
3.3 Біотехнологічні прийоми збереження колекційних зразків часнику (<i>Allium sativum</i> L.).....	63

3.3.1	Визначення умов тривалого депонування активних <i>in vitro</i> колекцій	63
3.3.2	Кріоконсервування колекційних зразків часнику	65
Глава 4. Створення джерел стійкості для селекції овочевих культур в культурі ізольованих клітин і тканин <i>in vitro</i> (Т. В. Івченко).....		72
4.1	Створення джерел стійкості до некротрофних патогенів грибів роду <i>Alternaria</i> Nees ТА <i>Fusarium</i> Link.	78
4.1.1	Створення джерел стійкості моркви до чорної гнилі (<i>Alternaria radicina</i> M.D. et E.) методами клітинної селекції в культурі <i>in vitro</i>	80
4.2	Клітинна селекція помідора (<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.), баклажана (<i>Solanum melongena</i> L.) на стійкість до грибів роду <i>Fusarium</i> Link.	88
4.2.1	Розробка способу створення фузаріозостійкого вихідного матеріалу пасльонових овочевих культур	89
4.3	Спосіб оцінки і добору джерел стресотолерантності помідора для альтернативних технологій	96
Глава 5. Розробка способів подолання постгамної несумісності під час міжвидової гібридизації помідора (<i>Lycopersicon Tourn.</i>), баклажана (<i>Solanum melongena</i> L.), гарбуза (<i>Cucurbita</i> L.) (Г. В. Мозговська)		108
5.1	Розробка прийомів подолання постгамної несумісності помідора <i>Lycopersicon Tourn</i>	111
5.2	Розробка способів культивування зиготичних зародків баклажана (<i>Solanum melongena</i> L.)	118
5.3	Розмноження гібридних рослин гарбуза (<i>Cucurbita</i> L.) в культурі <i>in vitro</i>	120
Глава 6. Методи індукованої гаплоїдії <i>in vitro</i> у селекції овочевих рослин (Т. М. Мірошніченко).....		130
6.1	Способи індукції гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів в культурі <i>in vitro</i>	131

6.2	Застосування методів індукованого андрогенезу і гіногенезу в культурі <i>in vitro</i> для індукції подвоєних гаплоїдів помідора (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) і моркви (<i>Daucus carota</i> L.)	134
6.2.1	Створення лінійного матеріалу помідора (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) методом індукованого андрогенезу <i>in vitro</i>	134
6.2.2	Створення лінійного матеріалу моркви методом індукованого гіногенезу <i>in vitro</i>	141
Розділ 7. Методичні підходи щодо використання технологій <i>in vitro</i> для інтродукції нішевих культур із вегетативним типом розмноження (Г. В. Мозговська)		
7.1	Розробка методичних підходів щодо інтродукції якона (<i>Polymnia sonchifolia</i> Poepp.)	156
7.2	Біотехнологічні способи розмноження генотипів-інтродуцентів батату (<i>Ipomoea batatas</i> L)	166
Глава 8. Молекулярно-генетичні біотехнології в селекції і насінництві овочевих рослин (Т. В. Івченко).....		
8.1	Застосування молекулярних ДНК-маркерів в селекції і насінництві	183
8.2	Використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації генотипів овочевих рослин	187
8.2.1	Використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації сортів цибулі ріпчастої	188
8.3	Стандартизація методу молекулярно-генетичної ідентифікації генотипів овочевих культур	194

ПЕРЕДМОВА

Забезпеченню продовольчої безпеки, з огляду на постійні зміни у глобальних суспільних мегатрендах, таких як глобалізація в контексті covid - 19, диверсифікація споживання овочевої продукції, підвищення технологічної точності виробництва, зміни клімату та навколишнього середовища, прискорення урбанізації, передбачає інтенсифікацію удосконалення селекційних і насінницьких процесів, оскільки сорти та високоякісне насіння – головні елементи сучасних зональних технологій виробництва сільськогосподарських культур.

Ринок насіння овочевих культур в нашій країні та за кордоном характеризується підвищеною конкуренцією, бо рівень урожайності овочів з одиниці площі в 4–10 разів перевищує аналогічний показник зернових культур. У в'язку із суттєвими макроекономічними змінами в галузі овочівництва, різними рівнями інтенсивності виробництва й агротехніки у виробників овочевої продукції лідерами на ринку насіння виступають селекційні фірми. Їх пріоритетом є використання на всіх ланках селекції і насінництва лабораторних методів, серед яких саме методи біотехнології займають лідируюче місце в організації раціональних систем створення гетерозисних гібридів і сортів овочевих культур. Цьому напряму досліджень присвячено роботи закордонних і вітчизняних біотехнологів, у тому числі й фахівців Інституту овочівництва і баштанництва НААН.

У представлений книзі висвітлено розроблені способи прискореного розмноження рослин, генетичної їх стабілізації, створення нового вихідного селекційного матеріалу, перспективного в селекційних програмах. Нові сучасні підходи його ідентифікації є стабільно відтворюваними й апробованими під час проведення біотехнологічних досліджень останніх в інституті десяти років у рамках програми наукових досліджень Національної академії аграрних наук України “Сільськогосподарська біотехнологія” та “Овочівництво і баштанництво”. Обґрунтовано теоретичні підходи

прискорення селекційного процесу застосуванням клітинних технологій *in vitro*, використанням молекулярно-генетичних маркерів. Представлено результати практичного вирішення проблеми інтенсифікації селекційного процесу та насінництва сортів і гібридів традиційних (помідор, цибуля ріпчаста, морква, баклажан, кавун, гарбуз, часник) і нішевих (якон, батат) овочевих культур за використання біотехнологічної ланки. Висвітлено питання щодо використання методів ізольованих тканин *in vitro* для подолання таксономічних бар'єрів несумісності та створення джерел стійкості до некротрофних патогенів. Окрему увагу зосереджено на сучасних експериментальних підходах до збереження та розмноження генофонду овочевих культур *ex situ* й аналізу ефективності створення нових ліній методами біотехнології. Викладено стандартизовані методи розмноження генотипів овочевих рослин у культурі *in vitro* й особливості використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації генотипів сільськогосподарських культур.

Слід зазначити, що наші біотехнологічні дослідження проведено у тісній співпраці з провідними селекціонерами, генетиками, імунологами Інституту та його мережі. Така співпраця сприяла ефективному впровадженню результатів наукових досліджень в селекційні інновації, у тому числі й районовані сорти та гібриди овочевих культур.

Т. В. Івченко

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАП	6-бензиламінопурин
B5	Поживне середовище за Gamborg та ін. (1968)
ГК ₃	Гіберелова кислота
2,4-Д	2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
ЗКЗ	Загальна комбінаційна здатність
ІОБ НААН	Інститут овочівництва і баштанництва Національної академії аграрних наук України
ІО _д К	Індолілолійна кислота
ІО _ц К	Індолілоцтова кислота
МГМ	Молекулярно генетичний маркер
МС-маркер	Мікросателітний маркер
НІР	Найменша істотна різниця
MS	Поживне середовище за Murashige, Skoog (1962)
НО _ц К	λ-нафтилоцтова кислота
НЦГРРУ	Національний центр генетичних ресурсів рослин України
ПЛР	Полімеразно ланцюгова реакція
СКЗ	Специфічна комбінаційна здатність
КФ	Культуральний фільтрат
<i>ex situ</i>	Збереження генофонду рослин створенням банків насіння, меристем, пилку та кріобанків
<i>in situ</i>	Збереження генофонду рослин у природних екосистемах
PVS N	Plant vitrification solution
R ₀ - R _n	Рослини-регенеранти різних поколінь, культивовані <i>in vitro</i> , висаджені в польові умови
SSR	Simple Sequence Repeats
Scp	Помилка середньої величини
Sv	Помилка коефіцієнта варіації
V	Коефіцієнт варіації

ГЛАВА 1. БОТАНІКО-БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

В Україні вирощують близько 80 видів овочевих рослин, які належать до різних ботанічних родин. Продуктовими органами овочів є різні їх частини – листки, черешки листків, плоди, коренеплоди, стеблоплоди, цибулини та інші, в яких накопичуються запасні поживні речовини.

Досліджувані при проведенні біотехнологічних досліджень в ІОБ НААН культури належать до 6 родин: пасльонові (*Solanaceae* Gals.) — помідор, перець, баклажан; цибулеві (*Alliaceae* L.) – цибуля ріпчаста, цибуля шалот, часник; айстрові (*Asteraceae* Dumort.) – якон; селерові (*Apiaceae* Linde.) – морква; гарбузові (*Cucurbitaceae* Juss.) – огірок, кавун, гарбуз, в'юнкові (*Convolvulaceae*) – батат. Більшість із них відносять до класу дводольних рослин і тільки види цибулевих – до класу однодольних.

Овочеві рослини характеризуються широким розмаїттям форм, що виражається в їх відмінностях по габітусу, тривалості життя. Існують класифікації, в яких, з одного боку, об'єднуються близькі за названими ознаками культури, що належать до різних родин, з іншого - всередині культур виділяються життєві форми (морфобіотіпи), значно розрізняються між собою.

У овочевих культур з життєвою формою дуже тісно пов'язані біологічні та господарсько цінні ознаки - тривалість життя, розміри і просторова орієнтація надземних органів і кореневої системи, ритми росту і плодоношення, врожайність і якість продукції, стійкість до несприятливих умов зовнішнього середовища.

Поява нових життєвих форм часто обумовлює більш високий рівень технології. Так, поява детермінантних форм помідора, перцю, огірка дозволило створити сорти з високою скоростиглістю і механізувати збирання. Поява кущових форм гарбуза значно полегшило їх механізований обробіток.

На відміну від представників дикої флори, де життєві форми є результатом пристосування до умов середовища існування, життєві форми культурних рослин здебільшого створюються в процесі селекції і утримуються в подальшому відбором.

Весь життєвий цикл овочевих рослин, їх ріст і розвиток, відбуваються під сукупною взаємодією факторів навколишнього середовища.

Видовий склад овочевих рослин дуже різноманітний, вони по-різному реагують на температурні умови навколишнього середовища. За вимогливістю до тепла В. І. Едельштейн [1] розділив овочеві культури на групи.

До морозо- та зимостійких за цією класифікацією належать цибуля шалот, часник. Ростові процеси у рослин цієї групи можуть розпочинатися за температури 1-5 °С, оптимальною для росту і розвитку є 15-20 °С. Восени та навесні вегетуючі рослини переносять приморозки до 8 – 10 °С.

До групи холодостійких культур входять дворічні рослини – морква, цибуля ріпчаста. Ці культури можуть тривалий час переносити температуру – 1-2 °С, а протягом кількох діб – приморозки до – 3–5 °С. Оптимальна температура для рослин – близько 17-23 °С. За температури вище 25 °С настає компенсаційна точка, коли надходження органічної речовини дорівнює витраті її на дихання. Температура понад 30 °С негативно позначається на розвитку холодостійких рослин.

До групи вимогливих до тепла овочевих культур входять помідор [2], перець [3], баклажан [4], огірок [5], якон [6], батат [7]. Проростання насіння розпочинається за 15-16 °С, оптимальна температура для росту і розвитку – 20-30 °С. Температури нижче 15 °С і вищі за 30 °С небезпечні для процесів запилення та зав'язування плодів. За температури нижче 0 °С рослини гинуть. Компенсаційна точка близька до 40 °С.

Жаростійкими є рослини кавуна [8], гарбуза [9]. Оптимальна температура для їх росту і розвитку – близько 30 °С. Компенсаційна точка настає за температури вище 40 °С. Зниження її до 0 °С спричиняє загибель рослин.

За реакцією на інтенсивність освітлення овочеві культури розділяють на наступні групи: високовимогливі (кавун, гарбуз, помідор, перець, баклажан, огірок); середньовимогливі (часник [10], цибуля ріпчаста [11], морква [12]); невимогливі цибулі ріпчаста, цибуля шалот [13] (під час вигонки на зелень).

Для овочевих рослин суттєве значення окрім інтенсивності освітлення має й його тривалість. Рослини довгого дня (морква, цибуля ріпчаста, часник) в умовах тривалого освітлення починають раніше цвісти й утворювати плоди. Рослини короткого дня (огірок, гарбуз, перець, баклажан, окремі сорти помідора) у початкових фазах росту та розвитку потребують менше освітлення, а у подальшому можуть рости в умовах довгого дня. Окремі рослини (кавун, окремі сорти помідора й огірка) не реагують на зміни довжини дня, тобто нейтральні до неї. Для світлолюбних овочевих культур оптимальна освітленість дорівнює 30-40 тис. лк. Для середньо- і маловимогливих вона знаходиться в межах 20-30 тис. лк. Під час дорощування та вигонки овочевої продукції можна обмежитися мінімальним освітленням (0,5-2 тис. лк)[2].

Всі овочеві культури потребують певних умов водозабезпечення, їх транспіраційний коефіцієнтом, який становить від 300 до 800. Це означає, що на отримання 1 кг сухої речовини овочева рослина витрачає близько 300-800 кг води. Коефіцієнт водоспоживання (кількість води, що витрачається рослиною та ґрунтом на 1 т товарного врожаю) становить від 25 до 300 м³/т. Обидва коефіцієнти свідчать про високу потребу у овочевих рослин у воді. До групи найбільш вимогливих до вологості ґрунту належать огірок. До групи вимогливих відносять цибулю, часник, помідор, перець, баклажан. Помідор характеризується високою спроможністю добувати вологу з шару ґрунту до 0,8 м й економно її витрачати. Дефіцит вологи в ґрунті призводить до масового опадіння бутонів у рослин перцю та баклажана. Менш вимогливими до ґрунтової вологи вважається морква. У неї досить потужна коренева система, здатна добувати вологу з підорного шару. До групи

посуhostійких овочевих культур відносять кавун та гарбуз із сильнорозгалуженою й глибокопроникною кореневою системою. Ці культури споживають багато вологи, але добувають її з глибоких шарів ґрунту і витрачають економно [14].

Під час розробки ефективних поживних середовищ для культивування овочевих рослин у культурі *in vitro* необхідно, в першу чергу, враховувати вимоги культур до елементів мінерального живлення в залежності від видового та сортового складу, фази росту й розвитку, будови кореневої системи. Більшість з них у ювенільній фазі розвитку потребують оптимального рівня таких елементів, як калій, азот і фосфор, мідь, марганець, кобальт.

Суттєво впливає на розвиток овочевих культур і реакція ґрунтового розчину. Більшість рослин добре розвивається на ґрунтах з нейтральною або слабо кислою реакцією (рН – 6,0–6,8) [15]. Це оптимальний показник для цибулі ріпчастої та цибулі шалот. Для помідора, перцю, баклажана, моркви, огірка, гарбуза рН повинна бути не нижчою 5,5.

Отже, для успішного розмноження рослин у культурі тканин і клітин *in vitro* під час розробки протоколів поживних середовищ і умов культивування пробіркового матеріалу необхідно використовувати різні типи експлантів із урахуванням біологічних особливостей досліджуваних культур, стадії їх розвитку. Лише такий підхід забезпечить масову регенерацію пробіркових рослин.

Селекційний процес з будь-якою культурою починається з вивчення способів її розмноження й особливостей біології цвітіння. В онтогенезі овочевих рослин розмноження може відбуватись як за одноразовим (моноциклічним), так і за багаторазовим (поліциклічним) типом. Моноциклічне розмноження характерним для одно- та дворічних рослин, поліциклічне – для багаторічних [16].

Вегетативне розмноження характерне для таких овочевих культур, як часник, цибуля-шалот, якон. Для нього використовують вегетативні органи.

Особливість біології багаторічних овочевих рослин у можливості умовно поділити їх життєвий цикл на великий та малий. Великий цикл – життя рослини від проростання до повного відмирання надземних та підземних органів. Оскільки багаторічні цибулеві рослини (часник та цибуля шалот) морфологічно являють собою “систему послідовно утворюваних поколінь пагонів”, А. В. Кузнецов вважав [17], що під малим циклом в онтогенезі цих рослин слід розглядати цикл життя окремого пагона відновлення. Він розпочинається з моменту утворення відокремленої ділянки меристеми–конусу наростання майбутнього пагона. Далі охоплює внутрішньобрунькову фазу розвитку пагона, його вегетаційний період і відмирання усіх надземних органів, залишаючи вегетативні органи розмноження: зубки, повітряні цибулинки й однозубки, захищені сухими лусками від несприятливих зовнішніх умов.

Недоліком вегетативного способу розмноження рослин є факт передачі від материнської рослини вірусних, бактеріальних, деяких грибних хвороб і нематод. Найбільш визнаним і широко використовуваним способом оздоровлення посадкового матеріалу часнику від вірусної інфекції є культура апікальних меристем *in vitro*. Теоретична основа цього способу – давно визнаний факт: вміст вірусів у рослині зменшується в напрямі до точки росту. Доведено, що окремі зони апікальної меристеми і навіть вся вона вільна від вірусів внаслідок того, що розповсюдження останніх по рослині відстає від швидкого росту апікального купола [18]. Рослини часнику, оздоровлені методом культури меристем, не мають хромосомних порушень, у них хороший фізіологічний стан і висока продуктивність [19].

Більшість овочевих культур розмножуються статевим способом. За способом запилення рослини поділяють на групи: самозапильні, факультативно самозапильні і перехреснозапильні. У помідора, перцю, баклажана насіння може утворюватися як самозапиленням, так і перехресним способом. За звичайних умов, сприятливих для утворення пилку, переважає самозапилення. На півдні України в суху й жарку погоду змінюється будова

квітки (стовпчик маточки знаходиться вище тичинок), через що спостерігається перехресне запилення (найчастіше у перцю, особливо гострого). Також відбувається перезапилення рослин трипсами. Тому цю групу рослин прийнято відносити до факультативно самозапильних культур [20].

До перехреснозапильних (ксеногамних) належить більшість овочевих рослин, які формують насіння від запилення пилком з інших рослин того ж чи інших сортів, а інколи й інших споріднених видів [16]. Вчені багатьох країн повідомляють [21, 22], що на ймовірність запилення в останні роки суттєво впливають кліматичні зміни. Екстремально високі температури в період цвітіння спричиняють стерильність пилку. Крім того, постійно відбувається зміна видового складу комах-запилювачів. Тому за таких умов необхідно корегувати селекційні методи щодо прийомів ізоляції рослин, визначення ефективності загальноприйнятих норм просторової ізоляції селекційного матеріалу.

Овочеві культури характеризуються різними механізмами запобігання попадання свого пилку на приймочку тієї ж квітки.

Значна кількість видів має двостатеві квітки (огірок, гарбуз), які знаходяться на одній і тій же рослині. Г.С. Степанов вважає [23], що на певному етапі еволюції двостатева квітка ставала обмежуючим її фактором, і нові умови середовища почали вимагати удосконалення її функцій шляхом переходу від гермафродитної статевої організації до роздільностатевої. При цьому жіноча квітка могла виникнути в результаті стерилізації андроцея двостатевої квітки, чоловіча – шляхом стерилізації гінецея. Ізоляція та добір могли призвести до корінної зміни сексуального типу рослин, тобто до виникнення екзогенного типу онтогенезу за ознакою статі. На морфологічному рівні це виразилося в неоднаковому розміщенні квіток різних статевих типів на окремих особинах. На культурі огірка й кавуна, наприклад, одержано майже всі статеві типи та вивчено закони наслідування статі. На основі встановлених закономірностей створено форми з практично

жіночими квітами (частково дводомні). Їх використовують материнськими лініями у гібридній селекції [24].

У моркви та цибулі ріпчастої пиляки дозрівають і вивільняють пилок на 2-4 доби раніше моменту, коли приймочка квітки стає сприйнятливою до проростання. У капустяних рослин самозапилення неможливе через явище самонесумісності – неможливість запліднення зав'язі пишком з тієї ж квітки.

Селекційна робота з перехреснозапильними культурами вимагає ретельної ізоляції. З цієї причини селекційний процес у дворічних перехреснозапильних овочевих культур, таких як морква, цибуля ріпчаста, особливою трудомісткий і тривалий. Зокрема, створення гетерозисних гібридів F_1 за допомогою традиційних методів інбридингу та гібридизації потребує майже 15 років [25, 12].

У перехреснозапилюваних рослин обов'язковою умовою створення лінійного матеріалу є переведення його з гетерозиготного стану в гомозиготний, яке за традиційних методів селекції здійснюють шляхом інбридингу. Вже у першому самозапильному поколінні моркви спостерігається значна інбредна депресія: за урожайністю насіння – 72,8 %, за масою коренеплоду – 50,6 %, за довжиною коренеплоду – 23,5 % [26]. За даними М. К. Литвинової, депресія проявляється також через низьку польову схожість, загибель рослин за несприятливих погодних факторів [27]. Зниження імунних властивостей інбредних рослин спричиняє підвищення ураження коренеплодів хворобами під час зберігання – до 78 % у першому та до 45 % у другому поколінні інбридингу [28].

Посилаючись на вище подане, методи прискорення селекційного процесу є особливо актуальними. Нині вони набувають широкого застосування, а їх спектр розширюється. Це, перш за все, біотехнологічні способи, такі як мікророзмноження в культурі *in vitro*, експериментальна гаплоїдія, клітинна селекція та генетична інженерія. Перші три напрями активно розвиваються в Інституті овочівництва і баштанництва НААН, їх

застосовують у практичній селекції овочевих культур із метою підвищення ефективності роботи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Эдельштейн В. И. (1962). Овощеводство. Сельхозгиздат. – 440 с.
2. Болотских А. С. (2005). Энциклопедия овощеводства. – Харьков: Фолио, 799 с.
3. Генофонди перців і їх використання в селекційно-генетичних дослідженнях (2016). За наук. ред. С. І. Корнієнка. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД» – 248 с.
4. Magioli C. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant (2005). Acta bot. Bras. **19**(1):139–148.
5. Корнієнко С. І., Ткали Ю. В., Несин, Н. В., Сергієнко О. В., Кондратенко С. І., Птаха Н. І., Позняк О. В. (2014). Методичні рекомендації з первинного насінництва огірка сорту Ніжинський місцевий: методичні рекомендації. – Х., – 28 с.
6. Тюкавин Г.Б. (2001). Интродукция якону в России. – М., – 271 с.
7. Івченко Т. В., Мозговська Г.В., Віценя Т.І., Баштан Н.О., Мірошніченко Т.М. (2020). Селекція та сучасні технології розмноження і вирощування батату (*Ipomoea batatas* L.): методичні рекомендації. – Вінниця : ТОВ "ТВОРИ" – 44 с.
8. Дютин К.Е. (2000). Генетика и селекция бахчевых культур. – М., – 231 с.
9. Белик В. Ф. (1982). Бахчеводство. - М. : Колос, - 175 с.
10. Барабаш О. Ю., Демкевич Л. І., Мірошніченко Г. І. (1992). Цибуля і часник. – К.: Урожай. – 176 с.
11. Івченко Т. В. (2003). Біотехнологічні та фізіологічні методи в селекції цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «селекція і насінництво». – Харків. – 20 с.
12. Корнієнко С. І., Горова Т. К., Івченко Т. В. (2016). Методологія створення гібридів F₁ моркви на основі ЦЧС. ІОБ НААН. – Х. – 80 с.
13. Біленька О.М., Івченко Т.В., Щербина С.О., Даценко С.М. (2017). Параметри адаптивності форм цибулі шалот за масою цибулини. Овочівництво і баштанництво: міжвідомчий тематичний науковий збірник / Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – Х: ВП «Плеяда». **63**, С. 35-41.
14. Барабаш О. Ю.(1994). Овощеводство. – К.: Высшая школа, 1994. – 374 с.
15. Тараканов Г. И. (1982). Овощеводство защищенного грунта. – М.: Колос. – 303 с.
16. Жук О. Я., Сич. З. Д. (2011). Насінництво овочевих культур: навч. посіб. – Вінниця: Глобус-ПРЕС. – 450 с.
17. Кузнецов А. В. (1954). Чеснок культурный. – М.: Сельхозиздат. – 117 с.
18. Тюкавин Г. Б. (1987). Получение безвирусного чеснока. Плодоовощное хозяйство. **4**. – 63 с.
19. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Эрдель К. (1986). Борьба с вирусными болезнями растений. – М.: Агропромиздат. – 480с.
20. Старих Г. А. , Пивоваров В. Ф., Носова Л. Л, Гончаров А. В. (2011). Селекция и семеноводство овощных культур: учебное пособие. – М.: ФГБОУ РГАЗУ – 84 с.
21. Lamarque J.-F., Kyle G. P. , Meinshausen M. et al. (2011). Global and regional evolution of short-lived radiatively-active gases and aerosols in the representative concentration pathways. Climatic Change. **109** (1-2):191–212.
22. Groisman P. Y. , Knight R. W. , Easterling D. R. et al. (2005). Trends in intense precipitation in the climate record. Journal of Climate. **18** (9):1326–1350.
23. Степанов Г. С. (1997). Разнокачественность репродуктивных органов у основных половых типов однодомной конопли. Доклады Россельхозакадемии. **6**:12–14.

24. Сергієнко О. В., Радченко Л. О., Солодовник Л. Д. (2015). Нові геноеційні лінії огірка корнішонного типу для використання в гетерозисній селекції. Селекція і насінництво: міжвід. темат. наук. зб. – X., **107**:189–196.
25. Сергієнко О. Ф., Горова Т. К. (2006). Інцухт-депресія у ліній моркви першого покоління на рослинах вегетативного періоду онтогенезу. Селекція і насінництво: міжвід. темат. наук. зб.. **93**:128–138.
26. Erhard W. (1980). Untersuchungen zur Linienerhaltung bei Speisemohren. Tagungsber Akad. Landwirtschaftswiss. **168**:421–430.
27. Литвинова М. К. (2001). Морковь – *Daucus carota* L. (биологические особенности, селекция и семеноводство, агротехника возделывания). – Пенза. – 144 с.
28. Тимин Н. И. (1986). Методические особенности создания мужски стерильных и мужски фертильных линий моркови для гетерозисной селекции. Научно-технический бюллетень ВАСХНИЛ. – С. 19–23.

ГЛАВА 2. ВИКОРИСТАННЯ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ДЛЯ ПРИСКОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЇ ТА НАСІННИЦТВА СОРТІВ І ГІБРИДІВ ОВОЧЕВИХ І БАШТАННИХ КУЛЬТУР

Одним із ефективних напрямів застосування клітинних технологій *in vitro* в селекції і насінництві сільськогосподарських культур є клональне мікророзмноження, яке за своєю сутністю аналогічне вегетативному типу розмноження рослин з тією лише різницею, що відбувається в пробірках, в умовах *in vitro* [1-2].

Технології мікророзмноження в культурі ізольованих тканин і органів широко використовуються нині для масового прискореного розмноження в комерційних лабораторіях, а також у селекції та насінництві багатьох видів рослин, у тому числі й овочевих.

Великомасштабне комерційне розмноження рослин методами культури ізольованих клітин і тканин вперше проведено в США. Впродовж останніх тридцяти років цей напрям активно розвивався і зараз займає одне з провідних місць у світі серед сучасних агротехнологій. Впродовж 1986 - 1993 рр. світове виробництво пробіркових рослин щорічно збільшувалось на 50%. В 1993 р. воно становило 663 млн, а в 2007 р. – 950 млн. рослин. Через підвищену конкуренцію на ринку садивного матеріалу комерційні фірми постійно оптимізували статті витрат на клонування в культурі *in vitro*, зберігаючи при цьому основну перевагу методу вегетативного розмноження – швидке виробництво високоякісного, однорідного за всіма параметрами посадкового матеріалу, вільного від хвороб і шкідників [3]. У середині дев'яностих років минулого століття промислове клональне мікророзмноження перемістилось з європейських розвинених країн до країн Південно-Східної Азії, Центральної Америки, Індії, створивши нові

можливості в глобальній торгівлі садивним матеріалом для виробників, власників розсадників і забезпечивши суттєве зниження витрат через економію коштів на заробітну плату й енергоносії [4].

Головні пріоритети клонального мікророзмноження рослин у порівнянні з традиційними методами розмноження детально викладено в роботах Р. Г. Бутенко [5, 6]. Однією із основних переваг цієї технології є високий, порівняно з традиційними методами, коефіцієнт розмноження, який залежить від генотипу донора, його фізіологічного стану (фази розвитку), розміру вихідного експлантату та його біологічної компетенції [7].

Відомо кілька методів мікророзмноження, при цьому вибір його значною мірою обумовлюється морфогенетичними особливостями культивованих тканин і органів рослини та конкретними завданнями селекції й насінництва. Частіше застосовується метод активації розвитку вже існуючих на рослині меристем, який дозволяє з максимальною вірогідністю отримувати матеріал, генетично ідентичний вихідному [8]. Застосування клонального мікророзмноження в культурі *in vitro* дозволяє не тільки в багато разів підвищити коефіцієнт розмноження та прискорити традиційний селекційний процес за рахунок швидкого розмноження цінних генотипів і сортів часнику, картоплі ранньої, цибулі шалот, а й може бути ефективним заходом оздоровлення садивного матеріалу від вірусів, віроїдів, мікоплазм, шкочочинність яких сягає 10-50 % [9-11]. У деяких випадках метод культури меристем доповнюють термо- та хіміотерапією [8, 12-15]. Розмір меристем впливає на ефективність оздоровлення генотипів від вірусної інфекції. Серед апікальних меристем картоплі розміром 0,2 мм (конус наростання апекса з одним листовим зачатком) лише 10 % були вільними від Х-вірусу, 70% – від Y-вірусу картоплі. З цієї причини надається перевага експлантатам менших розмірів (0,075-0,1 мм) приймаючи до уваги, що вони більш вимогливі до умов культивування. Серед деяких видів рослин високу ефективність виявили й інші методи розмноження в культурі *in vitro*, зокрема індукція прямого морфогенезу з тканин експлантатів або індукція пагонів (ембріоїдів)

з калусних культур [16]. Однак за прямого і, особливо, непрямого морфогенезу не виключається ймовірність виникнення соматклональної варіабельності, тому ці методи можна використовувати тільки для видів з дуже низьким рівнем мінливості в культурі тканин [17].

В селекції та насінництві клональне мікророзмноження використовують для розв'язання наступних завдань:

- швидке розмноження безвірусного матеріалу;
- підтримання та розмноження унікальних малочисельних і цінних генотипів,
- швидке розмноження нових сортів (до декількох тисяч рослин протягом місяців, тоді як за використання традиційних методів необхідно кілька років);
- розмноження рослин із вегетативним типом розмноження та стерильних генотипів [6].

У провідних селекційних центрах впродовж останніх 20-и років широко використовують також метод вегетативного розмноження в культурі *in vitro* для створення та підтримання батьківських ліній [18]. Переваги біотехнологічного способу клонального розмноження селекційного матеріалу порівняно зі статевим полягають у:

- одержанні з соматичних тканин десятків і сотень копій вихідної рослини, дібраної селекціонером за певними параметрами;
- розмноженні рослин у лабораторних умовах безперервно протягом року;
- депонуванні цінних генотипів *in vitro* впродовж кількох років, не застосовуючи їх польового розмноження.

Метод клонального мікророзмноження дозволяє з індивідуально дібраних екземплярів швидко одержати клони генетично ідентичних рослин та значно розширити спектр гібридних схрещувань із їх участю. Термін створення ліній за такою схемою становить 7 років, тоді як традиційний метод створення чоловічих стерильних ліній моркви, заснований на інбридингу та зворотних схрещуваннях, потребує майже 12 років [19].

Рослини часнику, оздоровлені методом культури меристем, звільнені від хромосомних порушень, мають хороший фізіологічний стан і високу продуктивність [20].

Застосування технологій клонального мікророзмноження засвідчило свою ефективність і в розв'язанні проблем гібридної селекції на стерильній основі для розмноження та відтворення стерильних форм. Використання стерильних ліній спрощує технологію отримання гібридного насіння за рахунок скорочення ручної праці. Живцювання в культурі *in vitro* уможливорює розмноження та відтворення стерильних форм, проведення пошуку відновлювачів і закріплювачів стерильності [21-24].

Під час вибору методу клонального мікророзмноження рослин ураховують вплив генетичних, фізіологічних, гормональних і фізичних факторів. Це пов'язано з тим, що розроблена технологія отримання мікроклонів для одного виду рослини не завжди підходить для інших методів мікророзмноження і, тим більше, не може бути застосована для рослин іншого виду. На розмноження в пробірці впливають: генотип, вік вихідної рослини, сезонність ізоляції, а також розмір первинних експлантатів; з гормональних чинників – співвідношення цитокинінів й ауксинів, склад поживного середовища; з фізичних – кислотність середовища, умови освітлення [25], а також температурний режим і відносна вологість повітря.

Завдяки застосуванню клонального мікророзмноження, в НДІ картоплярства НААН оздоровлено майже 70 сортів картоплі, щорічно розмножують до 30 тис. пробіркових її рослин [26]. Також в Україні метод клонального мікророзмноження в культурі *in vitro* активно використовують у хмелярстві, виноградарстві, для розмноження декоративних і лікарських рослин. Проте більш широкий його розвиток стримують не високі коефіцієнти регенерації та виникнення соматоклональної мінливості на рівні спонтанних генних і хромосомних мутацій, висока собівартість розмноження матеріалу.

Незважаючи на масштабні дослідження з розробки методів клонального мікророзмноження, проведені в нашій країні і за кордоном, ми

не виявили інформації щодо способів застосування пробіркових клонів у ланці селекція – насінництво овочевих культур. Також відсутні стандартизовані методики розмноження рослин у культурі *in vitro*, що негативно впливає на якість і однорідність розмноженого матеріалу. Потребує уваги і питання аналізу рентабельності використання клонального мікророзмноження в селекції і насінництві овочевих культур за різних рівнів матеріального оснащення біотехнологічних лабораторій, а також визначення ефективних способів адаптації пробіркових рослин до умов *in vivo*.

2.1 Оптимізація способів прискореного розмноження генотипів овочевих рослин в культурі *in vitro*

В останні роки в Україні у сільгоспвиробників різних форм власності спостерігається сталий попит на насінневий матеріал таких вегетативно розмножуваних овочевих рослин як часник, різні види цибулевих культур. Згідно традиційної технології їх розмноження здійснюється за допомогою вегетативних органів або їх частин методом клонового добору. Цей спосіб розмноження не відповідає сучасним вимогам з двох основних причин: низький коефіцієнт розмноження та постійне накопичення на посадковому матеріалі фітопатогенів – грибів, бактерій та вірусів. Використання ураженого вихідного матеріалу в селекції та насінництві ставить під загрозу виродження навіть нових сортів, створених у нашій країні методом клонового добору. Віруси, потрапивши в рослину, суттєво змінюють типовий для даного сорту обмін речовин і стають причиною зниження урожайності (на 30 –50 %) та погіршення якості насінного матеріалу. [27, 28].

Для широкого введення в теорію та практику виробництва сучасного методу розмноження овочевих рослин у культурі *in vitro*, за використання якого можливо істотно поліпшити ситуацію в країні, нами оптимізовано елементи методик прискореного розмноження затребуваних ринком комерційних генотипів.

2.1.1 Клональне мікророзмноження часнику (*Allium sativum* L.)

Розмноження овочевих рослин методами *in vitro* є основою для ведення селекційної і насінницької роботи. Використання сучасного біотехнологічного методу прискорює розмноження цінних генотипів і уможливорює збереження колекційного рослинного матеріалу незмінним. Для вирішення проблем селекції зі створення, розмноження та збереження вихідного матеріалу проведено дослідження з оптимізації методики клонального мікророзмноження часнику.

Вивчено декілька послідовних етапів клонування рослин часнику, а саме: добір експлантів і фітогормонального складу поживних середовищ, розмноження та укорінення пробіркового матеріалу, адаптація до умов *in vivo*.

Досліджено вплив фітогормонального складу поживного середовища на індукцію пагонів і підібрано оптимальні середовища для культивування апікальних меристем, виділених з зубків часнику (MS з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л ІОцК) і з повітряних цибулин (MS, модифіковане 0,1 мг/л 6-БАП і 1 мг/л ІОцК) (рис. 2.1). Недоліком цього виду експланту є значні витрати часу на виділення меристем та низький коефіцієнт розмноження (1:1).

Основний метод, використаний при клональному мікророзмноженні – це активація розвитку вже існуючих у рослині меристем, який базується на усуненні апікального домінування. Цього можна досягнути видаленням апікальної меристеми стебла (рис. 2.2) з наступним мікроживцюванням пагонів *in vitro* та додаванням в поживне середовище фітогормонів цитокінінової дії, які індукують розвиток чисельних пазушних пагонів.

Відновлення росту меристем часнику на індукційних середовищах візуально спостерігалось на 7-10-й день культивування. Розвиток відбувався за типом прямого органогенезу [рис. 2.3].

Кращі результати з культивування апікальних меристем зубків забезпечило середовище MS, модифіковане регуляторами росту БАП (0,5мг/л) і ІОцК (0,1мг/л), на якому середня довжина пагона через 60 діб становила $75,13 \pm 2,90$ мм, кількість листків – $3,10 \pm 0,18$ шт. (табл. 2.1).

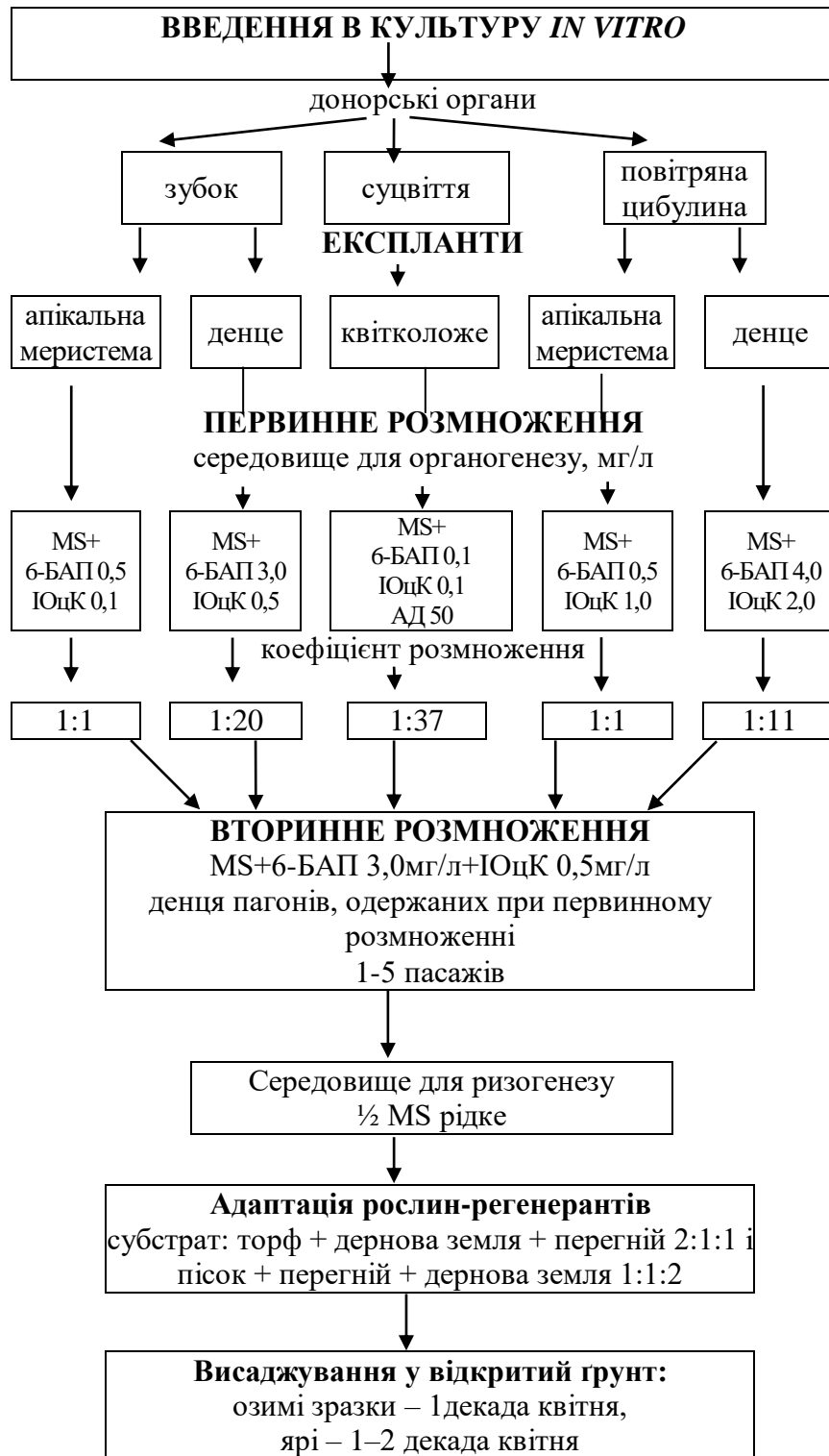
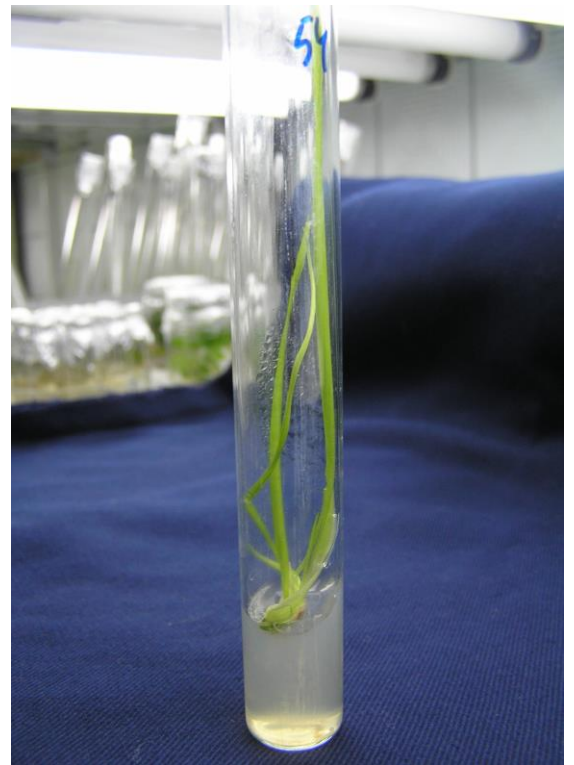


Рис. 2.1 Схема клонального мікророзмноження рослин часнику *in vitro*.



2.1 Апікальна меристема часнику виділена з зубків



2.2.Мікро пагін часнику одержаний з апікальної меристеми



2.3 Меристематичні зони (шматочки денця) цибулі ріпчастої висаджені на індукційні середовища для регенерації адвентивних пагонів



2.4 Індукція мікро пагонів з меристематичних зон тканин молодих суцвіть часнику

Таблиця 2. 1 – Вплив вмісту регуляторів росту в поживному середовищі MS на розвиток апікальних меристем часнику сорту Дюшес після 60-ти діб культивування

Регулятори росту (мг/л)	Коефіцієнт розмноження	Довжина пагона, мм	Кількість листоків, шт.
Апікальні меристеми зубків			
Без регуляторів росту (контроль)	1,0	15,40±1,5	2,23±0,2
Кінетин (0,5) + ІОцК (0,1)	1,0	59,33±3,6	2,90±0,1
БАП (1,0) + НОцК (0,5)	1,0	54,83±2,2	2,67±0,2
БАП (1,0) + ІОцК (0,5)	1,0	57,23±1,7	3,03±0,2
БАП (0,5)+ ІОцК (0,1)	1,0	75,13±2,9	3,10±0,2
НІР ₀₅		4,3	0,4
Апікальні меристеми з повітряних цибулинок			
Без регуляторів росту (контроль)	1,0	42,8±1,5	2,2±0,1
Кінетин (0,5) +ІОцК (0,1)	1,0	62,5±3,5	2,9±0,2
БАП (1)+ ІОцК (0,5)	1,0	70,5±2,1	3,0±0,2
БАП (0,1) + ІОцК(1,0)	1,0	76,3±1,7	3,0±0,2
НІР ₀₅		15,7	0,41

На середовищах модифікованих більш високими концентраціями цитокінінів (> 1 мг/л), спостерігали пригнічення відростання листків й їх деформацію. На безгормональному середовищі MS показники довжини пагона та кількості листків були істотно нижчими – 15,40±1,53 мм і 2,23±0,16 шт. відповідно.

Оптимальні умови для відновлення та росту меристем часнику, виділених із повітряних цибулинок, забезпечило модифіковане середовище MS із додаванням 0,1мг/л БАП і 1мг/л ІОцК, на якому довжина пагона становила 76,3±1,7 мм, кількість листків – 3,0±0,2. На безгормональному середовищі MS довжина пагонів на момент обліку становила 42,8±1,5 мм, а середня кількість листків дорівнювала 2,2±0,1 шт. Результати дисперсійного аналізу засвідчили суттєвий вплив на розвиток апікальних меристем складу поживних середовищ ($F_{фак.} > F_{теор.}$ для даної ознаки).

Результати культивування апікальних меристем часнику дозволили нам зробити висновок, що меристеми з повітряних цибулинок є більш зручним

експлантатом, ніж меристеми з зубків, бо отримані з них рослини-регенеранти утворювалися на безгормональному середовищі та характеризувалися високими параметрами росту без додаткового культивування на середовищі з ауксинами. Крім того, застосування в якості первинних експлантів апікальних меристем з повітряних цибулинок забезпечує можливість оздоровлення рослин від фітопатогенів, а також є кращим матеріалом для тривалого зберігання колекційних зразків за умов криогенних температур. Недоліком цього виду біоматеріалів є значні витрати часу на виділення меристем та низький коефіцієнт розмноження (з одного зубка можна отримати одну апікальну меристему) [29]. Тому для розробки прискорених способів клонального мікророзмноження часнику в культурі *in vitro* оцінено ефективність застосування інших меристематичних тканин часнику – донець зубків і повітряних цибулинок, молодих суцвіть (рис. 2.4). Упродовж застосування всіх означених типів біоматеріалу інтенсивне утворення пагонів на індукційних середовищах спостерігали на 10-15-у добу. На першому етапі розмноження на експлантатах утворювалися численні дрібні пагони.

Позитивний регенераційний відгук із тканин донець зубків часнику було забезпечили всі варіанти з використанням у поживних середовищах високих концентрацій БАП (2–3 мг/л). Найвищі результати індукування мікропагонів із меристематичних тканин зубка виявили на середовищі MS, модифікованому 3мг/л БАП і 0,5мг/л ІОцК, на якому 100% експлантатів утворювали конгломерати пагонів у кількості $16,0 \pm 1,0$ шт./експлантат (табл. 2.2). Під час культивування біоматеріалу часнику на середовищах з 1 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОцК регенерація була відсутня.

Встановлено також вплив вмісту регуляторів росту в індукційних середовищах на показники регенерації мікропагонів з меристематичних тканин донець повітряних цибулинок. Максимальну кількість пагонів із

Таблиця 2. 2 – Рівень регенерації та кількість пагонів із меристематичних тканин денця зубка, повітряних цибулинок і суцвіть часнику сорту Дюшес через 30 діб культивування залежно від вмісту регуляторів росту у середовищі MS

Регулятори росту (мг/л)	Кількість пагонів шт./експлантат	Рівень регенерації, %
1	2	3
Денце зубка		
MS+ БАП (3,0) (контроль)	11,3±1,0	83,3
MS+ БАП (3,0) +1,5мг/л НОцК	7,9±0,3	96,7
MS+ БАП (2,0) + НОцК (1,0)	9,9±0,4	73,3
MS+ БАП (3,0) + ІОцК (0,5)	16,0±1,9	100
MS+ БАП (1,0) + ІОцК (0,5)	0	0
НІР ₀₅	5,1	3,1
Денце повітряних цибулинок		
MS+ БАП (3,0) (контроль)	7,7±0,5	86,7
MS+ БАП (1,0) + НОцК (0,5)	0	0
MS+ БАП (3,0) + ІОцК (1,5)	5,9±0,4	93,3
MS+ БАП (4,0) + ІОцК (2,0)	10,9±1,3	100,0
НІР ₀₅	5,9	2,0
Квітколоже молодих суцвіть		
MS+ БАП (3,0) (контроль)	33,4±1,5	100
MS+ БАП (3,0) + ІОцК (0,5)	34,1±0,9	100
MS+ БАП (2,0)	33,3±1,0	100
MS+ БАП (3,0) + ІОцК (0,5)	31,6±0,7	100
MS+ БАП (0,1) + ІОцК (0,1)+ аденін (50)	37,1±3,9	100
НІР ₀₅	2,9	

одного експлантату отримано на середовищі MS з додаванням 4 мг/л 6-БАП і 2 мг/л ІОцК – 10,9±0,7 шт. Регенераційний відгук у даному варіанті спостерігався в 100% експлантатів. Загалом у всіх варіантах середовищ із

підвищеною концентрацією БАП (від 2 до 4 мг/л) спостерігали позитивний регенераційний відгук на модифікацію середовища цитокінінами. На середовищах з 1 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОцК регенерація також була відсутня. Одержані результати уможливають зробити висновок про ефективність використання тканини денця повітряних цибулинок для мікророзмноження часнику. Їх формування відбувається в надземній частині рослини, завдяки чому даний тип біоматеріалу менш забруднений, ніж зубки, формування яких проходить у ґрунті. Позитивним є факт тривалості використання цього типу експлантату, яка становить близько 10 місяців.

Високою регенераційною здатністю у досліді характеризувались і тканини квітколожа молодих суцвіть часнику, використання яких у якості донорського матеріалу уможливлювалось завдяки наявності на квітколожі в основі квіток і повітряних цибулинок меристематичних зон. Максимальну кількість пагонів забезпечило середовище MS з додаванням 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІОцК та 50 мг/л аденіну – $37,1 \pm 0,9$ шт. експлантатів. Враховуючи вимогу до методу клонального мікророзмноження, яка полягає в збереженні генетичної стабільності клонованого матеріалу, даний варіант, забезпечуючи високий коефіцієнт розмноження на середовищі з мінімальним вмістом регуляторів росту, можна рекомендувати для застосування під час розмноження комерційних генотипів часнику. Модифікація поживного середовища MS більш високими концентраціями регуляторів росту не сприяла підвищенню виходу рослин регенерантів із тканин суцвіть.

Пагони, утворені на експлантатах із молодих суцвіть, добре укорінювалися після відокремлення від основного експлантату на безгормональному середовищі MS і не потребували модифікованого середовища. Отже, у часнику на молодому суцвітті формуються із експлантатів на поживних середовищах з мінімальною концентрацією регуляторів росту диференційовані пагони. Недоліком даного типу біоматеріалу є досить коротка тривалість використання – 1–2 тижні [30].

Попередніми дослідженнями встановлено, що на регенераційний потенціал рослин в культурі *in vitro* суттєво впливає генотип експлантату. Розроблену нами модифікацію поживного середовища (MS + 3мг/л БАП+0,5мг/г ІОЦК) апробована під час розмноження п'яти колекційних зразків НЦГРУ та чотирьох зразків біотехнологічної колекції, представлених ярими й озимими формами часнику (табл.2.3). За стандарт

Таблиця 2. 3 – Вплив генотипів на регенераційну здатність експлантатів денця зубка часнику через 60 діб культивування

Зразок (№ за каталогом)	Регенерація, %	Отримано пагонів із зубка, шт.	Довжина пагона, мм
Озимий сорт Дюшес G-4 (стандарт)	100	19,6±1,2	104,9±3,6
Озимий, ІУ 022582	94	12,0±0,4	121,0±3,1
Озимий, ІУ 022595	100	15,2±0,4	117,2±2,6
Ярий, ІУ 116/99	94	16,4±0,8	110,3±0,9
Озимий, ІУ 26320	94	8,4±0,4	115,7±1,7
Озимий, ІУ 26325	100	9,2±0,8	105,4±2,8
Озимий, G-2	100	13,6±0,8	109,0±1,5
Озимий, G-25	100	8,0±0,9	115,0±3,0
Ярий сорт Мануйлівський, G-3	100	20,4±3,2	111,5±2,1
	НІР ₀₅	4,5	

використовували сорт Дюшес, з біоматеріалом якого у попередні роки ми розробляли склад поживних середовищ для клонального мікророзмноження.

На 60-у добу культивування тканин денець зубків на поживному середовищі на експлантатах усіх 9 генотипів спостерігалось пагоноутворення. Середня кількість пагонів із одного зубка у різних генотипів варіювала з 8,0±0,9 до 20,4±3,2 шт./зубок. Найвищу

пагоноутворювальну здатність отримано від донець сортів Дюшес – $19,6 \pm 1,2$, Мануйлівський – $20,4 \pm 1,2$ та часнику ярого ІУ 116/99 – $16,4 \pm 0,8$ шт. / зубок. Найнижчий коефіцієнт розмноження був у зразка часнику озимого G-25 – $8,0 \pm 0,1$ штук з одного зубка. Отримані результати уможливають зробити висновок, що розроблена нами модифікація середовища MS 3мг/л БАП+0,5мг/г ІО_цК забезпечує стабільну індукцію мікропагонів на різних генотипах часнику. Її можна рекомендувати для прискореного клонального мікророзмноження комерційних генотипів.

Важливим елементом у біотехнологічному циклі є адаптація рослин-регенерантів, отриманих *in vitro*, до умов вирощування *in vivo*. Етап адаптації до умов *in vivo* є досить складним для багатьох культур. Більшість труднощів пов'язано зі слабким розвитком судинної системи, а також зі швидким в'яненням рослин-регенерантів після видалення з культуральної ємкості. Вважається що в'янення – наслідок зменшення епікутикули на поверхні листка і ненормального функціонування продихів. Результатом нездатності продихів до нормального функціонування в умовах *in vitro* може бути і аномальний розвиток стінок їх замикаючих клітин. Зміна умов культивування, спричинена зниженням рівня вологи та підвищенням інтенсивності освітлення, призводить до втрати тургору в адаптованих пробіркових рослин. У нових умовах культивування – *in vivo* у рослин-регенерантів формуються нові листки з нормально розвиненими продихами [31, 32].

В досліді з адаптації застосовували рослини-регенеранти, які мали 5–7 листків, довжиною 120–150 мм і 4–5 первинних корінців. Період адаптації тривав до 20 діб. Потім рослини підрощували протягом 30 діб з тим, щоб отримати добре розвинені рослини, здатні адаптуватися до польових умов.

Виявлено вплив складу субстрату на життєздатність і ріст акліматизованих рослин часнику. Істотне збільшення частки життєздатних рослин і довжини листків отримано на субстратах, що містили перегній + дернова земля + пісок (співвідношення 1:2:1) і торф + перегній + дернова земля (2:1:1). Кокосовий субстрат виявився придатним для короткотривалого

виросування часнику (до 20 діб).

Досліджуючи строки висаджування рослин-регенерантів у відкритий ґрунт, використано озимий сорт часнику Дюшес і ярий сорт Мануйлівський. Істотно збільшувалась кількість дозрілих цибулин при висаджуванні озимого сорту у 1 декаді квітня, ярого – у 1–2 декаді квітня (табл. 2.4).

Середня маса отриманих цибулин озимого зразка становила $24,9 \pm 5,1$ г, кількість зубків – $6,1 \pm 0,4$ шт., ярого – відповідно $6,3 \pm 0,9$ г і $5,8 \pm 0,2$ шт.

Виявлено, що не всі строки висаджування рослин-регенерантів у

Таблиця 2. 4 – Вплив строків садіння рослин - регенерантів часнику в ґрунтові умови на прояв морфологічних ознак цибулин покоління R₁

Строк Садіння	Дозрілих цибулин, %	Маса, г	Діаметр, см	Висота, см	Кількість зубків, шт.
Озима форма – сорт Дюшес					
I декада Квітня	100	$24,9 \pm 3,1$	$3,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,4$
II декада Квітня	$57,9 \pm 9,3$	$12,3 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0$
III декада Квітня	$38,9 \pm 2,3$	$5,8 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0$
Яра форма – сорт Мануйлівський					
I декада Квітня	100	$6,3 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$
II декада Квітня	100	$2,9 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$
III декада Квітня	$80,3 \pm 6,9$	$1,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,05$

відкритий ґрунт забезпечували формування цибулин. Так, за висаджування у 2–3 декаді квітня і в більш пізні строки значна частина рослин озимого сорту не дозрівала, у кінці літа на початку осені у таких рослин продовжувалося наростання вегетативної маси, взимку рослини вимерзали. Отримані результати уможливають рекомендувати висаджувати адаптований пробірковий часник лише за ранніх строків висадки матеріалу в ґрунтові умови – у 1 декаді квітня.

2.1.2 Розмноження інбредних ліній цибулі ріпчастої в культурі *in vitro*. Традиційний спосіб створення вихідного матеріалу для селекції цибулі ріпчастої, перехреснозапилювальної культури, полягає в гібридизації між собою неспоріднених сортів, які є джерелами господарсько-цінних ознак, і проведенні серед отриманих гібридів індивідуальних доборів кращих сімей [35]. Недоліком даного способу є факт, що створений матеріал вирізняється недостатньою генетичною константністю, а його стабілізація за сукупністю господарських ознак потребує тривалого часу. Для генетичної стабілізації матеріалу добори рослин кращих сімей піддають самозапиленню, внаслідок чого отримують інбредні лінії. Хоч традиційний спосіб уможливує створення генетично константного матеріалу, але через низьку зав'язуваність насіння на самозапилюваних рослинах, що є наслідком автостерильності, він низькорезультативний. Розроблений нами “Спосіб створення інбредних ліній цибулі ріпчастої” [36] ґрунтується на тому, що рослини-регенеранти пробіркового клону, отримані з однієї цибулини мають тотожний генотип і схрещування їх між собою фактично є самозапиленням. Однак на відміну від самозапилення рослин власним пилом, яке використовують за стандартної технології, під час перезапилення ідентичних між собою рослин-регенерантів, отриманих з однієї цибулини, прояву автостерильності не відбувається. Процедура клонального мікророзмноження відбувалась упродовж 6 пасажів. Еталоном у досліді використано цибулини комерційного гібрида *Densyti F₁* (Італія), надалі – б. к. *Ds*, який у колекційному розсаднику стабільно перевищував районовані гібриди за показниками врожайності (65 т/га), товарності (90 %), вирівняності цибулин (95-97 %) і лежкості після 9 місяців зберігання. Для клонального розмноження використано цибулини двох індивідуальних доборів: б. к. *Ds/1* – сухі луски цибулин жовтого кольору, соковиті – кремового; б. к. *Ds/2* – сухі луски цибулин червоно-коричневого кольору, соковиті – білого, які добирали з потомства *F₂* гібрида *Densyti F₁*.

Висаджені на регенераційні середовища вихідні експлантати – денця цибулин забезпечували різний регенераційний відгук. Кількість сформованих

мікропагонів залежала від діаметра вихідних цибулин і від генотипу. З цибулин R₁ добору б. к. Ds/1 мали в середньому 11,2 ± 3,5 шт. експлантатів-регенерантів, а з цибулин R₁ добору б. к. Ds/2 – 7,2 ± 4,4шт. Усі одержані в результаті проведення дослідів пробіркові рослини після адаптації в першій декаді травня висадили в ґрунтові умови, де їх вирощували впродовж 11 тижнів (травень - серпень).

Порівняльний аналіз морфологічних ознак цибулин після збирання врожаю вихідного гібрида Densyti F₁ (еталон), гібрида F₂ (контроль), та цибулин покоління R₀, розмнужених у культурі *in vitro* індукцією з тканин денця засвідчив, що застосування клонування в культурі *in vitro* дозволяє розмножувати індивідуальні добори рослин зі стабільним індексом форми.

Індекс форми (відношення висоти цибулини до її ширини) у гібрида Densyti F₁ і створених на його основі цибулин пробіркових клонів не мали значних відмінностей (табл. 2.6). У цибулин генотипу б.к. Ds/1 варіабельність становила 2,77 %, у б.к. Ds/1– 2,5 %, тоді як у вихідного гібрида Densyti F₁ цей показник дорівнював 4,6±0,5 %. У цибулин б.к. Densyti F₂ варіабельність була дещо вищою – 9,3 ±0,9 %. Вирівняність цибулин покоління R₁ становила 97,5 – 97,7 %, тоді як у вихідного гібрида вона була 95,4 %, а у рослин гібрида F₂, розмнуженого традиційним способом – 90,7 %. Пробіркові рослини з обох доборів сформували цибулини масою 169,4 ± 7,1 г (б. к. Ds/1) і 127,7 ± 9,8 г (б.к. Ds./2). Позитивним також є факт, що всі одержані з пробіркових рослин цибулини R₁ зберігали ознаки вихідних донорських цибулин за кольором сухих і соковитих лусок. Отже клональне мікророзмноження уможливорює швидко одержати з індивідуально дібраних екземплярів клони генетично ідентичних рослин цибулі ріпчастої, їх наявність дозволяє значно розширити спектр гібридних схрещувань, а також збільшити вихід насіння з однієї комбінації за рахунок збільшення кількості рослин, задіяних у кожній комбінації схрещувань, та подолання негативної дії автостерильності.

Таблиця 2.6 – Морфологічні ознаки цибулин вихідних гібридів і рослин покоління R₁, розмножених у культурі *in vitro* індукцією з тканин денця індивідуальних доборів F₂

Вихідний генотип	Діаметр цибулини, см	Індуковано мікропагонів, шт.	Ширина, (a), см	Висота (h), мм	Індекс цибулини a/ h	Маса цибулини, г
Densyti F ₁ (еталон)	-	-	5,5±0,3	5,5±0,2	1,0±0,2	135,3±9,1
				V, %	4,6±0,5	
				B, %	95,4	
Densyti F ₂ (контроль)	-	-	5,5±1,2	6,0±2,0	0,92±0,2	127,9±21,3
				V, %	9,3±0,9	
				B, %	90,7	
<i>In vitro</i> матеріал						
Б. к. Ds.1/ 1	3,5	13	6,5±0,01	6,5± 0,02	1,0	160,5±9,3
Б. к. Ds.1/ 2	3,2	7	7,7±0,02	7,0±0,03	1,1	179,0±8,3
Б. к. Ds.1/ 3	3,8	12	8,5±0,01	8,0±0,03	1,06	185,4±9,9
Б. к. Ds.1/ 4	4,0	16	7,5±0,01	6,5±0,02	1,15	170,3±8,5
Б. к. Ds.1/ 5	3,9	15	6,0±0,03	6,0±0,01	1,0	148,3±7,9
Б. к. Ds.1/ 6	3,0	4	7,5±0,02	7,0±0,03	1,07	172,7±9,0
Середнє	3,6±0,5	11,2±3,5	7,3±0,02	6,8±0,02	1,03	169,4±7,1
				V, %	2,77	
				B, %	97,7	
Б. к. Ds.2/ 1	4,0	10	6,5±0,02	6,5 ±0,02	1,0	161,0 ±10,1
Б. к. Ds.2/ 2	3,2	2	4,0±0,03	4,0 ±0,02	1,0	60,5 ±11,3
Б. к. Ds.2/ 3	3,8	8	6,5± 0,03	6,5 ±0,03	1,0	162,6 ±9,4
Б. к. Ds.2/ 4	3,7	9	6,0±0,02	6,0± 0,04	1,0	154,1 ±10,7
Б. к. Ds.2/ 5	4,1	11	4,5± 0,02	4,5 ±0,03	1,0	62,8 ±8,3
Б. к. Ds.2/ 6	3,5	3	7,3± 0,04	7,0 ±0,04	1,03	165,4± 9,0
Середнє	3,7±0,4	7,2±4,4	5,8± 2,6	5,6 ±0,03	1,02	127,7± 9,8
				V, %	2,5	
				B, %	97,5	

2.1.3 Клональне мікророзмноження цінних селекційних зразків для гетерозисної селекції моркви. Селекція гетерозисних гібридів моркви через дворічний цикл розвитку і перехресне запилення є набагато складнішою за сортову селекцію. Вона потребує створення і підтримання великої кількості одно- та двокомпонентних інбредних ліній. Тому методи прискорення селекційного процесу є особливо актуальними. Нині вони набувають широкого застосування і їх спектр розширюється. Це, перш за все, біотехнологічні способи, такі як мікророзмноження в культурі *in vitro*, експериментальна гаплоїдія, клітинна селекція та генетична інженерія. Перші три напрямки активно розвиваються в Інституті овочівництва і баштанництва НААН, їх застосовують у практичній селекції моркви з метою підвищення ефективності процесу. Біотехнологічні дослідження та статистичний аналіз отриманих даних виконують згідно з існуючими методиками [5, 19].

Метод клонального мікророзмноження дозволяє швидко одержати з індивідуально дібраних екземплярів клони генетично ідентичних рослин, та значно розширити спектр гібридних схрещувань з його участю. Термін створення ліній за такою схемою становить 7 років, тоді як традиційний метод створення чоловічостерильних ліній моркви, заснований на інбридингу та зворотних схрещеннях, потребує близько 12 років.

Одним з важливих напрямків селекційної роботи з морквою в Інституті овочівництва і баштанництва НААН є створення чоловічостерильних ліній на основі вітчизняних сортів Нантська харківська, Оленка та Шантене сквирська, що мають високі господарські та біохімічні властивості [37]. Нами розроблено нову прискорену селекційну схему, яка базується на створенні лінійного матеріалу з використанням методу культури ізольованих тканин (рис. 2.7).

Використання клонування *in vitro* значно підвищило ефективність індивідуального добору, тому що дозволило гарантовано розмножити цінні рослини, тоді як без мікророзмноження відібрані генотипи могли бути втраченими внаслідок ураження хворобами та рекомбінації при статевому розмноженні. Наявність кількох ідентичних рослин дало можливість значно збільшити вихід

насіння з кожної комбінації схрещувань та збільшити кількість схрещувань чоловічостерильних форм з метою добору закріплювачів стерильності та гібридизації. Адже при штучному запиленні однієї рослини моркви вихід насіння часто є недостатнім для подальшої роботи, а іноді – зовсім відсутній.



Рис. 2.7. – Схема створення ЦЧС ліній моркви за допомогою мікроклонування.

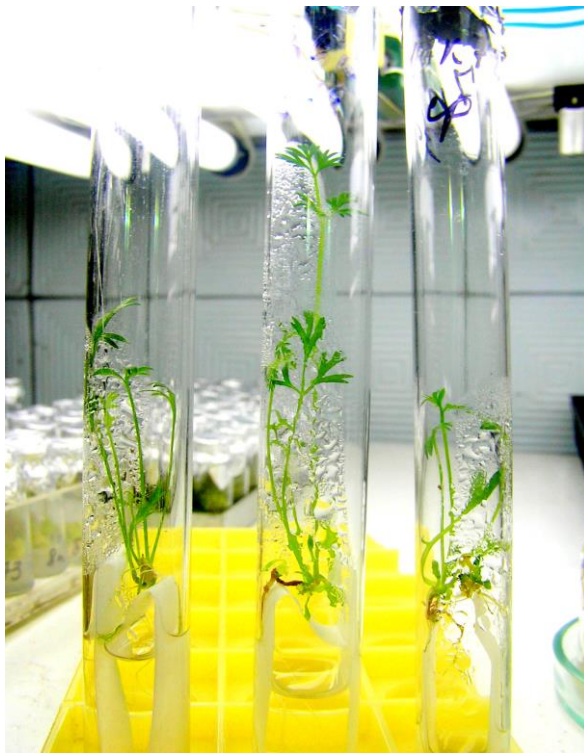
Реалізація поставлених завдань не була б можливою без розробки надійної та доступної технології клонування *in vitro* селекційних зразків моркви [38], яка б забезпечила ефективне репродукування індивідуально дібраних рослин та депонування найбільш цінних калюсних клонів упродовж тривалого часу. До основи розробленої нами методики покладено оптимізований спосіб індукції непрямого соматичного ембріогенезу (рис. 2.8).



Калюсні тканини, отримані з коренеплодів моркви



Регенерація соматичних ембріодів з калюсів моркви



Підросування соматичних ембріодів моркви на рідкому живильному середовищі



Адаптація рослин-регенерантів моркви в умовах *ex vitro*

Рис 2.8. – Етапи мікророзмноження моркви шляхом соматичного ембріогенезу

Для введення до культури *in vitro* з кожної рослини відбирали по одному зонтику першого чи другого порядку, що не завдавало шкоди насінникам і дозволило зберігати їх для проведення необхідних схрещувань. Експериментально визначено оптимальний склад живильного середовища для індукції соматичного ембріогенезу у калюсній культурі моркви. Він є універсальним для більшості генотипів (патент № 77741) [39]. Оптимізований метод забезпечив високий коефіцієнт розмноження і високу стабільність одержаних рослин-регенерантів. Спосіб підвищує утворення соматичних ембріодів у калюсній культурі моркви і може бути застосованим з метою мікроклонального розмноження рослин для селекційних, насінницьких та науково-дослідних потреб.

Установлено, що оптимальними середовищами для індукції калюсу з тканин суцвіть моркви є поживні середовища B5 та MS доповнені 1,0 мг/л 2,4-Д та 1,0 мг/л кінетину.

Для субкультивування калюсів моркви можна рекомендувати застосування середовищ B5S та B5 з умістом регуляторів росту 2,4-Д та кінетину по 0,2 мг/л.

Оптимальним середовищем для індукції соматичного ембріогенезу моркви визначено безгормональне середовище MS з підвищеним вмістом хлориду кальцію (MSC).

Кращим живильним середовищем для одержання рослин з соматичних ембріодів моркви *in vitro* є середовище $\frac{1}{2}$ B5 з концентрацією хлориду кальцію 170,0 мг/л без регуляторів росту.

За даним напрямом було розмножено у культурі *in vitro* 14 індивідуальних селекційних доборів, серед яких шість генотипів мали чоловічу стерильність типу петалоїд і оптимально розвинуті насінневі кущі, шість генотипів були дібрані у фазі коренеплоду за підвищеним вмістом β -каротину, один зразок являв собою добір на жорсткому фоні у фазі чотирьох справжніх листків і один генотип був добром у калюсній культурі, стійким проти чорної гнилі (*Alternaria radicina*). Більшість із них походили з сорту

Нантська харківська, який має відмінні смакові якості та циліндричну форму коренеплоду, найбільш придатну для переробних технологій.

Усі розмножені в культурі *in vitro* рослини було залучено до гетерозисної селекції моркви в ІОБ НААН. За наведеною вище схемою створено лінії сортотипів Нантська, Шантене, Геранда, серед яких: Мона, Мрія, Марічка та ін., які відзначаються стабільно високим проявом чоловічої стерильності на рівні 95 – 100 %, фертильні лінії – Юнона та Настуся.

До НЦГРРУ передано лінії моркви з чоловічою стерильністю – Мона, Марічка, Мрія та фертильна лінія Настуся.

2.2. Стандартизація методу розмноження генотипів овочевих рослин у культурі *in vitro*

Високі вимоги в насінництві до розмноженого в культурі *in vitro* біоматеріалу передбачають застосування в практичній роботі стандартизованих методик. Стандартизація є одним із найактуальніших елементів сучасного механізму управління якістю виконання робіт, оптимального ресурсозбереження за дотримання необхідних умов і вимог техніки безпеки та захисту навколишнього середовища. Мета розробки стандарту ДСТУ 7645:2014 “Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження “ полягала у встановленні оптимальних вимог до методу прискореного вегетативного розмноження овочевих рослин (часнику, різних видів цибулевих та ін.) в культурі *in vitro*. Застосування в овочівництві стандартизованого методу прискореного розмноження рослин у культурі *in vitro* уможливить ведення селекційної та насінницької роботи з вітчизняними сортами, розмножуваними відповідно до загальноприйнятих світових стандартів [33].

Стандарт апробовано за розмноження клону часнику озимого UL00010, який виділився за продуктивністю та зимостійкістю, але був неоднорідним за морфологічними показниками цибулин. Розмножували

перспективний генотип з дібраний методом індивідуального добору цибулин. Розмноження проводили активізацією мікропагонів із меристем зубків на поживному середовищі MS, модифікованому регуляторами росту 0,5мг/л БАП і 0,1мг/л ІОцК. Для додаткового розмноження денця рослин-регенерантів упродовж 4 пасажів культивували на середовищі MS із додаванням 3мг/л БАП і 0,5мг/л ІОцК. За аналізом біометричних параметрів розвитку рослин оцінено та дібрано 250 кращих рослин. У квітні 2008 р. за використання розроблених нами методичних прийомів укорінено, адаптовано рослини-регенеранти та висаджено їх у відкритий ґрунт. У липні того ж 2008 р. з адаптованих рослин одержано 250 однозубок нової Лінії G-25 (№ біотехнологічного каталогу), які висадили 1.10.2008 р. для подальшого розмноження та селекційної оцінки. Впродовж 2009-2011 рр. матеріал розмножували за загальноприйнятою для культури часнику технологією.

Середня маса цибулини Лінії G-25 становить 71,0 г і значно перевищує стандарт за аналогічним показником 50,5 г (табл. 2.5). Загальна урожайність нової лінії більше за стандарт на 42,3 %, а вихідної форми – на 29,6 %. Товарність цибулин нової Лінії G-25 складає 98 % і перевищує стандарт на 8%, вихідну форму – на 10 %. Перспективну Лінію G-25 після розмноження передано для впровадження в селекційний процес в ІОБ НААН.

Таблиця 2. 5 – Характеристика зразків часнику за господарсько-цінними ознаками

Зразок	Урожайність		Товарність %	Середня маса цибулини, г	Тривалість вегетаційного періоду, діб
	т/га	% до st			
Дюшес, st	7,1	-	90	50,5	100
Вихідна форма 00010	9,2	129,6	88	65,0	105
Лінія G-25	10,1	142,3	98	71,0	105
НІР ₀₅	0,48				

З метою активного використання результатів біотехнологічних досліджень у селекційній та насінницькій роботі з культурою часнику нами визначено ефективність використання методів біотехнології для прискореного розмноження місцевих його форм та розроблено інноваційну схему одержання оздоровленого садивного матеріалу (рис. 2.9).

За нашими розрахунками, при умові застосування розробленої схеми, з 1 кг часнику за 1 рік в культурі *in vitro* можна отримати до 10 тис. пробіркових рослин. Після їх дорощування в умовах плівкової теплиці з квітня по липень можна мати майже 50 тис. посадкових зубків вихідного генотипу. Наступного року з висадженого під зиму матеріалу вже буде зібрано 4 млн. штук повітряних цибулин та 1 т однозубки (добазового садивного матеріалу), які можна передати опорним насінницьким пунктам для подальшої насінницької роботи.

Згідно з методикою визначення економічної ефективності [34], етап клонального мікророзмноження найбільш капіталоємкий і становить 73,3%. У структурі собівартості отриманої продукції основними статтями витрат є заробітна плата – 50,6 %, електрична енергія й опалення – 23,0 %, матеріали й обладнання – 22,0 %, мінеральні добрива – 3,5 %. Оцінка ефективності реалізації запропонованого проекту свідчить, що термін його окупності становитиме 1 рік, починаючи з третього року освоєння. Індекс прибутковості – 1,5.



Рис. 2.6. Інноваційна схема одержання оздоровленого посадкового матеріалу часнику на основі методів біотехнології

Література

1. Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* **31**:597–620.
2. Мартощук О. М. (2006). Біотехнології як інноваційний розвиток Овочівництва. *Аграрний вісник Причорномор'я*. **36**:103–107.
3. Biotechnology in Agriculture, Forestry and Fisheries - FAO's Policy and Strategy. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Електронний ресурс], Rome, Italy. – Режим доступу: <http://www.fao.org/docrep/V4845E/V4845E02.htm#Biotechnologyinagriculture,forestryandfisheries> FAO' spolicyandstrategy
4. How appropriate are currently available biotechnologies in the crop sector for food production and agriculture in developing countries. [Електронний ресурс], Electronic forum on biotechnology in food and agriculture: Conference 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy Режим доступу: <http://www.fao.org/biotech/Conf1.htm>
5. Бутенко Р. Г. (1999). Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС. – 160 с.
6. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. (2003). Біотехнологія рослин. – Київ : Поліграф консалтинг. – С. 465–474.
7. Митрофанова И. В. (2011). Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрна наука. – 344 с.
8. Егорова Н. А., Бугара А. М., Ермилова А. М. (1998). Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры ткани. *Труды ИЭЛР*. – **24**:98–110.
9. Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Ежов В. Н. и др. (2012). Выявление фитопатогенов в садово-парковых агроценозах и биотехнологические пути оздоровления вегетативно размножаемых декоративных и плодовых культур. Материалы междунар. конф., посвящ. 80-летию Центрального бот. сада НАН Беларуси. Минск, II часть. С. 423–427.
10. Yamashita K., Sakai J., Hanada K. (1996). Characterization of a New Virus from Garlic (*Allium sativum* L.), Garlic Mite-borne Mosaic Virus. *Ann. Phytopathool. Sooc. Jpn.* **62**:483–489.
11. Пешков С. А. (2000). Оздоровление и микроразмножение в культуре *in vitro* селекционноценных клонов и сортов чеснока. Материалы Международной научно-практической конференции «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке». – **2**:134–135.
12. Тюкавин Г. Б. (1987). Получение безвирусного чеснока. *Плодоовощное хозяйство*. **4**:63.
13. Трускинов Э. В. Рогозина Е. В. (1997). Оздоровление клоновой коллекции картофеля в культуре ткани. *Физиология растений*. – **44**(3):432–439.
14. Мілкус Б.Н. Конуп О. Л. (2004). Вірусні і бактеріальні хвороби винограду на Україні. Х з'їзд Товариства мікробіологів України: Збірник тез доповідей 15–17 вересня 2004 – Одеса. – С. 257.
15. Балашова Г. С. (2010). Проблеми насінництва картоплі на півдні України в умовах зрошення. *Зрошувальне землеробство*. **54**:187–190.
16. Митрофанова И. В. (2007). Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур: автореф. дис. на соискание науч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология»/ И. В. Митрофанова. – Ялта, – 40 с.

17. Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* **62**:3713– 3725.
18. Корнієнко С. І., Горова Т. К., Івченко Т. В. та ін. (2016). Методологія створення гібридів F₁ моркви на основі ЦЧС. ІОБ НААН. – Х. – 80 с.
19. Івченко Т.В. (2013). Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro*: методичні рекомендації; підгот.: Т. В. Івченко, С. І. Корнієнко, С. І. Кондратенко та ін. – Х.: Пляяда, 2013. – 47 с.
20. Gimenez MD, Yañez-Santos AM, Paz RC, Quiroga MP, Marfl CF, Conci VC, García-Lampasona SC (2016). Assessment of genetic and epigenetic changes in virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by meristem culture followed by *in vitro* propagation. *Plant Cell Rep* **35**:129–141.
21. Мірошніченко Т. М., Самовол О. П., Івченко Т. В. (2018). Клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* стерильних генотипів томата. Методичні рекомендації. Селекційне : ІОБ НААН, 15 с.
22. Сергієнко О.Ф. (2005). Створення чоловічостерильних компонентів для гібридів F₁ моркви на основі сучасних методів біотехнології : дис. канд. с.-г.н. : 06.01.05 «селекція і насінництво». – Х., – 148 с.
23. Кильчевский А. В., Добродькин М. М., Пугачева И. Г., Добродькин А. М., Исаков А. В. (2010). Результаты изучения гетерозисных гибридов томата, созданных при участии фертильных и стерильных форм. *Овощеводство: сборн. научн. Трудов.* **17**:264–272
24. Тимофеева О. А., Невмержицкая Ю. Ю. (2012). Клональное микро размножение растений: учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский университет. – 56 с.
25. Генетические основы селекции растений. (2012). Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / За ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, –3. 489 с.
26. Олійник Т. М., Слободян К. А., Шевченко О. О. (2012). Методичні рекомендації. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем // Ін-т картоплярства НААН. Немішаєве. – К.:ТОВ «КВІЦ». – 28 с.
27. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Эрдель К. и др. (1996). Борьба с вирусными болезнями растений. – М.: Агропромиздат. – 480с.
28. Мирошніченко Т. Н., Самовол А. П., Івченко Т. В. (2015). Особенности длительного культивирования пробирочных растений отдаленных гибридов томата. *Овощи России.* 1(26):20–26.
29. Івченко Т. В., Віцєня Т. І., Гончаров О. М., Урюпіна Л. М. (2013). Використання культури апікальних меристем для прискороного розмноження місцевих форм часнику. *Вісник Харківського аграрного університету.* **5**:179–183.
30. Івченко Т. В., Віцєня Т. І., Шабєтя О. М. (2007). Клоування рослин *Alliaceae* L., які розмножуються вегетативним способом, в культурі *in vitro*. *Овочівництво і баштанництво.* **53**:103–109.
31. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови / Г. Б. Тюкавин. Под. ред. Пивоварова В. Ф. – М. : ВНИИССОК РАСХН, 2007. – 479 с.
32. Пат. №83840 UA, МПК А01N 27/00, А01N 43/34, А01N 63/04, А01N 3/00, А01N 59/00, А01P 21/00 (2007.12) Спосіб підвищення адаптації до умов *in vivo* клонально мікророзмножених *in vitro* пробіркових рослин картоплі і цибулі ріпчастої: патент на винахід / Дульнев П.Г., Івченко Т.В., Чернищенко Т. В., Яровий Г. І., Могильна О. М.; заявник і патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u20022108200; заявл. 16.10.2002; опубл. 10.12.2007, бюл. № 20.
33. ДСТУ 7645:2014 Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження *in vitro* / Т. В. Івченко, В. Ю. Гончаренко, О. М. Гончаров, Г. І.Яровий, Т. І. Віцєня. – [Чинний від 2015–01–01]. – Київ: Держспоживстандарт України – 21с. – (Національний стандарт України).
34. Ульянченко О.В., Яровий Г. І., Рудь В. П. та ін. (2001). Визначення економічної ефективності результатів науково-дослідних робіт в овочівництві: методичні

рекомендації: ХНАУ ім. В. В. Докучаєва.– 27 с.

35. Ali M. A., Dowker B. D., Currah L Munford ., P. W. (1984). Floral biology and pollen viability of parental lines of onion hybrids. *Ann. Appl. Biol.* **104**:167–174.

36. Пат. № 79688 UA, МПК А01Н 1/04 (2006.01) Спосіб створення інбредних ліній цибулі ріпчастої : патент на корисну модель / Тимчук В. М., Тимчук С. М., Івченко Т. В.; заявник та патентовласник В. М. Тимчук. – № u2012 13223; заявл. 20.11.2012, опубл. 25.04.2013, Бюл. № 8.

37. Сергієнко О. Ф. Ракшеєва Л. І. , Горова Т. К. (2003). Використання методів культури ізольованих тканин в селекції чоловічостерильних ліній моркви. Селекція і насінництво. **87**:56 – 63.

38. Сергієнко О. Ф., Баштан В. Б., Горова Т. К. (2004). Методика мікроклонування селекційних зразків моркви. – Мерефа : ІОБ УААН. – 12 с.

39. Пат. 77741 Україна, МПК (2006) А01Н 4/00, С12N 5/04. Живильне середовище для одержання соматичних ембріодів у калюсній культурі моркви *in vitro* / Сергієнко О. Ф., Ледовський С. Я., Горова Т. К. ; заявник і патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва УААН. – № 20040706346 ; заявл. 30.07.2004 ; опубл. 15.01.2007. Бюл. №1, 2007.

РОЗДІЛ 3. ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЇ У ЗБЕРІГАННІ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН

Інтенсифікація виробництва овочевої продукції значною мірою залежить від потенційних можливостей генотипів. Цінні генетичні джерела – національне надбання, використання якого в селекції дозволяє створювати конкурентоздатні сорти і гібриди. Основний спосіб підтримання різноманіття генофонду полягає у створенні колекцій та збереженні їх *ex situ*.

Одна із актуальних проблем, які виникають під час підтримання в живому стані сортозразків рослин у колекціях генбанків – втрата життєздатності насіннєвим матеріалом в процесі зберігання, що спричиняє втрату частини генофонду [1]. Насіннєвий фонд необхідно регулярно оновлювати шляхом вирощування колекційних зразків у ґрунтових умовах. Така робота потребує великих земельних ділянок та значних затрат праці. Проте погодні умови не завжди дозволяють отримати насіння у достатній кількості та належної якості, особливо інтродукованих видів. Крім того, можливість обміну генофондом при вирощуванні у відкритому ґрунті обмежена через можливий ризик перенесення різноманітних хвороб [2 – 7]. Існують також колекційні зразки, які неможливо або вкрай важко зберегти у вигляді насіння. Це стосується, насамперед, вегетативно розмножуваних рослин, таких як картопля, часник, деякі види багаторічних цибуль тощо, а також мутантних форм, наприклад, зразків з чоловічою стерильністю [8, 9].

З метою зниження матеріальних витрат на вирощування, запобігання втраті зразків від хвороб та спрощення їх обміну, вкрай необхідна розробка інноваційних способів тривалого зберігання колекцій. Важливими та ефективними методами збереження рослинного різноманіття є використання біотехнологічних підходів, а саме методів культури *in vitro* та кріоконсервації [2, 4, 10, 11]. Основні інструменти, які надає біотехнологія для збереження генетичного різноманіття овочевих рослин, показані на рис. 3.1.



Рис. 3.1. Схема збереження біорізноманіття овочевих рослин з використанням методів біотехнології

Ідею щодо можливості тривалого підтримання та зберігання рослин у культурі *in vitro* вперше було висунуто у Франції вченим Морелем на початку другої половини минулого століття. В 70-х роках того ж століття в результаті розробки й використання методу культури апікальних меристем колекції *in vitro*, які склались із оздоровлених сортів культурних рослин, стали виникати в багатьох країнах світу. Сьогодні в них представлено селекційні сорти й клони культивованих рослин, а також їх аборигенні окультурені та дикоростучі види, зібрані в місцях природних ареалів

поширення. Так, лише колекція *in vitro* ВІР (Росія) нараховує нині понад 600 зразків [12, 13].

Використання методів культури тканин є оптимальним в роботі з видами рослин, які мають ускладнене розмноженням *in situ* й *ex situ*, та при масовому виробництві цінних колекційних генотипів, або для рослин представлених в одиничних екземплярах. Культивування рослин у стерильній культурі досить надійно ізолює зразки від патогенів, що дає істотну перевагу перед польовими колекціями, в яких відбувається виродження через нагромадження вірусних та інших інфекцій. Колекції *in vitro* дуже компактні порівнянно з польовими і потребують мінімальної площі для розміщення. Компактність і ізольованість зразків *in vitro* дуже зручна для інтродукції і обміну, оскільки запобігає перенесенню карантинних об'єктів [14, 15].

Розвиток біотехнології забезпечив створення нових категорій гермоплазми, таких як клони з елітних генотипів, стерильні лінії, клітинні лінії з певними цінними ознаками та генетично трансформований матеріал [16, 17].

Для розмноження та збереження активних колекцій *in vitro* використовують депонування в умовах нормального чи уповільненого росту. Зберігання в умовах нормального росту не відрізняється від традиційного способу клонального мікророзмноження рослин. Для його практичної реалізації необхідне регулярне пересаджування пробіркових рослин на свіжі поживні середовища, забезпечення стабільних умов культивування (температури, освітленості, складу поживних середовищ) [18]. Перевага надається способам регенерації, які виключають формування калусних тканин, забезпечуючи при цьому найбільшу генетичну стабільність мікропагонів [19]. Оскільки частота мутацій в культурі *in vitro* має пряму залежність від швидкості поділів клітин, для запобігання ризику генетичних змін слід максимально дотримуватись умов культивування, які сприяють тривалому збереженню ознак об'єкта й цілісності його геному. Культивування

колекційних зразків за стандартних умов температури на середовищах, які забезпечують високу швидкість розмноження пробіркового матеріалу, зазвичай здійснюють для сезонного накопичення пробіркових рослин перед їх садінням навесні у ґрунтові умови [20].

Для середньострокового зберігання колекційних зразків матеріал культивують *in vitro* в умовах повільного (обмеженого) росту («slow growth»). Метою застосування цього методологічного підходу є уповільнення росту культур і збільшення інтервалів між субкультивуваннями [9, 21], а також підвищення ступеня безпеки зберігання культур внаслідок зменшення кількості фізичних втручань у систему і мінімізації можливості зараження матеріалу при субкультивуванні [22]. Існує цілий ряд публікацій про успішне застосування низької температури для тривалого збереження рослинного матеріалу. Кожному конкретному виду рослин визначають оптимальну температуру культивування, а далі обирають лімітуючі значення температури, які не зашкоджують матеріалу. Даний прийом дозволяє істотно знизити інтенсивність ростових процесів, а температурний фактор до того ж сприяє уповільненню висихання поживного середовища та зниженню можливості ураження рослинного матеріалу бактеріальними інфекціями, ймовірність якого підвищується під час пересаджувань [23 – 25].

Ефективним способом індукції повільного росту є зміна складу регуляторів росту у середовищі, або додавання до середовища осмотично активних речовин (манітол, сорбітол), які створюють ефект водного стресу, що уповільнює ріст культур [26, 27]. Ще один ефективний метод зниження швидкості росту пробіркового матеріалу – модифікація складу поживних середовищ ретардантами (абсцизовою кислотою, хлормекватхлоридом, гідразидмалеїновою кислотою та ін.) [28 – 31]. Застосування вказаних прийомів вирішує завдання збереження клонового матеріалу в культурі *in vitro* без впливу на його життєздатність. Депонування зменшує також можливість виникнення соматональних варіантів і забезпечує зниження витрат ресурсів на підтримання пробіркового матеріалу. В Україні вчені активно

використовують у роботі колекції пробіркових рослин картоплі [32]. Проте встановлено, що зразки оздоровлених сортів можна безперервно культивувати *in vitro* не більше трьох років за умови періодичного вірусологічного та мікробіологічного контролю їх стану і суворого дотримання всіх вимог технології вирощування картоплі *in vitro* [33].

Найбільш складним і одночасно найбільш перспективним способом довгострокового зберігання гермоплазми є криозберігання, тобто консервація за ультранизьких температур. Цей спосіб має істотні переваги, оскільки дозволяє виключити такі процеси, як виснаження запасних речовин, нагромадження токсинів, розпад і активацію ферментативних комплексів, самоокислення ліпідів, деградацію функціональних і генетичних систем та інші біохімічні й біофізичні процеси, пов'язані зі старінням клітин [34, 35].

Важливою умовою успішного кріоконсервування є запобігання утворенню кристалів льоду всередині клітин на етапі охолодження до -196°C [36, 37]. Цього можна досягти комбінацією високих швидкостей заморожування й використанням рослинних об'єктів з низьким вмістом води у тканинах [35, 38 – 40]. Виникненню великих кристалів у клітинах запобігає попередня обробка тканин кріопротекторами [41, 42]. Сучасні методи кріоконсервування різняться між собою швидкістю охолодження матеріалу. Основні з них: метод повільного програмного заморожування [43], вітрифікації [44 – 46] та методи надшвидкого заморожування [35, 47].

Основним об'єктом кріоконсервації для більшості рослин є насіння. Але існують виключення, наприклад, культури з вегетативним розмноженням. Оптимальним вихідним матеріалом для кріозаморожування таких колекційних зразків слугують меристематичні тканини, оскільки їх використання дозволяє уникнути трудомістких операцій живцювання й контролю морфогенезу [48]. Важливим є і факт, що регенеровані з меристем рослини характеризуються генетичною стабільністю. До того ж вони краще переносять заморожування до ультранизьких температур, бо мають дрібні клітини, у яких відсутні великі вакуолі [31, 49, 50].

Істотно впливають на результат кріоконсервування розмір і стадія розвитку меристем, які виділяються з рослин, культивованих *in vitro*. Згідно з даними Н. Takagi та ін. (1997), кращі результати забезпечувало заморожування меристем, які складались з апікального купола і декількох примордіальних листків. Наприклад, апекси таро (*Calocassia esculenta*) з розмірами 0,5 – 0,8 мм, що містили 1-2 пари примордіальних листків, ефективніше дегідратувалися вітрифікуючими розчинами й активніше відновлювалися після кріоконсервування, ніж апекси більших розмірів [51]. Апекси без примордіальних листків найкраще витримували заморожування, але впродовж подальшого культивування не мали достатнього регенераційного потенціалу для розвитку. Е. Келлер [52, 53] на культурі часнику визначив, що меристеми *Allium sativum* L. маленьких розмірів не відновлювали ріст після кріоконсервування, на відміну від апексів середнього і великого розмірів. Апікальні меристеми банана (*Musa* spp.) з апікальним куполом і частково розвиненими листковими примордіями, також забезпечували кращі показники життєздатності під час культивування та кріоконсервування, ніж апекси з нерозвиненими або повністю розкритими примордіальними листками [51].

Більш результативним методом для кріозберігання колекційних зразків виявилась вітрифікація, яка передбачає дегідратацію клітин до заморожування шляхом витримування у вітрифікуючих розчинах і/або висушування повітрям з наступним надшвидким заморожуванням [35, 39]. В результаті такої обробки знижується ймовірність формування внутрішньоклітинного льоду.

Застосування вітрифікуючих розчинів вважається одним із можливих шляхів успішного низькотемпературного консервування біологічних об'єктів зі збереженням високого рівня життєздатності. Високі концентрації проникаючих кріопротекторів (гліцерин, 1,2-пропандіол, етиленгліколь) впливають на процеси затвердіння при зниженні температури, внаслідок чого досягається склоподібний стан. У кріоконсервуванні методом вітрифікації

при використанні вітрифікуючих розчинів (plant vitrification solution - PVS) все частіше використовують високі концентрації кріопротекторів для кріоконсервування. Для запобігання їх токсичного впливу на меристематичні клітини попередньо культивують апекси на середовищі, збагаченому сахарозою чи сорбітом. Такий захід дозволяє підвищити життєздатність багатьох видів рослин після кріоконсервування [18, 31, 44, 54, 55]. Проте ще досі не розкрито механізми реакції біологічних об'єктів на дію високих концентрацій кріопротекторів, які характеризуються різними фізико-хімічними властивостями і, перш за все, різною проникною здатністю та токсичністю.

Таким чином, технології кріозберігання рослинних об'єктів, розвивається й постійно вдосконалюється. Вже сьогодні кріобанки можуть значно спростити роботу селекціонерів, надаючи їм можливість широко використовувати зародкову плазму малопоширених сортів, у тому числі народної селекції, дикорослих видів, а також зникаючих видів рослин.

Загалом склад і розмір *in vitro*- й кріоколекцій визначається необхідністю оздоровлення, розмноження та дублювання найбільш цінних зразків польових колекцій, а також задоволенням запитів щодо міжнародного обміну. За сучасними вимогами, зразки серцевинних колекцій (core-collections), яких максимально представлено генетичне різноманіття виду при мінімізації їх кількості, обов'язково повинні зберігатися в умовах використання усіх трьох систем зберігання (польові умови, *in vitro* та кріоколекції), оскільки кожна з них має свої переваги й недоліки, вони є взаємно доповнюючими. Лише їх спільне використання є гарантією надійного довгострокового зберігання генетичного різноманіття рослин [9, 15].

3.1. Способи відновлення схожості насіння колекційних зразків рослин родини *Solanaceae* Gals. (помідора, перцю, баклажана) в культурі *in vitro*

Тривалість збереження насінням схожості залежить від багатьох обставин – виду рослини, умов вирощування насінневих рослин, вологості насіння та умов його зберігання. Оптимальними умовами зберігання насіння є герметична упаковка та низькі температури. Але й за оптимальних умов тривалість зберігання схожості насінням овочевих культур невелика. Насіння рослин родини пасльонових зберігає схожість, у середньому, 2 – 5 років, насіння помідора – до 8 років [56 – 58]. Під час тривалого зберігання в насінні настає органічний спокій, який проявляється в тому, що рослина не проростає навіть за сприятливих умов. Такий стан може бути обумовлений анатомо-морфологічною будовою насіння, недорозвиненістю зародка, наявністю інгібіторів проростання або відсутністю активаторів росту в насінні, старінням, обумовленим коагуляцією і денатурацією білків [59 – 62]. У ряді випадків культивування насіння на збагачених фітогормонами поживних середовищах в умовах *in vitro* стимулює процес проростання насіння, що втратило схожість, і дозволяє таким чином «реанімувати» цінні колекційні зразки.

У дослідженнях з відновлення схожості використовували насіння помідора, перцю, баклажана з колекції НЦГРРУ, що зберігалось понад 10 років у нерегульованих умовах і мало лабораторну схожість менше 10 %. На поживне середовище Мурасиге-Скуга (MS) [63], збагачене регуляторами росту (ІОцК, НОцК, кінетином, гібереловою та янтарною кислотою) висаджували від 50 до 100 насінин кожного зразка. Отримані рослини-регенеранти додатково розмножували живцюванням та дорощували на рідкому безгормональному живильному середовищі MS за розробленим способом [64]. Всього протягом 2003 – 2016 р.р. для відновлення схожості із колекції НЦГРРУ на поживні середовища висаджено 165 зразків помідора (культурні та дикорослі форми), 105 зразків перцю солодкого, в тому числі 5 дикорослих форм, 45 зразків баклажана.

Для відновлення схожості насіння помідора встановлено ефективність використання середовища MS без додавання регуляторів росту (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Ефективність проростання насіння колекційних зразків помідора в ґрунтових умовах і на безгормональному поживному середовищі MS

Зразок	№ каталогу НЦГРРУ	Походження	Строк зберігання насіння, років	Кількість пророслого насіння, %	
				в культурі <i>in vitro</i>	в ґрунті
Консул	UL0200535	Україна	14	11	0
Сен-Пьер	UL0200527	Україна	13	2	0
Банан	UL0201557	Україна	13	8	0
Взрыв	UL0200525	Україна	13	14	0
Червоний мисливець	UL0200566	Україна	12	10	0
Мокка	UL0200544	Угорщина	11	2	0
Альфа IU 24470	UL0200550	Україна	11	11	0
Мархатская кисть	UL0200538	Україна	11	6	0
Бархат	UL0200534	Україна	11	10	0
Золоте яблуко	UL0201577	Україна	11	8	0
Місцевий M27044	UL0200553	Україна	11	16	0
Делишес	UL0201573	Україна	11	7	0
Slager	UL0200366	Угорщина	10	8	0
Zaria	UL0200285	Болгарія	10	10	0
Негритянка	UL0200572	Україна	10	5	0
№ 5	UL0200291	Китай	10	12	0
Викторина	UL0200295	Молдова	10	8	0
Жираф	UL0200390	Україна	10	2	0
Искорка	UL0200006	Україна	10	4	0
Микадо	UL0200453	Україна	10	9	0
IU 027359	UL 027359	Україна	10	1	0
Rod 271	UL0200192	Польща	9	9	0
№5	UL0200291	Китай	8	6	0
Середнє				6,8	0

Визначено, що насіння помідора, термін зберігання якого перевищує 15 років, втрачає здатність до проростання як у ґрунтових умовах, так і в культурі *in vitro*. Використання культури гіпокотильного калюсу під час відновлення схожості насіння цінних мутантних зразків помідора дозволило нам додатково отримувати до 23 шт. рослин-регенерантів з однієї насінини, що надзвичайно цінно у випадках розмноження колекції мутантних зразків із мінімальної кількості насіння. Живцювання отриманих в культурі *in vitro* паростків забезпечило стабільне розмноження цінного матеріалу для використання в генетико-селекційних фундаментальних дослідженнях.

За використання біотехнологічних методів відновлено схожість дикорослих видів помідора та створено колекцію пробіркових рослин *S. pennellii* Cor. та *L. minutum* Rick., яку впродовж 2008 – 2010 рр. використовували у фундаментальних наукових розробках в ІОБ НААН.

У дослідженнях з відновлення схожості насіння колекційних зразків перцю *Capsicum* Tourp. найкращі показники пророслого насіння забезпечили середовища: MS, модифіковане ГК₃ (0,1 мг/л) і кінетином (3 мг/л) – 38,7; та MS, модифіковане янтарною кислотою (3 мг/л) – 35,8, тоді як на контрольному варіанті цей показник становив 28,2 %.

На культурі баклажана ефективним виявився прийом культивування за змінних температур. Пророщування колекційного насіння баклажана на безгормональному поживному середовищі MS за температури 25С° забезпечило формування від 1 до 4 % проростків у 27 % висаджених генотипів. Під час культивування аналогічних колекційних зразків баклажана за змінних температур відсоток пророслого насіння збільшувався до 8, 8 % у 84 % зразків.

Всього за роки проведення досліджень успішно відновлено схожість 118 зразків насіння з колекції НЦГРРУ, в тому числі: 68 колекційних зразків помідора їстівного, у тому числі 36 мутантних зразків та 2 дикорослих види (*S. pennellii*. Cor. і *S. minutum* Rick); 28 зразків перцю солодкого, зокрема 2 дикорослих види (*C. pubescens*, *C. frutescens*); 20 зразків баклажана (рис.3.2 – 3.5).



Рис. 3.2 Проростання колекційних зразків помідора на безгормональному поживному середовищі MS



Рис. 3.3 Розмноження мутантної форми томата LA 2499 на безгормональному поживному середовищі MS

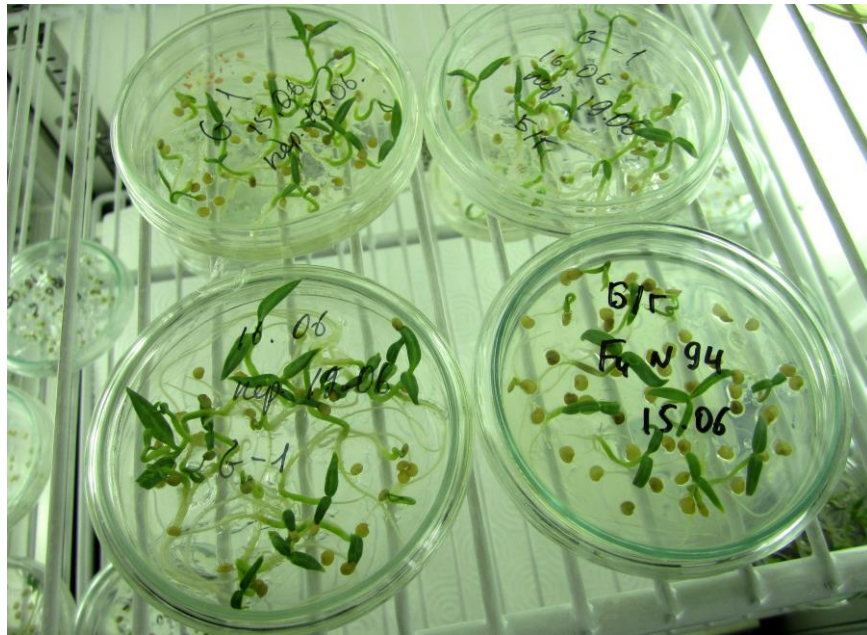


Рис. 3.4 Проростання насіння колекційних зразків перцю солодкого на поживному середовищі MS з додаванням ГК₃ (0,1 мг/л) і кінетину (3 мг/л)



Рис. 3.5 Проростання насіння колекційних зразків баклажана на безгормональному поживному середовищі MS за змінних температур культивування

3.2.1 Визначення оптимального режиму стерилізації та строків введення первинних експлантатів в культуру *in vitro*. Ефективність розмноження в культурі *in vitro* чоловічостерильних рослин помідора залежить від типу вихідного експлантату, строків їх відбору і режимів дезінфекції. Для розмноження використовували зразки з ознакою пилоквої стерильності, підтвердженою цитологічним аналізом. Встановлено, що найбільш ефективний режим стерилізації первинних експлантатів – використання 0,01 % розчину ртуті (II) хлориду ($HgCl_2$) протягом 15 хв., що дозволило отримати 67,3% життєздатних експлантатів (табл. 3.2). При застосуванні 0,1 % розчину $HgCl_2$ вихід життєздатних експлантатів не перевищував 38,3%. Використання для дезінфекції 1,7 % розчину натрію гіпохлориту ($NaClO$) дозволило отримати лише 25,0 – 26,5 % життєздатних експлантатів.

Таблиця 3.2 – Залежність життєздатності експлантатів помідора від режиму стерилізації

Режим стерилізації		Висаджено експлантатів, шт.	Життєздатні експлантати	
дезінфікуюча речовина	експозиція, хв.		кількість, шт.	% від загальної кількості
$NaClO$ 1,7 %	15, контроль	480	120	25,0
	18	480	127	26,5
	20	480	0,0	0,0
$HgCl_2$ 0,01 %	15	480	335	69,7
$HgCl_2$ 0,1 %	10	480	31	6,5
	15	480	0	0,0
	20	480	0	0,0
	25	480	17	3,5
	30	480	46	38,3
$HgCl_2$ 0,5 %	3	480	60	12,5
НІР ₀₅			40,5	9,6

Ефективність стерилізації та вихід життєздатних експлантатів при введенні їх в ізолювану культуру зменшувався зі збільшенням віку

рослини-донора, що пов'язано із накопиченням у рослинах внутрішніх бактеріальних інфекцій, а також з переходом рослин у фазу закінчення вегетації. В результаті досліджень було виявлено, що для введення в культуру *in vitro* найбільш доцільно використовувати апікальні бруньки бічних пагонів помідора, відібрані з рослин в III декаді липня – I декаді серпня (фенологічні фази масового цвітіння – початку плодоношення), що дозволяє підвищити ефективність стерилізації до 81,0 %. Слід відзначити, що своєчасне введення матеріалу в культуру *in vitro* і, відповідно, ефективність розмноження напряду пов'язані з можливістю ранньої ідентифікації стерильних форм.

3.2.2 Ефективність клонального мікророзмноження різних експлантатів стерильних форм помідора в культурі *in vitro*. З метою добору оптимальних параметрів системи *in vitro* для розмноження чоловічостерильних зразків помідора було досліджено параметри росту і розвитку різних типів експлантатів на різних поживних середовищах протягом трьох пасажів. Встановлено, що для культивування апікальних бруньок доцільно використовувати безгормональне живильне середовище MS, для сегментів листків та пазушних бруньок – середовище БІ (MS + 2мг/л 6-БАП + 2 мг/л ІОцК).

У апікальних експлантатів на безгормональному середовищі у 62,5% зразків спостерігався ризогенез, формувалися рослини-регенеранти (табл. 3.3). Найбільш швидким розвитком характеризувався зразок *S.l.11s/14*. Найнижчі показники життєдіяльності на безгормональному середовищі зафіксовані у генотипів *S.l.5s/14* і *S.l.16s/14*, що може бути пов'язано з контамінацією рослин-донорів вірусними інфекціями.

На середовищі БІ розвиток експлантатів відбувався через калусогенез і подальший органогенез, який спостерігали у 75% генотипів. Середній об'єм калюсу коливався від 167.5 до 1826.7 мм³. Найбільший середній об'єм калюсу характерний для зразків *S.l. 1s/14* і *S.l.12s/14*. Активність

калюсогенезу залежала від індивідуальної чутливості генотипів до фітогормонального складу живильного середовища, віку і якості листкових експлантів.

Відзначено зниження середніх показників росту і розвитку під час другого субкультивування. Це пов'язано з проявом в культурі *in vitro* внутрішніх бактеріальних інфекцій, присутніх у донорському матеріалі. У третьому пасажі відбувалось збільшення усіх показників життєдіяльності експлантів у 87,5% генотипів у зв'язку зі звільненням експлантів від бактеріальних інфекцій в умовах *in vitro*.

Морфогенез на рівні 1 бал вже у першому пасажі спостерігали у 12,5% генотипів. Відмічено підвищення активності морфогенезу з першого по третій пасаж. Середня кількість морфогенних зон на калюсі за період культивування зростає від 0,2 до 1,9. Це свідчить про їх успішну адаптацію до умов культивування *in vitro*.

Застосування методу клонального мікророзмноження дозволило підтримувати в культурі *in vitro* 87,5% введених стерильних генотипів помідора. Найвищий коефіцієнт розмноження характерний для зразків *S.l.1s/14* (2,1), *S.l.5s/14* (3,3), *S.l.11s/14* (2,9). За період досліджень було розмножено та передано у селекційні дослідження п'ять стерильних ліній помідора: *S.l.3s/12*, *S.l.4s/12*, *S.l.1s/14*, *S.l.8s/14*, *S.l.11s/14*.

На основі проведених досліджень розроблено загальну схему розмноження стерильних форм помідора в культурі *in vitro* (рис. 3.6).

Отримані в шляхом мікроживцювання рослини-регенеранти 5 генотипів були адаптовані до нестерильних умов і висаджені у захищеному ґрунті. За результатами повторного цитологічного аналізу пилку та господарської оцінки розмножених зразків виділено перспективні лінії помідора з підтвердженою ознакою пилкової стерильності *S.l.1s/14* і *S.l.11s/14*. Стерильність пилку адаптованих рослин становила 100%. Таким чином, застосована біотехнологія гарантовано дозволяє забезпечити

селекційний процес необхідною кількістю рослин томата з ознаками чоловічої стерильності.

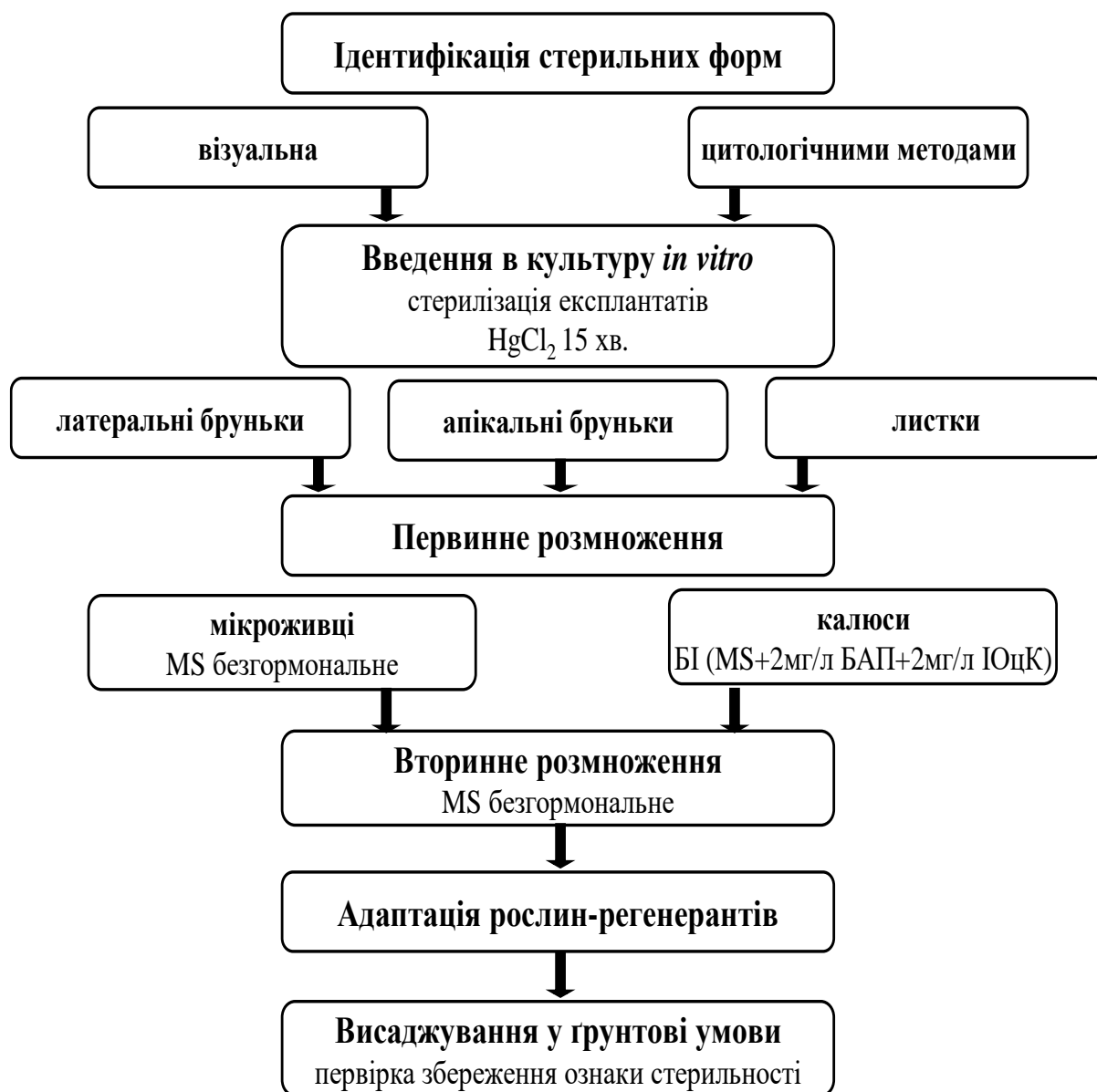


Рис. 3.6. Схема біотехнологічного способу розмноження стерильних форм помідора

3.3 Біотехнологічні прийоми збереження колекційних зразків часнику (*Allium sativum* L.)

3.3.1 Визначення умов тривалого депонування активних *in vitro* колекцій часнику. На прикладі культури часнику фахівцями лабораторії генетики, генетичних ресурсів і біотехнології ІОБ НААН Віценою Т. І. та Івченко Т. В. оцінено ефективність різних способів депонування зразків пробіркових колекцій [73, 74]. Застосовані прийоми сприяли уповільненню ростових процесів у депонованому матеріалі та збереженню рослин протягом 12 місяців без пересаджень. Через 12 місяців депонування максимальну збереженість життєздатних клонів пробіркових рослин забезпечило культивування за температури 4 °С на середовищі ½ MS – 96,4±11,2% та за температури 22 °С на середовищі MS, доповненому 120 г/л – 84,9±4,7 % (рис. 3.7). Мінеральний склад поживних середовищ для депонування не чинив

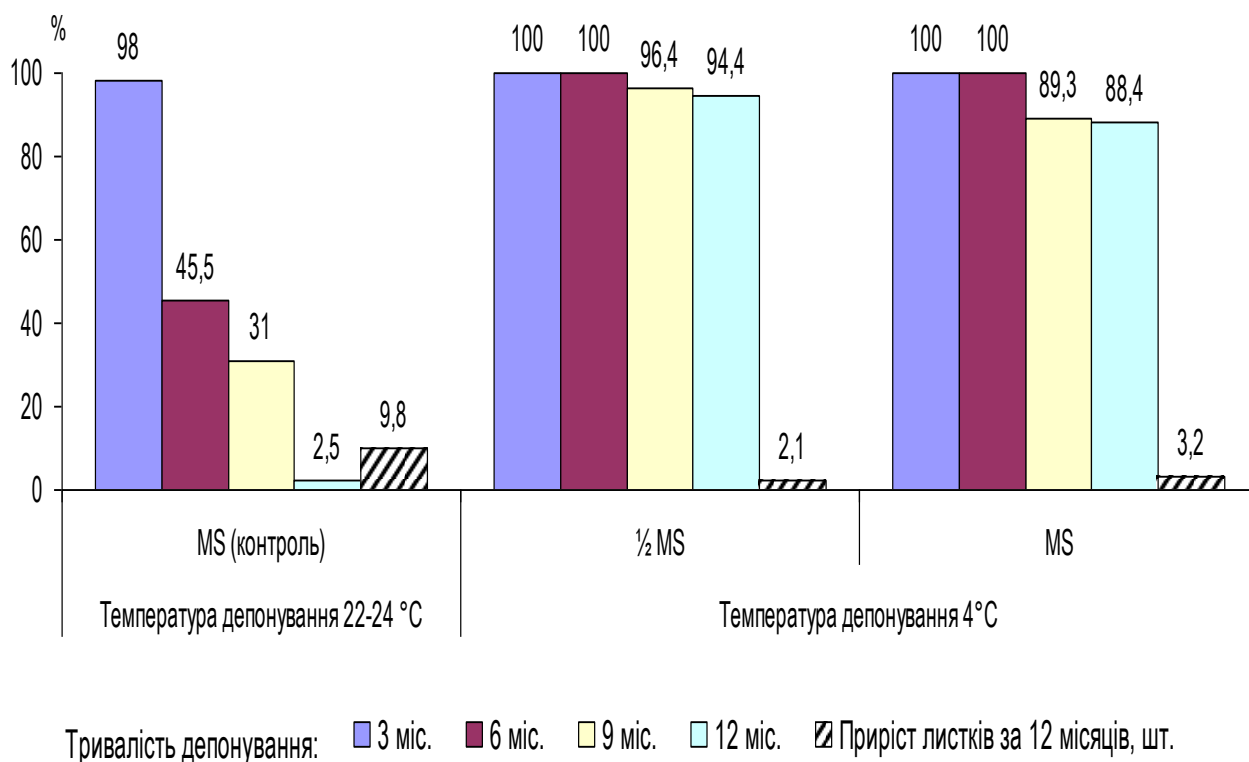


Рис. 3.7 Вплив умов тривалого депонування на життєздатність пробіркових рослин часнику озимого сорту Дюшес, %

суттєвого впливу на життєздатність рослин і приріст листків. На поживному середовищі MS вона становила $88,4 \pm 1,8$ %. Гідратованих рослин у цих варіантах не зафіксовано. Мінімальна збереженість життєздатних клонів – $2,5 \pm 1,1$ % була в контрольному варіанті культивування біоматеріалу за температури 22 °C на середовищі MS, модифікованому 45 г/л сахарози. Максимальну кількість гідратованих рослин забезпечив цей варіант – $7,7 \pm 1,6$ %. Під час подальшого культивування рослини, депоновані за температури 4 °C, за силою росту поступалися рослинам, депонованим на середовищі MS, доповненому 120 г/л сахарози.

Різні способи підтримання колекцій пробіркових рослин часнику свідчать, що безпересадкове їх депонування впродовж 12 міс. за температури 4 °C на поживному середовищі $\frac{1}{2}$ MS дозволяє зменшити основні витрати порівняно із стандартним культивуванням (температура $22 - 24$ °C, пасажування кожні 4 тижні) на 63% , за депонування за стандартної температури на середовищах із високим вмістом сахарози – на 73% .

Порівняльна оцінка рівня збереження генетичної стабільності ознак колекційних зразків часнику покоління R_2 сорту Дюшес, розмножених і депонованих методами біотехнології, порівняно зі рослинами аналогічного генотипу, вирощеними за стандартною технологією в польових умовах, суттєвих морфологічних відмінностей у розмноженого в культурі *in vitro* генотипів не виявила. Це уможливорює включення процесу депонування в культурі *in vitro* клонів пробіркових рослин до системи середньострокового зберігання генетичних колекцій овочевих рослин з переважно вегетативним типом розмноження.

3.3.2 Кріоконсервування колекційних зразків часнику. У результаті експериментальної роботи Віцені Т.І., Івченко Т.В. та ін. було вдосконалено спосіб тривалого зберігання колекційних зразків часнику, які мають високий рівень популяційного поліморфізму і є цінним джерелом генетичного різноманіття в умовах ультранизких температур [75]. Даний спосіб відпрацьовано під час використання в якості донорського матеріалу апікальних меристем часнику [76, 77].

З метою зменшення пошкодження клітин після їх насичення кріопротекторними розчинами досліджено ефективність використання однокомпонентних (1,2-пропандіолу і 1,3-бутандіолу) і багатокомпонентних (розчин PVS N – 2М гліцерину+1М сахарози+2,5М етиленгліколю) кріозахисних речовин. Життєздатність меристем ярого часнику після обробки їх кріопротекторним розчином PVS N становила 37,5 %, тоді як в абсолютному контролі (обробка кріопротекторами без заморожування) – 100 %, що засвідчує низький цитотоксичний ефект розчину для обробки меристем перед кріозаморожуванням (табл. 3.3). Найвищий показник збереженості меристем часнику (75,3 %) вдалось отримати за рахунок більш швидкого охолодження матеріалу (до 1000°С за хвилину). Його забезпечило використання алюмінієвих контейнерів місткістю 0,1мм³. Використання 15 % водного розчину 1,2-пропандіолу забезпечило задовільні результати – 44,0 % життєздатних меристем після заморожування. Обробка меристем 15 % водним розчином 1,3-бутандіолу виявилась не ефективною.

Визначено, що культивувати деконсервовані меристеми часнику доцільно на поживному середовищі MS, модифікованому 0,5 мг/л кінетину, що дозволяє одержати кращі морфометричні показники регенерованих рослин [78].

Після кріоконсервування методом вітрифікації найбільшу життєздатність мали меристеми часнику розміром 2-3 мм (60-70 %). У меристем 3,5-4 мм був високий регенераційний потенціал, але низька життєздатність (менш ніж 25 %), оскільки вони гірше насичувалися вітрифікуючим розчином і гинули під час заморожування в рідкому азоті.

Таблиця 3.3 – Вплив кріопротекторних речовин на життєздатність і ріст апікальних меристем часнику ярового сорту Мануйлівський після 55 діб культивування

Кріопротекторна речовина, тип контейнера	Кількість життєздатних меристем, %	Довжина, мм	
		пагона	Кореня
Без заморожування і без обробки кріопротекторами (абсолютний контроль)	100	54,3±4,1	19,5±3,9
15 % водний розчин 1,2-ПД (контроль 1)	100	41,0±3,8	10,8±2,7
1,2-ПД-пк*	14,3±3,5	7,8±2,1	0
1,2-ПД-ак**	44,0±5,3	36,1±4,5	7,5±2,5
PVS N (2М гліцерину+1М сахарози+2,5М етиленгліколь на середовищі MS (контроль 2)	100	39,7±3,2	21,2±4,0
PVS N-пк*	37,5±5,1	7,7±1,9	0
PVS N-ак**	75,3±6,7	32,3±5,3	15,0±3,3
15% водний розчин 1,3 БД (контроль 3)	100	48,0±4,8	17,5±4,2
1,3-БД-пк*	0	-	-
1,3-БД-ак**	0	-	-

Примітка. * Пк – поліетиленові контейнери;

**ак – алюмінієві тонкостінні контейнери.

У меристем розміром 0,5 мм за даних умов дослідження регенераційний потенціал був відсутній через сильну цитотоксичну дію від кріопротектора.

У результаті досліджень визначені оптимальні умови для довготривалого зберігання колекційних зразків часнику в умовах наднизьких температур. Застосовані методичні підходи набули подальшого розвитку у дослідженнях з кріоконсервування меристем і насіння батату, спаржі, помідора і моркви [79 - 85] і можуть бути цікаві для роботи з іншими культурами.

Отримані нами еспериментальні дані підтверджують ефективність застосування біотехнологічних методів для збереження і розмноження цінних колекційних разків овочевих рослин як з вегетативним, так і з насіннєвим типом розмноження.

Література:

1. Андреев Л. Н., Горбунов Ю. Н. (2000). Сохранение редких и исчезающих растений *in situ*: достижения и проблемы. Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии: 19–23.
2. Белокурова В. Б. (2010). Методи біотехнології в системі заходів збереження біорізноманіття рослин. Цитология и генетика. **3**: 58–72.
3. Fay M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In Vitro Cell Dev. Biol. **28**: 1–4.
4. Хеншоу Г. Г., О'Хара Дж.Ф. (1987). Методы *in vitro* для сохранения и использования мирового генофонда растений. Биотехнология сельскохозяйственных растений. Агропромиздат: 205–224.
5. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. (2003). Біотехнологія рослин. Поліграф консалтинг.: 465–474.
6. Plucknett D. L., Horne M. E. (1992) Conservation of genetic resources. Agriculture, Ecosystems and Environment. **42**: 75–92.
7. Engelmann F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. Euphytica. **57**: 227–243.
8. Шабетя О. М. (2013). Методологія формування банку генетичних ресурсів овочевих і баштанних видів рослин та його практичне використання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с.-г. наук: спец. 06.01.05 «селекція і насінництво». 41 с.
9. Priyanka V., Kumar R., Dhaliwal I., Kaushik P. (2021). Gerplasm conservation: instrumental in agricultural biodiversity – a review. Sustainability. **13**(12). DOI 10.3390/su13126743
10. Рябчун В. К., Богуславський Р. К. (2002). Проблеми та перспективи збереження генофонду рослин в Україні. 38 с.
11. Bir Bahadur, Manchikatla Venkat Rajam, Leela Sahijram, K. V. Krishnamurthy (2015). Plant biology and biotechnology. Volume II: Plant genomics and biotechnology. 768 p. doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5
12. Трускинов Э. В. (2007). Коллекции *in vitro* на современном этапе итродукции, использования и хранения мирового генофонда вегетативно размножаемых культур сельскохозяйственных растений. Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке:

труды II Вавиловской международной конференции. 207–209.

13. Филипенко Г. И., Забегаева О. Н., Баранова Е. А. (2007). Низкотемпературное хранение и криоконсервация мировой коллекции ВИР. Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции: 209–210.

14. Jenderek M. M., Reed B. M. (2017). Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National plant germplasm system. *In vitro cellular & developmental biology-plant*. **53**(4): 299 – 308. DOI 10.1007/s11627-017-9828-3

15. Гавриленко Т. И., Дунаева С. Е. (2007). Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. 161–163.

16. Engelmann F. (1997). Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter*. **112**: 9–18.

17. Maxted N., Ford-Lloyd B. V. Hawkes J. G. et al. (1997). Complementary conservation strategies. *Plant Genetic Resources Conservation*: 15–39.

18. Новикова Т. И., Набиева А. Ю., Полубаярова Т. В. (2008). Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада. Вестник ВОГиС. **12**(4): 564–571.

19. Кунах В. А. (1999). Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. Физиология растений. **6**: 919–929.

20. Hummer K. E.; Reed B. M. (2000). Establishment and operation of a temperate clonal field genebank. Management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI: 29–31.

21. Engelmann F., Marzalina M., Khoo K., Tsan F. (1999). Alternative methods for the storage of recalcitrant seeds – an update. IUFRO Seed Symposium 1998 ‘Recalcitrant Seeds’. FRIM: 159–170.

22. Grout B. W. W., Bhojwani S. S. (1990). *In vitro* conservation of germplasm. Plant tissue culture: applications and limitations. 394–423.

23. Watt M. P., Thokoane N. L., Mycock D., Blakeway F. (2000). *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **61**: 161–164.

24. Mitrofanova O. V., Chelombit S. V., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Ivanova N. N., Kuzmina T. N. (2021). Creation of *in vitro* germplasm collection of common fig in the Nikita Botanical Gardens. VI international symposium on fig. *Acta Horticulturae*. 1310: 7 – 14. doi 10.17660/ActaHortic.2021.1310.2

25. Arbeloa A., Marin J., ALorente P. (2017). *In vitro* conservation of fruit trees by slow growth storage. *Acta Horticulturae*. VI International symposium on production and establishment of micropropagated plants. **1155**: 101-106. doi 10.17660/ActaHortic.2017.1155.13

26. Подвигина О. А., Знаменская В. В., Цутикова Л. А. (2000). Депонирование селекционного материала на искусственных питательных средах. Сах.свекла. **12**: С. 18–19.

27. Munoz M., Diaz O., Reinun W., Winkler A., Quevedo R. (2019). Slow growth *in vitro* culture of *Chilotanum* potato grmplasm. *Chilean journal of agricultural research*. **79**(1): 26 – 35. DOI 10.4067/S0718-58392019000100026

28. Тюкавин Г. Б. (1987). Получение безвирусного чеснока. Плодоовощное хозяйство. **4**: 63–68.

29. Walkey D. G. A., Webb J. W., Bolland C. J., Miller A. (1987). Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *J. Plant Sci*. **62**: 211–220.

30. Трускинов Э. В., Rogozina E. B. (1997). Оздоровление клоновой коллекции картофеля в культуре ткани. Физиология растений. **44**(3): 432– 439.

31. El-Dawayati M. M. (2017). *In vitro* conservation of date palm shoot-tip explants and callus cultures under minimal growth conditions. *Methods in Molecular Biology*. Date palm

biotechnology protocols vol. II: gerplasm conservation and molecular breeding. **1638**: 49 – 59. DOI 10.1007/978-1-4939-7159-6_5

32. Демчук І. В., Зарицький М. М. (2010). Проблеми оздоровлення картоплі методами біотехнології. Сільськогосподарська мікробіологія. **10**: 179–194.

33. Склярєнко Д. А., Бугара А. М. (2004). Використання клонального мікророзмноження *Onobrychis pallasii* (Willd.) Vieb. з метою збереження виду. Наукові основи збереження біотичної різноманітності **6**: 165–169.

34. Withers L. A., Engelmann F., Altman A. (1998). *In vitro* conservation of plant genetic resources. Biotechnology in agriculture. Marcel Dekker Inc.: 57 – 88.

35. Ruta C., De Mastro G., Tarraf W., Ancona S., Tagarelli A., Ozudogru A., Lambardi M. (2020). Long-term preservation of *Cicer arietinum* L. gerplasm by *in vitro* propagation and cryopreservation. Genetic resources and crop evolution. **67**(2): 263 – 271. DOI 10.1007/s10722-019-00867-6

36. Sakai A., Engelmann F., Takagi H. (2000). Development of cryopreservation techniques. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application: 1–7

37. Sakai A., Razdan M. K., Cocking E. C. (1997). Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. Conservation of plant genetic resources *in vitro*: General Aspects. **1**: 53–66.

38. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification / A. Sakai, // Plant Cell Reports. — № 9. – P. 30–33.

39. Engelmann F., Dumet D., Chabrilange N. et. al. (1995). Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oil palm embryos. Plant Genet. Res. Newslett. **103**: 27–31.

40. Takagi H., Engelmann F. (2000). Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. 178–193.

41. Yamada T., Sakai A., Matsumoto T., Higuchi S. (1990). Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. Plant Science. **78**: P.81–87.

42. Alturki S. M. (2019). *In vitro* gerplasm conservation of Alahsa oasis date palm cultivars. Fresenius environmental bulletin. **28**(7): 5644 – 5653.

43. Engelmann F., Dumet D., Chabrilange N. et. al. (1995). Cryopreservation of Importance of zygotic and somatic embryos from recalcitrant and intermediate-seed species. Plant Genetic Resources Newsletter. **103**: 27–31.

44. Dumet D., Engelmann F., Chabrilange N., Duval Y. (1993). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Rep. **12**: 352–355.

45. Шевченко Н. А., Стрибуль Т. Ф., Ивченко Т. В., Вицень Т. И. (2007). Использование нового витрифицирующего раствора при консервировании меристем чеснока. Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке. Состояние, проблемы и перспективы: 2 Вавиловская международная конференция: тезисы докладов. 215–217.

46. Bandusena M. K. B., Chandrasekera B. S. G., Edirisinghe E. S. C. (2020). Development of cryopreservation protocol for cultivar ‘Ambul’ (*Musa* sp.) using vitrification technique. Acta Horticulturae. **1285**: 153-159. doi 10.17660/ActaHortic.2020.1285.24

47. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification / A. Sakai, // Plant Cell Reports. — 9. – P. 30–33.

48. Skinner D. Z., Baughan G. R., Auricht G., Hughes S. (1999). A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections. Crop Sci. **39**: 1237–1242.

49. Withers L. A. (1979). Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*. Plant Physiology. **63**: 460–467.

50. Стрибуль Т. Ф., Вицень Т. И., Ивченко Т. В., Шевченко Н. А., Лысак Ю. С.

- (2008). Зависимость жизнеспособности меристем чеснока от условий криоконсервирования. Проблемы криобиологии. **2**: 241.
51. Takagi C H., Think N. T., Islam O. M. et. al. (1997). Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of taro (*Calocassia esculenta* (L) Scott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedures Text. Plant Cell Reports. **16**: 549–599.
52. Keller E. R. J., Senula A. (2001). Experience of *in vitro* storage and criopreservation of *Allium* at IPK. European Collections of Vegetatively Propagated Allium: Report of a Workshop. 75–81.
53. Keller E. R. J., Senula A. (2004). *In vitro* techniques to improve the germplasm preservation – case studies for three temperate crops and some general remarks. *In vitro* culture, transformation and molecular markers for crop improvement. 107–117.
54. Panis B., Strosse H., Van Den Hendle S., Swennen R. (2002). Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. **23**(6): 375–384.
55. Uragami A., Sakai A., Nagai M. (1990). Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. Plant Cell Report. **9**: 328–331.
56. Условия хранения семян овощных культур. (1976). Р.Ж. Овощные и бахчевые культуры. **4**: 6.
57. Ткаченко Н. М., Ткаченко Ф. А. (1977). Семена овощных и бахчевых культур. Колос: 188 с.
58. Мехтизаде Э. Р., Акпаров З. И., Мамедова С. А. (2007). Прогноз генетической долговечности семян. Современные проблемы науки и образования. **3**: 16–20.
59. Ткаченко Ф. А., Корзун Г. П., Дяченко В. К. (1976). Биохимический состав и физические свойства семян овощных и бахчевых культур. Овощные и бахчевые культуры. **5**: 96.
60. Кан А. А. (1982). Покой семян: смена концепций и теорий [пер. с англ.]. Физиолог. и биохим. покоя и прорастания семян. Колос: 47–67.
61. Солдатова О.П., Орлова Н.И. (1984). Развитие мутационного процесса в семенах при хранении. Доклады ВАСХНИЛ. - **11**: 18.
62. Николаева М. Г. (1982). Покой семян и факторы, его контролирующие. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. Колос: 72-94.
63. Murashige T., Skoog F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473 – 497
64. Мірошниченко В.П., Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В., Гончарова С. А. (2004). Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин. 25 с.
65. Шабетя О. М., Івченко Т. В., Кондратенко С. І., Задорожна О. А. та ін. (2013). Збереження насіння пасльонових культур у стані життєздатності та генетичної автентичності: методичні рекомендації. 47 с.
66. Динь С. Т. (2012). Комбинационная способность стерильных и фертильных линий детерминантного томата с групповой устойчивостью к болезням (фузариозу, вертициллезу, нематоду, ВТМ, кладоспориозу): автореф. дис. канд. с.-х. н.: 22с.
67. Харченко В. А. (2000). Создание гетерозисных гибридов F₁ томата для открытого грунта на основе функциональной мужской стерильности: / дис. канд. с.-г. н.: 133 с.
68. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. (2012). Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. Беларуская навука: 490 с.
69. Rajinder Kumar Dhall. Role of biotechnology in hybrid seed production of vegetable crops – a review / Rajinder Kumar Dhall, D. S. Cheema // *Agric. Rev.* – № 22 (3/4). – P. 163 – 182.
70. Poonam Bhati, a Nanjappa Ashwath, Tissa Senaratna et al. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **78**: 1 – 21.
71. Юркова Г. Н., Галецкая Г. Р. (1990). Регенерационная способность коллекционных образцов культурного томата. Проблемы теоретической и прикладной генетики в Казахстане: 122 – 123.

72. Adhikari P.B., Yoon C.S., Kang W.H. (2016). Callus induction and shoot regeneration of commercial tomatoes (*Solanum lycopersicum*) through anther culture. Proceedings Paper. Acta Horticulturae. **1142**: 389-393. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1142.59
73. Івченко Т. В., Віценя Т. І. (2008). Формування базових колекцій овочевих рослин з використанням біотехнологічних методів. Геном рослин: зб. наук. пр. 5 міжнародної конференції. 192–195.
74. Івченко Т. В., Віценя Т. І., Шабетя О. М. (2007). Клонування рослин *Alliaceae* L., які розмножуються вегетативним способом, в культурі *in vitro*. Овочівництво і баштанництво. **53**: 103–109.
75. Пат. № 22540 UA, МПК А01N 3/00 (2007.04) Спосіб кріоконсервування методом вітрифікації меристем часнику сорту Мерэф'янський білий : патент на корисну модель / Віценя Т. І., Івченко Т. В., Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. О., Григоращенко А. І. ; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № u200612465; заяв. 27.11.2006; опубл. 25.04.2007, Бюл. № 5.
76. Віценя Т. І., Івченко Т. В., Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. О. (2010). Кріозберігання зразків генофонду часнику. Генетичні ресурси рослин. **8**: 200–208.
77. Віценя Т. І., Івченко Т. В., Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. О. (2007). Кріоконсервування апікальних меристем часнику. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: 463–465.
78. Віценя Т. І., Івченко Т. В., Шевченко Н. О., Стрибуль Т. Ф. (2015). Вплив розміру експлантатів та фітогормонального складу живильного середовища на відновлення меристем часнику після кріоконсервування методом вітрифікації. Проблеми кріобіології та кріомедицини. **25**(1): 3–13.
79. Mozgovska A.V., Shevchenko N.O., Ivchenko T.V., Miroshnychenko T.M., Bashtan N.O. (2018). Survival of Sweet Potato Meristems Under Different Cryopreservation Regimens. ProblCryobiolCryomed. **28**(2): 156.
80. Shevchenko N.O., Miroshnychenko T.M., Ivchenko T.V., Bashtan N.O., Vytsenya T.I. (2019). Survival of SweetPotatoes (*Ipomoea batatas* L.) Meristems After Cryopreservation by Vitrification. ProblCryobiolCryomed. **29**(2): 157.
81. Shevchenko N., Mozgovska A., Bobrova O., Bashtan N., Kovalenko G., Ivchenko T. (2020). Post-Thaw Survival of Meristems from *in vitro* Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.). Plants Proceeding: 1-7. doi.org/10.3390/IECPS2020-08769.
82. Shevchenko N.O., Miroshnychenko T.M., Ivchenko T.V., Bashtan N.O. (2019). Effectiveness of Different Cryopreservation Methods of Tomato Meristems (*Lycopersicon esculentum* Mill.). ProblCryobiolCryomed. **29**(2): 160.
83. Shevchenko N.O., Ivchenko T.V., Bashtan N.O. та ін. (2020). Effect of Ultra-Low Temperature Treatment of Seeds on Laboratory and Field Germination of Carrots (*Daucus carota* subsp. *sativus*). ProblCryobiolCryomed. **30**(3):290. <https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.290>.
84. Shevchenko N., Ivchenko T., Kuts O., Mozgovska A., Bashtan N., Miroshnychenko T., Lialiuk O., Kovalenko G. (2020). Field performance of cryopreserved seed-derived carrot, tomato and asparagus plants. Cryobiology. **97**: 297-298.
85. Shevchenko N., Lialiuk O., Stribul T., Ivchenko T. (2021). Influence of Seed Priming Techniques on Seedling Establishment and Yield of Asparagus Hybrids. Biol. Life Sci. Forum. **4**(1): 31 //doi.org/10.3390/IECPS2020-08734.

ГЛАВА 4. СТВОРЕННЯ ДЖЕРЕЛ СТІЙКОСТІ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В КУЛЬТУРІ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН *IN VITRO*

У зв'язку з глобальними змінами клімату актуальним завданням селекції є створення лінійного матеріалу овочевих культур, з різноманітними корисними властивостями, пристосованих до сучасних умов та стійких до розповсюджених хвороб. Загальновідомо, що біотики патогенних грибів змінюються дуже швидко, тому скорочення строків створення нових сортів рослин має велике значення. В сучасній селекційній практиці для створення джерел стійкості до фітопатогенів й екстремальних погодних умов використовують спектр різних методологічних підходів. Серед них високу ефективність для оцінки генотипів на стійкість до хвороб забезпечує використання культури *in vitro* [1-6], яка дозволяє добирати клітинні популяції, стійкі до селективного фактора, а потім регенерувати цілі рослини.

Перші дослідження, зосереджені на вивченні взаємозв'язків рослина-патоген в ізольованій культурі вчені провели ще в 40-х роках ХХ-го століття [7], після чого декілька спроб використання цього методу в селекції здійснив Р. Day [8]. Можливість вибору стійких генотипів в культурі *in vitro* вперше продемонстрував в роботах Р. Carlson [9], який в якості агента для добору клітин і протопластів тютюну використав метіонін сульфоксимін. Відтоді в цьому напрямі наукових досліджень відбувся значний прогрес, який підтверджено великою кількістю створених в культурі *in vitro* стійких генотипів культурних рослин [10]. Розвиток указанного методу обумовлено перш за все активним розвитком клітинних технологій *in vitro*. Можливість спільного культивування рослин із фітопатогенними організмами стала дуже корисним й ефективним засобом для кращого розуміння факторів, які впливають на хвороби рослин [11-13]. Проте, як свідчать опубліковані результати, використання методів клітинної селекції для створення селекційних джерел має багато не вирішених питань. Значна кількість

проблем, пов'язаних із теоретичним і практичним підходам представлено в роботах [14-18, 1].

У клітинній селекції застосовують різні клітини й органи рослин, а також різні види селективних агентів, які за оптимальних умов можуть запускати реакції, аналогічні реакціям цілої рослини на патоген. Рослина, або її тканина чи орган, які виживають під тиском селективного добору, є потенційними джерелами стійкості/толерантності. Різницю між дібраними стійкими лініями та вихідним матеріалом можна пояснити виникненням соматоклональної мінливості. В калюсних клітинах і клітинних лініях вона відбувається як спонтанно [19], так і індуковано, за допомогою мутагенних чинників. Результатом соматоклональної мінливості в культурі *in vitro* є утворення клітинних варіантів, які відрізняються від вихідних форм за такими важливими в селекції ознаками: висота рослини та її архітектоніка, форма квітки, зміна пігментації, кількість листків і гілок, продуктивність і розмір плодів [20, 21]; різний рівень стійкості до абіотичних факторів (наприклад, посухи) [22-24] і біотичних стресів, у тому числі хвороб або патогенів [25-29]. Утворені соматоклони можуть мати різне походження – генетичне або епігенетичне. Природа їх виникнення пояснюється тим, що вже умови культури ізольованих клітин і тканин виступають в якості мутагенної системи, оскільки клітини зазнають значного травмування ще на етапі введення в умови *in vitro*. Далі на етапі регенерації в поживні середовища додаються регулятори росту, які перепрограмувають напрям розвитку клітин [30]. Незвичайні для клітин умови навколишнього середовища, механічні пошкодження тканин, можлива повітряна емболія через їх розсічення, осмотичний шок через розміщення на поживних середовищах з високим вмістом сахарози, штучні мінеральне живлення та вміст регуляторів росту, висока відносна вологість повітря та накопичення різних газів (етилену) у пробірках – всі ці фактори спричиняють окислювальний стрес і можуть призвести до виникнення спонтанних мутацій. Найчастіше в культивованих клітинах вони спостерігаються у вигляді зміненої кількості хромосом, різних хромосомних

аберацій, точкових мутацій, генних ампліфікацій, у зміні положень мобільних диспергованих генів, зміні позаядерних генів – у пластидному і митондріальному геномах [31]. Такі мутації спричиняють наступні генетичні зміни: гіпер- або гіпометилування, поліплоїдію/анеуплоїдію, розриви на ДНК, хромосомні перебудови, делеції. Аналогічні результати описано багатьма й іншими авторами.

Підвищити мінливість соматоклональних варіантів можна за рахунок їх стимуляції мутагенними речовинами – етилметансульфонатом, азидом натрію [32], гамма та рентгенівськими променями [30].

Генетично стійкі мутанти вважаються цінними джерелами підвищеної генетичної мінливості селекційних ознак, включаючи біотичну й абіотичну стресостійкість. З іншого боку, спонтанна соматоклональна мінливість може бути недоцільною у біотехнологічних дослідженнях з культурами, які потребують збереження їх генетичної ідентичності (під час клонального мікророзмноження комерційного матеріалу) або якщо висока генетична стабільність є необхідною умовою.

Ідеальна модель для проведення клітинної селекції до хвороб в умовах *in vitro* повинна включати в себе: 1 – експлантатів здатних до регенерації з високою частотою перспективних у селекції клітинних варіантів або індукційну систему мутацій з високою здатністю до регенерації стійких/толерантних, генетично стабільних фертильних рослин; 2 – легковідтворюваний селективний агент для добору стійких клонів, який викликає аналогічні біохімічні реакції, як і збудник хвороби за природних умов; 3 – перевірку стійкості дібраних клітинних ліній на штучних і природних інфекційних фонах із використанням контрольних генотипів (джерел стійкості до хвороби).

Живі збудники хвороб не знайшли широкого застосування в дослідженнях з клітинної селекції для скринінгу стійкості, оскільки в лабораторних умовах (підвищена вологість, поживні середовища з високим вмістом елементів живлення) шкодочинні організми за темпами розвитку

випереджають рослинні тканини. Тому через певні труднощі зі спільним вирощуванням фітопатогена й тканин рослини-хазяїна, більшість дослідників працюють із безклітинними селективними агентами. Зазвичай, це культуральний фільтрат або очищений токсин, з яким пов'язаний розвиток хвороби. Не принципово, чи викликає токсин або культуральний фільтрат аналогічні симптоми, як і хвороба. Головне, щоб між стійкістю до селективного агента в умовах *in vitro* та польовою стійкістю рослин до хвороби була відповідність [33, 1].

Найбільш широко в експериментах з клітинної селекції використовують культуральні фільтрати (КФ), які отримують культивуванням грибного міцелію в рідкому поживному середовищі. Відфільтрований від залишків міцелію КФ містить у своєму складі суміш грибних метаболітів і використовуються для добору джерел стійкості [6, 34]. До складу КФ може входити спектр вторинних метаболітів – полісахариди, олігосахариди [35], білки, глікопротеїни, ненасичені жирні кислоти, цитоплазма бактерій або грибів, регулятори росту [36], а також токсини, які можуть відігравати певну роль у якості індикаторів патогенності під час розвитку хвороби [1, 37]. Використання КФ у дослідках призводить до синтезу в рослинних клітинах різних захисних реакцій, таких як синтез фітоалексинів або активного утворення деяких ферментів [38-39], акумуляції фенольних кислот та загальних фенолів [6] і хітинази. КФ, одержаний на рідких середовищах Чапека використовують у провідних селекційних центрах України для скринінгу рівня стійкості генотипів до некротрофних патогенів у фазі проростків, розсади та на листових дисках [40-41].

Застосування фільтратів із різними рівнями токсичності у клітинній селекції забезпечує деякі переваги порівняно з традиційними імуногелічними методами оцінки селекційного матеріалу [42] а саме:

– за рахунок проведення скринінгу стійких форм в умовах *in vitro* можна уникнути впливу несприятливих погодних і кліматичних умов, що дозволяє спростити оцінку генотипів за комплексом полігенних ознак;

- оцінки великої кількості зразків на невеликих площах;
- спрощується можливість маніпулювання з численними мутантними популяціями, гаплоїдними генотипами та соматональними варіантами з високою варіабельністю геномів.

У дослідах з клітинної селекції в якості селективного чинника використовують і очищені токсини, які виділяють з грибних і бактеріальних патогенів. Останнім часом понад 250 фітотоксичних метаболітів, продукованих фітопатогенними бактеріями і грибами, виділено, очищено і й структурно охарактеризовано. Особливо корисними є неспецифічні токсини, які діють шляхом пригнічення імунного відгуку рослинних клітин [1, 13].

Водночас не можна не зважити на певні труднощі на шляху до подальшого розвитку ефективних методів селекції *in vitro*. Серед них виділяють наступні: через надскладний генетичний контроль або відсутність адекватних знань з генетичної детермінації селективної ознаки важко чи й неможливо знайти прийнятний для добору в культурі *in vitro* селективний агент; складно чи й неможливо вести селекцію ознак, що проявляються на рівні клітинної спеціалізації та цілої рослини; низький рівень або й неможливість регенерації рослин зі стійких культур; змінені клітинні лінії з часом втрачають здатність до регенерації, що є головною перешкодою для широкого впровадження цих методів; існує проблема кореляції між проявом селективної ознаки на рівні культури та інтактною рослини; господарсько-цінні ознаки регенерантів часто бувають зчеплені з небажаними для селекції ознаками; генетична нестабільність в культурі та можливі порушення геному; оцінюють експлантати в штучних умовах, тому завжди є ризик, що бажані ознаки в польових умовах проявлятимуться інакше [43].

За останні два десятиріччя опубліковано понад 100 наукових статей, в яких представлено результати використання клітинної селекції для підвищення стійкості до фітопатогенів 30 видів сільськогосподарських культур. Їх застосування забезпечило створення стійких селекційних ліній [152-153,159-164]. В даний час, ці методи є важливим доповненням до

класичних селекційних методів.

В Україні дослідження з клітинної селекції проведено у СГІ-НЦНС, які продемонстрували ефективність проведення експрес-оцінки толерантності селекційного матеріалу м'якої пшениці до грибів роду *Alternaria* Nees. та *Fusarium* Link. [44]. У Миронівському інституті пшениці розроблено ефективні методи оцінки і добору генотипів пшениці на стійкість до фузаріозу колосу [45, 46]. Масштабні дослідження з клітинної селекції овочевих рослин проводяться в Китаї [47], Індії [48], США [49], Чехії [1], Іспанії [50]; Туреччині [51], Італії [52].

Найбільша кількість наукових публікацій присвячена результатам її використання для створення джерел стійкості до некротрофних патогенів (грибів роду *Fusarium* Link. та *Alternaria* Nees.) помідора [53], капусти цвітної [54], баклажана [55, 56], цибулі ріпчастої [58], моркви [59-61], огірка [61-62]. Для вказаних збудників хвороб характерні сильні фітотоксичні властивості. Тому в механізмах стійкості рослин до них повинні бути захисні реакції, які запобігатимуть згубній дії токсичних продуктів на життєздатність клітин [63]. Оскільки расовий склад збудників фузаріозу постійно змінюється, необхідна певна біотехнологічна система для створення донорів стійкості, в якій можна було б моделювати умови отримання толерантних варіантів із кумулятивною стійкістю до різних за патогенністю штамів цього збудника, й робити це в коротші строки, ніж традиційна селекція. На думку Ігнатової [44], для робіт такого напрямку найрезультативнішою біотехнологічною схемою *in vitro* може бути багатоступінчаста, яка б уможлилювала на фоні селективного чинника поступово, від експлантата до експлантата, добирати кращі варіанти, накопичувати генетичні компоненти стійкості у клітинних популяціях. За розроблених умов добору й регенерації рослин у такій системі є надія отримати сприятливе поєднання стійкості з іншими бажаними ознаками. Використання ступінчастої схеми селекції дозволило одержати більшу кількість рослин-регенерантів зі стабільною стійкістю до фузаріозу.. Беручи до уваги встановлене існування

епігенетичних механізмів впливу зовнішнього середовища (у нашому випадку КФ патогена) на генотип [64] та наявність у рослин домінування стійкості до некротрофних патогенів над сприйнятливістю [65], можна зробити висновок про ефективність спадково стійких до грибних паразитів форм овочевих культур створення шляхом клітинної селекції в калюсній культурі. Застосування в якості селективного фактора КФ некротрофних патогенів в умовах *in vitro* дає змогу здійснити скринінг рівня стійкості селекційного матеріалу та добирати із гетерогенних клітинних популяцій перспективні для селекції стійкі форми. Але представлені в наукових публікаціях методики потребують доопрацювання, тому що вони не ефективні в роботі з українськими сортами, оскільки розроблені для генотипів з іншими генетичними параметрами.

4. 1. Створення джерел стійкості до некротрофних патогенів грибів роду *Alternaria* Nees ТА *Fusarium* Link.

За останнє десятиріччя в Лівобережному Лісотеку України зафіксовано якісні й кількісні зміни у регіональному патокомплексі овочевих культур відкритого та захищеного ґрунту. Втрати від хвороб огірка, баклажану, моркви та помідора домінуючими патогенами яких є гриби роду *Fusarium* (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. gibbosum*, *F. solani*) й *Alternaria* збільшуються під дією екстремальних для рослин значень температури ґрунту (нижче 16° та вище 28°C). Навіть у сприятливі для вирощування овочевих культур сезони, від сприйнятливих до хвороб сортів можна недобрати 20-60 % товарного урожаю [66].

З огляду на виявлені зміни скореговано пріоритетність селекційних програм у напрямі доповнення традиційних селекційних методів створення стійких до хвороб форм овочевих культур методом клітинної селекції. Головною перевагою застосування технологій *in vitro* для прискорення традиційного селекційного процесу є можливість у лабораторних умовах,

завдяки соматональним варіаціям або індукованим мутаціям оцінювати і добирати клітини з селекційно-цінними ознаками. До того ж, можна за відносно короткий проміжок часу швидше і більш точно проаналізувати велику кількість генотипів і оцінити ознаки полігенної стійкості.

Загальна схема клітинної селекції овочевих культур на стійкість до хвороб, яка поєднує в собі біотехнологічні та імунологічні підходи, складається з етапів, приведених на рис. 4.1.



Рис. 4.1 Загальна схема проведення клітинної селекції овочевих рослин на стійкість до фітопатогенів.

4.1.1 Створення джерел стійкості моркви до чорної гнилі (*Alternaria radicina* M.D. et E.) методами клітинної селекції в культурі *in vitro*. Під час вирощування моркви найбільш шкочинними хворобами є біла, чорна, фомозна та сіра гнилі, збудниками яких є грибні патогени. Їх сукупна дія викликає щорічне ураження коренеплодів під час зберігання до 20-50 %, а насінневих рослин впродовж вегетації – 8-60 % [67]. Вказані хвороби завдають значних економічних збитків як виробникам товарної продукції, так і виробникам насіння. Тому одним із головних напрямів сучасної селекції моркви є створення комерційних форм, стійких до вищеназваних патогенів, націлене на реалізацію біологічного потенціалу рослин, одержання якісної продукції та зменшення кількості використовуваних фунгіцидів.

Ефективній реалізації досліджень за обраним напрямом сприяла розроблена в ІОБ НААН ефективна система розмноження моркви методом соматичного ембріогенезу [68, 69]. Вона уможливила не тільки отримувати калюсну культуру з соматичних і гіногенних тканин у достатній для проведення доборів кількості, а й отримувати рослини-регенеранти.

Для забезпечення селекційного процесу джерелами стійкості до чорної гнилі якості вихідного матеріалу використано 22 зразка моркви, які представлені соматичними та гіногенними калюсними клонами. Враховуючи результати попередніх досліджень [70], використано ступінчасту схему клітинної селекції, за якої добір стійких генотипів проводили шляхом 2-разового добору на селективних середовищах. На першому етапі добирали калюси на селективному середовищі з 30 % КФ, на другому – на середовищі з 40 % КФ. Між першим і другим етапами калюси впродовж 30 діб на середовищі без селективного фактора. Це було зроблено з метою більш жорсткого добору стійких генотипів.

Через 30 діб культивування на селективному середовищі калюси різних генотипів за показниками життєздатності виявили значні відмінності стосовно чутливості до середовища з 30 % КФ у порівнянні з контрольним зразком, еталоном стійкості (табл. 4.1).

Таблиця 4. 1 – Вплив КФ гриба *Alternaria radicina* M.D. et E. в селективному середовищі на життєздатність і калюсогенез зразків моркви після 1-разового добору (через 30 діб культивування)

Генотип	Без КФ (контроль)		30 % КФ		
	життє- здатність %	об'єм калюсу, мм ³	життє- здатність, %	об'єм калюсу	
				мм ³	% до контролю
2011 р.					
D.c.321	100	1828±210,0	50	32±5,0	1,7
D.c.320	100	2500±135,0	90	151±30,4	6,1
D.c.319	100	4750±183,1	100	3055±211,0	83,3
D.c.318	100	840±100,1	100	707±97,1	84,2
D.c.317	100	375±42,0	24	125±11,6	33,3
Середнє	100	2058,9	72,8	994,2	41,7
НІР ₀₅ для порівняння з середнім в досліді				66,4	
2013 р.					
D.c.338/1	100	3548±442,1	100	2226±344,2	62,7
D.c. 338/2	100	3987±377,0	100	1868±245,2	72,5
D.c.339/1	100	2576±347,8	100	1812±205,3	70,3
D.c.339/2	100	2075±300,5	95	1091±206,4	52,6
D.c.339/3	100	3270±389,8	89	1180±198,9	36,1
D.c.340/1	100	2357±267,6	100	1279±206,4	54,3
D.c.340/2	100	3140±367,9	100	2100±323,3	66,9
D.c.341	100	2709±303,4	87	1076±187,5	39,7
D.c.342/1	100	3320±379,3	92	1406±206,2	42,3
D.c.342/2	100	1340±244,5	100	711±145,3	53,1
D.c.343/1	100	2065±206,9	88	870±187,3	42,1
D.c.343/2	100	1993±205,8	100	1114±234,6	55,9
D.c.344	100	2650±311,4	79	985±189,6	37,2
D.c.333	100	1876±204,4	100	1236±157,9	65,9
D.c.336	100	1439±188,4	100	996±135,4	69,2
D.c.330	100	2582±322,2	88	67±23,4	2,6
D.c.334	100	1025±124,1	95	250±14,5	24,4
Середнє	100	2374,7	89,9	1060,8	44,7
НІР ₀₅ для порівняння з середнім в досліді				57,4	

Резистентними (до 30 %) виявились калюси генотипів D.c.318, D.c.319 і D.c.320, життєздатність яких становила 90–100 %. Вплив КФ після першого етапу культивування на селективному середовищі також проявлявся зниженням

інтенсивності наростання об'єму калюсів. Найвищі параметри виявили у калюсів генотипів D.c.319 і D.c.318 з приростом їх об'єму 84,2-83,3% відповідно. Взагалі ж в дослідях 2011 р. на середовищі з 30 % КФ чорної гнилі об'єм калюсів коливався від 1,7 % до контролю у зразка D.c.321, до 84,2 % – D.c. 318.

Результатами досліджень 2013 р. встановлено, що селективне середовище з 30 % КФ *A. radicina* не чинило суттєвого впливу на життєздатність калюсів більшості генотипів. На рівні 95-100 % від контрольних показників за цією ознакою були генотипи D.c.338/1 –, D.c.338/2, D.c.339/1, D.c.340/1, D.c.340/2, D.c.342/2, D.c.343/2, D.c.333, D.c.336. Проте інтенсивність росту калюсів досліджуваних генотипів суттєво відрізнялася від середнього значення в досліді. Найвищу калюсогенну здатність спостерігали на першому етапі добору в генотипів D.c.338/1, D.c.338/2, D.c.339/1, D.c.340/2, D.c.342/2, D.c.333, D.c.336. Її показники були на рівні 62,7-72,5 % від контролю і суттєво перевищували середній показник досліді (47,7 %).

Після другого етапу клітинної селекції калюсів моркви на середовищі, модифікованому 40 % КФ, виявлено значні відмінності генотипів за параметрами калюсогенезу. Результати, одержані в 2011 р. свідчать, що найвищий приріст калюсу належав генотипам D.c 318 і D.c 319, у яких на селективному середовищі цей показник становив 79,8 % і 40,6 % відповідно до контролю (табл. 4.2). Для генотипів D.c.317, D.c.320 і D.c.321 вміст 40 % КФ виявився критичним, через що наростання калюсної тканини призупинялось.

Отже, з наведених результатів можна зробити висновок про те, що вміст 40 % КФ чорної гнилі в селективному середовищі уможлиблює диференціювати селекційні зразки за реакцією на фільтрат і одержувати стійкі калюсні варіанти. В 2013 р. отримані результати підтвердили висновок про сублетальність 40 % КФ що за схеми 2-разового добору для калюсів більшості генотипів. Виявлено некроз у середньому в 72,2 % калюсів. Калюсні клони різних генотипів істотно відрізнялись між собою за здатністю

Таблиця 4. 2 – Вплив КФ гриба *Alternaria radicina* M.D. et E. на життєздатність і калюсогенез різних генотипів моркви після 2-разового добору на селективному середовищі

Генотип	Без КФ (контроль)		40 % КФ		
	життє- здатність, %	об'єм калюсу, мм ³	життє- здатність%	об'єм калюсу	
				мм ³	% до контролю
2011 р.					
D.c.321	100	1828±210,0	87,5	0	0
D.c.320	100	2500±135,0	55,4	0	0
D.c.319	100	4750±183,1	95,0	1930±170,6	40,6
D.c.318	100	840±100,1	93,3	671±35,0	79,8
D.c.317	100	375±42,0	4,0	0	0
Середнє	100	2058,9	67,0	520,3	24,1
НІР ₀₅ для порівняння з середнім в досліді			67,6		
2013 р.					
D.c.338/1	100	3670±343,1	75,0	1226±25,1	33,4
D.c. 338/2	100	3890±322,2	46,7	1868±301,4	48,0
D.c. 339/1	100	2700±289,9	53,4	812±144,5	30,0
D.c. 339/2	100	2367±265,6	6,7	0	-
D.c. 339/3	100	3340±399,7	11,3	0	-
D.c. 340/1	100	2408±265,3	57,1	1279±243,6	53,1
D.c. 340/2	100	3700±388,0	33,3	1100±232,2	29,7
D.c. 341	100	2470±288,2	10,9	0	-
D.c. 342/1	100	3237±355,1	21,7	0	-
D.c.342/2	100	1398±181,0	15,2	0	-
D.c. 343/1	100	2205±253,7	0	0	-
D.c. 343/2	100	2060±224,4	20,5	0	-
D.c. 344	100	2480±25,7	0	0	-
D.c. 333	100	1740±209,1	64,0	1023±209,6	58,8
D.c. 336	100	1330±254,4	57,0	796±106,4	59,8
D.c. 330	100	2470±287,8	0	0	-
D.c. 334	100	1270±187,5	0	0	-
Середнє	100	2514,8	27,8	368,4	14,0
НІР ₀₅ для порівняння з середнім в досліді			117,3		

до виживання. Достовірно вищу від середнього показника в дослідженнях, частку життєздатних калюсів мали генотипи D.c.338/1, D.c.338/2, D.c.339/1, D.c.340/1, D.c.340/2, D.c.333 і D.c.336, калюси яких не втрачали здатності до подальшого росту. Найбільший приріст об'єму калюсу (53,1-59,8 % від контролю) належав генотипам D.c.333, D.c.336 і D.c.340/1. Крім того, за візуальною оцінкою, на селективному середовищі калюси не змінювали колір і не мали ознак некрозу (потемніння) (рис. 4.2)

Деякі генотипи (D.c.339/1, D.c.339/2, D.c.339/3, D.c.341, D.c.342/1, D.c.342/2, D.c.344, D.c.330, D.c.334) виявили найбільшу чутливість до дії КФ, тобто були надто сприйнятливими. Дія селективного чинника на другому етапі добору виявилась для експлантатів цих генотипів летальною, бо більшість з них були на 100 % некротичними. Сприйнятливі генотипи із подальших досліджень виключили.

В результаті культивування за схемою ступінчатого добору на селективних середовищах із додаванням КФ чорної гнилі, дібрано 5 соматичних і 2 гіногенних стійких калюсних варіантів. Їх додатково розмножували на регенераційному середовищі для формування рослин-регенерантів методом ембріогенезу.

Одержання ембріодів з калюсів моркви, резистентних до дії збудника чорної гнилі Alternaria radicina M.D. et E. Проблема отримання рослин стійких клітинних ліній – одна з найбільш важливих і складних у клітинній селекції, але без її розв'язання не можна створити джерела стійкості. Регенерація з калюсів значно ускладнена, а частота індукції рослин дуже низька, що пов'язано з мутаційними змінами, які виникають спонтанно в культурі *in vitro* [58, 71]. У дослідженнях 2013 р. негативний вплив селективного середовища спричиняв суттєве зниження частки ембріогенних калюсів. З індукованих на контрольному середовищі калюсів (без КФ) в середньому 85,8 % експлантатів мали здатність формувати ембріоди (табл. 4. 3). З одного калюсу їх утворювалося в середньому $13,3 \pm 2,1$ шт. ембріодів (рис. 4. 3). Кількість ембріодів у контрольному варіанті залежала від генотипу. Максимальна ембріогенна здатність належала калюсам

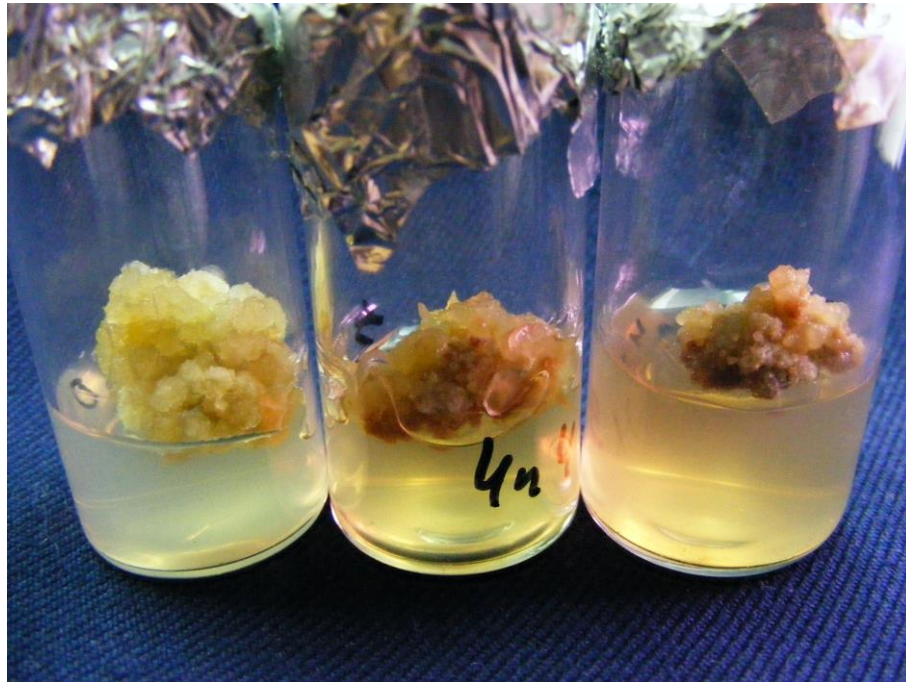


Рис. 4.2 Калюси моркви зразка D.c.306/1 на середовищах (зліва направо): без КФ чорної гнилі, з 30% КФ, з 50 % КФ.



Рис. 4.3 Регенеранти моркви, одержані з калюсів, дібраних на культуральному фільтраті *Alternaria radicina* M.D. et E., 2009 р.

Таблиця 4. 3 – Ембріогенна здатність калюсних варіантів моркви, дібраних методом ступінчастого добору на селективних середовищах з КФ гриба *Alternaria radicina* M.D. et E.

Генотип	Частка ембріогенного калюсу, %			Вихід ембріодів, шт./калюс		
	без КФ (контроль)	2-разовий добір	% до контролю	без КФ (контроль)	2-разовий добір	% до контролю
2011 р.						
D.c.318	95,0	14,5	15,3	15,3±2,1	3,4±0,9	22,2
D.c.319	93,0	0	0	5,4±1,6	0	0
Середнє	94	7,25	7,7	10,35±1,8	1,7±0,8	11,1
2013 р.						
D.c.338/1	89,0	10,4	11,7	15,1±2,1	2,5±0,6	16,6
D.c.338/2	96,5	7,4	7,7	16,4±2,1	2,6±0,5	15,8
D.c.339/1	88,0	6,8	7,7	10,5±2,1	2,2±0,4	20,9
D.c.340/1	92,8	5,0	5,3	10,9±2,1	1,2±0,4	11,0
D.c.340/2	90,0	0	0	12,7±2,1	0	0
D.c.333	70,5	9,7	13,7	14,5±2,1	2,5±0,2	17,2
D.c.336	75,9	11,0	14,5	13,0±2,1	2,6±0,3	20,0
Середнє	86,1	7,1	8,7	13,3±2,1	1,9±0,3	14,5

Примітка. * НІР₀₅ для порівняння виходу ембріодів - 1,4

генотипу D.c.338/2 – 16,4 шт. в 2013 р., мінімальна – генотипу D.c.318 (рис. 4.3) з 5,4 шт. в 2011 р.. З калюсів, які пройшли клітинну селекцію на селективних середовищах з КФ, 7,2 % були здатними до ембріогенезу. Цей показник значно менший за контрольний, але він перевищив наші результати з клітинної селекції щодо частоти ембріогенезу отримані в 2009 р. – 1 %. У дібраних методами клітинної селекції калюсів цей показник частота у різних генотипів мав значні відмінності і варіював від 5,0 до 14,5 %. У калюсів таких зразків, як D.c.319 і D.c.340/2, після добору на селективних середовищах

зафіксовано повну відсутність ембріогенної здатності. Також спостерігали зменшення кількості ембріоїдів, утворених із ембріогенних калюсів, до $1,2 \pm 0,4$ – $2,6 \pm 0,5$ шт./калюс, що становить 11,0–20,0 % до контролю. Цим підтверджується висновок про суттєвий вплив післядії КФ чорної гнилі на ембріогенну здатність калюсів.

Вирощування рослин-регенерантів моркви, резистентних до дії чорної гнилі, в польових умовах. Як зазначали вище, з ембріоїдів отримали рослини-регенеранти генотипів D.c. 318, D.c. 333 і D.c. 336, які спочатку адаптувались до нестерильних умов, після чого їх висаджували в польові умови. На етапі пересаджування регенерантів з горщечків в ґрунт рівень приживлення був на рівні 100 %. Форма у всіх регенерантів була нетиповою, коренеплоди були вкороченими та мали по кілька відростків. Через застосування фунгіцидів під час адаптації до нестерильних умов та впродовж вегетаційного періоду рослини-регенеранти не уражувались грибними хворобами, що сприяло отриманню здорових коренеплодів.

Отже, розроблений нами спосіб, який оформлено патентом на корисну модель [72] уможливив скоротити тривалість отримання клітинних популяцій моркви, стійких до комплексу токсинів КФ гриба *Alternaria radicina* M.D. et E. до 120 діб, тоді як за розробленим у Росії способом [73] процес отримання стійких клітинних варіантів триває 215 діб. Він не потребує складного обладнання, скорочує енерговитрати, завдяки своїй швидкості дозволяє за перший рік отримати стійкі до альтернаріозу генотипи моркви (фаза розвитку рослин – коренеплід), наступного року – їх насіння для селекційної роботи. Для порівняння: за відомим польовим методом в умовах природного інфекційного фону визначення стійкості генотипів моркви до чорної гнилі відбувається за 6 років [74]. Створені джерела стійкості (коренеплоди та насіння) до чорної гнилі впроваджено в лабораторії селекції коренеплідних культур ІОБ НААН.

4.2 Клітинна селекція помідора (*Lycopersicum esculentum* Mill.), баклажана (*Solanum melongena* L.) на стійкість до грибів роду *Fusarium* Link.

Однією з найбільш шкодочинних хвороб овочевих культур в умовах відкритого і захищеного ґрунту в Україні є фузаріозне в'янення, основним збудником якого є гриби роду *Fusarium* Link. Поширеність хвороби останнім часом складає 37-69 % і призводить до істотних (30-50 %) втрат урожаю. Традиційні методи селекції на стійкість до фузаріозу результативні, але трудомісткі й тривалі.

Нині стійкості помідора до фузаріозного в'янення оцінюють методами штучного зараження інокулюмом сіянців, окремих пагонів (15-денна жива культура гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) або дорослих рослин, які вирощують на інфекційному фоні (внесення інокулюму гриба у ґрунт). Ступінь ураження рослин хворобою вираховують через 30 і 60 діб. Зведену характеристику рівня стійкості зразка до того ж отримують після 2 - 3 років досліджень [76]. Крім того, оцінку рівня стійкості рослин помідора до фузаріозного в'янення можна визначити лабораторним методом, який полягає у штучному зараженні 20-денної розсади комплексом екстрацелюлярних метаболітів патогену або пророщуванням насіння в екстракті культуральної рідини збудника, з якої оцінку здійснюють за інтенсивністю росту корінців [77]. Недоліками польового способу є тривалий час (кілька років) і витратність польових досліджень, нерегулярність прояву хвороби за різних погодних умов, загибель сприйнятливого до хвороби селекційного матеріалу, який може нести цінні господарські ознаки. Недоліки лабораторного методу – обмежений у часі вплив КФ на рослину, ризик втрати цінних генотипів з огляду на малочисельність вибірки та цінність матеріалу. Тому здійснена нами розробка систем клітинної селекції *in vitro* має особливу актуальність для селекційної практики як технологія добору вихідного матеріалу з певними ознаками.

4. 2. 1. Розробка способу створення фузаріозостійкого вихідного матеріалу пасльонових овочевих культур. Розроблений нами в тісній співпраці з імунологами ІОБ НААН “Спосіб створення фузаріозостійкого вихідного матеріалу пасльонових овочевих культур“ (патент на корисну модель № 89518) [79] дозволяє розширити арсенал лабораторних методів для прискорення процесу створення стійкого вихідного матеріалу застосуванням багаторазового добору в умовах *in vivo* та *in vitro*, підвищити його ефективність за рахунок більш точного визначення рівня тривалої стійкості, скоротити термін отримання стійкого вихідного матеріалу, його збереження та прискореного розмноження стійких генотипів. В основу способу покладено наші попередні розробки з клітинної селекції стосовно стійкості помідора до ранньої сухої плямистості, в яких обґрунтовано ефективність добору стійких до хвороб генотипів у культурі *in vitro* на селективних середовищах з КФ грибів [80, 81].

Розроблений нами спосіб включає 5 етапів (табл. 4.4).

1 етап – первинна імунологічна оцінка матеріалу. З відібраних чистих колоній найбільш поширених видів грибів-збудників фузаріозного в’янення пасльонових рослин (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*) за розробленим методом [82] отримували чисту культуральну рідину (КФ) цих грибів, змішували її у пропорції 2:1:1:1 та розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Таке видове співвідношення видів грибів-збудників фузаріозного в’янення пасльонових овочевих рослин відповідає нині природному стану популяції хвороби в агроценозах пасльонових овочевих рослин Лісостепової зони.

Оцінювали і добирали стійкі генотипи за імунологічною реакцією – швидкістю втрати тургору впродовж 48 годин у КФ розсади детермінантних генотипів (фаза 3-4 справжніх листків) та у свіже дібраних пасинків з другого ярусу рослин індетермінантного типу. Контролем у дослідах слугували 10 - 15 рослин (пасинків) кожного зразка, які занурювали у дистильовану воду. Всього в 2011 р. пройшли імунологічну оцінку 123 зразка.

Таблиця 4.4 – Послідовність етапів оцінки та добору за один рік фузаріозостійкого вихідного матеріалу помідора в культурах *in vitro* та *in vivo*

Етап добору	Вихідний матеріал	Вихідні параметри	Тривалість процесу	Вартість, грн.
1 етап - добір у культурі <i>in vivo</i>	30-денна розсада баклажана та детермінантних генотипів помідора, свіжо-зрізані пасинки помідора індетермінантного типу	Перевірка всіх зразків на стійкість до КФ грибів <i>F. oxysporum</i> , вибракування нестійких генотипів	2 доби	748,09
2 етап - скринінг рівня стійкості в культурі <i>in vitro</i>	7-10-денні сім'ядольні листки стерильних паростків	Оцінка рівня стійкості генотипів до КФ грибів <i>F. oxysporum</i> у порівнянні з еталонами стійкості та сприйнятливості за 5-бальною шкалою	6 тижнів	1430,29
3 етап - добір у культурі <i>in vivo</i> стійких калюсних варіантів	Морфогенні калюси	Добір стійких клітинних варіантів, їх розмноження в культурі <i>in vitro</i> живцюванням	20 тижнів	2408,60
4 етап – додаткова імунологічна перевірка дібраних в культурі <i>in vitro</i> варіантів	Адаптовані пробіркові рослини покоління Ro	Перевірка всіх зразків за стійкістю до КФ грибів, вибракування нестійких генотипів	2 доби	3064,83
5 етап - селекційна оцінка відібраних генотипів		Оцінка стійкості зразків в умовах природного інфекційного фону, добори, отримання насіння	20 тижнів	693,00
Всього				8344,82

2 етап – первинний скринінг стійкості генотипів методами клітинної селекції в культурі *in vitro*. За результатами імунологічної оцінки стійкості в умовах штучного фону, для введення в стерильну культуру добирали перспективні генотипи, а також генотипи – еталони з визначеною в польових умовах стійкістю та сприйнятливістю до хвороби. Клітинну селекцію здійснювали культивуванням сім'ядоль 7-дених стерилізованих проростків на базовому середовищі MS, модифікованому регуляторами росту (ІОцК і БАП). В якості селективного агента добору до нього (в залежності від видової належності рослин) додавали від 20 до 50 % суміші КФ основних збудників фузаріозного в'янення. Контролем слугувало базове поживне середовище без додавання КФ [83]. Еталонними зразками в дослідженнях з клітинної селекції слугували гібриди з визначеною високою польовою стійкістю до хвороби.

Вплив комплексу токсинів КФ на ріст і розвиток калюсів оцінювали візуально за розробленою нами шкалою 16-у добу культивування [84] (рис. 4.4)

3 етап - добір у культурі *in vivo* стійких калюсних варіантів. Клітинну селекцію здійснювали за двоступінчастою схемою. Другий пасаж проходив на базовому середовищі MS без додавання селективного агента. У третьому пасажі рослини-регенеранти повторно культивували на базовому середовищі MS з додаванням до нього культурального фільтрату, і повторно в культурі *in vitro* добирали резистентні до дії КФ грибів *F. oxysporum* f. sp. калюсні клони (рис. 4.5). Отримані в результаті двоступінчастого добору рослини-регенеранти розмножували, підрощували, укорінювали й адаптували до ґрунтових умов.

4 етап – додаткова імунологічна оцінка дібраних у культурі *in vitro* клітинних варіантів лабораторним методом для підтвердження стійкості до фузаріозного в'янення. Адаптовані рослини-регенеранти повторно оцінювали в лабораторних умовах експрес-методом (48-годинна інкубація рослин у 50% розчині суміші КФ). Для подальшого селекційного використання в якості вихідного стійкого матеріалу залучали зразки (рослини), які залишились без візуальних симптомів в'янення під дією КФ впродовж всього терміну проведення тесту.

- **бал 0** – розвиток тканин не відрізняється від культивування на контрольному варіанті;
- **бал 1** – хлорозних тканин до 25 %, наростання калюсів інтенсивне;
- **бал 2** – хлорозних тканин - до 50 %, наростання калюсів середнє;
- **бал 3** – хлорозних тканин – до 75 %, наростання калюсів пригнічене;
- **бал 4** – хлорозних тканин більше 75 %, наростання калюсів відсутнє.

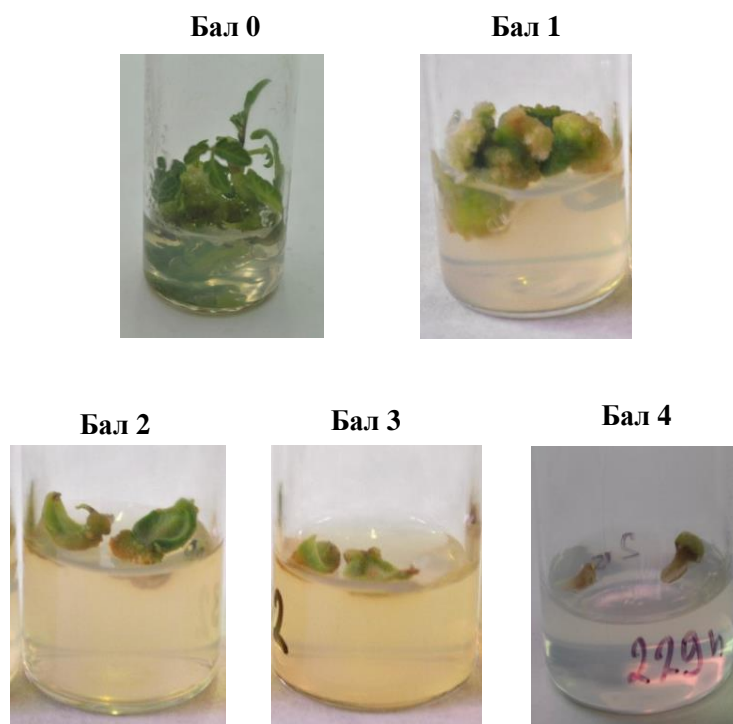


Рис. 4. 4. Шкала оцінки ступеня ураження калюсної культури помідора сумішшю ФКР збудників фузаріозного в'янення в культурі *in vitro*

5 етап - селекційна оцінка відібраних генотипів за комплексом основних господарських ознак. Відібрані за стійкістю в умовах *in vitro* та адаптовані до нестерильних умов рослини-регенеранти висаджували в плівкову теплицю для оцінка стійкості зразків в умовах природного інфекційного фону. Оцінювали рівень прояву комплексу основних господарських ознак згідно “Методиці проведення експертизи сортів на відмітність, однорідність і стабільність (ВОС)” [85]. На даному етапі одержували насіння від перспективних генотипів.

За рахунок застосування розробленого способу термін створення джерел стійкості помідора становить 2 роки. Порівняльний аналіз витрат на технологічний процес добору джерел стійкості пасльонових культур лабораторними методами в культурах *in vitro* та *in vivo* (за цінами 2015-2016

pp) дозволив визначити, що витрати на проведення добору джерел стійкості становлять 8344,82 грн, тоді як за традиційною технологією, через необхідність вирощування колекційних зразків впродовж 3 вегетаційних сезонів на площі 0,4 га вони становлять 62799,49 грн. Такі результати засвідчують високу ефективність комплексу розроблених нами лабораторних методів в селекції помідора і баклажана, оскільки вони значно знищують витрати (на 86,8 %) на оцінку стійкості селекційного матеріалу і створення джерел стійкості до некротрофних патогенів.

Зв'язки між параметрами овочевих культур у культурі *in vitro* (об'єм калюсу, кількість морфогенних зон, життєздатність калюсних клонів на селективних середовищах) та регенерованих із них рослин покоління R₂ *in vivo* підтвердили ефективність проведення клітинної селекції на селективному середовищі з 40 % КФ грибів роду *F. oxysporum* f. sp. (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Особливості взаємозв'язків основних показників баклажану і помідора овочевих на селективних середовищах з КФ грибів роду *Fusarium* у культурах *in vitro* й *in vivo* та ознаками рослин у польових умовах*

Ознака	Культура <i>in vitro</i>		Культура <i>in vivo</i>		Польові умови	
	життєздатність	кількість морфогенних зон	Пагона	кореня	загальна урожайність	ступінь ураження
Баклажан						
Об'єм калюсу	Дуже слабкий	Тісний**	Слабкий	Слабкий	Тісний	Зворотній дуже слабкий
Життєздатність	-	Зворотній дуже слабкий	Середній	Середній	Тісний **	Зворотній тісний
Помідор						
Об'єм калюсу	Середній	Тісний	-	-	Дуже Слабкий	Слабкий
Життєздатність	-	Слабкий	-	-	Зворотний дуже Слабкий	Зворотний тісний

Примітка. *Для аналізу кореляційного зв'язку між парами ознак застосовували наступну шкалу: 0,0 – 0,19 – дуже слабкий; 0,2 – 0,39 - слабкий; 0,40 – 0,59 – середній; 0,60 – 0,79 – тісний; 0,80 – 1,0 - дуже тісний.

** Коефіцієнт кореляції суттєвий на 0,05-му рівні.

У клітинних ліній баклажана покоління R₂ виявлено тісні зв'язки між парами ознак: об'єм калюсу–загальна урожайність, об'єм калюсу–кількість морфогенних зон. Зворотний тісний зв'язок під час клітинної селекції баклажана та помідора виявили також між ознаками життєздатності калюсних клонів та ступеня ураження фузаріозним в'яненням в умовах природного інфекційного фону. Ефективність розроблених схем клітинної селекції підтверджено під час польової оцінки дібраних на селективних середовищах джерел стійкості баклажана та помідора до фузаріозного в'янення. Найвищою стійкістю до хвороби (7 за 9-ти бальною шкалою) характеризувалися генотипи баклажана – *S. m.* 62, *S. m.* 40, *S. S. m.* 63, дібрані на селективних середовищах із 40 % КФ, і клітинні лінії помідора – *S.l.* 11/3, *S.l.* 46/1 на селективних середовищах із 30-50 % КФ (табл. 4.5). Окрім стійкості до хвороби вони також перевищували контрольні варіанти та вихідні генотипи за основними кількісними показниками: висотою рослини, кількістю та масою плодів, продуктивністю, товарністю плодів. За урожайністю плодів клітинні лінії баклажана перевищували стандартний – сорт Алмаз від 29,6 до 44,2 %. Дібрані сумісним використанням біотехнологічних, імунологічних і селекційних методів лінії помідора перевищували за урожайністю плодів стандартний генотип UL0200662 від 33,3 до 37,3%. На лінії баклажана *S. m.* 62 і *S. m.* 40 одержано свідоцтво Національного центру генетичних ресурсів.

Таблиця 4. 5 – Порівняльна оцінка морфобіологічних і господарських ознак селекційних зразків баклажана і помідора після добору на селективних середовищах з вихідними формами

Вихідний зразок	Добір на середовищі MS*, концентрація КФ	Новий генотип	Висота рослини, см	Параметри плодів (перерахунок на одну рослину)		Продуктивність, кг/росл.	Стійкість за 9-бальною шкалою	Загальна урожайність	Збільшення до контролю, %	Товарність, %
				кількість, шт.	середня маса, г					
Баклажан										
Алмаз,ст.	MS без КФ	<i>S. m. 9</i>	61,69±1,4	9,33±0,11	170,3±0,4	1,64 ±3,1	7	23,3±2,4 т/га	-	97,9
Б. к. 47	MS без КФ	<i>S. m. 47</i>	62,61±2,5	9,07±0,21	186,31±1,2	2,13 ±6,8	5	27,5±2,1 т/га	18,02	96,7
	MS+40 % КФ	<i>S. m. 62</i>	62,42±4,4	8,40±0,13	214,58±3,81	1,90±8,4	7	33,6±3,6 т/га	44,21	99,7
Б. к. 40	MS без КФ	<i>S. m. 40</i>	58,84±2,2	9,13±0,23	189,43±1,4	1,82±5,9	7	23,7±3,0 т/га	1,72	94,5
	MS+40 % КФ	<i>S. m. 63</i>	63,21±4,2	8,40±0,16	217,93±0,3	1,88±7,6	7	30,5±3,3 т/га	30,90	99,3
Б. к. 36	MS без КФ	<i>S. m. 36</i>	63,93±1,2	9,13±0,13	219,60±5,3	1,99±6,7	5	28,1±3,1 т/га	20,4	96,9
	MS+40 % КФ	<i>S. m. 79</i>	64,82±4,4	8,61±0,15	213,33±5,3	1,83 ±6,3	5	30,0±3,4 т/га	29,61	99,7
HIP ₀₅								1,91		
Помідор (індетермінантні форми)										
UL0200662 st	-	-	193,8±3,3	20,1±3,1	206,8±3,6	4,2±0,3	7	16,8 ±1,7 кг/м ²	-	98,3
МК 1/5	MS без КФ	<i>S.I. 5</i>	159,3±4,2	23,4±2,4	142,7±2,3	3,35±0,2	5	13,4±1,8 кг/м ²	0	97,1
	MS+50 % КФ	<i>S.I.11</i>	177,1±3,5	24,3±2,6	169,1±2,7	4,1±0,3	7	14,4±2,2 кг/м ²	7,5	90,1
	MS+50 %КФ + інд.добір	<i>S.I.11/3</i>	215,0±2,6	14,2±2,1	330,1±4,2	4,7±0,2	7	18,8±2,8 кг/м ²	37,3	98,7
К-4128	MS без КФ	<i>S.I.43</i>	165,3±3,8	21,4±2,5	169,1±2,7	3,6±0,3	5	14,4±2,1 кг/м ²	-	95,2
	MS+30 % КФ	<i>S.I.46</i>	185,5±4,4	24,3±2,6	170,8±3,4	4,1±0,4	7	16,4±2,3 кг/м ²	13,9	98,3
	MS+50 %КФ + інд.добір	<i>S.I.46/1</i>	118,2 ±2,2	25,7±2,8	187,2±2,6	4,8±0,2	7	19,2±1,9 кг/м ²	33,3	97,1
HIP ₀₅								4,3		

Примітка. * В цій та наступних таблицях регенераційне поживне середовище MS із додаванням регуляторів росту

4.3 Спосіб оцінки і добору джерел стресотолерантності помідора для альтернативних технологій

За останнє десятиліття у зв'язку із постійно зростаючими запитами ринку одним із основних напрямів розвитку овочівництва стало вирощування продукції із застосуванням альтернативних технологій. Питома вага господарств, що постачають натуральну сільськогосподарську продукцію, в загальній площі земель і в структурі сільськогосподарських підприємств України, також стає дедалі більшою [86, 87]. Тому створення сортів помідора, придатних для вирощування за альтернативними технологіями, надзвичайно актуальне.

Сорти, придатні для виробництва екологічно чистої продукції повинні відрізнятися здатністю ефективно використовувати природні ресурси агрокліматичної зони вирощування, забезпечувати екологічно стабільний врожай за рахунок комплексної стійкості до біотичних й абіотичним стресів, високим вмістом поживних речовин у свіжій та переробленій продукції. Тому актуальною є розробка способів створення високо адаптивних, стійких.

до абіотичних і біотичних факторів джерел, придатних до технологій альтернативного землеробства. Високу ефективність для оцінки генотипів на біо- та абіотичну стійкість забезпечує використання лабораторних методів

На даний час існують розрізнені експериментальні дані щодо складу селективних середовищ і методів добору стресотолерантного вихідного матеріалу для селекції помідора [88, 89]. Проведеними дослідженнями визначалась ефективність комплексної оцінки на селективних середовищах та математичного моделювання зразків детермінантного і індетермінантного типів за реакцію на дію абіотичних (соле- і посухостійкості, стійкість до дефіциту/надлишку елементів живлення) і біотичних (стійкості до хвороб) стресових факторів для спрямованого добору вихідних джерел для селекції генотипів для інтенсивних (Int) і органічних(Org) систем виробництва помідора.

В дослідження було залучено 12 генотипів помідора: еталон біотичної стійкості - дикорослий вид *Solanum chilense*; еталон абіотичної стійкості - створену в ІОБ НААН жаростійку лінію K-7311; рекомендовані для інтенсивних технологій гібриди F1 Esmira і Zulfia (Rijk Zwaan)); рекомендовані для виробництва за органічних технологій сорти Golden konongin "Reine D'or", Potiron ecarlate, районовані сорти вітчизняної селекції Севен, Дама, Гейзер і перспективні селекційні лінії T-2, T-4, T-5.

У якості тест-систем для оцінки реакції генотипів на стійкість до абіотичних факторів використовували мікроживці довжиною 10 мм які висаджували на селективне середовище MS із додаванням 5, 10, 15 г/л NaCl (сольовий стрес) (рис. 4.6) ; 50, 100, 150 мг/л гідроксипроліну ($C_5H_9NO_3$ (осмотичний стрес).

У якості експлантатів для оцінки біотичної стійкості генотипів використовували сформований на сегментах сім'ядольних листків морфогенний калюс, отримані на живильному середовищі MS із додаванням регуляторів росту (2 мг/л ІоцК та 2 мг/л БАП). Тестування зразків здійснювали на селективному середовищі MS, доповненому 30 і 40 % культурального фільтрату (КФ) збудників *Alternaria* Nees. та *Fusarium* Link.).

Для моделювання стійкості по дефіциту/надлишку елементів мінерального живлення [90] використовували 6 варіантів поживного середовища MS, модифікованих за вмістом основних компонентів (A – NH_4NO_3 ; B – KNO_3 ; C – $CaCl_2 \cdot 2H_2O + KH_2PO_4 + MgSO_4$): I. A – 1,0; B – 1,0; C – 1,0 (середовище MS – контроль)); II. A – 1,5; B – 1,5; C – 1,5; III. A – 1,5; B – 1,5; C – 1,0; IV. A – 1,0; B – 1,0; C – 0,5; V. A – 0,5; B – 0,5; C – 1,0; VI. A – 0,25; B – 0,25; C – 0,5.

У якості експлантатів для висаджування на селективні середовища використовували мікроживці довжиною 10 мм, одержані з пробіркових рослин дослідних зразків. Пробіркові рослини були попередньо одержані шляхом пророщування в умовах *in vitro* насіння досліджуваних генотипів.

Вплив селективних факторів на біометричні показники пробіркових рослин – відсоток життєздатності і укоріненості експлантатів, висоту рослин-регенерантів і довжину їх кореневої системи визначали через 4 тижні культивування на селективних середовищах. Для нівелювання впливу культури *in vitro* на фенотипові ознаки регенерантів живці помідора висаджували також на контрольний варіант, середовище MS. За отриманих на ньому результатах нормували дані по відношенню до контролю з отриманням індексів, що дозволило проаналізувати різні показники разом.

Активність пероксидази у рослинах-регенерантах, культивованих на селективних середовищах визначали за методом Бояркіна [91].

Застосування комплексного оцінювання в культурі *in vitro* стійкості до некротрофних хвороб, соле-, посухстійкості і стійкості до різних рівнів мінерального живлення 12 різних за генетичною конституцією генотипів помідора забезпечило отримання значного масиву експериментальних даних щодо впливу на біометричні показники диференційованих і недиференційованих експлантатів індукованого на селективних середовищах стресу (рис. 4.7).



Рис. 4.6. Розвиток рослин-регенерантів зразка Goldene koningin «Reine D'Or» помідора в залежності від концентрації натрію хлориду у поживному

середовищі (зліва направо): без NaCl, з 3, з 5 г/л NaCl, з 10 г/л NaCl, з 15 г/л NaCl

Для розробки моделей оцінки стресотолерантних зразків, придатних для вирощування за різних рівнів інтенсивності виробництва, проаналізувавши індекси всіх 71 показників на селективних середовищах в культурі *in vitro* за використання функцій кластерного аналізу ми згрупували генотипи із подібною нормою реакції. За реакцією генотипів зразки розподілились на 2 групи (рис. 4.8).

У першу групу увійшли 6 зразків (*S. chilense*, Goldene koningin "Reine D'Or", Potiron D'Ecarlate, T-5, Дама, T-2), які за польовою оцінкою є придатними для вирощування за органічних технологій, у другу 4 зразки (Зульфія F₁, Есміра F₁, Севен, К. 7311), високо врожайні сорти і гібриди, рекомендовані для інтенсивних технологій вирощування помідора.

За допомогою коефіцієнту кореляції Gamma за Goodman–Kruskal [92], використання якого дозволяє аналізувати зв'язки між непараметричними ознаками, всі ознаки 71 ознаки оцінки генотипів помідора в культурі *in vitro* додатково обрахували, що дозволило нам встановити 11 істотних на 5-ти відсотковому рівні значущості коефіцієнтів кореляції (табл. 4.6).

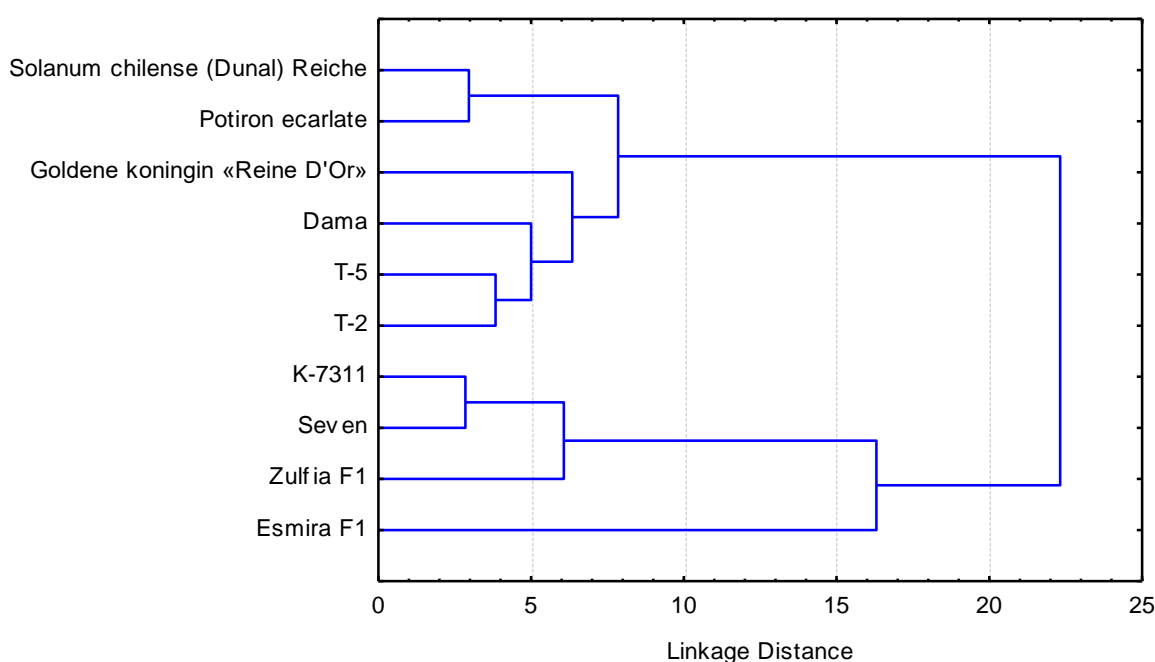


Рис. 4.8. Діаграма створена методом Уорда для 10 генотипів за результатами аналізу евклідових відстаней між фенотипами

Таблиця 4.6 – Істотні коефіцієнти кореляції Gamma за реакцією генотипів в культурі *in vitro* на селективних середовищах

№ вар	Ознаки	Gamma	p-level
13	Середня висота пагона на селективному середовищі із додаванням NaCl 5 г/л	0,67	0,048
14	Середня висота пагона на селективному середовищі із додаванням NaCl 10 г/л	0,75	0,026
15	Середня висота пагона на селективному середовищі із додаванням NaCl 15 г/л	0,75	0,026
19	Середня висота пагона на селективному середовищі із додаванням 30% ФКР <i>Alternaria</i>	0,83	0,014
32	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням NaCl 10 г/л	0,92	0,007
33	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням NaCl 15 г/л	1,00	0,003
34	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням гідроксипроліну 50 мг/л	1,00	0,003
35	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням гідроксипроліну 100 мг/л	0,92	0,007
36	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням гідроксипроліну 150 мг/л	0,83	0,014
39	Показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням 40% ФКР <i>Fusarium</i>	0,75	0,027
57	Довжина кореня на модифікованому середовищі II	0,75	0,027

Для побудови моделей класифікаційних функцій ці 11 показників проаналізовано за використання канонічного дискримінантного аналізу, що

дозволило нам розрахувати систему класифікаційних рівнянь для розподілу зразків на дві встановлені групи:

$$\text{Група А} = -13,84 - 7,90 \cdot (P_{\text{Na}10}) - 3,82 \cdot (P_{\text{H}0.05}) + 5,91 \cdot (P_{\text{F}40}) + 30,24 \cdot (R_{\text{ЛП}})$$

(рекомендовано вирощувати за альтернативної системи виробництва),

$$\text{Група В} = -25,04 + 7,00 \cdot (P_{\text{Na}10}) + 5,10 \cdot (P_{\text{H}0.05}) + 1,51 \cdot (P_{\text{F}40}) - 6,33 \cdot (R_{\text{ЛП}})$$

(рекомендовано вирощувати за інтенсивної системи виробництва)

де, $P_{\text{Na}10}$ - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням NaCl 10 г/л;

$P_{\text{H}0.05}$ - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням гідроксипроліну (0,05 г/л);

$P_{\text{F}40}$ - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням 40% ФКР *Fusarium*;

$R_{\text{ЛП}}$ - довжина кореня на модифікованому середовищі MS із підвищеним вмістом елементів мінерального живлення (1,5 x NH₄NO₃ + 1,5 x KNO₃ + 1,5 x CaCl₂ · 2H₂O + KH₂PO₄ + MgSO₄).

Відповідність генотипу до певної групи визначали за максимальним значенням результату рівняння. Якщо числовий результат рівняння А більший, ніж у рівнянні В, то генотип потрапляє в групу А, як що – ні, генотип розподіляється в групу В. Використання даної системи рівнянь дає можливість надавати рекомендації стосовно напряму використання нових генотипів помідора і їх придатності до вирощування за різних рівнів інтенсивності виробництва.

Система дискримінантних рівнянь також пройшла перевірку під час аналізу досліджуваних 12 зразків: еталон біотичної стійкості - дикорослий вид *Solanum chilense*; еталон абіотичної стійкості - створену в ІОБ НААН жаростійку лінію К-7311; рекомендовані для інтенсивних технологій гібриди F1 Есміра і Зульфія (Rijk Zwaan)); рекомендовані для виробництва за органічних технологій сорти Golden konongin “Reine D`or”, Potiron ecarlate,

районовані сорти вітчизняної селекції Севен, Дама, Гейзер і перспективні селекційні лінії Т-2, Т-4, Т-5 (табл. 4.7).

За результатами проведеного аналізування у **групу А** увійшли зразки *S.chilense*, Goldene koningin «Reine D'Or», Potiron ecarlate, Дама, Т-5, Т-2, які характеризувались високою стійкістю до хвороб. У **групу В** увійшли високо урожайні генотипи (іноземні гібриди Зульфія F1, Есміра F1, К-7311, Севен) які

Таблиця 4.7 – Перевірка системи дискримінантних рівнянь за розробленою моделлю

Назва генотипа	Група А	Група В	Розподіл по групам
<i>S. chilense</i> et.	7,83	-14,54	А
К-7311, et.	7,05	14,44	В
Зульфія F1	2,48	21,09	В
Есміра F1	5,78	29,65	В
Goldene koningin «Reine D'Or»	23,10	3,21	А
Potiron ecarlate	11,88	-14,25	А
Севен	-2,63	27,64	В
Дама	14,34	-3,81	А
Т-5	8,14	-12,08	А
Т-2	11,61	-6,59	А

рекомендуються для інтенсивних технологій виробництва овочевої продукції.

За нашою оцінкою створена в ІОБ НААН лінія Т-5, яка рекомендується для вирощування в захищеному ґрунті (плівкових теплицях) і відкритому ґрунті за результатами лабораторної оцінки відповідає групі **Група А** і тому рекомендована нами для вирощування за технологій органічного овочівництва.

Розроблений «Спосіб оцінки і добору джерел стресотолерантності помідора для альтернативних технологій в культурі *in vitro*» дозволяє за рахунок комплексної оцінки на селективних середовищах та математичного моделювання за 3 місяців диференціювати зразки детермінантного і індетермінантного типів за реакцію на дію абіотичних (соле- і посухостійкості, стійкість до дефіциту/надлишку

елементів живлення) і біотичних (стійкості до хвороб) стресових факторів, впровадження якого на 20 % зменшить об'єми польових досліджень, в два рази прискорить тривалість створення придатних для вирощування за органічних технологій генотипів і сприятиме покращенню екологічної ситуації. За його використання також можна надати рекомендації стосовно напряму використання нових генотипів за різних рівнів інтенсивності виробництва помідора, як інтенсивних, так і органічних систем виробництва помідора з високою екологічною безпечністю продукції. За використання визначених нами функцій можливо прискорити оцінку великої кількості генотипів за сукупністю ознак у селекційній практиці, насамперед за стійкістю до біотичних і абіотичних факторів. Даний методичний підхід для оцінки генотипів можливо застосовувати на культурі помідора як на ранніх так і на заключних етапах селекції.

Література

1. Švábová L., Lebeda A. J. (2005). *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Phytopathol.* **153**:52–64.
2. Király Z., Klement Z., Solymosy F., Vörös J. (1974). *Methods in Plant Pathology*. Akadémiai Kiadó. – Budapest. – 509 p.
3. Dhingra O. D., Sinclair J. B. (1986). *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton: CRC Press, – 355 p.
4. Lebeda A. (1986). *Methods of Testing Vegetable Crops for Resistance to Plant Pathogens*. VŠÚZ: VHI Sempra. – 286 p.
5. Trigiano R. N., Windham M. T., Windham A. S. (2004). *Concepts and Laboratory Exercises. Plant Pathology: CRC Press*. – 413 p.
6. Singh D. P., Singh A. (2005). *Disease and Insect Resistance in Plants*. Enfield: Science Publishers Inc.. – 417 p.
7. Helgeson J. P., Ingram D. S., Helgeson J. P. (1980). Disease resistance studies with tissue cultures. *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. – 179–184.
8. Day P. R., Ingram D. S., Helgeson J. P. (1980). Tissue culture methods in plant breeding. *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980. – P. 223–231.
9. Carlson P. S. (1973). Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*. **180**:1366–1368.
10. Daub M. E. (1986). Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **24**:159–186.
11. Ingram D. S., Helgeson J. P. (1980). *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980. – 272 p.
12. Helgeson J. P., Deverall B. J. (1983). *Use of Tissue Culture and Protoplasts in Plant Pathology*. Sydney: Academic Press, 1983. – 194 p.

13. Huang J. S. (2001). Plant Pathogenesis and Resistance. Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. – 691 p.
14. Lebeda, A., Švábová, L. (2010). Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases. Chapter 2: In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. pp. 5-46.
15. Wenzel G. (1985). Strategy in unconventional breeding for disease resistance. Annu Rev Phytopathol. **23**:149–172.
16. Daub M. E. (1986). Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annu Rev Phytopathol. **24**:159–186.
17. Kashyap, S.P., Prasanna, H.C., Kumari, N, Mishra, P, Singh, B. (2020). Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and *de novo* assembly of wild tomato *Solanum chilense*. Scientific reports. **10** (10). doi:10.1038/s41598-020-72474-w
18. Ahuja, I., Vos, R.C., Bones, A.M. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. Trends in Plant Science. **15**:664-674.
19. Kharabian A., Darabi A. (2005). Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*). Plant Cell Tiss. Organ. Cult. **83**:161–168.
20. Tang C. Y., Tai C. H. (2001). Improvement of the horticultural traits of Cavendish banana (*Musa* spp., AAA group) through somaclonal variation. Tropic Agric. **78**:40–47.
21. Ravindra N. S. , Kulkarni R. N., Gayathri M. C, Ramesh S. (2004). Somaclonal variation for some morphological traits, herb yield, essential oil composition in an Indian cultivar of rose-scented geranium. Plant Breeding. **123**:84–86.
22. Bajji M., Bertin P., Lutts S., Kinet J. M. (2004). Evaluation of drought resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected *in vitro*. Aust J Exp Agric. **44**:27–35.
- 23 Abdel-Raheem A. T., Ragab A. R., Kasem Z. A. (2007). *In vitro* selection for tomato plants for drought tolerance via callus culture under polyethylene glycol (PEG) and mannitol treatments. African Crop Science Conference Proceedings. El-Minia. pp. 2027 – 2032.
- 24 Emilio, A. Cano, F., Vicente, M. (2005). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. Plant cell, tissue and organ culture. **53**:19–26.
25. Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M., Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. Physiologia plantarum. **112**(4):487-494. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1120405.x
26. Md Rais Uddin Rashed, Mallika Rani Roy, Santosh Kumar Paul, Md Maksudul Haque. (2016). *In vitro* Screening of Salt Tolerant Genotypes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Horticulture. **3** (4). doi: 10.4172/2376-0354.1000186
27. Dugdale L. J. , Mortimer A. M. , Isaac S., Collin H. A. (2000). Disease response of carrot and carrot somaclones to *Alternaria dauci*. Plant Pathol. **49**:57–67.
28. Mehta R., Angra D. (2000). Somaclonal variation for disease in wheat and production of dihaploids through wheat × maize hybrids. Genet. Molec. Biol. **23**:617–622.
29. Jain S. M. (2005). Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. **82**:113–123.
30. Jain S. M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. / S. M. Jain // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2005. – Vol. 82. – P. 113–123.
31. Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et. all. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regul. **37**:263–285.
32. Mohan Jain S. (1981). Tissue Culture – derive variation – novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. **60**:197–214.
33. Ahmed K. Z., Mesterházy Á., Sági F. (1991). *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium* resistance. I. Double-layer technique. Euphytica. **57**:251–257.
34. Івченко Т. В., Мірошніченко Т., Віценя Т., Баштан Н. та ін. (2016).

Біотехнологічний спосіб створення стійкого до хвороб вихідного селекційного матеріалу овочевих культур. Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин : збірник наукових праць. – СГІ –НЦНС. – Одеса: Астропринт. – 148–155.

35. Peros J. P., Chagvardieff P. (1987). Toxic effect of *Ustilago scitaminea* on sugarcane callus. II. Culture filtrate action and comparison with the effects of *Ustilago maydis* and kinetin. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz . **94**:301–307.

36. Gentile A. , Tribulato E., Continella G., Vardi A. (1992). Differential responses of citrus calli and protoplasts to culture filtrate and toxin of *Phoma tracheiphila*. Theor. Appl. Genet. **83**:759–764.

37. Buiatti M., Scala A., Bettini P. et. all. (1985). Correlations between *in vivo* resistance to *Fusarium* and *in vitro* response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. Theor. Appl. Genet. **70**:42–47.

38. Crino P., Upadhyay R. K. , Mukerji K. G. (eds.) (1997). Culture filtrate as selective agent of resistance to phytopathogenic fungi. Toxins in Plant Disease Development and Evolving Biotechnology. – Enfield: Science Publishers Inc., – P. 183–208.

39. Lebeda A., Švábová L. (1997). Variation in response of several wild *Pisum* spp. to *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. Cereal Res Commun. **25**:845–846.

40. Основи селекції польових культур на стійкість до шкідливих організмів: навчальний посібник / за ред. В. В. Кириченка, В. П. Петренкої, 2012 Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. – Х.: Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва,. – 320 с.

41. Бабаянц Л. Т., Бабаянц О. В., Васильев А. А. [та ін.] (2007). Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на групповую устойчивость к фитопатогенам. 36. наукових праць СГІ-НЦНС. – Одеса, **9**(49):224–237.

42. Nedlnik J., Repkova J. (1998). Plant selection *in vitro* for resistance to some pathogens using secondary toxic metabolites. Czech J. Genet. Plant Breed. **34**:69–76.

43. Дубровіна О. В., Моргун Б. В. (2009). Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. Физиология и биохимия культурных растений. **41**:463–476.

44. Игнатова С. А. (2011). Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задача, возможности, разработки систем *in vitro*: монография. – Одесса: Астропринт.– 224 с.

45. Волощук С. І. (2006). Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* : дис. ... канд. с.-г. н.: 03.00.15. К.– 270 с.

46. Сергеева, Л.Е., Бронникова, Л.И. (2017). Клеточная селекция с использованием катионов Ва²⁺ для отбора солеустойчивых линий пшеницы. Физиология растений и генетика. **49** (2):174 – 178.

47. Chi W, Feng P, Ma J, Zhang L (2015). Metabolites and chloroplast retrograde signaling. Curr Opin Plant Biol. **25**:32–38.

48. Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. Semin Cell Dev Biol 21:805–811.

49. Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. Plant Cell Environ. **35**:259–270.

50. Smulders MJM, de Klerk GJ (2011). Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regul **63**:137–146.

51. Taşkın H, Baktemur G, Kurul M, Büyükalaca S (2013). Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. Sci World J **13**:5.

52. Fortes A, Gallusci P (2017). Plant stress responses and phenotypic plasticity in the Epigenomics era: perspectives on the grapevine scenario, a model for perennial crop plants. Front Plant Sci. **8**:82.

53. Bohn G. W., Tucker C. M. (2009). Immunity to fusarium wilt in the tomato. Science. **8**:60–64.

54. Graf G, Barak S. (2015) Stress induces cell dedifferentiation in plants. *Biochim Biophys Acta (BBA)—Gene Regul Mech.* 1849:378– 384.
55. Koike M, Murakami T., Katsumata Y., Amemyia Y. (1993). Use of culture filtrates of *Verticillium dahliae* as a bioassay for screening of disease tolerant eggplant Plant Tiss Cult Lett. 10:71–74.
56. Ivchenko T. V., Kornienko S. I., Miroshnichenko T. M., Mozgovska H. V. (2014). The Usage of Cell Selection for Creation of Tomato and Eggplants Breeding Lines with Resistance to *Fusarium*. *Agricultural Science and Practice.* 1(3):15–21.
57. Gourd J. M. Southwars G. M., Phillips G. S. (1988). Response of *Allium* tissue cultures to filtrates of *Pyrenochaeta terrestris*. *Hort. Sci.* 23:766–768.
58. Калашникова Е. А. (2003). Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Калашникова Елена Анатольевна. – М.,– 279 с.
59. Чикризова О. Ф. Поляков А. В., Каранова С. Л. (2003). Устойчивость каллюсных тканей моркови к стрессовым факторам в условиях *in vitro*. *Физиология растений.* 50(5): 379–383.
60. Раскалиева В. А., Калашникова Е. А. (2001). Использование методов биотехнологии в получении форм моркови, устойчивых к альтернариозу. *Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы.* – М.: Воскресенье. 2:81–91.
61. El-Kazzaz A. A., Ashour A.M.A. (2004). Genetically Resistant Cucumber Plants to Wilt Pathogen via Tissue Cultures Egypt. *J. Phytopathol.* 32(1):1–10.
62. Івченко Т. В., Віцень Т. І., Сергієнко О. В. (2016). Використання клітинних технологій *in vitro* для добору стійкого до фузаріозного в'янення (*Fusarium oxysporum*) вихідного матеріалу огірка [Електронний ресурс]. Наукові доповіді НУБІП, 2(59), – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2016_2/index.html. – 12 с.
63. Рубин Б. А., Архивовская Е. В., Аксенова В.А. (1975). Биохимия и физиология иммунитета растений. М.: Высшая школа – 404 с.
64. Бабицкий А. (2005). Эволюция и репродуктивная память. Reports and Abstracts of the VIII Geneticist's and Breeder's Congress of Moldova "Genetics and breeding of Plants, Animals and Microorganisms". – Chishinau (Moldova). - 696–701.
65. Василевский В.А. Тимин Н.И. (1997). Генетические особенности моркови и их использование в селекции на гетерозис. Гетерозис сельскохозяйственных растений: материалы межд. симп. – М., – С. 21–22.
66. Черненко В. Л. (2013). Моніторинг зонального патоккомплексу помідора відкритого ґрунту та його значення для імунологічних досліджень. Овочівництво і баштанництво. 59:305–314.
67. Сазонова Л. В. Власова З. А. (1990). Корнеплодные растения: морковь, сельдерей, петрушка, пастернак, редис, редька. *Агропромиздат.* – С. 72–83.
68. Сергієнко О.Ф. (2000). Оптимизация методики микрочлонирувания моркови. *Физиология и биохимия культурных растений.* – Киев. 32(3):232 235.
69. Сергієнко О.Ф. (2002). Мікрочлонування селекційних зразків моркви, особливості розвитку рослин-регенерантів *in situ*. *Вісник аграрної науки.* 11(41-43).
70. Мірошніченко В.П., Сергієнко О.Ф., Івченко Т. В. (2004). Методика досліджень в культурі ізолюваних тканин овочевих рослин. – Мерефа: ІОБ УААН – 25 с.
71. Бавол А. В. Дубровна О. В., Лялько І. І. (2009). Селекція *in vitro* м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *Triticici*. *Физиология и биохимия культурных растений.* 41(4):314–320.
72. Пат. № 91923 UA, МПК (2014.01) A01C1/00 Спосіб створення стійких проти альтернариозу форм моркви у культурі *in vitro* : патент на корисну модель / Сергієнко О. Ф., Івченко Т.В., Віцень Т. І., Черненко В. Л.; заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u2014 00287; заявл. 14.01.2014; опубл. 25.07.2014, Бюл. № 14.
73. Тюкавин Г. Б. (2007). Основы биотехнологии моркови. ВНИИССОК РАСХН. – 479 с.
74. Родева В., Станчева Й. (2003). Използаване на токсични метаболити от

фитопатогени в *in vitro* селекція за устійчивост при растенията. Растениевъдни науки: Национален центр за аграрии науки. **40**:204–209.

75. Черненко К. М. Черненко К. М. (1999). Діагностика стійкості моркви проти чорної гнилі експрес-методом за насінням. Зб. наукових праць УААН відділення рослинництва і переробки продукції. – Аграрна наука. – С. 209–210.

76. Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур [За ред. Т. К. Горової, К. І. Яковенка]. 2001–Х., – 644 с.

77. Ivchenko T. Vitsenia T., Miroshnichenko T. (2015). Sell breeding of vegetable crops on resistance to biotic and abiotic factors of environment. Proceedings of Azerbaijan Institute of Crop Husbandry – **26**:32–38.

78. Melo I. S. Costa C. D. (1985). Resistance reaction of aubergine progenies to *Verticillium albo-atrum* Reinkes Berth. Summa. **8**:180–185.

79. Пат. 89518 UA, МПК (2013.11) A01H 1/00 Спосіб створення фузаріозостійкого вихідного матеріалу пасльонових овочевих культур (помідор, баклажан, перець) : патент на корисну модель / Івченко Т. В., Черненко К. М., Черненко В. Л., Мозговська Г. В., Мірошніченко Т. М.; заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u2013 13062; заявл. 11.11.2013; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8.

80. Івченко Т. В. Мозговська Г. В. (2013). Приготування фільтратів культуральної рідини гриба *Fusarium solani* Sacc. для використання в клітинній селекції баклажана на стійкість проти фузаріозного в'янення. Селекція і насінництво: зб. наук. праць. Х., – С. 23–31.

81. Івченко Т. В. Баштан Н. О., Черненко К. М. (2016). Клітинна селекція помідора на стійкість до ранньої сухої плямистості (*Alternaria solani* Ell.). Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В. В. Докучаєва : сер. “Рослинництво, селекція, насінництво, плодоовочівництво”. **1**:104–113.

82. Билай В. И. (1977). Фузари. – К. : Наукова думка. – 443 с.

83. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Горова Т. К., Мірошніченко Т. М., Гурін М. В. (2015). Використання біотехнологічних методів у створенні вихідного матеріалу для селекції органічних сортів томата // Фактори експериментальної еволюції. **17**:169–173.

84. Івченко Т. В. Мірошніченко Т. М., Черненко В. Л. (2014). Оцінка стійкості зразків помідора проти фузаріозного в'янення в культурі *in vitro*. Овочівництво і баштанництво. **60**. :193–201.

85. Методика експертизи сортів на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС). Овочеві, баштанні культури та картопля (2004). Охорона прав на сорти рослин. Офіційний бюлетень. Мінагрополітики України, Держслужба з охорони прав на сорти рослин. –1(2):252 с.

86. Reisvik, S. World map of vegetable crops. (2018). Global industry trends [Електронний ресурс] //URL: www.agroxxi.ru/mirovye-agronovosti/vsemirnaja-karta-ovoschnyh-kultur-globalnye-tendencii-otrasli.html.

87. Phillips, S.L., Wolfe, M.S. (2005). Evolutionary plant breeding for low input systems. Journal of Agricultural Science. **143**:245–254.

88. El-Sayed, A., Mahdia, F., Fouad, H. (2004). Responses to nacl salinity of tomato cultivated and breeding lines differing in salt tolerance in callus cultures. Internation Journal of Agriculture and Biology. **6**:9-26.

89. Wang, Z.Y., Bao, Y.F. (2018). Silencing the SLB3 transcription factor gene decreases drought stress tolerance in tomato. Journal of Integrative Agriculture. **19**(11):2699-2708. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63350-0

90. Poothong, S., Reed, B.M. (2014). Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. Scientia Horticulturae. **165**:132–141

91. Бояркин А.Н. (1961). Колориметрическое определение активности пероксидази. Биохимия. **16**(2):252-254.

92. Goodman, L.A., Kruskal, W.H. (1954). Measures of association for cross classifications. Journal of the american statistical association. **49**(268):732–764,

ГЛАВА 5. РОЗРОБКА СПОСОБІВ ПОДОЛАННЯ ПОСТГАМНОЇ НЕСУМІСНОСТІ ПІД ЧАС МІЖВИДОВОЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ ПОМІДОРА (*LYCOPERSICON TOURN.*), БАКЛАЖАНА (*SOLANUM MELONGENA L.*), ГАРБУЗА (*CUCURBITA L.*)

Для багатьох важливих сільськогосподарських культур, у тому числі й для овочевих (помідор, гарбуз, баклажан), міжвидова гібридизація – ефективний спосіб залучення цінних господарських ознак до селекційної практики [1, 2, 3, 4]. Але можливості міжвидових схрещувань обмежуються через існування бар'єрів несхрещуваності між різними видами, які ускладнюють отримання фертильних гібридів [5, 6, 7]. Для їх подолання ефективним виявилось комплексне поєднання селекційних і біотехнологічних методів на етапах запилення, запліднення та розвитку ембріонів [8, 9, 10]. Такий підхід уможливорює оптимізацію всіх етапів з розмноження рослин у культурі ізольованих клітин *in vitro*, яке можна контролювати в лабораторних умовах упродовж року, незалежно від сезону [11, 12, 13].

Методика вирощування зародків міжвидових гібридів помідора виявилася успішною для комбінацій *L. esculentum* / *L. hirsutum*; *L. esculentum* / *S.pennellii*; *L. esculentum* / *L. minutum* та ін., що дозволило зберігати маложиттєздатні рекомбінантні генотипи з цінними комбінаціями генів. У комбінації *L. esculentum* / *L. peruvianum* гібридні зародки гинули в постгамній фазі запліднення внаслідок несумісності зародка й ендосперму [14, 15, 16]. Тому вилучення та дорощування таких гібридних зародків на штучному поживному середовищі, яке замінює ендосперм, дозволяє зберегти та доростити гібридні рослини до ювенільної фази, а надалі у горшечковій культурі – до репродуктивної фази [17, 18]. За даної технології вихідним матеріалом використовують насіння дикорослих видів, або створених на їх основі міжвидових гібридів та напівкультурних різновидів [19]. Найбільш перспективним є використання наступних видів роду: *S.pimpinellifolium* -

посуhostійкість і стійкість до засолення [20, 21]; *S. melongena* - стійкість до підвищених і знижених температур [22, 23]; *S. integrifolium* - покращена якість плодів [24, 25]; *S. torvum* - стійкість до хвороб і нематод [26, 27]; *S. laciniatum* - стійкість до дефіциту вологи у ґрунті [28, 29, 30].

Для культури баклажана залучення гермоплазми віддалених видів роду *Solanum* L. забезпечує підвищення в селекційних формах стійкості до біотичних й абіотичних факторів [31]. Стійкість баклажана до вертицильозного в'янення можна запозичити в *Solanum integrifolium*, *S. sisymbriifolium* F. Lam., *S. torvum* [32]. Наприклад, лінії, отримані від схрещування *S. linnaeanum* з *S. melongena*, характеризувались підвищеною стійкістю до вертицильозного в'янення [33, 34]. Дослідники з Нігерії, аналізуючи комбінаційну здатність вихідного матеріалу з *S. aethiopicum*, довели, що калюсні лінії баклажана мали толерантність до впливу на них високих (50 °C впродовж 3 годин) температур [35, 36]. Гібридам *S. inducum*, *S. gilo*, *S. sisymbriifolium* властива також стійкість до хвороб фузаріозного в'янення, фомопсису та нематоди [37, 38]. Отримані в культурі пиляків дигаплоїдні рослини *S. melongena* й *S. aethiopicum* Gilo gr. також виявилися стійкими до фузаріозного в'янення, спричиненого грибом *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* [39].

Результати міжвидової гібридизації серед видів роду *Cucurbita* й існуючі бар'єри несумісності детально проаналізовано в роботах Ayala [40] та Во [41]. Інтрогресивна селекція серед роду *Cucurbita* в першу чергу націлена на покращання таких господарських ознак, як продуктивність і якість плодів. Також зроблено спроби підвищити стійкість рослин до шкідників і хвороб, модифікувати архітекtonіку рослин й їх стать. Створені в результаті селекційної роботи міжвидові гібриди можуть бути цінними джерелами стійкості, насамперед, до хвороб, збудниками яких є вірусні та грибкові захворювання.

Отримання міжвидових гібридів між трьома культурними видами гарбуза *C. pepo*, *C. maxima* та *C. moschata* важливо з практичної і теоретичної

точки зору. Вид *C. maxima* має форми з високою цукристістю та ніжним м'якушем, але пізньостиглі та маловрожайні [42]. У виду *C. pepo* існують дуже скоростиглі, але недостатньо цукристі форми. Окремі сорти виду *C. moschata* містять велику кількість каротину. Міжвидова гібридизація гарбуза дозволяє створювати скоростиглі, багаті каротином і цукром сорти [43, 44].

Таким чином, було розроблено методичні підходи використання методу ембріокультури в культурі *in vitro* для подолання постгамної несумісності за міжвидової гібридизації томата, баклажана та гарбуза в Інституті овочівництва і баштанництва НААН.

Подолання постгамної несумісності між культурними та дикорослими видами томата, баклажана та гарбуза здійснювали шляхом використання гібридних комбінацій: томата - 1) *L. esculentum* / *L. peruvianum*; 2) *L. esculentum* / *L. chilense*; 3) *L. esculentum* / *L. pennellii*; гарбуза: 1) *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) / *C. pepo* (сорт Маслянка); та *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) / *C. moschata* (сорт Бальзам); баклажана: 1) *S. melongena* (сорт Алмаз) / *S. macrocarpon*; 2) *S. melongena* / *S. integrifolium*; 3) *S. melongena* / *S. aethiopicum* gr. *Gilo*; 4) *S. melongena* / *S. sisimbrifolium*; 5) *S. melongena* / *S. linnaeum*, зародки яких видаляли з недозрілих плодів через 15 – 30 діб після запилення та ініціювали її проростання культивуванням на твердих поживних середовищах MS, модифікованих регуляторами росту [45]. Для спрощення процедури ідентифікації гібридності під час інтрогресивної селекції материнськими формами використовували культурні рослини з маркерними ознаками. Отримані проростки міжвидових гібридів розмножували мікроживцюванням на безгормональному середовищі MS. Адаптацію розмножених в культурі *in vitro* гібридних рослин до умов *ex vitro* провели згідно лабораторної методики [46, 47, 48].

5.1. Розробка прийомів подолання постгамної несумісності помідора *Lycopersicon Tourn.*

Інтрогресивна селекція – залучення до схрещувань зародкової плазми дикорослих і напівдиких видів помідора відкриває великі перспективи для збільшення різноманіття вихідних селекційних форм помідора з цінними ознаками. Механізми несумісності та прийоми її подолання за міжвидових схрещувань рослин вже досить добре вивчено, проте культивування гібридних зародків і насіння віддалених гібридів помідора має свої особливості.

Доведено, що можливість розмноження гібридів несумісних видів родини *Solanaceae* L. на поживних середовищах у культурі *in vitro* залежить, перш за все, від генотипу та стадії розвитку гібридного зародка на момент його виділення з плода [49]. Проростання недозрілих зародків на поживних середовищах спостерігали на всіх варіантах лише в однієї гібридної комбінації *L. esculentum* (Мо 500) / *L. chilense*. Зважаючи на те, що частота проростання (75% до загальної кількості висаджених) незрілих зародків указаної гібридної комбінації на безгормональному середовищі MS дорівнювала частоті їх проростання на модифікованих регуляторах росту варіантах середовищ, нами зроблено висновок, що стадія ізоляції зародків із плоду – визначний фактор для подолання постгамної несумісності помідора. Не сприяло розвитку гібридних зародків і додавання до середовища гіберелової кислоти (ГК₃), яка впливає на розвиток зиготичних зародків рослин і на ініціацію проростання насіння, а також α -нафтилоцтової кислоти (НОцК) [50].

Формування повноцінних рослин-регенерантів із нормально розвиненими сім'ядолями та кореневою системою відбувалося лише після введення в культуру *in vitro* гібридних зародків від *L. esculentum* (Мо 500) / *L. chilense* через 30 і 40 діб після запилення. За літературними даними, через 30 діб після запилення вони знаходяться у фазі торпедовидного ембріюда, який

характеризується повністю сформованими зародками [51]. У нашому випадку, висаджені на поживні середовища через 20-26 діб після запилення зародки знаходились відповідно у глобулярній та сердечковидній стадіях розвитку і не були здатними до утворення проростків. Проте значний їх відсоток формував калюсні тканини (табл. 5.1). Максимальний об'єм калюсів забезпечило культивування зародків на поживному середовищі MS + 0,1 мг/л кінетину+0,01 мг/л НОцК. Але за наступного культивування індукованих з зародків калюсів на регенераційному середовищі вони мали низьку органогенну спроможність і не забезпечували отримання рослин-регенерантів.

Такі результати уможливили зробити висновок, що використання безгормонального базового поживного середовища MS, яке містить найважливіші макро- й мікроелементи, задовольняє вимогам необхідним для збереження життєздатності гібридних зародків помідора, ізольованих із плодів через 30 діб після запилення.

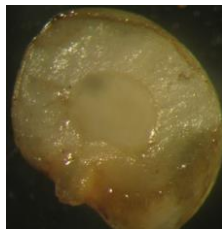
Окрім недорозвинених зародків, також вводили в культуру *in vitro* недорозвинене насіння з достиглих плодів міжвидових гібридів помідора, одержаних від запилення культурних материнських форм пилком дикорослих видів, попередньо оброблених різними дозами γ -випромінювання. Така робота виявилась достатньо результативною: 55,6 % усіх висаджених насінин міжвидового гібрида *L. esculentum* (Mo 500) / *L. chilense*, отриманих у результаті обробки пилку γ -променями (доза 10 Гр), утворили на рідкому й агаризованому безгормональному середовищах MS проростки. Вони мали як нормальний фенотип (розвинені пагін і корінці), так і аномальний розвиток (рис. 5.1).



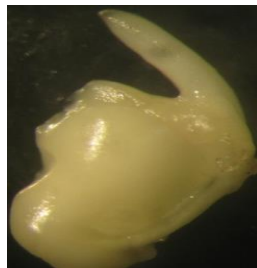
Рис. 5.1. Формування нормально розвинених (у центрі) й аномальних рослин-регенерантів міжвидових гібридів помідора в гібридній комбінації *L. esculentum* Mill (Mo 500) / *L. chilense*



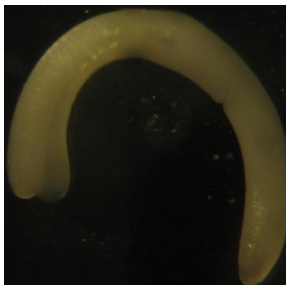
Рис 5.2. Введені в культуру *in vitro* рослини помідора через 3 тижні культивування:
a – *L. esculentum* (Mo 638);
b – *L. esculentum* (Mo 638) / *L. chilense*;
c – *L. esculentum* (Mo 638) / *S. pennellii* Cor.



a



b



c

Рис. 5.4. Формування зародків міжвидових гібридів:
a – глобулярна стадія розвитку;
b – сердечко подібна стадія розвитку;
c – майже сформований зародок

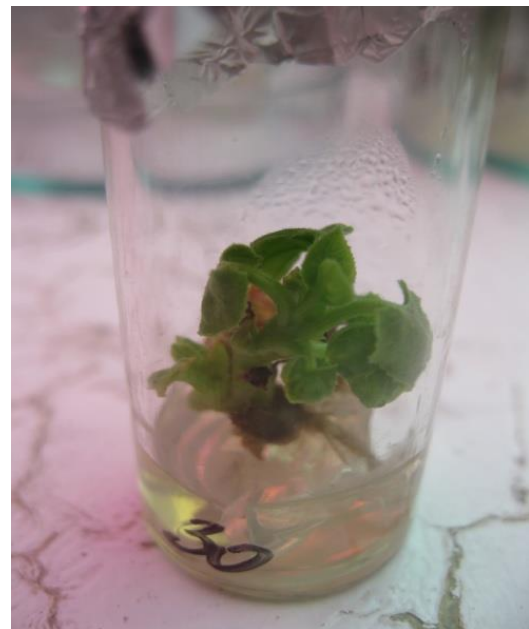


Рис. 5.5. Гібридні рослини гарбуза, отримані від схрещування:
C. maxima (лінія Кр-РЛ) / *C. moschata* (сорт Бальзам)

Таблиця 5. 1 – Вплив генотипу, розміру зародків і фітогормонального складу поживних середовищ на ефективність проростання зародків міжвидових гібридів помідора в культурі *in vitro*

Гібридна комбінація	Кількість діб після запилення	Розмір зародка, мм	Поживне середовища					
			MS, безгормональне		MS + 0,1 мг/л кінетину+ 0,01 мг/л ІОцК		MS + 0,1 мг/л ГК ₃ + 0,1 мг/л НОцК	
			пророслих зародків, %	середній об'єм калюсу, мм ³	пророслих зародків, %	середній об'єм калюсу, мм ³	пророслих зародків, %	середній об'єм калюсу, мм ³
<i>L. esculentum</i> (Мо 500) / <i>L. chilense</i>	21	1	0	0	0	930,6±11,3	0	328±4,1
	26	2	0	0	0	855,2±10,1	0	299,1±3,8
	30	3	50	0	50	0	30	0
	40	4	65	0	60	0	45	0
<i>L. esculentum</i> (Мо 638) / <i>L. chilense</i>	21	1	0	0	0	779,0±8,4	0	431,9±5,0
	26	2	0	0	0	699,3±8,0	0	322,4±6,1
<i>L. esculentum</i> (сорт Чайка) / <i>L. chilense</i>	21	1	0	0	0	805,0±9,5	0	212±3,2
	26	2	0	0	0	754,3±8,4	0	331,3±4,0
<i>L. esculentum</i> (Мо 638) / <i>L. peruvianum</i>	20	1		0	0	578,2 ±7,4	0	0
	25	2		0	0	478,6±5,3	0	0
	30	3		0	0	0	0	0
<i>L. esculentum</i> (Мо 500) / <i>L. peruvianum</i>	28	1	0	0	0	0	0	210,4±2,9
	32	2		0	0	0	0	235,7±1,8
<i>L. esculentum</i> (с. Чайка) / <i>L. peruvianum</i>	21	1	0	0	0	477,9±6,1	0	0
	28			0	0	234,0±3,9	0	0
<i>L. esculentum</i> / <i>S. pennlii</i> Cor.	25	1	0	0	0	0	0	0

Аномальність проростків проявлялась, насамперед, у відсутності сім'ядольних листків, а також незвичним для більшості проростків опушенням. Через відсутність сім'ядоль таке гібридне насіння у випадку його пророщування в ґрунтових умовах не змогло б сформувати рослину. Лише за культивування в умовах *in vitro* можна зберегти життєздатність такої рослини, та за рахунок технологічних можливостей методу провести додаткове розмноження цінного для селекції матеріалу.

Оскільки біотехнологічні роботи досить енерго- та трудомісткі, велике значення набуває рання діагностика гібридності одержаного пробіркового матеріалу, передусім, за допомогою маркерних ознак. З метою спрощення ідентифікації гібридності, материнськими формами під час міжвидового схрещування використовували зразки культурного помідора з низкою яскравих фенотипових маркерних ознак, частину яких можна вже виявити на етапі пробіркової рослини – Мо 500 (гени Wo^m , o , aw , d , r , c , $m-2$), Мо 638 (гени $v-2$, r , a , c , $clau$, gs , gf , u , v), сорт Чайка (гени sp , d , $j-2$, u , I , $I-2$). Прояв маркерних ознак у введених в культуру *in vitro* гібридних зиготичних зародків міжвидових гібридів помідора свідчить, що у трьох рослин гібридної комбінації *L. esculentum* (Мо 500) / *L. chilense* (табл. 5.2.) рослини-регенеранти характеризувалися повним комплексом фенотипових ознак материнської мутантної форми *L. esculentum* (Мо 500). Їх обумовлювала наявність генів o та aw (відсутність антоціанового забарвлення), c (“картопляний” листок), $m-2$ (хлоротичні плями на листках).

У фазі проростка ідентифіковано гібридність таких проростків за антоціановим забарвленням сім'ядоль і гіпокотелю. Пізніше наявність їх у рослин досліджуваних гібридних комбінацій підтверджено аналізом форми листків регенерантів. У гібридних рослин був відсутнім прояв рецесивного гену c , властивого мутантному зразку *L. esculentum* (Мо 638) (рис. 5.2.).

Згідно отриманих даних, стало зрозумілим, що одержані проростки не були гібридними, а утворились внаслідок самозапилення материнської рослини. Також встановлено, що з плодів, які мали велику кількість насінин

(понад 5 шт.), усі пробіркові рослини також належали материнському фенотипу. Тоді як плоди, отримані від гібридних комбінацій *L. esculentum* (Мо 638) / *L. peruvianum* та *L. esculentum* (Мо 638) / *L. chilense*, містили не більше двох насінин діаметром від 1 до 3,5 мм.

Таблиця 5. 2 – Вплив гібридної комбінації на формування плодів під час міжвидової гібридизації помідора та проростання гібридного насіння на штучних поживних середовищах у культурі *in vitro*.

№ п/п	Комбінація схрещування	Кількість плодів, шт	Середня кількість насінин у плоді, шт.	Розмір зародка, мм	Кількість, %	
					пророслих зародків	рослин міжвидових гібридів
1	<i>L. esculentum</i> (Мо 500) / <i>L. chilense</i>	2	11	1 – 2	0	0
2	<i>L. esculentum</i> (Мо 500) / <i>L. chilense</i>	2	10	1 – 2	0	0
3	<i>L. esculentum</i> (Мо 500) / <i>L. chilense</i>	1	16	3	12	0
4	<i>L. esculentum</i> (Мо 638) / <i>L. peruvianum</i>	1	3	1 – 3,5	1	1
5	<i>L. esculentum</i> (Мо 638) / <i>L. chilense</i>	1	4	1- 3,5	2	2

Додатково було встановлено відмінності в динаміці проростання зародків, висаджених на поживне середовище. Гібридні зародки відрізнялись тривалішим періодом спокою. Так, висаджене на штучне поживне середовище гібридне насіння *L. esculentum* (Мо 638) / *L. chilense* діаметром 3,5 мм проросло тільки через 2,5 місяці.

До ідентифікованих за маркерними ознаками гібридних рослин *L. esculentum* (Мо 638) / *L. chilense* в подальшому застосовували метод клонального мікророзмноження. Морфометричні показники пробіркових рослин створеного міжвидового гібрида та вихідної материнської форми помідора (*L. esculentum* (Мо 638) засвідчили високі темпи росту пагонів

рослин-регенерантів гібриду *L. esculentum* (Mo 638) / *L. chilense*. За показниками довжина стебла і кількість листків, рослини гібрида перевищували вихідну материнську форму (табл. 5.3).

Культивування гібридних рослин на поживних середовищах мало характерну особливість – утворення на поверхні тканин стебел і черешків листків сипкий калюсоподібний шар.

Таблиця 5. 3 – Морфометричні показники розвитку мікроживців *L. esculentum* (Mo 638) і гібрида *L. esculentum* (Mo 638) / *L. chilense* через 4 тижні культивування на рідкому безгормональному середовищі MS (середнє за 3 пасажі)

Гібрид	Показники:		
	довжина стебла, мм	кількість листків, шт.	розвиток кореневої системи, балів
<i>L. esculentum</i> (Mo 638)	68,7±9,0	7,1±6,9	4,9±0,3
<i>L. esculentum</i> (Mo 638) / <i>L. chilense</i>	93,0±12,3	10,3±9,6	5,1±0,3
НІР ₀₅	18,2	2,9	-

Адаптовані до нестерильних умов рослини заввишки 150-300 мм з 1-3 боковими пагонами передали для застосування в інтрогресивній селекції до лабораторії прикладної генетики ІОБ НААН.

Підтверджено, що під час створення міжвидових гібридів помідора ефективно є використання батьківськими компонентами генотипів-носіїв мутантних генів, що відносяться до модифікації антоціану, форми і розміру листків, хлорофільні модифікації. Їх використання дозволяє здійснювати ранню ідентифікацію гібридності рослинного матеріалу в умовах *in vitro* за проявом маркерних фенотипових ознак (колір сім'ядоль, гіпокотелю, форма й опушення листків).

5.2. Розробка прийомів подолання постгамної несумісності баклажана (*Solanum melongena* L.)

Досліджено можливості використання біотехнологічного способу для розмноження міжвидових гібридів між культурною формою (*S. melongena* L.) та дикорослими видами баклажана *S. aethiopicum* gr. *Gilo* та *S. integrifolium* Poir. Незрілі гібридні зародки видаляли із стерилізованих насінин через 15, 20, 25, 30 діб після запилення, після чого їх розміщували на агаризованих поживних середовищах. При розробці способу отримання гібридних зародків несумісних видів роду *Solanum* L., вивчено ефективність культивування зародків різного віку на безгормональному середовищі MS (контроль) та середовищі модифікованому регуляторами росту – 0,1 мг/л НОцК та 0,1 мг/л ГК₃.

На модифікованому регуляторами росту середовищі 97,7% зародків гібрида *S. melongena* L. / *S. aethiopicum* gr. *Gilo*, та 90,9 % гібрида *S. melongena* L. / *S. integrifolium* Poir., які були висаджені на середовища через 20-25 діб після запилення – в стадії “торпеди”, формували в культурі *in vitro* проростки (рис. 5.3).

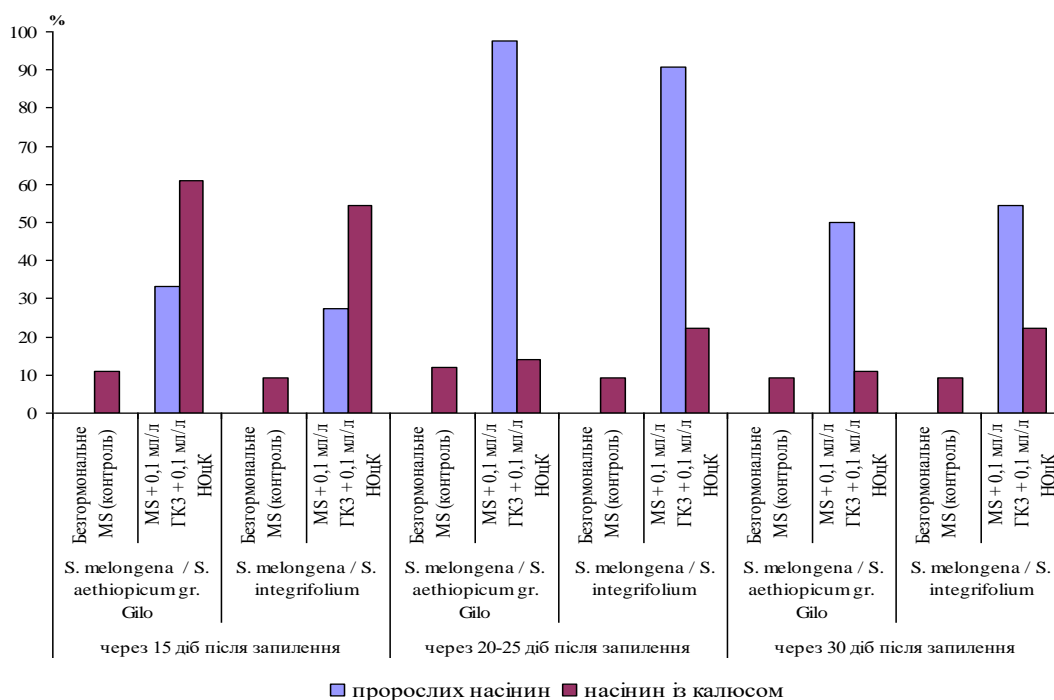


Рис. 5.3. Вплив поживного середовища і віку ізольованих насінин на проростання зиготичних зародків міжвидових гібридів баклажана в культурі *in vitro*.

Тоді як на безгормональному середовищі пророслих зародків цієї стадії не спостерігалось. У зародків висаджених на середовища через 15 діб після запилення – в стадії глобули і сердечка подібній стадії, проросло 33,3 % в комбінації *S. melongena* / *S. aethiopicum* gr. Gilo, та 27,3 % в комбінації *S. melongena* L. / *S. integrifolium* Poir.

Автотрофна стадія розвитку гібридного зародку розпочинається, зазвичай, коли зародок досягає сердечка подібній стадії. У цей період він вже не повністю залежить від екзогенного запасу регуляторів росту, що робить його більш пристосованим для розвитку у штучних умовах. Тобто із збільшенням рівня диференціації та зиготичних зародків до стадії “торпеди” підвищується відсоток збережених проростків міжвидових гібридів баклажана. В той же час, найменш диференційовані зародки (глобулярні) характеризувались більш високою здатністю до утворення калюсної тканини.

Високі показники проростання зиготичних зародків до стадії “торпеди” забезпечили формуванням фенотипічно нормальних рослин загальної кількості 190 шт. 2-х міжвидових гібридів. Такі результати підтвердили висновок, що застосоване нами модифіковане середовище MS є досить збалансованим по елементах трофічного і гормонального живлення і забезпечує проліферацію гібридних проростків баклажана [52].

Використання зародків, які видаляли з насіння через 30 діб після запилення мало певні особливості. На даній стадії – майже сформованого насіння, насіннева шкірка була достатньо щільною, через що виділити зародки із насінин без їх травмування не можливо. Через такі особливості лише 50,0 % зародків гібрида *S. melongena* L. / *S. aethiopicum* gr. Gilo, та 54,5 % гібрида *S. melongena* L. / *S. integrifolium* Poir. сформували в культурі *in vitro* проростки на модифікованому регуляторах росту середовищі MS. На безгормональному варіанті поживного середовища проростків не зафіксовано. Такі результати уможливають зробити висновок, що при культивуванні гібридних зародків інконгруентних видів в культурі *in vitro* необхідно враховувати як морфологічні особливості розвитку

насінин, так і потреби ізольованого *in vitro* зародків в елементах живлення, які визначаються видовими особливостями рослинних об'єктів.

Отримані в культурі *in vitro* рослини-регенеранти із недозрілих зародків при комбінаціях схрещувань з *S. melongena* L. / *S. aethiopicum* gr. Gilo та *S. melongena* L. / *S. integrifolium* Poir. впродовж 5 місяців додатково розмножували живцюванням на рідкому безгормональному середовищі MS [53, 54]. Первинну адаптацію пробіркових рослин міжвидових гібридів провели у квітні місяці використовуючи ґрунтовою суміш з коко-ґрунту та торфу співвідношенні 1:1. Впродовж адаптації підтримували вологість повітря на рівні 80 %, температуру – не менше 22 °С, фотоперіод – 16 год. світла та 8 год. темноти. Отримані рослини міжвидових гібридів *S. melongena* L. / *S. aethiopicum* gr. Gilo, та *S. melongena* L. / *S. integrifolium* Poir. передано для впровадження в селекційний процес [55, 56].

Розроблено спосіб на корисну модель № 79677 “Спосіб одержання гібридних рослин несумісних видів баклажана роду *Solanum* L.” (Пат. № 79677 UA), що включає дорощування на модифікованих варіантах середовища MS недозрілих гібридних насінневих зародків через 20-25 діб після запилення в культурі *in vitro* до утворення гібридних рослин. Спосіб дає суттєві переваги над традиційним методом дорощування гібридних зародків *in planta*, оскільки за традиційним методом після схрещування несумісних видів баклажана гібридні насінневі зародки не визрівають і абортуються материнськими формами рослин внаслідок прояву генетичного явища несумісності, тоді як розроблений спосіб дозволяє отримати на 80 % більше рослин міжвидових гібридів [57].

5.3. Розмноження гібридних рослин гарбуза (*Cucurbita* L.)

в культурі *in vitro*

Отримання гібридів між трьома культурними видами гарбуза – гарбузом звичайним (*Cucurbita pepo* L.), гарбузом великоплідним (*Cucurbita maxima* Duch.) і гарбузом мускатним (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.) має

практичне значення та викликає теоретичний інтерес. У виду *C. maxima* зустрічаються форми з високою цукристістю та ніжним м'якушем, але вони пізно досягають та низько врожайні. У виду *C. pepo* властива надзвичайна скоростиглість, але недостатня цукристість. Окремі сорти виду *C. moschata* мають порівнянно з іншими видами більш високий вміст у плодах каротину. Тому за рахунок застосування міжвидової гібридизації в селекції можна створювати скоростиглі, багаті каротином і цукрами сорти і гібриди гарбуза [46]. Методами традиційної селекції досягти оптимального поєднання стійкості до несприятливих факторів середовища, урожайності та високої якості плодів у одному генотипі важко. Здебільшого, під час схрещувань між культурними видами гарбуза (гарбузом звичайним, гарбузом великоплідним і гарбузом мускатним) у рослин утворюється неповноцінне насіння з недорозвиненими зародками, тому використання культури *in vitro* для подолання постгамної несумісності є особливо важливим.

Впродовж культивування гібридних зародків гарбуза, виділених через 25 діб після запилення, в контрольному (безгормональному) варіанті середовища MS комбінація схрещування *C. maxima* / *C. pepo* в культурі *in vitro* забезпечила частоту формування проростків 73,7%, а комбінація *C. maxima* / *C. moschata* – 66,2% (табл. 5.4).

На середовищі із додаванням 0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК в комбінації схрещування *C. maxima* / *C. pepo* вихід пророслих насінин становив 84,2%, а у комбінації схрещування *C. maxima* x *C. moschata* – 76,3%.

Впродовж культивування 30-денних зародків на безгормональному середовищі спостерігали підвищення відсотка сформованих гібридних рослин. У комбінації схрещування *C. maxima* / *C. pepo* цей показник становив 85,2%, а у комбінації схрещування *C. maxima* / *C. moschata* – 80,1%.

Максимальну частоту формування проростків гібридних рослин гарбуза забезпечило середовище MS із додаванням 0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК.

При цьому кількість пророслих гібридних зародків, отриманих від комбінації схрещування *C. maxima* / *C. pepo* становила 96,4%, та 91,1% від

Таблиця 5. 4 – Вплив строків ізоляції та складу модифікованого поживного середовища MS на розвиток зиготичних зародків міжвидових гібридів гарбуза

Комбінація схрещування	Розмір зародка, мм	Поживне середовище			
		безгормональне (контроль)		0,1 мг/л кінетину та 0,01 мг/л ІОцК	
		висаджених насінин, шт.	пророслих насінин, %	висаджених насінин, шт.	пророслих насінин, %
Через 25 діб після запилення					
<i>C. maxima</i> / <i>C. pepo</i>	0,5–1,1	137	73,7	137	84,2
<i>C. maxima</i> / <i>C. moschata</i>	0,2–0,6	137	66,2	137	76,3
через 30 діб після запилення					
<i>C. maxima</i> / <i>C. pepo</i>	0,7–1,3	97	85,2	97	96,4
<i>C. maxima</i> / <i>C. moschata</i>	0,4–0,9	97	80,1	97	91,1

схрещування *C. maxima* / *C. moschata*.

Висаджені на поживне середовище зародки міжвидових гібридів через 3-4 доби потовщувались, а на 6-7 добу на них розпочиналось утворення корінців. Через 9-10 діб фіксували активну фазу розвитку насінини: ріст гіпокотеля, розкриття сім'ядольних листочків, які до цього часу набували зеленого кольору.

У виділених через 30 діб після запилення зародків вони були більшого порівняно з 25-денними розміру, а процес утворення з них рослин відбувався швидше. Гібридні зародки, отримані в комбінації схрещувань *C. maxima* x *C. pepo*, мали розмір 0,7 мм x 1,3 мм. Початок проростання корінця відбувався на 4-5-ту добу, а процес фотосинтезу сім'ядольних листочків – на 6-7-му. Розкривалися сім'ядольні листочки на 8-9-ту добу після висаджування зародків на поживне середовище.

Гібридні зародки аналогічного віку ізоляції, отримані в комбінації схрещування *C. maxima* / *C. moschata*, були меншого розміру – 0,4 мм x 0,9 мм і за проходженням фаз розвитку вони відставали від рослин гібрида *C. maxima* / *C. pepo*. Проростання корінців відбувалося на 5-6-ту добу, процес фотосинтезу сім'ядольних листочків – на 7-му. Сім'ядольні листочки розкрились на 9-10-ту добу.

У подальшому рослини додатково розмножували живцюванням на поживному середовищі з додаванням 0,5 мг/л ІюЛК, що сприяло кращому укоріненню (табл. 5.5). Через 2 тижні культивування висота пагонів складала в середньому $6,1 \pm 1,2$ см, рослина мала $9,0 \pm 1,1$ шт. справжніх листків, довжина кореня дорівнювала $3,4 \pm 0,3$ см, маса гібридних рослин – $212,1 \pm 2,2$ мг. Частота укорінення пагонів становила 87,1 %. Пробіркові рослини, отримані в результаті схрещування *C. maxima* / *C. moschata* (сорт Бальзам) мали зелене забарвлення, хвилястий край листків (рис. 5.5).

Таблиця 5. 5 – Біометричні показники гібридних рослин гарбуза на поживному середовищі MS, модифікованому 0,5 мг/л ІюЛК

Показник	Комбінація схрещування		НІР _{0,05}
	<i>C. maxima</i> / <i>C. pepo</i> (сорт Маслянка)	<i>C. maxima</i> / <i>C. moschata</i> (сорт Бальзам)	
Висота пагона, см	$6,1 \pm 0,8$	$7,4 \pm 0,6$	1,6
Кількість міжвузлів, шт.	$4,4 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,5$	0,8
Кількість листків, шт.	$9,0 \pm 1,4$	$8,3 \pm 1,0$	1,1
Довжина кореня, см	$3,4 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$	1,2
Маса рослини, мг	$212,1 \pm 25,2$	$178,4 \pm 26,8$	25,4
Частота укорінення, %	87,1	83,2	3,1

Пагони затримувались в наростанні вегетативної маси порівняно з попередньою гібридною комбінацією. З цієї причини пересаджування та

живцювання пагонів здійснювали через кожні 3 тижні. На момент пересаджування на свіже поживне середовище їх висота становила $7,4 \pm 0,1$ см; кількість утворених листків – $8,3 \pm 1,2$ шт., довжина головного кореня – $2,9 \pm 0,3$ см. Частота укорінення пагонів була високою – 83,2 %.

Після одержання із насінневих зародків сформованих пробіркових рослин їх клонально мікророзмножили і депонували живцювання на твердому безгормональному поживному середовищі MS. Використання його в досліді уможливило запобігти виникнення аномальних рослин впродовж подальшого розмноження рослин вище означених гібридів та забезпечити максимальну генетичну стабільність клонованого матеріалу.

Однією з вимог до маркерних ознак є їх ранній прояв. Найкращими маркерними ознаками для ідентифікації міжвидових гібридів вважаються такі, що проявляються вже у фазі проростків. Найважливішими маркерними ознаками у гібридів гарбуза були колір листків та їх форма. Так, наприклад, у гібрида *C. maxima* / *C. moschata* однакові за проявом із батьківською формою – мають темно-зелений колір, тоді як у материнської форми гарбуза листки світло-зелені, з сильним опушенням. Гібридні пробіркові рослини гарбуза, отримані в комбінації схрещування *C. maxima* (лінія Кр-РЛ) / *C. pepo* (сорт Маслянка), характеризувались інтенсивним зеленим кольором листків, які були розсіченим по краям листової пластинки.

Рослини-регенеранти одержаних гібридів гарбуза характеризувались швидкими темпами наростання вегетативної маси, тому живцювали пагони через кожні 14 діб. Одержані рослини-регенеранти з добре розвиненими листками під час останнього пасажу висаджували для укорінення на поживне середовище MS, модифіковане ауксином ІОЛК у концентрації 0,5 мг/л. Для адаптації пробіркових рослин гарбуза використовують субстрат із торфу та коко-грунту у співвідношенні 1:1. Вирощували горщечкову розсаду пробіркових рослин протягом 40–60 діб. На субстраті з кокосового волокна та торфу приживлюваність рослин-регенерантів через 4 тижні становила від 85 до 90%. Оптимальними строками висаджування горщечкової розсади

гарбуза у відкритий ґрунту була друга декада травня [46]. Отриманий вихідний матеріал гібридів гарбуза впроваджено в подальшу селекційну роботу на Дніпропетровській ДС ІОБ НААН.

Отже, для розмноження інконгруентних гібридів помідора та несумісних культурних видів гарбуза зиготичні зародки слід видаляти з плодів і висаджувати на поживні середовища через 30-35 діб після запилення, баклажана – через 25 діб. На момент ізоляції вони знаходяться в стадії “торпеди” з повністю сформованими зародками. Зародки меншого віку (від 15– 25 діб) знаходяться на глобулярній та сердечкоподібній стадіях, під час наступного культивування на середовищах вони нездатні до формування гібридних проростків. Їх подальший розвиток відбувається виключно у напрямі утворення калюсної тканини.

Проведеними дослідженнями підтверджено, що метод клонального мікророзмноження уможливорює розмноження віддалених гібридів помідора, баклажана та гарбуза із мінімальної кількості насіння впродовж року для їх застосування в селекції. Використанням культури ізолюваних клітин *in vitro* створюються умови для стабільного депонування колекції віддалених гібридів з виникненням мінімальної кількості аномальних пробіркових рослин протягом тривалого часу. Встановлено також, що депонування в ізолюваній культурі гібридних зародків на безгормональному середовищі MS не призводить до появи рослин з новими ознаками, проте сприяє підвищенню варіабельності морфологічних параметрів пробіркових рослин віддалених гібридів F₁.

В даний час швидким альтернативним інструментом створення стресотолерантних генотипів помідора, підвищення їх продуктивності та ранньостиглості, а також стійкості до основних хвороб і стресових умов вирощування є щеплення [58, 59]. Перевага щеплених рослин полягає в одержанні прищепкою завдяки підщепі необхідної стійкості та розвитку протягом вегетаційного періоду потужнішої кореневої системи.

За останні двадцять років доведено, що щеплення є дієвим інструментом для підвищення рівня стійкості овочевих рослин родини *Solanaceae* та *Cucurbitaceae* в багатьох країнах світу, особливо у країнах із розвиненими технологіями інтенсивного виробництва овочевої продукції [60]. За даної технології вихідним матеріалом використовують насіння дикорослих видів, або створених на їх основі міжвидових гібридів та напівкультурних різновидів. Таким чином, результати досліджень із подолання постгамної несумісності у міжвидовій гібридизації, будуть використані у подальших дослідженнях із мікрографтингу для створення підщеп помідора, стійких до основних хвороб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Hajjar R., Hodgkin T. (2007). The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. **156**:1–13. doi: 10.1007/s10681-007-9363-0.
2. Kharkongar H.P., Khanna V.K. (2013). Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Solanum*. *Agrotechnology*. **11**:004. doi: 10.4172/2168-9881.S11-004.
3. Kozik E.U., Dyki B. (2001). Compatibility studies in three wild species of *Lycopersicon*. *Acta Physiologiae Plantarum*. **23**:65–72. doi: 10.1007/S11738-001-0024-y.
4. Baek S., Royer S.M. (2016). Interspecific reproductive barriers between sympatric populations of wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*. **103**(11):1964–1978. doi: 10.3732/ajb.1600356.
5. Boecklen W. (2017). Topology of syngameons. *Ecology and Evolution*. **7**(24):10486–10491. doi: 10.1002/ece3.3507.
6. Sharma D.K., Chaudhary D.R., Pandey D.P. (2001). Studies on hybrid vigor in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Haryana Journal of Horticultural Sciences*. **30**:236–238.
7. Délices G., Leyva-Ovalle C. (2021). Morphological characterization of wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the tomato domestication area. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. **33**(4):303–313. doi: 10.9755/ejfa.2021.v33.i4.2684.
8. Lafon-Placette C., Köhler C. (2016). Endosperm-based postzygotic hybridization barriers: Developmental mechanisms and evolutionary drivers. *Molecular Ecology*. **25**:2620–2629. doi: 10.1111/mec.13552.
9. Ghani M.A., Abbas M.M., Amjad M.P. (2020). Production and characterisation of tomato derived from interspecific hybridisation between cultivated tomato and its wild relatives. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. **95**(4):506–520. doi: 10.1080/14620316.2019.1689182.
10. Dar R.A., Sharma J.P., Nabi A. (2012). Germplasm evaluation for yield and fruit quality traits in tomato (*Solanum Lycopersicon* L.). *African Journal of Agricultural Research*. **7**:6143–6149. doi: 10.5897/AJAR12.307.
11. Szymanski J., Bocobza S. (2020). Analysis of wild tomato introgression lines elucidates the genetic basis of transcriptome and metabolome variation underlying fruit traits and pathogen response. **52**(10):1111–1121. doi: 10.1038/s41588-020-0690-6.
12. Gebologlu N., Bozmaz S., Aydin M., Cakmak P. (2011). The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement

in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Afr J Biotechnol.* **10**(24):4895–4900. doi: 10.5897/AJB10.2275.

13. *Peralta I.E., Knapp S., Spooner D.M.* (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst Bot.* **30**:424–434. doi: 10.1600/0363644054223657.

14. *Kabelka E., Franchino B., Francis D.M.* (2002). Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA 407 confer resistance to strains of *Clavi bactermichiganensis* subs *pmichiganensis*. *Phytopathology.* **92**:504–510. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.5.504.

15. *Moyle L.C.* (2008). Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution.* **62**:2995–3013. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x.

16. *Roth M., Florez-Rueda A.M.* (2018). Incidence and developmental timing of endosperm failure in post-zygotic isolation between wild tomato lineages. *Annals of Botany.* **121**:107–118. doi: 10.1093/aob/mcx133.

17. *Caicedo A.L., Schaal B.A.* (2004). Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Mol. Ecol.* **13**:1871–1882. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02191.x.

18. *Caicedo A.L.* (2008). Geographic diversity cline of R gene homologs in wild populations of *Solanum pimpinellifolium* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* **95**:393–398. doi: 10.3732/ajb.95.3.393.

19. *Canady M.A., Meglic V., Chetelat R.T.* (2005). A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome.* **48**: 685– 697. doi: 10.1139/G05-032.

20. *Weihua H., Jianhua J.* (2019). Maintenance of root water uptake contributes to salt-tolerance of a wild tomato species under salt stress. **67**(2):205-217. doi: 10.1080/03650340.2020.1720911.

21. *Martinez J.P., Fuentes R.* (2020). Effects of Salt Stress on Fruit Antioxidant Capacity of Wild (*Solanum chilense*) and Domesticated (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) Tomatoes. *Agronomy-Basel.* **10**(10):1481. doi: 10.3390/agronomy10101481.

22. *Lin Y.P., Lu C.Y.* (2020). The climatic association of population divergence and future extinction risk of *Solanum pimpinellifolium*. *AOB Plants.* **12**(2):12. doi: 10.1093/aobpla/plaa012.

23. *Nosenko T., Böndel K.B.* (2016). Adaptation to low temperatures in the wild tomato species *Solanum chilense*. *Molecular Ecology.* **25**: 2853–2869. doi: 10.1111/mec.13637.

24. *Baek S., Covey P., Petersen J.J.* (2015). Testing the SI × SC rule: pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, Solanaceae). **102**(2):302–311. doi: 10.3732/AJB.1400484.

25. *Kaur K., Dhatt A.S.* (2021). Inheritance of alloplasmic fertility restoration in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Genetic resources and crop evolution.* **68**(5): 1949-1960. doi: 10.1007/s10722-021-01108-5.

26. *Chaerani.* (2020). Related wild species for breeding of tomato resistant to early blight disease (*Alternaria solani*). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **482**:12-19. doi: 10.1088/1755-1315/482/1/012019.

27. *Stam R., Nosenko T.* (2020). The de Novo Reference Genome and Transcriptome Assemblies of the Wild Tomato Species *Solanum chilense* Highlights Birth and Death of NLR Genes Between Tomato Species. *G3-Genes Genomes Genetics.* **9**(12): 3933-3941. doi: 10.1534/g3.119.400529.

28. *Liedl B.E., McCormick S, Mutschler M.A.* (2006). Unilateral incongruity in crosses involving *Lycopersicon pennellii* and *L-esculentum* is distinct from self-incompatibility in expression, timing and location. *Sexual Plant Reproduction.* **9**: 299-308. doi: 10.1007/BF02152705.

29. *Kahlon P.S., Seta S.M.* (2020). Population studies of the wild tomato species *Solanum chilense* reveal geographically structured major gene-mediated pathogen resistance. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*. **287**(1941):2723. doi: 10.1098/rspb.2020.2723.
30. *Moyle L.C., Graham E.B.* (2005). Genetics of hybrid incompatibility between *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Genetics*. **169**:355-373. doi: 10.1534/genetics.104.029546.
31. *Fawzi N.M., Habeeb H.R.* (2016). Taxonomic studies on the wild species of genus *Solanum* L. in Egypt. *Ann Agric Sci*. **61**:165–173. doi: 10.1016/j.aogas.2016.10.003.
32. *Kumchai J., Wei Y.C.* (2013). Production of interspecific hybrids between commercial cultivars of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *S. torvum*. *Genetics and Molecular Research*. **12**:755–764. doi: 10.4238/2013.March.13.4.
33. *Sohrab S.S., Bhattacharya P.S., Rana D.* (2015). Development of interspecific *Solanum lycopersicum* and screening for Tospovirus resistance. *Saudi J Biol Sci*. **22**:730–738. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.11.009.
34. Butemea R., Nakajiria M. (2021). Intraspecific crossability and compatibility within *Solanum aethiopicum*. **7**(7):e07645. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07645.
35. *Böndel K.B., Lainer H., Nosenko T.* (2015). North–south colonization associated with local adaptation of the wild tomato species *Solanum chilense*. *Molecular Biology and Evolution*. **32**: 2932–2943. doi: 10.1093/molbev/msv166.
36. *Afful N.T., Nyadanu D.* (2018). Evaluation of crossability studies between selected eggplant accessions with wild relatives *S. torvum*, *S. anguivi* and *S. aethiopicum* (Shum group). **10**(1):1-12. doi: 10.5897/JPBCS2017.0695.
37. *Bal U., Abak K.* (2003). Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis I: pollination with *Solanum sisymbriifolium* Lam. pollen. *Pak J Biol Sci*. **6**(8):745–749. doi: 10.3923/pjbs.2003.745.749.
38. *Łukasz P., Ruta-Piosik M.* (2019). Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica*. **215**(2):31. doi: 10.1007/s10681-019-2358-9.
39. *Grumet R., McCreight J.D., McGregor C.* (2021). Genetic Resources and Vulnerabilities of Major Cucurbit Crops. *Genes*. **12**(8):1222. doi: 10.3390/genes12081222.
40. *Ayala-Doñas A., Cara-García Md., Talavera-Rubia M.*(2020). Management of soil-borne fungi and root-knot nematodes in Cucurbits through breeding for resistance and grafting. *agronomy*. **10**(11):1641. doi: 10.3390/agronomy10111641.
41. *Bo K., Ma Z., Chen J. et al.* (2015). Molecular mapping reveals structural rearrangements and quantitative trait loci underlying traits with local adaptation in semi-wild Xishuangbanna cucumber (*Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi et Yuan). *Theor Appl Genet*. **128**:25–39. doi: 10.1007/s00122-014-2410-z.
42. *Uretsky J., Brent J.Lo.* (2018). Evaluation of Morphological Traits Associated with Productivity in F1 Interspecific (*Cucurbita maxima* Duch. x *C. moschata* Duch.) Hybrid Processing Squash. **52**(9):8. doi: 10.21273/HORTSCI12018-17.
43. *Gomes R.S., Machado J.R., et al.* (2020). Brazilian germplasm of winter squash (*Cucurbita moschata* D.) displays vast genetic variability, allowing identification of promising genotypes for agro-morphological traits. *PLoS ONE*. **15**(6):0230546. doi: 10.1371/journal.pone.0230546.
44. *Karaagac O., Balkaya A.* (2013). Interspecific hybridization and hybrid seed yield of winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) lines for rootstock breeding. **149**:9–12. *Sci Hortic Amsterdam*. doi: 10.1016/j.scienta.2012.10.021.
45. *Kornienko S., Ivchenko T., Gurin M.* (2014). Realization of Genetic Potential for Mutant Variability in Tomato Breeding. *Mutagenesis: Exploring Novel Genes and Pathways*. **1**:57-77. doi: 10.3920/978-90-8686-796-7.
46. Івченко Т.В. Біотехнологічний спосіб подолання постгамної несумісності при міжвидовій гібридизації гарбуза в культурі *in vitro*: методичні рекомендації; підгот.: Т.В.

Івченко, С.І. Корнієнко, І.І. Колеснік та ін. / НААН. Інститут овочівництва і баштанництва. – Мерефа – 2015. – 28 с.

47. Івченко Т.В. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro*: методичні рекомендації; підгот.: Т.В. Івченко, С.І. Корнієнко, С.І. Кондратенко та ін. / НААН. Інститут овочівництва і баштанництва. – Х.: Плеяда, 2013. – 47 с.

48. Івченко Т.В. Методичні рекомендації з одержання і розмноження в культурі *in vitro* рослин міжвидових гібридів томата; підгот.: Т. В. Івченко, В. П. Мірошніченко, О. П. Самовол / УААН. Інститут овочівництва і баштанництва. – Мерефа – 2010. – 9 с.

49. Івченко Т.В., Корнієнко С.І., Горова Т.К. (2015). Використання біотехнологічних методів у створенні вихідного матеріалу для селекції органічних сортів томата. Фактори експериментальної еволюції. **17**:169–173.

50. Мірошніченко Т.Н., Івченко Т.В., Самовол А.П. (2015). Особенности длительного культивирования пробирочных растений отдаленных гибридов томата. Овощи России. **1**(26):20–26.

51. Пат. 81587 UA, МПК (2013.01) A01H 4/00 Спосіб одержання клітинних ліній овочевих рослин родини *Solanaceae* L. в культурі *in vitro* : патент на корисну модель / Івченко Т. В., Мірошніченко Т. М., Мозговська Г. В., Гарт О. Ю., Баштан Н. О.; – заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u201213520; заявл. 26.11.2012; опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13.

52. Мозговская Г.В., Ивченко Т.В. (2013). Особенности микроклонального размножения межвидовых гибридов рода *Solanum* и адаптация растений–регенерантов к условиям *in vivo*. Овощеводство. **21**:127–135.

53. Мозговська Г.В., Івченко Т.В., Шабетя О.М. (2014). Створення перспективного селекційного матеріалу баклажана із використанням біотехнологічних методів. Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. **21**:161–163.

54. Івченко Т.В., Мозговська Г.В. (2012). Оптимізація способів адаптації отриманих в умовах *in vitro* рослин-регенерантів баклажана. Овочівництво і баштанництво. **58**:181–188.

55. Мозговская А.В., Ивченко Т.В. (2013). Преодоление постгамной несовместимости у отдельных видов рода *Solanum* L. в культуре *in vitro*. Генофонд и селекция растений. **1**:124–131.

56. Івченко Т.В., Мозговська Г.В. (2013). Використання методу ембріокультури для створення вихідного селекційного матеріалу рослин баклажана стійких проти фузаріозного в'янення. Овочівництво України. **1**:57–59.

57. Пат. № 79677 UA, МПК (2013.01) A01H 4/00. Спосіб одержання гібридних рослин несумісних видів баклажана роду *Solanum* L. : патент на корисну модель / Мозговська Г. В., Івченко Т. В., Кондратенко С. І.; заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u201213160; заявл. 19.11.2012; опубл. 25.04.2013, Бюл. № 8.

58. Truong D.S., Tham T.T. (2018). Establishment of Reciprocal Micrografting of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Eggplant (*Solanum melongena* L.). VJAS. **1**(1):156-165. doi: 10.31817/vjas.2018.1.2.05.

59. Wang J.L., Chen N., et al. (2020). Plant grafting relieves asymmetry of jasmonic acid response induced by wounding between scion and rootstock in tomato hypocotyl. PLoS ONE. **15**(11):e0241317. doi: 10.1371/journal.pone.0241317.

60. Martínez-Andújar C., Ruiz-Lozano J.M. (2017). Hormonal and Nutritional Features in Contrasting Rootstock-mediated Tomato Growth under Low-phosphorus Nutrition. Front. Plant Sci. **8**:533. doi: 10.3389/fpls.2017.00533.

ГЛАВА 6. МЕТОДИ ІНДУКОВАНОЇ ГАПЛОЇДІЇ *IN VITRO* У СЕЛЕКЦІЇ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН

Одним із сучасних експериментальних методів, перспективних як для практичного використання, так і для проведення фундаментальних досліджень у галузях селекції і генетики сільськогосподарських рослин, є індукована гаплоїдія.

Гаплоїди – організми, які містять у соматичних клітинах гаплоїдний (n) набір негомологічних хромосом, тобто лише половину хромосомного набору, притаманного певному виду [1]. Явище спонтанної природної гаплоїдії зустрічається у багатьох видів культурних рослин: пшениці, жита, кукурудзи, рису, ячменю, сорго, картоплі, тютюну, льону, буряка, капусти, гарбуза, огірків, помідорів тощо. Проте частота її зазвичай не перевищує 0,1% (наприклад, у кукурудзи – 1 гаплоїд на 1000 диплоїдних рослин) [2, 3]. Як правило, утворення гаплоїдів у покритонасінних рослин є результатом розвитку зародка із незапліднених гамет шляхом апоміксису. Вважається, що це один із шляхів подолання негативного впливу умов зовнішнього середовища та генетичних факторів, які перешкоджають запиленню [4, 5]. Гаплоїдні клітини можуть також виникати у результаті соматичної кон'югації хромосом, яка супроводжується «випадінням» їх реплікації у окремих клітинних циклах [6].

У селекційній практиці штучно індуковану гаплоїдію широко використовують для отримання із гаплоїдів шляхом подвоєння у них числа хромосом гомозиготних ліній – так званих подвоєних гаплоїдів, які є необхідним вихідним матеріалом як для сортової, так і для гібридної селекції. Класичний спосіб отримання таких ліній – інцухтування. При цьому фенотипова та генотипова одноманітності у однорічних овочевих рослин досягаються за 6 – 7, а у дворічних – за 8 – 12 поколінь [7]. Використання ж гаплоїдних технологій дозволяє стабілізувати генетичні ознаки протягом лише одного покоління і скоротити селекційний процес у 2 – 3 рази [4, 8].

Крім того, повна гомозиготність подвоєних гаплоїдів уможлиблює ведення прямого добору не тільки на рівні домінантних, а й рецесивних ознак, виділяти цікаві рецесивні мутації [9, 10]. У них відсутні явища домінування та наддомінування і проявляються тільки неалельні генні ефекти (адитивність, епістаз і т.п.). Розщеплення генів у таких рослин відповідає розщепленню їх у гамет, що значно спрощує генетичний аналіз кількісних ознак і пошук генів, відповідальних за ту чи іншу ознаку [2]. Тому методи індукованої гаплоїдії активно застосовують для картування локусів кількісних ознак (QTL), геномному аналізу, для отримання анеуплоїдів і трансгенних рослин, у біохімічних та фізіологічних дослідженнях [5, 11 – 13]. Протягом останніх десятиріч гаплоїдні технології часто поєднують з маркер-асоційованою селекцією [10, 14], що дозволяє максимально швидко створювати конкурентноздатні гібриди F_1 із заданими ознаками.

6.1 Способи індукції гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів в культурі *in vitro*

Існує цілий ряд способів отримання гаплоїдних форм рослин: віддалена гібридизація з подальшою елімінацією хромосом, запилення опроміненим пилком, обробка фітогормонами, створення стресових умов тощо [1, 2, 13, 15]. Подвоєні гаплоїди отримують шляхом самозапилення або колхіцинування гаплоїдних рослин, досить часто також спостерігається явище спонтанної диплоїдизації [1, 16]. Однак найбільш швидким і ефективним способом індукції гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів на сьогоднішній день є біотехнології *in vitro*.

Біотехнологічні методи індукування гаплоїдії в усьому світі використовуються для отримання гомозиготних ліній зернових [14, 16, 17], бобових [18], технічних [19, 20], а також деревних [21], декоративних [22], лікарських [23] рослин. Велика кількість робіт зарубіжних дослідників присвячена овочевим культурам, зокрема пасльоновим (помідор, перець, баклажан) [24 – 32], селеровим (морква, кріп, фенхель) [33 – 36], гарбузовим (огірок, кавун, диня) [37, 38] та ін.

Основою біотехнологічних методів індукованої гаплоїдії є регенерація в культурі ізольованих жіночих або чоловічих гамет. Існує два основних шляхи репродукції гаплоїдів *in vitro*: 1) андрогенез – регенерація в культурі ізольованих пиляків або мікроспор; 2) гінтогенез – регенерація в культурі незапліднених зав'язей або насіннєзародків [39]. Формування гаплоїдних рослин відбувається внаслідок перепрограмування на поживних середовищах на пряму розвитку експлантатів із гаметофітного на спорофітний, яке реалізується, як правило, на проміжній фазі диференціації, продовж якої мікроспори або насіннєзародки є тотипотентними [7, 40, 41].

Розвиток мікро- та макроспор в умовах *in vitro* може відбуватися шляхом прямого ембріодогенезу або шляхом утворення калюсу з подальшим ембріодогенезом або органогенезом [13, 39]. Більш бажаним для дослідників є прямий ембріодогенез, оскільки у цьому випадку зменшується імовірність генетичних відхилень. Під час розвитку через калюсну культуру можлива поява соматиклонів, зокрема спонтанні зміни плоїдності [15, 42].

Єдиного універсального протоколу отримання гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів не існує не лише для різних видів рослин, а й для зразків, які належать до одного виду. Проте в результаті узагальнення численних експериментальних даних науковцями ІОБ НААН були виділені основні етапи одержання подвоєних гаплоїдів овочевих рослин біотехнологічними методами, які наведено на рис. 6.1 [43].

Успіх індукції гаплоїдів у культурі *in vitro* залежить від видових особливостей; генотипу; фізіологічного стану і умов вирощування донорських рослин; типу, стадії розвитку і способу попередньої обробки експлантатів; складу поживних середовищ; умов культивування ізольованого матеріалу [13, 44 – 47]. Тому одним із основних питань, над вирішенням якого працюють науковці, є пошук механізмів контролю етапів гаплопродукційного процесу з метою отримання можливості працювати з будь-яким генотипом [48, 49].

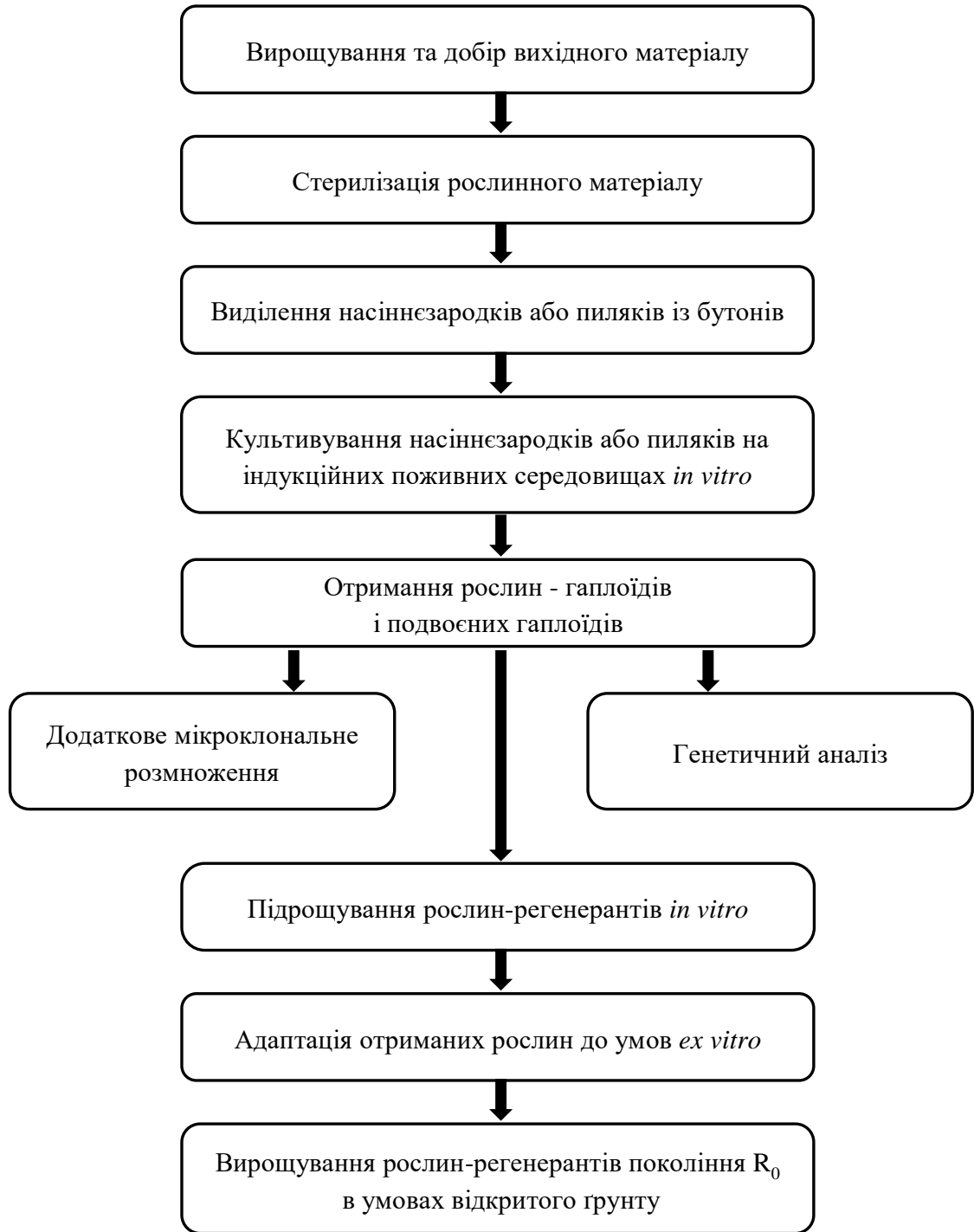


Рис. 6.1 Основні етапи отримання подвоєних гаплоїдів овочевих рослин в культурі *in vitro*

6.2 Застосування методів індукованого андрогенезу і гіногенезу в культурі *in vitro* для індукції подвоєних гаплоїдів помідора (*Solanum lycopersicum* L.) і моркви (*Daucus carota* L.)

В Україні методи експериментальної гаплоїдії активно застосовуються в селекції м'якої пшениці [48, 50 – 52], тритикале [53], ячменю [54 – 56], кукурудзи [57, 58], рису [59], соняшнику [60], льону [61], буряків цукрових [62]. Значно менше робіт вітчизняних учених присвячені овочевим видам рослин. Значний вклад у дослідження даного питання зробили фахівці ІОБ НААН, якими було розроблено ряд біотехнологічних методик зі створення дигаплоїдних ліній найбільш поширених овочевих культур, зокрема помідора та моркви.

6.2.1 Створення лінійного матеріалу помідора (*Solanum lycopersicum* L.) методом індукованого андрогенезу *in vitro*. Найбільш ефективним методом отримання гаплоїдів *in vitro* для багатьох видів рослин виявився індукований андрогенез. Після вдалого отримання у 1964 р. гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків *in vitro* [63] вчені відпрацювали методики одержання андрогенних гаплоїдів більш ніж у 250 видів рослин [30, 39, 64]. За використання цього методу кожна мікроспора потенційно здатна регенерувати у життєздатний зародок, тому кожна рослина буде являти собою варіацію, яка існує в популяції мікроспор [13]. Незважаючи на те, що помідори були однією з перших культур, у яких вдалося штучно індукувати гаплоїди, механізми утворення гаплоїдів для різних генотипів все ще не визначено і відсутня ефективна методика їх отримання [42, 65].

У зв'язку з цим спеціалістами лабораторії біотехнології ІОБ НААН протягом 2005 – 2018 р.р. проводились дослідження з індукції андрогенезу в культурі ізольованих пиляків помідора *in vitro*.

Для кожного виду рослин існує певна фаза розвитку гамет, що забезпечує максимальний вихід гаплоїдів. Цю фазу встановлюють за допомогою цитологічного аналізу і пов'язують експериментальним шляхом з

морфологічними параметрами квітки. У більшості рослин, у яких досягнуто андрогенезу, оптимальною стадією розвитку пиляків є перше мітотичне ділення або більш ранній період [47]. Для рослин родини *Brassicaceae* найбільш оптимальною є стадія ранньої одноядерної мікроспори [66], родини *Alliaceae* – 2-4-ядерний зародковий мішок [67], родини *Solanaceae*, у тому числі й помідора – профаза або метафаза другого мітозу [46, 68] з довжиною бутону 3-4 мм. За іншими даними, для помідора оптимальною є ізоляція бутонів розміром 5-7 мм, які містять одноядерні мікроспори [69]. У наших експериментах у якості експлантатів використовували пиляки, виділені із бутонів довжиною 4 – 5 мм.

Численними дослідженнями доведено існування генетичної залежності між здатністю до регенерації гаплоїдів помідора у культурі *in vitro* та генотипом [24, 45, 70]. Пошук генотипів із високою гаплопродюсерською здатністю надзвичайно актуальний. Прикладне використання таких генотипів у генетичних і селекційних дослідженнях спрощується через домінуючий характер наслідування даної ознаки [8]. Ряд дослідників вказує на ефективність використання різноманітних мутантних форм, яким властива здатність до стабільного андрогенезу в культурі *in vitro* [71, 72]. У зв'язку з цим, у якості донорського матеріалу було використано рослини поколінь F₁-F₃, F₇ селекційного розсадника, виділених за господарсько-цінними ознаками та наявністю маркерних мутантних генів (*B*, *dy*, *j-z*, *o*, *del*, *ug*, *sp*⁺, *Aft*, *u*⁺, *u*, *gf*, *ps-2*, *ex*, *ex-2* та ін.).

Індукція калюсогенезу та морфогенезу в культурі ізольованих пиляків помідора. Розвиток ізольованих пиляків помідора зазвичай відбувається шляхом калюсогенезу з подальшим органогенезом. Тому першим етапом створення подвоєних гаплоїдів цієї рослини є індукція калюсоутворення. В цьому процесі значну роль відіграє фактор поживного середовища. Для культури пиляків помідора використовують поживні середовища Мурасиге-Скуга (MS), Лінсмаєра-Скуга (LS), Nitsch, N6 та ін. [73, 74], збагачені різноманітними комбінаціями фітогормонів – ауксинів (ІОцК, НОцК, 2,4-Д) та цитокінінів (БАП, кінетин, зеатин, 2-іп) [8, 24, 74].

У першій серії дослідів пиляки висаджували на модифіковані варіанти поживного середовища Мурасиге-Скуга (MS): БІ 2 (2мг/л БАП + 4 мг/л ІОЦК) та БІ 5 (5 мг/л БАП + 2 мг/л ІОЦК). На обох експериментальних середовищах спостерігався калюсогенез, проте більш ефективним виявилось середовище БІ 2, на якому виявили калюсогенну здатність 65,5% генотипів (табл. 6.1).

Здатність до регенерації із калюсів андрогенного походження була відмічена лише у 6 із 113 досліджених генотипів (5,3 %) – (Мо500 x СХ-4, 495-2/2, 582-2/14, 327-1/2, 589-1/13, 335-2/3). Спостерігали гемо-, різотрофний та геморізотрофний генез. Процес регенерації починався після тривалого культивування андрогенних калюсів на індукційних середовищах (2-5 місяців).

Інтенсивність наростання калюсу не була пов'язана з високою морфогенетичною активністю. Регенераційною здатністю характеризувались як генотипи з високою здатністю до проліферації калюсу, так і з середньою. Найвищу здатність до проліферації калюсу виявив генотип 498-1/3 (F₁[F₅ (du x Дружба) x La 3262)., носій мутантних генів *B*, *du*, *j-z*, *o*, *del*, *ug*. На середовищі БІ 2 середній об'єм калюсу цього генотипу за п'ять пасажів склав 1600 мм³, проте регенераційної здатності у нього не виявлено.

На середовищі БІ 5 здатність до індукції калюсогенезу й органогенезу виявили менше генотипів. Але у окремих з них, наприклад, у 495-2/2 на цьому варіанті середовища також зафіксовано утворення органогенних пагонів, що підтверджує залежність органогенних властивостей пиляків перш за все, від генотипу.

Серед форм помідора з андрогенними властивостями 60,9 % мали у своєму геномі мутантний ген *u*, що вказує на можливий взаємозв'язок між наявністю вказаного гена і здатністю до морфогенезу в культурі ізолюваних пиляків [75]. Також підвищеною здатністю до андрогенезу характеризувалися генотипи помідора з морфологічними відхиленнями від нормальної будови квітки, з різними типами функціональної чоловічої стерильності (ФЧС), обумовленими мутантними генами (*ps-2*, *ex*, *ex-2*), що співпадає з даними інших дослідників [72]. Шість з восьми (75 %) використаних у дослідженнях генотипів з ФЧС виявили здатність до калюсогенезу.

Таблиця 6.1 – Показники морфогенної здатності генотипів помідора на різних варіантах поживного середовища MS в культурі ізолюваних пиляків (середнє за 5 пасажів)

Генотип	Поживне середовище					
	безгормональне (контроль)		БІ 2		БІ 5	
	об'єм калюсу, мм ³	адвентивних пагонів, шт. на 1 калюс	об'єм калюсу, мм ³	адвентивних пагонів, шт. на 1 калюс	об'єм калюсу, мм ³	адвентивних пагонів, шт. на 1 калюс
Мо500 х СХ-4	200,0	1,0	560,0	1,0	300,0	0,0
495-2/2	114,0	3,8	257,3	4,1	270,0	3,8
582-2/14	150,0	1,0	1004,0	3,5	250,0	1,0
327-1/2	-	-	1312,3	1,3	730,0	0,0
589-1/13	-	-	50,3	0,0	258,5	1,0
335-2/3	-	-	1120,0	1,0	768,0	1,5
328-2/2	-	-	400,0	0,0	42,0	0,0
349-2/3	-	-	199,1	0,0	47,8	0,0
357-1/4	-	-	500,0	0,0	12,0	0,0
374-1/2	-	-	106,0	0,0	512,0	0,0
398-2/3	-	-	1120,0	0,0	-	0,0
470-1/1	-	-	29,3	0,0	1152,0	0,0
474-1/2	-	-	686,0	0,0	381,0	0,0
485-1/1	-	-	32,8	0,0	492,0	0,0
495-1/2	-	-	637,2	0,0	132,5	0,0
498-1/3	-	-	1600,0	0,0	200,0	0,0
588-1/25	-	-	1,0	0,0	500,0	0,0
595-1/1	-	-	246,0	0,0	12,0	0,0
603-1/1	-	-	26,8	0,0	277,0	0,0
638-2/3	-	-	125,0	0,0	13,0	0,0
654-2/4	-	-	300,0	0,0	375,0	0,0
695-1/2	-	-	6,0	0,0	644,0	0,0
698-1/1	-	-	-	0,0	864,0	0,0

У другій серії дослідів було досліджено шість варіантів поживного середовища: 1) БІ-2 (MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОцК); 2) MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК; 3) MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОК; 4) MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОц; 5) MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л НОцК; 6) MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОК. Середовище БІ-2 (MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОцК), як найбільш ефективно за результатами попереднього досліду, було взяте за контроль [76].

Кількість життєздатних експлантатів становила від 12,8 (середовище БІ-2, зразок А-67) до 63,9 % (середовище MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК, зразок А-64). Серед варіантів поживних середовищ виділилось середовище MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК, на якому життєздатність зберігали 52,0 % експлантатів. Проліферація калюсу розпочиналась через 35 – 40 діб після введення пиляків у стерильну культуру. Найбільшу частку калюсогенезу (81,5 %) в середньому по всім генотипам спостерігали на середовищі MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК (табл. 6.2). Найнижчий показник (38,6%) визначено на контрольному варіанті.

Таблиця 6.2 – Частка калюсогенезу в культурі ізольованих пиляків помідора на різних варіантах поживного середовища, %

Поживне середовище	Зразок							Середнє НІР ₀₅ =50,4
	А-61	А-62	А-63	А-64	А-65	А-66	А-67	
БІ-2, контроль	73,9	39,6	24,2	55,9	33,1	31,0	12,8	38,6
MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК	80,6	75,7	98,5	77,3	87,1	81,3	72,4	81,8
MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОК	44,9	68,0	86,7	75,6	66,2	53,2	44,2	62,7
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОц	55,6	47,0	44,4	28,8	52,1	25,8	45,0	42,7
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л НОцК	20,0	63,3	70,1	66,1	55,3	70,0	51,0	56,5
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОК	66,7	98,3	40,4	49,9	54,4	64,0	48,3	60,3
Середнє НІР ₀₅ =28,1	56,9	65,3	60,7	58,9	58,0	54,2	45,6	57,4

За показником об'єму калюсу (табл. 6.3) статистично підтвердженої різниці також не виявлено ні за середовищами, ні за зразками. Це пов'язано з надзвичайно високою варіабельністю даного параметра в культурі пиляків помідора.

Максимальне значення даного показника було визначене у зразка А-61 (F₁ Н-34 Rot / F₇ (Me²⁰¹ Груша черная)) на контрольному варіанті середовища – 138,1 мм³; мінімальне – у зразка А-62 (F₁ Безразмерный / Н-34 Rot) на середовищі MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л НОцК – 3,1 мм³.

Найбільший середній об'єм калюсу в середньому по всіх зразках визначено на середовищі MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОК – 59,2 мм³. Дуже близький показник встановлено на контрольному варіанті – 54,1 мм³. Найменший об'єм калюсу спостерігали на середовищах MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОК – 7,6 мм³ і MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОК – 8,2 мм³.

Таблиця 6.3 – Середній об'єм калюсу в культурі пиляків помідора на різних варіантах поживного середовища, мм³

Поживне середовище	Зразок							Середнє HP ₀₅ =75,3
	А-61	А-62	А-63	А-64	А-65	А-66	А-67	
БІ-2, контроль	138,1	42,8	8,4	60,2	34,1	88,5	6,7	54,1
MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК	25,3	55,7	18,5	14,0	24,0	54,0	35,7	32,5
MS+2 мг/л БАП+4 мг/л ІОК	68,2	30,0	26,5	98,7	15,1	121,9	53,8	59,2
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОЦ	4,00	11,5	18,7	9,5	2,9	8,2	3,9	8,2
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л НОцК	16,6	3,1	38,0	13,7	19,3	28,9	13,9	19,1
MS+2 мг/л кінетину+4 мг/л ІОК	6,9	11,9	9,6	4,8	8,5	4,2	7,3	7,6
Середнє HP ₀₅ =26,1	43,2	25,8	19,9	33,5	17,3	50,9	20,2	30,1

Найбільшим середнім об'ємом калюсу (50,9 мм³) характеризувався зразок А-66 (F₁ Великий воин / Н-34 Rot); найнижчим – А-65 (17,3 мм³, F₁

Великий воїн / F₁₁ Рамзай). Регенерація адвентивних пагонів із одержаних калюсів протягом розпочиналась в залежності від генотипу під час другого – третього субкультивування. За результатами даного дослідження для індукції калюсогенезу в культурі ізолюваних пиляків помідора найбільш ефективною визнано модифікацію поживного середовища MS+2 мг/л БАП+4 мг/л НОцК.

Збереження проліфераційної активності андрогенних калюсів помідора за тривалого культивування. З метою визначення оптимальних концентрацій регуляторів росту в культуральному середовищі для тривалого пасажування органогенного калюсу, отриману калюсну тканину висаджували на безгормональне середовище MS (контроль) і на середовища Бі 2 та Бі 5. У субкультивованих на безгормональному середовищі калюсах свої морфогенні властивості зберегли 50% генотипів. В середньому за пасаж у контрольному варіанті отримано пагонів 3,8 шт./калюс (рис. 6.2).

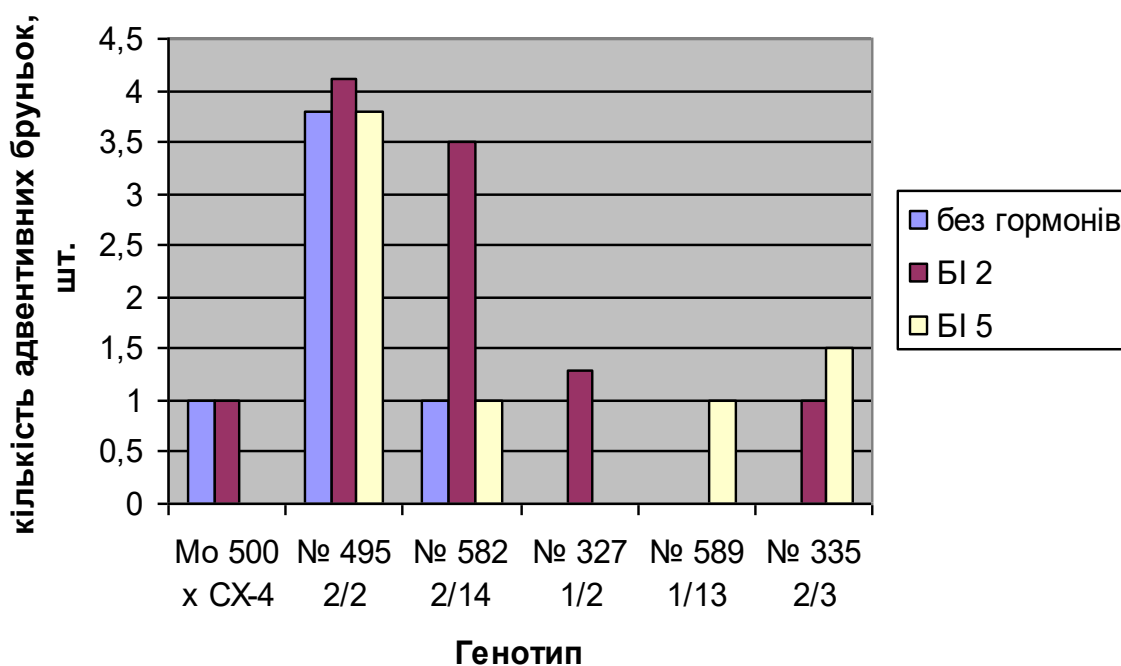


Рис. 6.2 Залежність параметрів гомогенезу в культурі ізолюваних пиляків помідора від генотипу та складу поживного середовища (середнє за 5 пасажів)

Кращим для індукції адвентивних бруньок визначено середовище Бі 2, яке забезпечувало утворення максимальної кількості рослин-регенерантів

(4,1 шт./калюс) у 83,3% генотипів. З культивованих на середовищі БІ 5 андрогенних калюсів утворювалось від 3,8 до 4,0 шт./калюс мікропагонів і органогенез спостерігався у 50 % генотипів.

Депоновані калюси, які не виявили органогенних властивостей у 1-4 пасажах, не виявили їх і в наступних усіх досліджуваних варіантах середовищ. Органогенні калюси всіх вивчених нами генотипів зберігали високу проліфераційну активність впродовж 6-8 пасажів, проте їх морфогенний потенціал порівнянно з першими чотирма постійно знижувався, а у 9-10 пасажах взагалі призупинявся.

В результаті досліджень були отримані рослини-регенеранти андрогенного походження МК-1, МК-3, МК-5, МК-10 були успішно переведені в умови *in vivo* за розробленим нами способом (патент на винахід № 81097) [77]. Адаптований матеріал висаджували в умови захищеного ґрунту для отримання насіння R₁, яке впроваджено в селекційний процес в ІОБ НААН, а також використано в досліді з клітинної селекції для добору джерел стійкості до ранньої сухої плямистості. Такий підхід до використання створених методом андрогенезу ліній дозволяє не тільки за 1 рік отримати лінійний матеріал, а й добирати серед рослин андрогенних клонів лінії з цінними господарськими ознаками.

6.2.2 Створення лінійного матеріалу моркви методом індукованого гіногенезу *in vitro*.

Метод індукованого гіногенезу в культурі незапліднених зав'язей або насіннєзародків використовують для одержання гаплоїдних рослин рису [78, 79], соняшнику [80], буряку цукрового [81, 82], цибулі ріпчастої [33, 83 – 86], кукурудзи [87], моркви [88], огірка [89 – 91], кавуна [37, 38] тощо. Метод гіногенезу на відміну від андрогенезу забезпечує більш високу регенераційну здатність у генотипів різного генетичного походження, досягаючи в окремих випадках 100 % [92–94].

Біологічні особливості дворічних овочевих рослин, до яких належить і морква (*Daucus carota* L.) – перехресне запилення, дворічний цикл розвитку, сильна інбредна депресія – роблять процес створення нового селекційного матеріалу досить складним, тривалим і трудомістким [43]. Тому використання методів індукованої гаплоїдії для селекції моркви є надзвичайно перспективним.

Активні дослідження зі створення подвоєних гаплоїдів моркви розпочались із застосуванням методів *in vitro* у 80-х роках ХХ ст. У 1990 р. був розроблений метод індукції подвоєних гаплоїдів шляхом андрогенезу (S. Andersen та ін.) [95], проте він забезпечував появу новоутворень лише у 13% досліджених генотипів моркви, тобто виявився недостатньо ефективним. У подальшому ряд авторів [43, 96] розвинули та удосконалили цей метод як для культури пиляків, так і для культури мікроспор моркви.

Рослини гіногенетичного походження вільні від деяких вірусів, альбінізму, але зберігають цитоплазму материнської рослини, тому гіногенез ефективний для прискореного одержання гомозиготних ліній з цитоплазматичною чоловічою стерильністю [97].

Наявність спонтанної дигаплоїдизації під час регенераційного процесу з калюсів гіногенного походження у моркви значно полегшує отримання дигаплоїдних рослин, бо виключає етап штучного подвоєння хромосомного набору у регенерантів. Якщо первинні ембріоїди представлені, головним чином, гаплоїдними клітинами, утворення рослин-регенерантів супроводжується зміною плоідності від n до $2n$ у 90% досліджуваних регенерантів. RAPD-аналіз гіногенних рослин покоління R_1 виявив повну одноманітність RAPD-спектрів усіх протестованих генотипів [96].

В Україні наукові дослідження з експериментальної гаплоїдії моркви розпочато у 2000-х роках Сергієнко О.Ф. Розробками науковців ІОБ НААН здійснено оптимізацію способу створення в культурі *in vitro* гіногенних гаплоїдів, в тому числі з ознакою цитоплазматичної чоловічої стерильності [43, 98].

У дослідження було залучено 20 генотипів моркви, як сортів, так і гібридів. Насіннєві рослини вирощували в польових умовах, а перед цвітінням ізолювали їх марлевими ізоляторами для зменшення осідання пилу з повітря на суцвіття. Для індукції гіногенезу використовували суцвіття I-II порядків за 1-2 доби до початку цвітіння, зібрані з насінників з оптимальною архітектонікою куща.

Суцвіття моркви, вирощені у польових умовах відзначаються високим рівнем забрудненості й інфікованості. Найбільш сприятливі умови для вирощування донорського матеріалу моркви – у захищеному ґрунті. Як свідчать результати досліджень ряду науковців, використання матеріалу, вирощеного в кліматичних камерах, забезпечує максимально високу синхронність гаметогенезу у рослин і нижчу їх ураженість грибковою та бактеріальною мікрофлорою порівняно з умовами відкритого ґрунту [97]. Проте для селекціонерів важливо дібрати вихідний матеріал із заданими ознаками безпосередньо в польових розсадниках, де їх властивості проявляються у відповідних ґрунтово-кліматичних умовах. У зв'язку з цим важиве значення має з пошуку ефективного методу дезінфекції суцвіть моркви для введення їх в культуру *in vitro*.

За результатами досліджень Віцені Т. І. та Івченко Т. В. найкращі показники дезінфекції суцвіть моркви, дібраних у польових умовах, визначено за використання 0,1 % розчину $HgCl_2$ з експозиціями 15 і 20 хв.: стерильність становила в середньому 50,1 і 75,5 %, а життєздатність експлантів – 43,5 і 34,6 % відповідно. Зазначену концентрацію і експозицію обробки можна застосовувати під час створення подвоєних гаплоїдів моркви методом гіногенезу [99].

Із суцвіть після стерилізації в ламінарному боксі виділяли бутони і висаджували на агаризовані поживні середовища: контрольний варіант – поживне середовище MSm [100] модифіковане 0,2 мг/л 2,4-Д, запропоноване – безгормональне середовище В-5 [101]. Через 2 тижні з бутонів виділяли насіннезародки, які у контрольному варіанті культивували на аналогічному

поживному середовищі, а у запропонованому – на середовищі В-5, модифікованому 0,2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л ГК₃. У контрольному варіанті після культивування бутонів на середовищі з ауксином 2,4-Д насіннєзародки розрихлювалися, і це значно ускладнювало їх виділення. Розроблений в ІОБ НААН спосіб попереднього культивування бутонів моркви на безгормональному середовищі (патент № 30285 від 25.02.2008 р.) [102] дозволяє спростити виділення насіннєзародків, мінімізувати їх травмування і підвищити вихід новоутворень *in vitro* у порівнянні з методикою Б.Г.Тюкавіна, [97], яку використано за прототип.

Такий методичний підхід забезпечив підвищення виходу новоутворень (калюсів чи ембріодів) із насіннєзародків. Новоутворення одержано з насіннєзародків моркви у 25 % генотипів, тоді як на контрольному варіанті їх не було. Частота утворення калюсів у генотипів з позитивною реакцією знаходилась в межах 16,7 – 50,0 %. Середня частота гіногенезу в досліді становила 7,7 % та істотно (НІР₀₅ – 4,53) відрізнялась від контрольного способу.

Регенерація рослин із гіногенних калюсів відбувалась шляхом непрямого ембріогенезу. З первинного калюсу регенерували спочатку первинні ембріоди, з яких одержували вторинні ембріоди, а з останніх – рослини-регенеранти. Для подальшого вирощування добирали рослини-регенеранти нормальної будови – з двома-чотирма листками, висотою від 5 см, з розвинутою кореневою системою. Адаптацію пробіркових рослин до умов *in vivo* проводили в кокосовому субстраті. Рослини-регенеранти висаджували у відкритий ґрунт у фазі 3-5 справжніх листків.

Досліджено рівень варіабельності біометричних показників гіногенних рослин моркви покоління R₀ першого та другого року життя у польових умовах.

Відмічено істотне варіювання кількісних ознак рослин першого року. У генотипів D.c.325 і D.c.328 коефіцієнти варіації таких ознак, як висота рослини становили 10,0 і 15,1%, ширина листкової пластинки – 16,6 і 19,3 %,

довжина її – 16,7 і 11,8 % відповідно (табл. 6.4). У зазначених генотипів встановлена також значна мінливість маси коренеплоду – 32,7 % у зразка D.c.325 і 30,1% у D.c.328.

Таким чином, розроблено ефективний метод отримання дигапloidних рослин моркви впродовж 2 років шляхом гiногенезу *in vitro*.

Таблиця 6. 4 – Біометричні показники гiногенних рослин моркви покоління R₀ першого року життя за вирощування в ґрунтових умовах

Генотип	Ознака	Lim _{min-max}	X ±S _x	V, %
D.c.325	Висота рослини, см	38,0 – 53,0	45,4±5,2	10,2
	Кількість листків, см	11,0 – 25,0	16,1±4,0	27,7
	Ширина листкової пластинки, см	20,0 – 39,0	30,3±4,4	16,6
	Довжина листкової пластинки, см	17,0 – 34,0	26,1±3,1	16,7
	Діаметр коренеплоду, см	5,2 – 7,5	6,5±0,7	14,2
	Довжина коренеплоду, см	8,0 – 12,0	10,4±1,2	12,8
	Маса коренеплоду, г	98,0 – 380,0	195,8±28,9	32,7
	Діаметр шийки коренеплоду, см	1,7 – 3,0	2,2±0,3	18,4
D.c.328	Висота рослин, см	27,0 – 40,0	35,8±3,6	15,1
	Кількість листків, см	10,0 – 23,0	14,8±2,8	25,1
	Ширина листкової пластинки, см	15,0 – 27,0	21,0±3,4	19,3
	Довжина листкової пластинки, см	16,0 – 22,0	20,3±2,0	11,8
	Діаметр коренеплоду, см	4,5 – 9,5	6,5±1,2	32,7
	Довжина коренеплоду, см	6,0 – 14,0	10,4±3,1	25,9
	Маса коренеплоду, г	113,5 – 363,9	219,3±53,6	30,1
	Діаметр шийки коренеплоду, см	9,0 – 22,0	17,3±3,5	27,6

На базі цього методу за результатами 10-річних досліджень розроблено оригінальну схему створення ліній з ознакою чоловічої стерильності (ЧС-ліній) моркви (рис. 6.3) [43].

За представленою схемою за 5 років у результаті спільної роботи біотехнологів та селекціонерів IOB НААН із застосуванням експериментальної

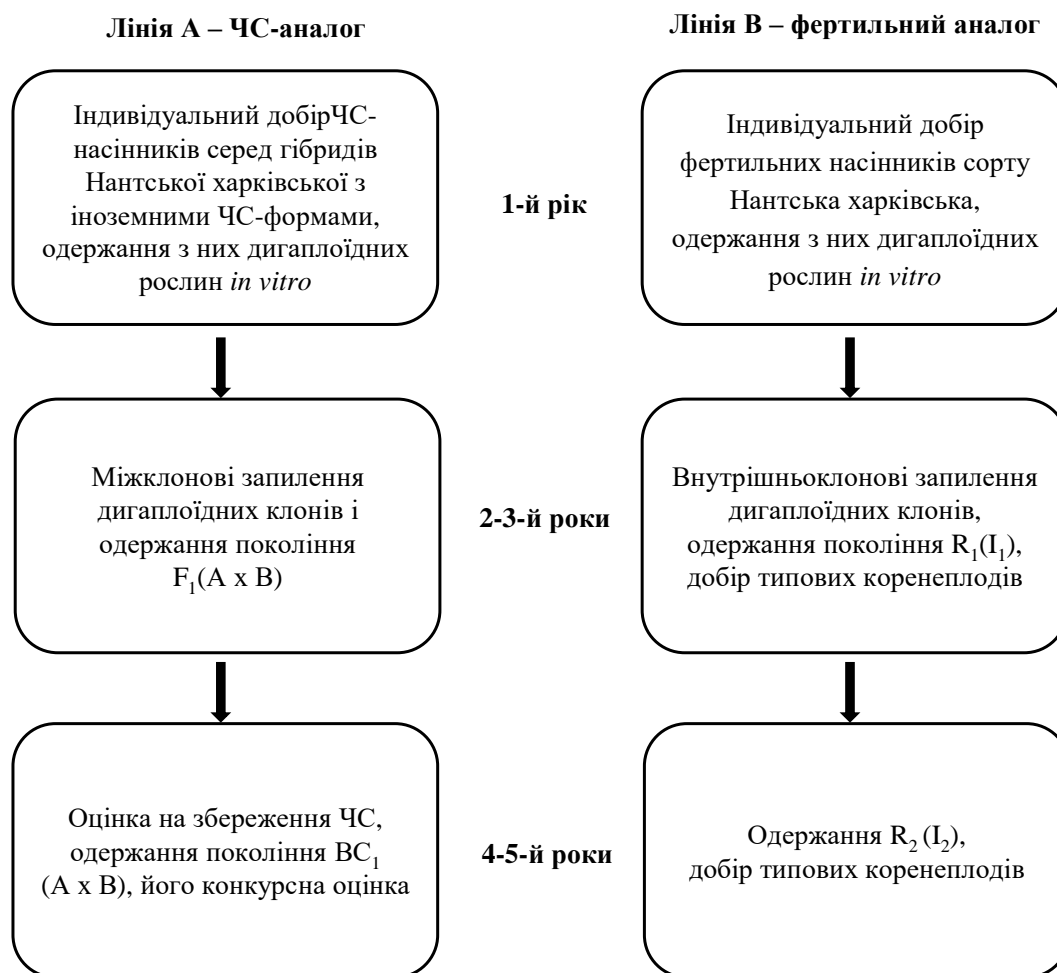


Рис 6.3 Схеми створення ЧС-ліній моркви на основі методу індукованого гіногенезу *in vitro*

гаплоїдії в культурі *in vitro* одержано ЧС-лінію Райдуга Нантського сортотипу з чоловічою стерильністю змішаного типу (браун та петалоїд) та її фертильний аналог. Гібрид F_1 на її основі (Райдуга ЧС x Кримчанка) переважав стандарт Веста F_1 за загальною врожайністю (на 16,6%) і товарністю (на 13,2%) [46]. Даний гібрид використовується в селекційному процесі ІОБ НААН та мережі його станцій.

Рослини другого року життя мали низькі або середні коефіцієнти варіації біометричних показників. Насінники R_0 генотипу D.c.325 мали низьке варіювання (<10 %) за такими ознаками, як висота рослини, діаметр центрального зонтика, розміри листової пластинки (табл. 6.5).

Таблиця 6. 5 – Біометричні показники гіногенних рослин моркви покоління R₀ другого року життя

Ознака	Генотип			
	D.c.325		D.c.328	
	X ± S _x	V, %	X ± S _x	V, %
Висота рослини, см	81,4±1,2	4,5	72,0±4,0	17,6
Кількість гілок I порядку, шт.	8,5±0,5	18,0	9,8±0,6	18,5
Кількість гілок II порядку, шт.	3,9±0,3	17,5	5,0±0,4	19,5
Діаметр центрального зонтика, см	8,5±0,2	5,6	11,4±0,6	19,9
Довжина листкової пластинки, см	16,2±0,3	6,4	18,3±1,0	16,6
Ширина листкової пластинки, см	16,8±0,2	6,4	19,5±1,2	19,1
Маса насіння з 1 рослини, г	13,0±0,6	12,4	7,7±0,4	15,3

У генотипу D.c.328 варіювання вищезначених ознак було середнім (від 16,6 до 19,9 %). За ознакою кількість гілок I і II порядків обидві гіногенні лінії мали середнє значення коефіцієнта варіації – 17,5-19,5. Такі дані можна пояснити відсутністю впливу післядії культивування в умовах *in vitro* у рослин насінників моркви гіногенного походження.

Методи індукованої гаплоїдії *in vitro* є надійним способом прискорення селекції таких господарсько цінних овочевих культур як помідор і морква. Запропоновані нами методичні підходи до індукції гіногенезу в культурі незапліднених зародків моркви можуть бути використані у гетерозисній селекції інших перехреснозапилених культур для створення гомозиготного лінійного матеріалу.

Література:

1. Тоцький В. М. (2002). Генетика. Астропринт. 712 с.
2. Чалык С.Т. (2003). Методы гаплоидии в генетике и селекции кукурузы. 179.
3. Пыльнев В.В., Коновалов Ю.Б., Хуцацария Т.И. (2005). Частная селекция полевых культур: учебник для вузов. 552 с.
4. Игнатова С. А. (2011). Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задача, возможности, разработки систем *in vitro*. 224 с.
5. Dunwell J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. **8**: 377-424. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
6. Кунах В. А. (1995). Геномная изменчивость соматических клеток растений. Биополимеры и клетка. **11**(6):

7. Френкель Р., Галун Э. (1982). Механизм опыления, размножения, и селекции растений. 385 с.
8. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. (2012). Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. Беларуская навука: 490 с.
9. Сассон А. (1987). Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. Пер. с англ. // Под ред. и с предисловием В. Г. Дебабова. М.: Мир. – 411 с.
10. Szarejko I., Forster B.P. (2007). Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica*. **158**(3): 359-370 DOI 10.1007/s10681-006-9241-1
11. Georgiev S. (2008). Haploids in genetic and cytogenetical research. *Biotechnology and biotechnological equipment*. **22** (2): 644 – 651. DOI 10.1080/13102818.2008.10817528
12. Bhowmik P., Bilichak A. (2021). Advances in Gene Editing of Haploid Tissues in Crops. *Genes*. **12** (9): 2021. DOI 10.3390/genes12091410
13. Ferrie A. M. R. (2012). Doubled Haploidy as a Tool in Ornamental Breeding. *Acta Horticulturae. Proceedings Paper*. **953**: 167-171.
14. Brazauskas G., Ruzgas V. (2009). Combination of haploidy and DNA marker selection for Wx genotype production in wheat. *Zemdirbyste-agriculture*. **96**(3): 27-35.
15. Dore C., Boulidard L., Sauton A., Rode J.C., Cuny F., Niemirowicz-Szczytt K., Sari N., de Vault R.D. (1995). Interest of irradiated pollen for obtaining haploid vegetables. *Proceedings Paper. Acta Horticultirae*. **392**:123-128. DOI 10.17660/ActaHortic.1995.392.14
16. Gugsu L., Kumlehn J., Tadesse A., Tefera H., Guzman M., Zapata F.J., Afza R., Mba C. (2009). Haploidy in Tef Gynogenesis Androgenesis. *Advanced in haploid production in higher plants. Proceedings Paper*: 265. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4_22
17. Patial M., Chaudhary H.K., Sharma N., Gangwar O. P., Kishore N., Pal D., Pramanick K. K., Bhardwaj S. C., Chauhan R. (2021). Developing genetic stock for yellow and brown rust resistance in *Triticum aestivum* L. via *Imperata cylindrica*-mediated doubled haploidy technique. DOI 10.1007/s42976-021-00180-y
18. Hale B., Lor P., Chellamma S., Samuel J.P., Phillips G.C. (2021). Gynoecium pubescence in soybean: a prevalent false-positive during in vitro androgenesis. *Plant cell tissue and organ culture*. **146**(2): 417-421. DOI 10.1007/s11240-021-02071-w
19. Henderson C. A. P., Pauls K. P. (1992). The use of haploidy to develop plants that express several recessive traits using light-seeded canola (*Brassica napus*) as an example. *Theoretical and applied genetics*. **83**(4): 476-479. DOI 10.1007/BF00226536
20. El-Fiki A., El-Metabteb G., Sayed A.H., Adly M. (2015). Androgenesis Induced in *Nicotiana glauca* and the Effect of Gamma Irradiation. *Notulae Scientia Biologicae*. **7**(1): 66-71. DOI: 10.15835/nsb.7.1.9477
21. Vahdati K., Sadat-Hosseini M., Martinez-Gomez P., Germana M. A. (2021). Production of Haploid and Doubled Haploid Lines in Nut Crops: Persian Walnut, Almond, and Hazelnut. *Methods in Molecular Biology. Doubled haploid technology*. **3**(2289): 179 – 198.
22. Ferrie A. M. R., Caswell K. L. (2011). Review of doubled haploidy methodologies in ornamental species. *Propagation of ornamental plants*. **11**(2): 63 – 77.
23. Ferrie A. M. R. (2009). Current Status of Doubled Haploids in Medicinal Plants. *Advances in haploid production in higher plants. Proceedings Paper*: 209-217. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4_18
24. Segui-Simarro J. M. (2016). Androgenesis in Solanaceae. *Methods in Molecular Biology. In vitro embryogenesis in higher plants*. **1359**: 209-244. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6_9
25. Segui-Simarro J. M., Corral-Martinez P., Parra-Vega V., Gonzalez-Garcia B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*. **30**(5): 765-778. DOI10.1007/s00299-010-0984-8
26. Bal U., Abak K. (2007). Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. *Euphytica*. **158**(1-2): 1-9. DOI 10.1007/s10681-007-9427-1

27. Niazian M., Shariatpanahi M. E., Abdipour M., Oroojloo M. (2019). Modeling callus induction and regeneration in an anther culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) using image processing and artificial neural network method. *Protoplasma*. **256**(5): 1317-1332. DOI 10.1007/s00709-019-01379-x
28. Motallebi-Azar A. R. (2020). Influence of silver nitrate (AgNO₃) and cold pretreatment on the doubled haploid production of tomato using anther culture. *Progress in nutrition*. **22**(3). DOI 10.23751/pn.v22i3.7541
29. Adhikari P.B., Yoon C.S., Kang W.H. (2016). Callus induction and shoot regeneration of commercial tomatoes (*Solanum lycopersicum*) through anther culture. *Proceedings Paper. Acta Horticulturae*. **1142**: 389-393. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1142.59
30. Kothari S.L., Joshi A., Kachhwaha S., Ochoa-Alejo N. (2010). Chilli peppers: a review in tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*. **28**: 35–48.
31. Comlekcioglu N. (2021). Effect of colchicine addition to culture medium on induction of androgenesis in pepper (*Capsicum annum* L.). *Pakistan journal of botany*. **53**(3): 1001-1005. DOI10.30848/PJB2021-3(14).
32. Mir R., Calabuig-Serna A., Segui-Simarro J. M. (2021). Doubled Haploids in Eggplant. *Biology-basel*. **10**(7). DOI10.3390/biology10070685
33. Shmikova N.A., Tjukavin G.B. (1994). Culture of unpollinated ovaries and ovules in bulb onion, carrot and cucumber. In *Plant biotechnology and genetic engineering: Int. Symp.* 113.
34. Ferrie A.M.R. (2021). Doubled Haploidy for Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Dill (*Anethum graveolens* L.). *Methods in Molecular Biology. Doubled haploid technology*. **2**(2288): 103-111. DOI 10.1007/978-1-0716-1335-1_6
35. Ferrie A. M. R., Bethune T. D., Waterer D. (2006). Development of double haploidy in Umbelliferae. *Proceedings of the 5th international symposium on in vitro culture and horticultural breeding. Acta Horticulturae*. **725**: 829. DOI 10.17660/ActaHortic.2006.725.115.
36. Gorecka K., Krzyzanowska D., Kiszczak W., Kowalska U., Gorecki R. (2009). Carrot Doubled Haploids. *Advances in haploid production in higher plants. Proceedings Paper*: 231-239. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4_20
37. Nebahat Sari, Ilknur Solmaz. (2021). Doubled Haploid Production in Watermelon. *Methods Mol Biol*. **2289**: 97-110. doi: 10.1007/978-1-0716-1331-3_6.
38. Dong Y.Q., Zhao W. X., Li X.C., Liu X. C., Gao N.N., Huang J.H., Wang W. Y., Xu X.L., Tang Z. H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*. **35**: 1991–2019.
39. 536. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. (2015). Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv*. **33**(6): 812 – 829. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001
40. Timina O.O., Tsykaliuk R.A., Orlov P.A. (2003). Somatic embryos of *Capsicum annum* L., genetic specialities of formation. *Capsicum and Eggplant Newsletter*. **22**: 103–106.
41. Горбунов В. Ю., Круглов Н. Н. (1997). Физиологические аспекты андрогенеза *in vitro* у злаков. *Биология клеток растений in vitro*. **1**: 67–80.
42. Juliao S.A., Carvalho C.R., da Silva T.C.R., Koehler A.D. (2015). Multiploidy occurrence in tomato calli from anther culture. *African Journal of Biotechnology*. **14**(40): 2846-2855. DOI: 10.5897/AJB2015.14525
43. Корнієнко С.І., Івченко Т.В., Горова Т.К. (2016). Наукові підходи створення гібридів моркви. ТОВ «Нілан-ЛТД»: 80 с.
44. Шевцова Г. (2005). Андрогенез в культурі ізолированих пильників помідоров. *Genetic and breeding of plants, animals and microorganisms: abstr. of the VIII Geneticists and Breeders Congress of Moldova*. 541–544.
45. Zagorska N.A., Abadjieva M.D., Oanh H.K. (1986) Factors affecting callus and plant production in anther cultures of tomato. *Gen. manipul. Plant. Breed Proc. Int. Symp.* 361–363.
46. Zagorska N.A., Shtereva A., Dimitrov B.D. et al. (1998). Induced androgenesis in

tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Influence of genotype on androgenesis ability. Plant Cell Reports. **17**: 968–973.

47. Bhaskara G.B. (2018). Basic principles and recent advances in anther/pollen culture for crop improvement. Plant biotechnology. **1**: 87-123.

48. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Лобанова К. І. (2010). Особливості виявлення рівня чутливості до андрогенезу різних генотипів м'якої пшениці в культурі пиляків. Фізіологія та біохімія культурних рослин. **42**(2): 107–117.

49. Ferrie A.M.R., Ehlert Z. (2021). Doubled haploidy for cow cockle (*Saponaria vaccaria* L.) methods in molecular biology. Doubled haploid technology. **3**(2289): 263-270 DOI 10.1007/978-1-0716-1331-3_17

50. Ігнатова С.О., Жосонар М. В., Лобанова К. І. (2008). Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: методичні рекомендації. 12 с.

51. Круглова Н. Н., Дубровная О. В. (2011). Морфогенез андроклиных каллюсов злаков *in vitro*. Физиология и биохимия культурных растений. **1**: 15–25.

52. Шестопал О. Л., Замбріборщ І. С., Топал М. М. (2013). Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями. Фактори експериментальної еволюції організмів. **12**: 326–330.

53. Волощук С. І., Волощук Г. Д. (2010). Вплив обробки зеараленоном та КФ на ефективність отримання гаплоїдів в культурі пиляків м'якої пшениці та тритикале. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека: 80 с.

54. Белинская Е. В., Наумова Л.Н., Манзюк В.Т. (1993). Генотипические особенности индукции гаплоидов в культуре пыльников ячменя. Цитология и генетика. **27**(5): 84–88.

55. Білинська О.В. (2010). Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae i su2*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. **11**(905): 60–66.

56. Ігнатова С.А. (2004). Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: дис. ... д-ра биол. наук. 435 с.

57. Сатарова Т. М. (2002). Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук. 41 с.

58. Черчель В.Ю., Сатарова Т.Н., Мельничук О.С., Гарькавая Е.Н. (2009). Оптимизация процесса диплоидизации гаплоидов кукурузы при ускоренном получении гомозиготных линий. Селекция і насінництво. **97**: 52–62.

59. Паламарчук Д. П. (2012). Перспективи використання подвоєних гаплоїдів в селекції рису та методи її отримання. Збірник наукових праць Зрошувальне землеробство. **58**: 130–133.

60. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Юшкіна Л. А., Супрун О. Г. (2012). Особливості андрогенезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. **105**: 116–120.

61. Сорока А.И. (2007). Получение удвоенных гаплоидов у льна масличного через культуру пыльников (методические указания). 26 с.

62. Рябовол Л. О. (1994). Разработка способов получения гаплоидов и дигаплоидов сахарной свеклы как исходного материала для селекционного процесса: автореф. дис. на здобуття вчен. степени канд. с.-х. наук. 24 с.

63. Guha S. Maheshwari C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature. **204**: 497.

64. Palmer C.E., Keller W. A. (2005). Overview of haploidy. Haploids in crop improvement. **56**: 3–9.

65. Бельская Г. В., Голомако В. В. (1998). Методы исследования пыльцевого андрогенеза в культуре пыльников помидора (*Lycopersicon esculenta* L.). Молекулярная

генетика и биотехнология: материалы межд. конф. 144–146.

66. Семова Н. Ю., Анохин Ю. Н. (1990). Индуцированный эмбриогенез в культуре пыльников белокочанной капусты. Доклады ВАСХНИЛ. **8**: 27–31.

67. Musial K., Bohanec B., Przywara L. (2001). Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Sexual Plant Reproduction. **13**(6): 335–341.

68. Adhikari P.B., Kang W.H. (2017). Association of Floral Bud and Anther Size with Microspore Developmental Stage in Campari Tomato. Horticultural science and technology. **35**(5): P. 608-617. DOI 10.12972/kjhst.20170065

69. Ahmadi B., Shariatpanahi M.E., Asghari-Zakaria R., Zare N., Azadi P. (2015). Efficient Microspore Embryogenesis Induction in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using Shed Microspore Culture. Journal of pure and applied microbiology. **9**(2): 21-29.

70. Moreno A., Claveria E., Pujol M., Dolcet-Sanjuan R. (2012). Development of a Methodology for the Production of Doubled Haploid Lines in *Solanum lycopersicum* L. Proceedings Paper. Acta Horticulturae. **935**: 95-100.

71. Cordts S., Kranz E., Brettschneider R. et al (1998). Isolation and characterization of genes which are strongly down-regulated after fertilization. Maize Genet. Cooper Newsl. **72**: 31–32.

72. Corral-Martinez P., Nuez F., Segui-Simarro J. M. (2011). Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms10* (35) tomato anthers. Euphytica. **178**(2): 215-228. DOI 10.1007/s10681-010-0303-z

73. Poonam Bhati, a Nanjappa Ashwath, Tissa Senaratna et al. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **78**: 1 – 21.

74. Segui-Simarro J.M., Nuez F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. Journal of Experimental Botany. **58**(5): 1119–1132. DOI 10.1093/jxb/erl271

75. Івченко Т. В, Сергиєнко О. Ф., Кондратенко С. І., Мирошніченко В. П., Виценя Т. І. (2006). Биотехнологические разработки в селекции овощных растений. Инновационные технологии в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур: сб. тез. межд. науч. конф. **2**: 119–120.

76. Мірошніченко Т.М. (2017). Визначення оптимального фітогормонального складу поживного середовища для індукції калюсогенезу в культурі ізольованих пиляків помідора Овочівництво і баштанництво. **63**: 232 – 236.

77. Пат. № 81097 UA, МПК (2006.01) A01N 43/40 Спосіб підвищення адаптації до умов *in vivo* клонально мікророзмножених *in vitro* пробіркових рослин картоплі і цибулі ріпчастої : патент на винахід / Дульнєв П. Г., Івченко Т. В., Кондратенко С. І., Горова Т. К.; – заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № 2002108200; заявл. 16.10.2002; опубл. 10.12.2007, Бюл. № 20.

78. Ma L., Yang C., Zeng D. (2009). Mapping QTLs for heading synchrony in a doubled haploid population of rice in two environments. J. Genet Genomics. **36**: 297–304.

79. Zichao L., Mu P., Li C., Zhang H. (2005). QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. Theor. Appl. Genet. **110**: 1244–1252.

80. Gelebart P. (1987). Obtention de plantes haploides par culture *in vitro* d'ovaries et d'ovules non fécondes de tournesol (*Helianthus annuus*). Agronomie. **7**: 81–86.

81. Gurel S., Kaya Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep. **19**: 1155–1159.

82. Славова Й.В. (1983). Разработка методов вегетативного размножения и получения гаплоидов в культуре *in vitro* у сахарной свеклы: автореф. дис. на соискание научной степени канд. с.-х. наук. 1983. 28 с.

83. Івченко Т. В. (2003). Биотехнологические и физиологические методы в селекции лука репчатого (*Allium cepa* L.): дис. канд. с.-х. наук. 210 с.

84. Keller E R., Maluszynski M, Kasha K J, Forster B P, Szarejko I. (1990). Haploidy in onion

- (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. Doubled Haploid production in crops plants-A Manual. 55–75.
85. Bohanec B., Jake M., Ihan A., Javornik B. (1995). Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Sci.* **104**: 215–224.
86. Campion B., Alloni C. (1990). Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture unpollinated ovules. *Plant Cell Tiss Org Cult.* **20**: 1–6.
87. Truong-Andre I., Demarly Y. (1984). Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Pflanzenzuchtg.* **92**: 309–320.
88. Kielkowska A., Adamus A. (2010). *In vitro* culture of in fertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult.* **102**: 309–319.
89. Suprunova T., Shmykova N. (2008). *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. *Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*: 371–374.
90. Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. (2005). Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *J. Amer Soc Hort Sci.* **130**: 555–560
91. Gemes-Juhasz A., Balogh P., Ferenczy A. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell. Rep.* **21**: 105–111.
92. Шмыкова Н.А., Супрунова Т. П. (2009). Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L. *Гавриш.* **4**: 40–44.
93. Znamenskaya V., Podvigina O., Zhuzhholova T. (1994). Haploidy of sugar beet. In *Plant biotechnology and genetic engineering.* 115.
94. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science.* **2**: 297–302.
95. Andersen S.B., Christiansen I., Farestveit B. (1990). Carrot (*Daucus carota* L.): *In vitro* production of haploids and field trials. *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* **12**: 393 – 402.
96. Тюкавин Г. Б., Шмыкова Н. А. (2000). Культура неопыленных семяпочек моркови. Межд. научно- практ. конф «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке». 275–277.
97. Тюкавин Г. Б. (2007). Основы биотехнологии моркови / Под. ред. Пивоварова В. Ф. М.: ВНИИССОК РАСХН. 479 с.
98. Vitsenia T. O., Sergiyenko O. F. (2015). Regeneration of plants from gynogenetic carrot calluses. *Agricultural science and practice.* **2**(3): P. 49-54. DOI 10.15407/agrisp2.03.049
99. Віцень Т. І., Т. В. Івченко. (2015). Спосіб дезінфекції суцвіть моркви в культурі *in vitro*. Теоретичні основи оптимізації селекційного процесу основних видів сільськогосподарських рослин: матеріали міжнародної наук.–практ. конф. 40–42.
100. Masuda K., Kikuta Y., Okazava Y. (1981). A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **60**: 183–193.
101. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soyben root cells. *Experimental Cell Researchs.* **50**: 151–158.
102. Пат. № 30285 UA, МПК (2006) А01Н 1/04, С12N 5/00 Спосіб індукції новоутворень у культурі насіннезародків моркви *in vitro*: патент на корисну модель / Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В, Яровий Г. І.; заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – № u200709889; заявл. 03.09.2007; опубл. 25.02.2008, Бюл № 4.

Глава 7. МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ *IN VITRO* ДЛЯ ІНТРОДУКЦІЇ НІШЕВИХ КУЛЬТУР ІЗ ВЕГЕТАТИВНИМ ТИПОМ РОЗМНОЖЕННЯ

Кліматичні зміни призводять до зниження врожайності сільськогосподарських культур по всьому світі. Підвищені температури, спричинені зміною клімату, впливають на процеси розвитку та фізіологічні процеси рослин, що зрештою впливає на врожайність та якість сільськогосподарських культур [1]. З цієї причини вченими ведуться пошуки, спрямовані на вирішення даної проблеми. Із основних напрямків розширення спектру селекційного матеріалу є інтродукція нових видів та дослідження способів їх адаптації до цих змін навколишнього середовища [2]. З кожним роком змінюються умови вирощування традиційних для Східного Лісостепу культур, а вирощування нішевих вимагає нових підходів.

Історія світового рослинництва протягом багатоміліардного розвитку людської цивілізації, особливо останніх століть, може бути наочним прикладом величезної вирішальної ролі інтродукції нових культурних рослин [3]. Найбільші події у світовому рослинництві пов'язані по суті з інтродукцією, яка у свою чергу нерозривна з господарською діяльністю людини, з певним етапом розвитку людського суспільства [4].

Енциклопедичне трактування терміну «інтродукція рослин» являє собою переселення окремих видів за межі природного ареалу до місця, де вони раніше не зростали. Першим основи інтродукції рослин розробляв ще О. де Кандоль [5]. Основоположником інтродукції вважається Є. Грачов, який у 1875-1877 рр. випробував більше 2000 зразків овочевих культур, отриманих з Англії, Бельгії, Німеччини, Італії, США, Франції, і на основі вивчення величезного сортименту рекомендував для вирощування 50 сортів капусти, 40 столових буряків, 36 - моркви, 20 - ріпи і т.д [6].

М.І. Вавілов замість суто емпіричних прийомів «проб і помилок» запропонував прогнозувати реальний успіх інтродукції рослин шляхом

зіставлення всієї суми природних умов батьківщини інтродуцента з такими ж районами інтродукції. У розробці наукових основ інтродукції рослин велику роль відіграла розроблена ним теорія про центри походження культурних рослин [7]. У цій роботі він науково обґрунтував проблему інтродукції нових культур перед вітчизняним рослинництвом, наголошуючи на необхідності широкого використання світових рослинних ресурсів. В альтернативу традиційним культурам необхідно вводити в практику нові, перспективні культури, які перевершують традиційні за своїми господарськими та біологічними ознаками культури певного регіону. У таких країнах як США, Канада, Австралія сільське господарство майже повністю базується на інтродукції іноземних видів рослин [8, 9].

З початку ХХ століття багато дослідників приділи увагу визначній ролі інтродукції у розвитку світового сільського господарства. На основі проведення численних досліджень ними були розроблені теорії та методи інтродукції [10]. В. П. Малєєв [11] на основі вивчення історії флори та видів розробив метод флорогенетичного аналізу рослин, для виявлення найбільш лабільних форм з метою інтродукції їх в інші райони. М. В. Культіасовим [12], розроблені еколого-історичні методи, які базуються на тому, що інтродукційні можливості рослин визначаються не лише умовам їх вирощування, а й екологічними особливостями їх предків.

Широке коло дослідників вказують, що найкращі сорти сучасних зернових, технічних, плодових та овочевих культур були отримані на основі широкого залучення різного екологічного матеріалу [13]. Інтродукція овочевих культур залишається актуальною і для нашої країни, так як інтродукція нових цінних видів овочевих культур рослин у різні еколого-географічні зони дозволяє значно розширити асортимент овочів та покращити харчування населення, зробити його більш повноцінним, корисним та різноманітним.

Розширення асортименту овочевих культур за рахунок інтродукції нових нетрадиційних видів овочевих культур є актуальною проблемою

сучасного українського овочівництва. Оскільки генетичне різноманіття рослин є одним із ключових ресурсів для вирішення нагальних проблем держави – забезпечення продовольчої, енергетичної, екологічної безпеки та охорони здоров'я, що дозволяє не лише збалансувати харчування людини, а й підвищувати захисні механізми та довголіття людського організму. Вирощування нішевих культур є перспективним напрямом диверсифікації виробництва як для малих товаровиробників, так і для агрохолдингів, оскільки дає змогу отримувати сільськогосподарську продукцію для реалізації на високомаржинальних внутрішніх ринках і навіть експорту [14-16]. І хоча в Україні сформувався, в основному, традиційний склад овочевих культур, але нині зростає інтерес і до нових видів з високим вмістом біологічно цінних компонентів. До перспективних рослин, які малопоширені в Україні, належать якон (*Smallanthus sonchifolius*) та батат (*Ipomoea batatas* L.). Інтродукція є надійним джерелом одержання експериментального матеріалу для багатьох наукових галузей, і в першу чергу для селекції рослин [17]. Робота з інтродукції нових видів рослин здійснюється з дотриманням Закону України про карантин рослин, який регулює порядок використання в селекційних дослідженнях під карантинного насінневого та садивного матеріалу сільськогосподарських культур. Це дозволяє запобігати поширенню в регіонах небезпечних карантинних шкідників, збудників хвороб і бур'янів [18, 19]. За останні десять років у науковій літературі опубліковано експериментальні роботи, що демонструють можливість використання біотехнологічних методів для прискореного створення цінного вихідного матеріалу для селекційних технологій зі створення високо конкурентних генотипів якона і батату [20].

За традиційної технології такі овочеві культури як якон та батат розмножують лише вегетативними органами. Даний спосіб не відповідає сучасним вимогам ринку через низький коефіцієнт розмноження та значне накопичення посадковим матеріалом вірулентних збудників хвороб. Головною перевагою застосування клонального мікророзмноження в культурі *in vitro*

дозволяє за короткий проміжок часу отримувати необхідну кількість зразків нових високопродуктивних генотипів, який до всього є генетично однорідним. Залучення до селекційної роботи зразків-інтродуцентів, які пройшли процедуру культивування в культурі *in vitro*, уможливорює запобігти поширенню в регіонах небезпечних карантинних шкідників, збудників хвороб і бур'янів [21, 22]. Ефективність біотехнологічного етапу розмноження рослин-інтродуцентів у культурі *in vitro* залежить насамперед від розробки ефективних стандартизованих протоколів цього процесу і потребує ретельного аналізу економічної ефективності на всіх його етапах. Але теоретичні підходи щодо уведення зразків, представлених у вигляді пробіркових клонів, досі не обґрунтовано. Таким чином, метою роботи було розробка ефективних біотехнологічних протоколів введення, культивування в умовах *in vitro* та адаптації до умов агресивного зовнішнього середовища пробіркових рослин генотипів-інтродуцентів якона та батату.

Під час проведення досліджень керувались загальноприйнятими та авторськими методиками, в яких детально представлено всі технологічні аспекти роботи у культурі *in vitro* та адаптації пробіркового матеріалу [23-25].

7.1. Розробка методичних підходів до інтродукції якона (*Polymnia sonchifolia* Poepp.).

Якон [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson], син. *Polymnia sonchifolia* – рослина родини Айстрових (*Asteraceae* Dumort.), підродини Айстрових (*Asteroideae*), триб Геліантових, або Соняшникових (*Heliantheae*), групи Неолійних культур, який походить з Аргентини [26, 27]. Це трав'яниста багаторічна рослина, яка утворює великі коренебульби. Рослини достатньо посуховитривалі та холодостійкі. Кущ якона може сягати висоти до двох метрів, має великі супротивні листки з пильчастими краями, жовто-помаранчеві квітки розміром 3 см. Рослина має два види коренів: центральне кореневище, з якого утворюються нові стебла та тонкі корінці, на

яких формуються коренебульби. Кореневі бульби якона на 93% складаються з води, на 5-6 % – із моно- та полісахаридів і на 1-2 % – із мінеральних речовин [28]. Вони запасують вуглеводи не тільки в формі крохмалю, полімеру глюкози, але й у формі інуліну, полімеру фруктози, тому якон незамінний продукт для хворих на цукровий діабет та людей з ожирінням [29]. Крім цукрів, коренебульби якона містять білок, клітковину, жир, кальцій, фосфор, багато калію та селен. До того ж білок коренебульб за вмістом незамінних амінокислот значно кращий за білок зерен пшениці, кукурудзи та сої [30]. З огляду на те, що якон змакує людям із різними вимогами до страв, він поширився в багатьох країнах світу, за межами місць його природного зростання, наприклад, у США, Новій Зеландії, Японії, Західній Європі, Молдові [31]. Тому питання інтродукції цієї культури на території України є актуальним і своєчасним.

Основне завдання первинного інтродукційного випробування – отримання життєздатного садивного матеріалу рослин-інтродуцентів якона здійснювали способом активізації латеральних й апікальних меристем живців рослин-регенерантів на рідких й агаризованих безгормональних поживних середовищах MS, доповнених 3 % сахарози та вітамінами. Застосування регуляторів росту в складі поживних середовищ не було передбачено схемою досліду, оскільки попередніми дослідженнями визначено, що меристемам якона властива висока гормонезалежність і вони можуть ефективно розмножуватися на безгормональних середовищах [32]. Більш активний ріст рослин-регенерантів спостерігали на рідких середовищах, що підтверджували показники їх висоти.

Аналогічні закономірності спостерігались, проаналізувавши параметри кількості листків, довжини міжвузлів та коренів. Тому на етапі масового розмноження матеріалу для висаджування в ґрунтові умови (січень-квітень) використовували рідке середовище MS, а на етапі депонування (квітень-грудень) – агаризоване. Їх застосування сприяло зниженню швидкості росту латеральних меристем на 23%, що дозволило подовжити тривалість пасажу від 45 до 60 діб.

На розвиток регенерантів якона впливала і сезонність культивування регенерантів. Кращий їх ріст спостерігали в січні-червні. У липні – вересні розвиток регенерантів уповільнювався і лише у жовтні інтенсивність їх росту підвищувалась. Цю особливість рослин-регенерантів враховували під час розрахунків коефіцієнтів розмноження якона в культурі *in vitro*. Вони свідчать, що за 6-тижневої тривалості пасажу, в залежності від умов вирощування, за рік з однієї рослини-регенеранта можна отримати $2,2 \cdot 10^4$ – $4,6 \cdot 10^6$ пробіркових рослин культури.

Депонування рослин-регенерантів якона на безгормональному середовищі забезпечило стабільне розмноження пробіркового клону зі збереженням високих показників його росту. Слід підкреслити, що аномальних рослин за весь період депонування якона не спостерігали. В процесі розмноження під час кожного пасажу постійно здійснювався індивідуальний добір на рівні рослин-регенерантів пробіркових рослин. У подальше розмноження залучали матеріал, який за темпами росту й кількістю листків характеризувався високими показниками (табл. 7.1).

Таблиця 7.1 – Біометричні показники рослин-регенерантів якона під час тривалого депонування на безгормональному поживному середовищі MS

Пасаж	Висота, мм	Довжина кореня, мм	Кількість листків, шт.
1	98,9±8,9	57,7±8,5	6,1±0,79
9	110,4±1,14	58,9±9,1	6,5±0,84
18	102,8±9,7	51,6±7,5	5,9±0,71
27	104,4±8,9	60,1±9,3	6,4±0,88
V, %	9,7±1,3	15,3±1,4	13,8±1,0
B, %	90,3 ±17,1	84,6±11,0	86,3±12,2

Завдяки такому добору відбувається селекція генотипів із низькою варіабельністю, що засвідчує низьку мінливість ознак пробіркових рослин (від $9,7 \pm 1,3$ до $15,3 \pm 1,5$ %) і високу вирівняність матеріалу (від $84,6 \pm 1,1$ до $90,3 \pm 1,7$ %). Одержані результати також можна пояснити складом поживного середовища, застосування якого дозволило розмножити пробірковий клон без генетичних змін, та низькою мінливістю ознак у рослин, що тривалий час розмножувались виключно вегетативним способом.

Розмножені в культурі *in vitro* регенеранти адаптували до ґрунтових умов у квітні-травні на різних субстратах. Приживлення рослин контрольного варіанта (чорнозем типовий малогумусний) було невисоким – 55 % (табл. 7.2). Через високу щільність ґрунту контрольний варіант не відповідав вимогам культури до високої аерації. Найкращий відсоток приживлення отримано за використання для адаптації кокоґрунту – 98 %.

Таблиця 7.2 – Вплив субстрату на приживаність і параметри розвитку пробіркових рослин якона під час адаптації до умов *in vivo*

Субстрат	Приживлюваність, %	Довжина, см.		
		пагона	листка	кореня
Ґрунт (контроль)	55	$9,5 \pm 0,93$	$4,1 \pm 0,62$	$9,4 \pm 0,35$
Пісок	96	$12,1 \pm 1,25$	$5,95 \pm 0,68$	$11,5 \pm 0,44$
Торф	74	$14,0 \pm 1,12$	$6,4 \pm 0,88$	$12,5 \pm 0,52$
Кокоґрунт	98	$13,0 \pm 0,89$	$5,6 \pm 0,57$	$11,7 \pm 0,34$
НІР ₀₅		1,11	0,34	1,51

Адаптовані рослини у торфі за біометричними показниками (довжиною пагонів, листків і коренів) перевищували рослини з інших варіантів, але приживлення становило 74 %. У піску приживаність рослин була високою – 96,0 %, але рослини значно відставали за темпами приросту надземної маси та кореневої системи. Тому останні два варіанти (торф і пісок) не можна рекомендувати для адаптації регенерантів якона (рис. 7.1).

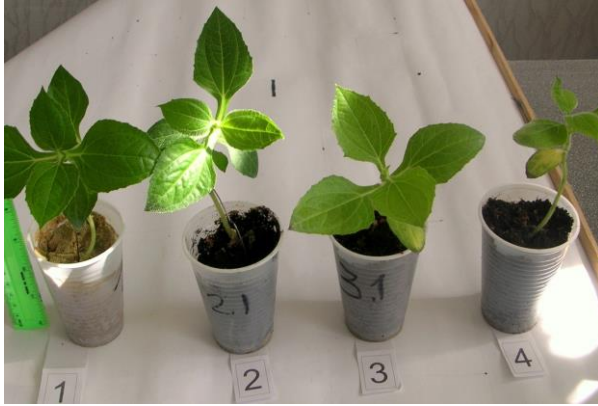


Рис. 7.2. Адаптовані пробіркові рослин на різних субстратах:
1 – пісок; 2 – торф; 3 – кокогрунт; 4 – ґрунт (контроль)



Рис. 7.3. Адаптовані пробіркові рослини якона після чотирьох тижнів вирощування в ґрунтових умовах



Рис. 7.4. Рослини якона через 9 тижнів вирощування в ґрунтових умовах



Рис. 7.5. Рослина якона на момент збирання врожаю (III декада вересня)

Важливим моментом під час розробки агротехнічних умов вирощування культур-інтродуцентів, які розмножуються розсадним способом, є визначення строків та схеми висаджування розсади. Для встановлення адаптаційних можливостей культури якона в умовах Східного Лісостепу України адаптовані рослини-регенеранти висаджували в польові умови в три строки (I, II, III декади травня) за різних схем їх розташування: 50x30 см та 80x40 см. За цих строків висаджування адаптованих пробіркових рослин приживаність у ґрунті становила 100% і у подальшому вони мали типовий для культури ріст (рис. 7.2).

Протягом всього вегетаційного періоду рослин якона ураження хворобами та пошкодження не виявлено.

Усі рослини мали округле стебло зеленого кольору, з густим опушенням. У рослин, висаджених за схеми 50 x 30 см висота головного стебла становила $110,5 \pm 14,5$ см за першого строку висаджування, $92,1 \pm 10,3$ см – за другого, $84,0 \pm 9,1$ см – за третього строку (табл. 7.3). Листки у рослин були супротивними, великими, з нерівномірно зубчастим краєм. Листкова пластинка у молодих рослин мала копієвидну форму, пізніше – ромбічну, з верхньої сторони була темно зеленого кольору, знизу – більш світла, опушена. Середня довжина листкової пластинки $20,0 \pm 3,2$ см, ширина – $23,2 \pm 3,5$ см (рис. 7.3).

З обох сторін листка якона знаходились ефірно-олійні залози, характерної для родини Айстрових. На великих жилках листкових черешків спостерігалось опушення. Бутонізації та цвітіння у рослин не було.

Таблиця 7.3 – Вплив схеми і строків садіння на біометричні показники розвитку надземної частини рослин якона

Схема Садіння, см	Строк садіння	Висота рослини, см	Кількість вузлів на стеблі, шт.	Діаметр стебла, мм	Листки, см		Кількість пагонів, шт.	
					ширина	довжина	1-го порядку	2-го порядку
50x30	I декада травня	110,5±14,5	11	24,9±2,0	24,5±3,1	20,8±3,2	2,0	4,4
	II декада травня	92,1±10,3	11	22,5±2,1	22,4±3,4	20,0±3,7	5,5	5,2
	III декада травня	84,0±9,1	11	24,2±2,4	22,8±2,9	19,3±2,9	5,1	2,1
Середнє		95,5±11,4	11	23,9±2,2	23,2±3,5	20,0±3,4	4,1	3,9
80x40	I декада травня	141,4±16,4	13	27,8±2,3	25,5±3,5	23,4±2,5	7,3	11,0
	II декада травня	129,7±12,2	13	26,4±2,5	24,5±3,2	21,9±2,1	7,4	9,0
	III декада Травня	114,0±11,4	11	24,8±2,3	22,5±3,0	20,1±3,4	4,5	5,2
Середнє		135,6±14,8	12,3	27,1±2,4	25,0±3,3	22,7±2,3	6,4	8,4

Характерна форма кущів визначалась кількістю і висотою пагонів 1-го і 2-го порядків. Розвиток пагонів 1-го порядку завершився на початку серпня і не змінювався до кінця вегетаційного періоду. У середині серпня на рослинах розпочиналось утворення пагонів 2-го порядку, стебла рослин значно потовщувались, збільшувались розміри листків. За основними показниками розвитку надземної частини, визначеними перед збиранням (висота, кількість пагонів 1-го і 2-го порядків, довжина міжвузлів, діаметр стебла, довжина і ширина листкової пластинки) рослини якона покоління R₀, висаджені у I і II дек. травня перевищували рослини, висаджені у III дек. травня.

Збільшення площі живлення у рослин, висаджених за схеми 80x40 см проти 50x30 см, сприяло одержанню більшої кількості пагонів 1-го порядку (з 4,1 до 6,4 шт.) і висоти рослин, яка за даної схеми становила в середньому 135,6±14,8 см. Слід зазначити, що рослини висаджені в III дек. травня за схеми 80 x 40 см також мали меншу кількість пагонів 1-го порядку та велику кількість недорозвинених пагонів 2-го порядку.

Врожай збирали перед першими приморозками, через 4 місяці вирощування у відкритому ґрунті, оскільки з літературних даних було відомо, що підмерзлі рослини у подальшому погано зберігаються [5]. На момент збирання (III дек. вересня), всі рослини мали зелені листки і стебла. Після викопування рослин виявлено, що в основі пагонів 1-го порядку формувалось розвинене кореневище з корневими бульбами (рис. 7.4).

Аналіз розвитку підземної частини рослин якона засвідчив вплив строків і схем садіння на масу та розмір кореневищ рослин (табл. 7.4). Кореневища максимальної маси отримано при висаджуванні рослин за схеми 50x30 см у I та II дек. травня – 1,91±0,223 кг та 2,14±0,278 кг, відповідно. У рослин, висаджених у III дек. травня, маса підземної частини була меншою – 0,727±0,08 кг. Аналогічна закономірність спостерігалась у рослин, висаджених за схеми 80x40 см. Строки садіння у відкритий ґрунт адаптованих рослин якона впливали на кількість одержаних коренебульб.

Таблиця 7.4 – Вплив схем садіння і тривалості вегетаційного періоду рослин якона в ґрунтових умовах на показники продуктивності під час їх інтродукції в умовах Східного Лісостепу України

Схема садіння, см	Строк садіння, травень	Кореневище				Кореневі бульби		
		маса, кг	висота, см	діаметр, см	бруньок відновлення, шт.	кількість, шт.	маса, кг	маса бульб діаметром ≥ 1 см, г
50x30	I дек.	1,93±0,22	25,6±2,6	43,9±5,3	50,1±6,1	17,7±2,3	0,95±0,12	53,6±7,2
	II дек.	2,16±0,27	22,8±3,1	31,3±4,0	44,3±4,5	12,6±1,2	0,86±0,13	68,2±7,4
	III дек.	0,72±0,08	20,6±2,5	33,4±3,6	20,3±2,7	5,2±0,6	0,27±0,03	51,9±6,2
Середнє		1,61	23,0	36,2	38,2	11,8	0,69	57,9
80x40	I дек.	2,26±0,13	27,2±3,1	55,4±6,1	65,5±7,1	25,2±3,3	1,26±0,21	52,4±6,4
	II дек.	2,05±0,20	25,5±3,3	44,8±5,0	52,1±6,0	13,7±2,5	1,05±0,18	80,7±10,1
	III дек.	1,68±0,12	22,7±4,0	36,3±4,5	23,6±1,9	12,2±1,6	0,60±0,09	54,7±6,4
Середнє		1,99	25,1	45,5	47,1	17,0	0,98	62,6
НІР ₀₅		0,14	1,5	1,45	11,2	5,8	0,4	6,8

Найбільше сформованих коренебульб було з рослин, висаджених у I дек. травня, – $17,7 \pm 2,3$ шт/рослину (схема 70 x 30 см) та $25,2 \pm 3,3$ шт/рослину (схема 80 x 40 см). Мінімальну кількість бульб – $5,2 \pm 0,6$ та $12,2 \pm 1,6$ шт/рослину одержано за відповідних схем садіння у III дек. травня.

Маса кореневих бульб, кількість закладених бруньок відновлення залежали від розміру кореневища і кількості пагонів 1-го порядку. Середня маса коренебульб (з однієї рослини) у рослин, висаджених за схеми 50 x 30 см, коливалась від $0,27 \pm 0,03$ кг до $0,95 \pm 0,12$ кг, за схеми 80 x 40 см – від $0,60 \pm 0,09$ кг до $1,26 \pm 0,21$ кг. Середня маса бульб діаметром ≥ 1 см за різних схем і строків садіння не мала значних відмінностей [6].

Значне варіювання висоти та параметрів кореневищ у рослин, висаджених за схеми 50 x 30 см, може бути пов'язано з меншою площею їх живлення. За більш розрідженої схеми 80x40 см рослини мали краще розвинений габітус куща та більшу кількість підземних органів.

У наступних дослідженнях із розробки агротехніки культури-інтродуцента необхідно приділити увагу оптимізації режимів мінерального живлення та відпрацюванню умов зберігання культури.

Аналіз біометричних ознак рослин пробіркових клонів якона у польових умовах не виявив суттєвих відмінностей між рослинами, що свідчить про внутрішньоклонову однорідність матеріалу. Пробірковий матеріал передано для використання в наукових дослідженнях до Уманського національного університету садівництва Національному фармацевтичному університету.

Отже, на етапі масового розмноження рослин-регенерантів якона в січні-квітні слід застосовувати рідке безгормональне середовище MS, у квітні-грудні – агаризоване безгормональне середовище, використання якого на етапі депонування сприяє зниженню швидкості росту латеральних меристем на 23% і дозволяє подовжити тривалість пасажу з 45 до 60 діб.

Кращим субстратом для адаптації пробіркових рослин якона є кокогрунт, фізичні властивості якого забезпечують отримання 98 % приживлених рослин і високі показники розвитку адаптованого матеріалу.

Первинне інтродукційне випробування якона засвідчило, що агрокліматичні умови Східного Лісостепу України є прийнятними для вирощування культури в умовах відкритого ґрунту. Лімітованими факторами, які впливають на продуктивність рослин роду *Polymnia*, є тривалість вегетаційного періоду рослин, обумовлена високою вимогливістю до тепла та схема вирощування рослин у відкритому ґрунті. Використання клонів пробіркових рослин якона дозволяє забезпечити селекцію достатньою кількістю матеріалу для проведення первинної інтродукції нової овочевої культури з вегетативним типом розмноження. Застосування в якості рослин-інтродуцентів пробіркових рослин запобігає перенесенню карантинних об'єктів із рослинним матеріалом і дозволяє здійснювати масове та прискорене розмноження цінних генотипів.

7.2. Біотехнологічні способи розмноження генотипів-інтродуцентів батату (*Ipomoea batatas* L)

Однією з овочевих рослин, виробництво якої постійно збільшується у Європі, є батат (*Ipomoea batatas* L.), який віднесено до родини В'юнкових (*Convolvulaceae*) [33, 34]. Інтродукція цієї культури має перспективи, завдяки високій поживній цінності його кореневих бульб, які окрім крохмалю (у складі якого амілоза переважає амілопектин), містять вітаміни С, D, К, глюкозу, пектин, каротин, амінокислоти [35-38].

Батьківщиною батату вважають тропічні райони Центральної та Південної Америки (Бразилія, Мексика, Венесуела). Дані з організації «Food and Agriculture Organization» (FAO) вказують, що більше 95 відсотків врожаю солодкої картоплі виробляється в країнах, що розвиваються, але Китай вирощує більше батату, ніж будь-яка інша країна [39]. Завдяки високому потенціалу продуктивності (від 40 до 100 т/га) у ґрунтово-кліматичних умовах України, цінним лікувально-дієтичним властивостям кореневих бульб та високому експортному потенціалу (за 10 років у Європі експорт батату збільшився у 6

разів) питання інтродукції цієї культури на території нашої держави є актуальним і своєчасним [40].

Виробництво батату пов'язано з низкою проблем, основною з яких є відсутність сертифікованого садивного матеріалу [41-43]. Тому розроблення ефективних технологій прискореної інтродукції й створення висококонкурентних і цінних з комерційної точки зору сортів батату з високими біохімічними показниками та адаптованих до агрокліматичних умов України є актуальним і затребуваним процесом в селекції і насінництві цієї культури.

Вихідним матеріалом для досліджень із інтродукції нової овочевої культури батату була колекція, яка налічувала 13 генотипів кореневих бульб, зібраних співробітниками лабораторії. З метою отримання донорських експлантатів для введення матеріалу в культуру *in vitro* та унеможливлення потрапляння до ґрунту патогенних мікроорганізмів із поверхні кореневих бульб, пророщування батату на початкових етапах роботи провели у ящиках із піском, розміщених в лабораторних умовах. Надалі дослідження проводились за наступними етапами:

I етап - розмноження в культурі *in vitro* вихідних експлантатів;

II етап - адаптація пробіркових рослин до умов *in vivo*;

III етап - вирощування розмноженого рослинного матеріалу у польових умовах;

IV етап - фенологічні спостереження за розвитком рослин;

V етап - збирання врожаю кореневих бульб.

Для одержання стерильних експлантатів батату донорські органи (пагони з пророщених на піску бульб) стерилізували у 30%-му розчині гіпохлориту натрію з експозицією обробки 25 хв, після чого промивали 5 разів стерильною дистильованою водою. Розмноження життєздатного садивного матеріалу здійснювали активізацією латеральних й апікальних меристем на рідких та агаризованих поживних середовищах MS, доповнених 3% сахарози, вітамінами та різними концентраціями фітогормонів (0,1 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОЦК і 2,0

мг/л ГКЗ). Одержані з меристем пагони розділяли на живці, які включали у себе частину стебла з листочком та латеральною брунькою. Висаджений матеріал культивували за температури 20...22°C, з фотоперіодом 16 год – освітлення, 8 год – темряви при інтенсивності освітлення 2 тис. лк. Пересаджування експлантатів проводили через кожні 45 діб [44]. Живці висаджували у пробірки з твердим живильним середовищем MS, занурюючи, щоб брунька живця знаходилася дещо вище від рівня середовища, для регенерації рослин.

Активація меристем, дозволяє отримати генетично ідентичні клони пробіркових рослин [45]. Крім того використання цих експлантатів супроводжується оздоровленням матеріалу, оскільки апікальна меристема характеризується відсутністю вірусів, які можуть бути присутніми у тканинах [46]. При розробці ефективного способу індукції росту в культурі *in vitro* апікальних і латеральних меристем шляхом утворення калюсогенезу або органогенезу, дослідили вплив фітогормонального складу живильних середовищ. Для початку обрали по одному генотипу із різним забарвленням м'якушу, керуючись результатами аналізу ринку щодо уподобань споживачів батату [47]: кремовим м'якушем характеризувався зразок *Z-11*, оранжевим - *J-12* та фіолетовим - зразок *Pu-13*.

Процес калюсоутворення спостерігали лише на малих меристемах у зразка *Z-11*, на усіх варіантах поживних середовищ (табл. 7.5). Об'єм калюсогенезу становив до $0,2 \pm 0,2$ см³. Можливо, це пов'язано із травмуванням при відокремленні меристем таких розмірів від пагонів. Виявлено, що найкращий ріст меристем та подальша ініціація рослин-регенерантів були на середовищі із додаванням 0,05 мг/л БАП + 0,05 мг/л КІН. В подальшому розвиток рослин-регенерантів відбувався із калюсних клітин, висота регенерантів при цьому становила $1,1 \pm 0,0$ см (із малих меристем) та $2,4 \pm 0,0$ см (із апікальних меристем), які мали по $1,1 \pm 0,3$ - $2,0 \pm 0,1$ шт листків, відповідно. У зразків *J-12* та *Pu-13* за даного варіанту поживного середовища розвиток апікальних меристем відбувався шляхом прямого органогенезу.

Таблиця 7.5 - Вплив фітогормонального складу живильних середовищ на ріст меристем
колекційних зразків батату через 30 діб культивування

Варіанти фітогормонального складу поживних середовищ MS	Z-11 (меристеми до 0,5 мм)	Z-11 (меристеми з 2 прим. листками)	J-12 (меристеми до 0,5 мм)	J-12 (меристеми з 2 прим. листками)	Pu-13
	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$
Приріст калюсу, см ³					
0,05 мг/л БАП + 0,05 мг/л КІН	0,2±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0 ±0,0
0,05 мг/л ГКЗ + 0,03 мг/л КІН	0,5±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
0,1 мг/л БАП	0,7±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Висота рослин-регенерантів, см ⁻¹					
0,05 мг/л БАП + 0,05 мг/л КІН	1,1±0,0	2,4±0,0	1,2±0,0	2,3±0,1	1,4±0,0
0,05 мг/л ГКЗ + 0,03 мг/л КІН	1,1±0,0	2,3±0,0	1,3±0,0	2,6±0,2	1,5 ± 0,0
0,1 мг/л БАП	1,2±0,1	1,3±0,0	1,3±0,2	1,4±0,2	1,3±0,1
Кількість листків, шт.					
0,05 мг/л БАП + 0,05 мг/л КІН	1,1±0,4	1,2±1,0	1,5±1,0	1,8±0,1	1,7±0,3
0,05 мг/л ГКЗ + 0,03 мг/л КІН	1,1±0,3	2,0±0,1	1,0±0,6	3,8±0,3	1,0±0,0
0,1 мг/л БАП	1,2±0,2	1,1±0,5	1,2 ±0,1	1,0±0,5	0,6±0,0
Площа листкової пластинки, (см ²) ⁻¹					
0,05 мг/л БАП + 0,05 мг/л КІН	0,5±0,0	1,6±0,1	0,4±0,0	1,0±0,0	0,6±0,1
0,05 мг/л ГКЗ + 0,03 мг/л КІН	0,4±0,0	1,5±0,0	0,3±0,0	1,4±0,0	0,3±0,0
0,1 мг/л БАП	0,3±0,0	0,6±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,3±0,0

Висота рослин-регенерантів через 4 тижні культивування становила у зразка *J-12* - $1,2 \pm 0,0$ см (із малих меристем) та $2,3 \pm 0,1$ см (із апікальних меристем). У зразка *Pu-13* висота регенерантів в середньому була в межах $1,4 \pm 0,0$ см, які мали по $1,7 \pm 0,3$ шт листків.

На середовищі із додаванням гіберелінів ($0,05$ мг/л ГКЗ + $0,03$ мг/л КІН), об'єм калюсу був більшим від $0,1 \pm 0,0$ см³ до $0,5 \pm 0,1$ см³. Проте, утворені рослини-регенеранти відставали у рості. Висота в середньому була в межах $1,1 \pm 0,0$ см із малих меристем та кількістю листків на рослині $1,1 \pm 0,3$ шт (зразок *Z-11*). Лише для зразка *J-12* дана комбінація фітогормонів ініціювала повноцінний розвиток рослин-регенерантів із апікальних меристем, висота яких була до $2,6 \pm 0,2$ см із кількістю листків $3,8 \pm 0,3$ шт на рослині.

Збільшення у 2 рази концентрації БАП ($0,1$ мг/л БАП) призвело до утворення найбільшого об'єму калюсу $0,7 \pm 0,2$ см³ на меристемах малого розміру у зразка *Z-11*, але відсутність ауксинів у середовищі негативно впливала на подальший розвиток регенерантів із меристем. В середньому за усіма зразками висота рослин склала від $1,2 \pm 0,1$ см (зразок *Z-11* із меристемами до $0,5$ мм) до $1,4 \pm 0,2$ см (зразок *J-12* із великими меристемами). Нестача поживних речовин вплинула також і на формування листків, в середньому їх кількість на рослині коливалась в межах $0,6 \pm 0,0$ шт (зразок *Pu-13*) до $1,2 \pm 0,2$ шт (зразок *Z-11*).

Виявлено, що для отримання первинних експлантатів батату для введення в культуру *in vitro* слід обирати апікальні меристеми великого розміру, які культивують на поживному середовищі $0,05$ мг/л БАП + $0,05$ мг/л КІН, що сприяє активному отриманню рослин-регенерантів [48].

Для прискорення процесу розмноження індивідуально дібраних високопродуктивних генотипів-інтродуцентів батату досліджено різний фітогормональний склад поживних середовищ для культивування рослин-регенерантів батату в культурі *in vitro* (табл. 7.6). Дослідження провели на перспективному зразку японського походження *Ok-3* (забарвлення м'якоті фіолетове).

Таблиця 7.6 - Залежність розвитку рослин-регенерантів батату генотипу *Ok-3* в культурі *in vitro* від фітогормонального складу поживних середовищ

Склад поживних середовищ	Об'єм калюсу, мм ³	Висота рослини-регенеранту, см	Бал розвитку кореневої системи	НІР _{0,05}
MS б/г(контроль 1)	0,5±0,1	2,9±1,3	3	1,2
MS +2 мг/л кальцій пантотенат +100 мг/л аргінін гідро хлорид +2 мг/л гліцин (контроль 2)	0,5±0,1	2,9±1,2	3	1,2
MS +0,01 мг/л ІОцК	0,0±0,0	7,1±1,2	5	2,1
MS +0,5 мг/л ІОцК	3,4±0,5	6,3±1,4	5	3,2
MS +0,5 мг/л БАП + 0,05 мг/л НОцК + 0,5 мг/л ГКЗ	0,7±0,2	2,3±1,1	2	1,3
MS +0,1 мг/л БАП + 0,05 мг/л НОцК + 2,0 мг/л ГКЗ	0,6±0,2	0,6±0,2	1	1,4
MS +0,1 мг/л БАП+ 0,5 мг/л НОцК + 2,0 мг/л ГКЗ	0,5±0,1	2,6±1,1	2	1,2
MS +0,1 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОцК+ 2,0 мг/л ГКЗ	0,7±0,2	1,1±0,2	1	0,8
MS +0,5 мг/л БАП + 0,05 мг/л НОцК + 0,5 мг/л ГКЗ	0,5±0,1	1,7±0,4	2	0,8
MS +0,1 мг/л БАП + 0,05 мг/л НОцК+ 2,0 мг/л ГКЗ	0,6±0,1	0,6±0,1	1	0,1

Задовільний розвиток пробіркових клонів спостерігали на поживному середовищі MS (безгормональне) та MS +2 мг/л кальцій пантотенат + 100 мг/л аргінін гідро хлорид + 2 мг/л гліцин. Об'єм калюсу складав $0,5 \text{ мм}^3$, висота рослин-регенерантів була $2,9 \pm 1,3$ см, бал розвитку корінців – 2 см. Різниця даних варіантів полягає у більш багатшому складі фітогормонів другого варіанту, що робить дане поживне середовище більш дорожчим у приготуванні. Слід виділити ще один варіант поживного середовища MS + 0,1 мг/л БАП+0,5 мг/л НОцК + 2,0 мг/л ГКЗ, де висота рослин складала $2,6 \pm 1,1$ см, бал розвитку коренів - 2, об'єм калюсу – $0,5 \pm 0,1 \text{ мм}^3$. Також перспективним є варіант із комбінацією фітогормонів MS + 0,5 мг/л БАП + 0,05 мг/л НОцК + 0,5 мг/л ГКЗ. Висота рослин-регенерантів складала $2,3 \pm 1,1$ см, бал розвитку коренів – 2, об'єм калюсу – $0,7 \pm 0,2 \text{ мм}^3$. Проте слід зауважити, що ріст рослин-регенерантів був уповільненим.

В результаті досліджень встановили, що найкраще проявив себе варіант із додаванням ауксинів 0,01 мг/л ІОцК. За даного варіанту поживного середовища, калюсогенез був відсутнім, а отже живці повноцінно укорінювались та розвивались. Висота пробіркових рослин становила $7,1 \pm 1,2$ см, бал розвитку коренів – 5. Ріст рослин-регенерантів став швидшим (пересадку робили через кожні 4 тижні). Частота розмноження клонів склала 1:5 за один пасаж. Це дало можливість за 5 місяців культивування отримати велику необхідну кількість клонів колекційних зразків батату для подальшої їх адаптації та оцінки в ґрунтових умовах Східного Лісостепу України [49].

Розмножений пробірковий матеріал адаптували до умов *in vivo* згідно з розробленим патентом на корисну модель [50]. До адаптації обирали рослини-регенеранти, які сформували від 3 до 7 листків і 5 та більше нормально розвинених первинних корінців. Відмиті від залишків агару рослини занурювали у 0,2%-й розчин системного фунгіциду згідно з «Переліком пестицидів і агрохімікатів дозволених для використання в Україні» й висаджували кожен в окремий горщечок розміром 10×15 см із субстратом, виготовленим з дернової землі, піску й кокоґрунту у співвідношенні 1:1:1.

Рослини в горщечках адаптували 3 тижні в умовах вологості повітря на рівні 85%, температури повітря на рівні 20...22°C і освітленості – від 5 до 10 клк. Рослини регулярно поливали дистильованою водою, щотижня підживлювали розчином, який містив $\frac{1}{4}$ концентрації мінеральних солей MS. Упродовж наступних 4–8 тижнів висаджені у горщики пробіркові рослини батату вирощували в умовах захищеного ґрунту.

Для отримання вихідного насіннєвого матеріалу (ВН) садивний матеріал генотипів-інтродуцентів у третій декаді травня висаджували у відкритий ґрунт в замульчовані чорною плівкою гребені. Висота гребенів становила 30 см, ширина – 40 см. За садивний матеріал використовували сегменти пагонів (сліпи) батату з адаптованих пробіркових рослин завдовжки 15–20 см і з кількістю міжвузль 5–6 шт. Оскільки науковими дослідженнями, проведеними в ІОБ НААН [51, 52] доведено, що використання як садивного матеріалу сегментів пагона, а не горщечкової розсади, забезпечує отримання вищого відсотка товарних кореневих бульб батату. Сліпи висаджували на глибину 10 см у замульчовані гребені, залишаючи над поверхнею не менше двох міжвузль. Схема садіння сліпів наступна – $(20 + 80) \times 40$ см, густина – 50 тис./га. Полив висаджених рослин упродовж усього періоду вегетації здійснювали за допомогою крапельного зрошення.

Упродовж вегетаційного періоду згідно з дескриптором [44] проводили фенологічні спостереження за розвитком рослин батату. Встановлювали відсоток покриття ґрунту пагонами через 35–40 діб після висаджування у ґрунтові умови, настання фаз бутонізації та цвітіння. Початок кожної з фенофаз фіксували за десятьма відсотками рослин, що вступили в цю фазу, повне настання фази – за 75%.

Для проведення обліку вимірювали не менше 20 рослин. Пагони й листки описували як середнє значення зразка. Фенологічні спостереження за розвитком рослин батату наведено в табл. 7.7. За довжиною стебла отримано широкий спектр форм. Розмах мінливості за ознакою «довжина стебла» складав 110 – 214 см, коефіцієнт варіації був на рівні 21 %, що свідчить про значне

варіювання. Так, рослини зразка *Or-2* утворювали найдовші стебла, схожі на ліани, довжиною 214 см.

Таблиця 7.7 - Біометричні показники генотипів-інтродуцентів батату

№ за біотехнологічним каталогом	Довжина, см		Кількість, шт.		Середня маса кореневих бульб, г	Урожайність, т/га	Товарність %
	стебла	міжвузль	додаткових пагонів	листі			
<i>V-6</i>	151	4	6	54	342	67	71
<i>Слобожанський рубін</i>	144	4	8	52	351	73,9	80,6
<i>Av-7</i>	153	5	5	55	255	66	88,4
<i>B-1</i>	133	5	6	48	189	49	80,4
<i>Or-2</i>	214	10	6	77	390	91	87,8
<i>Адмірал</i>	198	8	6	71	410	103,4	88,0
<i>M-5</i>	161	7	5	58	315	52	89,6
<i>Be-8</i>	115	6	5	42	238	42	35,6
<i>Pu-13</i>	120	6	6	44	230	39	33,6
<i>Bl-14</i>	110	6	4	40	233	21	24,1
<i>J-12</i>	124	5	6	45	160	13	18,9
<i>H-4</i>	136	4	6	49	185	10	13,9
<i>Ok-3</i>	137	6	8	50	115	5	16,4
НІР _{0,05}	12	2	2	13	11	3	8
<i>min</i>	110	4	4	40	10	3	7
<i>max</i>	214	8	8	77	435	104,1	90,3
<i>V%</i>	21	17	17	20	18	16	14

Зразок *Av-7* та сорт Слобожанський рубін характеризувались довжиною пагонів від 144 см до 153 см, відповідно. Зразки *Bl-14* та *Ok-3* не формували довгих стебел, вони мали довжину на рівні від 110 см до 137 см, відповідно.

За ознакою «кількість додаткових пагонів» розмах мінливості складав 4 – 8 см, а коефіцієнт варіації – 17 %. Найбільшу кількість додаткових пагонів мали зразки із різних груп стиглості: *Ok-3* - 8 шт., *V-6* – 8 шт., Адмірал – 6 шт. Найменшу кількість пагонів мали зразки *Bl-14* (4 шт) та *M-5* (5 шт).

За довжиною міжвузль спостерігалось значне варіювання ($V=30\%$). Розмах мінливості становив 4,39 – 9,97 см. Зразки *Or-2*, *M-5* та сорт Адмірал відрізнялись найдовшою довжиною міжвузль – 10 см, 7 см та 8 см відповідно.

За ознакою «кількість листків» розмах мінливості складав 40 – 77 шт., а коефіцієнт варіації – 20 %. Найбільшу кількість листків мали генотипи *Or-2* та *Адмірал* (77 та 71 шт., відповідно). Найменшу – *Bl-14* (40 шт.), *Ve-8* (42 шт.), *Pu-13* (44 шт.).

Збирання врожаю батату в ІОБ НААН впродовж років досліджень зазвичай проводили у середині вересня. Оптимальні строки обирали виходячи із погодних умов – до настання перших приморозків. Для характеристики структури врожаю викопували середню пробу кущів з кожної ділянки, яка становила 8–12 кущів для ділянок до 25 м². Структуру врожаю визначали через поділ кореневих бульб на фракції. Кількість бульб кожної фракції підраховували та визначали у відсотках. Для подальшого використання в селекційних дослідженнях під час отримання вихідного насінневого матеріалу добирали бульби з кращих за продуктивністю й товарністю рослин, які вирізнялись продуктивністю на рівні 40–80 т/га й товарністю на рівні 70–80%.

Найкращі клони одразу зважували, помічали та складали в окремий ящик. Так, середня маса кореневих бульб у сорту *Слобожанський рубін* складала в середньому 351 г, у зразків *V-6* – 342 г, *Av-7* – 255 г, *B-1* – 189 г. Найвищим показником середньої маси кореневих бульб відрізнялись сорт *Адмірал* – 410 г, зразки *Or-2* – 390 г та *M-5* – 315 г. У зразків *Ve-8* – 238 г, *Pu-13* – 230 г, *Bl-14* – 233 г, *J-12* – 160 г, *H-4* – 185 г, *Ok-3* – 115 г середня маса кореневих бульб виявилась найменшою. Даний факт пояснюється недостатнім періодом вегетації для даних зразків у зоні Східного Лісостепу України.

Найбільшу врожайність кореневих бульб батату отримано у сорту десертного призначення *Адмірал* (103,4 т/га), при цьому товарність була високою – 88 %. Сорт столового призначення *Слобожанський рубін* також мав одних з найвищих показників урожайності (73,9 т/га), а товарність кореневих бульб була на рівні 81 %.

Порівняльне вивчення зразків батату дозволило виявити специфічні особливості біохімічного складу кореневих бульб (табл. 7.8). Так, генотипи столового призначення мали високий відсоток сухої речовини у кореневих

бульбах. Найбільший її вміст визначено у зразка *B-1* (27,3 %) та *Av-7* (26,6 %). Серед десертних типів варто відокремити генотип *Be-8*, відсоток сухої речовини складав 25,3 %, загальний цукор 12,26 %, аскорбінова кислота - 12 мг %. Також високий вміст аскорбінової кислоти мали сорт Адмірал (12,03 мг %), зразки *Av-7* (15,71 мг %), *Pu-13* (17,7 мг %) [53, 54].

Таблиця 7.8 - Біохімічний склад кореневих бульб колекційних зразків батату

№ за біотехнологічним каталогом	Розчинна суха речовина, %	Загальний цукор, %	β-каротин, мг %	Крохмаль	Аскорбінова кислота, мг %
<i>V-6</i>	17,7	7,74	-	14,0	7,01
<i>Слобожанський рубін</i>	17,6	7,71	-	14,2	7,00
<i>B-1</i>	27,3	10,27	-	20,08	10,81
<i>M-5</i>	15,88	10,34	-	12,18	6,76
<i>Or-2</i>	17,3	8,86	6,33	14,00	11,84
<i>Адмірал</i>	17,8	9,12	6,43	14,12	12,03
<i>H-4</i>	12,62	11,4	-	-	11,5
<i>Av-7</i>	26,6	11,47	-	16,2	15,71
<i>Be-8</i>	25,3	12,26	3,52	16,78	12,0
<i>Z-11</i>	17,3	7,46	6,7	17,03	9,24
<i>Pu-13</i>	-	7,02	-	9,6	17,7
<i>Bl-14</i>	-	7,61	-	10,1	9,6
<i>J-12</i>	-	6,24	-	11,74	20,1

У ході досліджень з первинного інтродукційного випробування, проведено опис 13 зразків батату (табл. 7.9).

Таблиця 7.9 – Морфологічний опис колекційних зразків батату

№ за біотехнол. каталогом	Країна-походження	Характеристика кореневих бульб			Форма листків
		форма	забарвлення шкірки	забарвлення м'якуша	
<i>V-6</i>	USA	овальна	рожеве	кремове	серцеподібна
<i>Слобожанський рубін</i>	UKR	овальна	рожеве	кремове	серцеподібна
<i>Av-7</i>	USA	видовжено-еліптична	світло-рожеве	кремове	списоподібна
<i>B-1</i>	USA	видовжено-еліптична	кремове	кремове	ниркоподібна
<i>Or-2</i>	USA	еліптична	оранжеве	оранжеве	ниркоподібна
<i>Адмірал</i>	UKR	еліптична	оранжеве	оранжеве	ниркоподібна
<i>M-5</i>	USA	овальна	оранжеве	оранжеве	серцеподібна
<i>Be-8</i>	USA	округла	оранжеве	оранжеве	списоподібна
<i>Pu-13</i>	USA	еліптична	фіолетове	фіолетове	списоподібна
<i>Bl-14</i>	JRN	еліптична	оранжеве	оранжеве	серцеподібна
<i>J-12</i>	JPN	еліптична	кремове	біле	списоподібна
<i>H-4</i>	USA	еліптична	оранжеве	оранжеве	серцеподібна
<i>Ok-3</i>	CHN	еліптична	кремове	біле із фіолетовим	списоподібна

Досліджувані генотипи-інтродуценти розподілили на три групи стиглості за тривалістю вегетаційного періоду та формуванням показника урожайності кореневих бульб. Зразки, які характеризуються ранньостиглістю (90-95 діб): *V-6*, сорт Слобожанський рубін, *Av-7*, *B-1*. Середньостиглі зразки (100-110 діб): *Or-2*, сорт Адмірал, *M-5*. Найчисельніша група пізньостиглі зразки (115-125 діб): *Be-8*, *Pu-13*, *Bl-14*, *J-12*, *H-4*, *Ok-3* (Рис. 7.6).

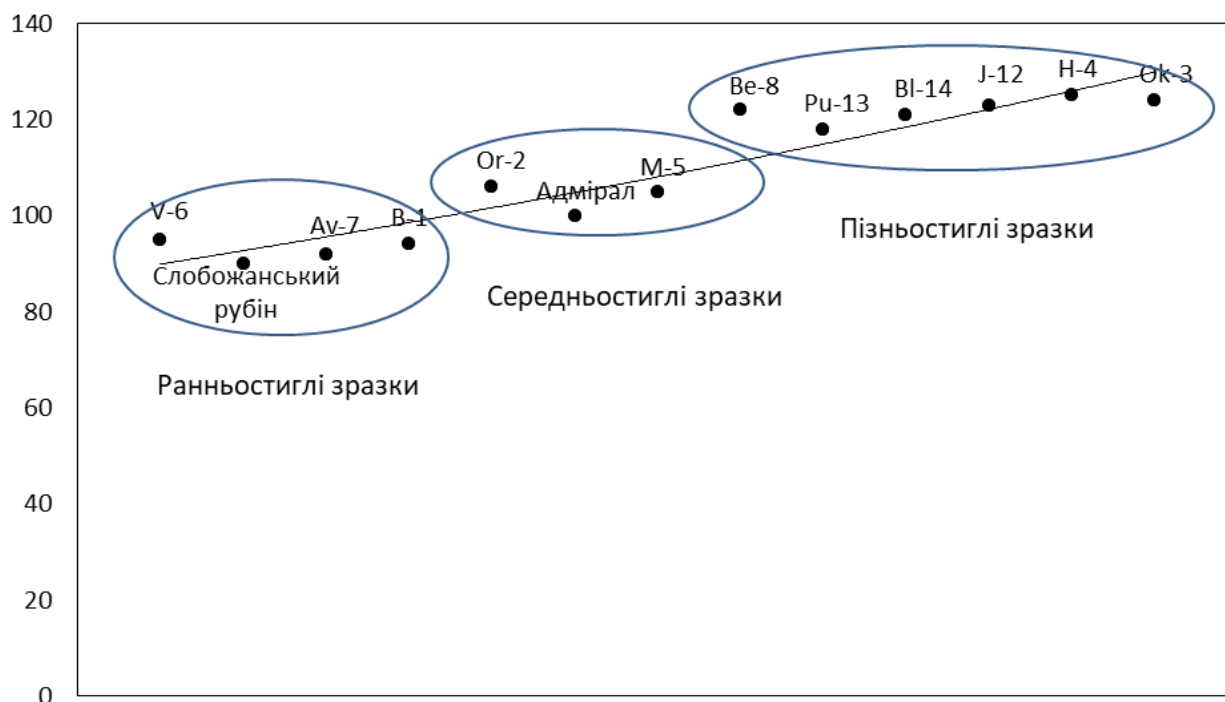


Рис. 7.6. Розподілення генотипів-інтродуцентів батату на групи стиглості за довжиною вегетаційного періоду

Проведеними дослідженнями доведено можливість прискорення процесу розмноження індивідуально дібраних високопродуктивних генотипів-інтродуцентів батату в лабораторних та польових умовах. За рахунок проведення клонової селекції відбувається збереження та прискорене розмноження перспективного вихідного матеріалу. На рис. 7.7 зображено послідовність процесів інтродукції батату із застосуванням технології *in vitro*.

За результатами наукової роботи в ІОБ НААН шляхом клонової селекції створено два нові високоврожайні сорти батату, на які отримано Свідоцтва про державну реєстрацію.

Сорт Адмірал (№ Свідоцтва 210617) характеризується урожайністю бульб на рівні 103,4 т/га, товарність яких не менше 88,0 %. Кореневі бульби десертного призначення, які відрізняються вмістом: каротину – 9,54 мг/100 г сирої речовини, сухої речовини – 18,26 %, загального цукру – 3,98%.



Рис. 7.7. Схема інтродукції нової овочевої культури батату (*Ipomoea batatas* L.) із застосуванням технології *in vitro*

За формою кореневі бульби еліптичної форми, оранжевого забарвлення із гладкою шкіркою. М'якуш суцільного яскравого оранжевого забарвлення. Пагони надзвичайно довгі, дуже плетисті, світло-зеленого кольору. Листки ниркоподібної форми, світло-зеленого кольору без антоціанового забарвлення. Кореневі бульби придатні для довготривалого зберігання понад 280 діб.

Сорт батату Слобожанський рубін (№ Свідоцтва 210616) з урожайністю корневих бульб 73,9 т/га, з притаманною високою товарністю 80,6 %. Бульби столового призначення, які відрізняються вмістом: сухої речовини – 24,26 %, загального цукру – 3,76%, крохмалю – 12,24 %. Кореневі бульби овальної форми, із гладкою шкіркою рожевого кольору. М'якуш кремового суцільного забарвлення. Пагони довгі, плетисті, листки темно-зеленого кольору без антоціанового забарвлення, ниркоподібної форми. Кореневі бульби також придатні для довготривалого зберігання понад 280 діб.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ozturk G.* (2021). Field performances of different seedling types used in sweet potato [*Pomoea batatas* (L.) Lam]. *Turkish Journal Of Field Crops Growing*. **26**(1):54-59. doi: 10.17557/tjfc.943571.
2. *Gemenet D.C., Pereira G.D.* (2020). Quantitative trait loci and differential gene expression analyses reveal the genetic basis for negatively associated beta-carotene and starch content in hexaploid sweetpotato [*Pomoea batatas* (L.) Lam.]. *Theoretical And Applied Genetics*. **133**(1):23-36. doi: 10.1007/s00122-019-03437-7.
3. *Вавилов Н.И.* Проблемы происхождения, географии, генетики, селекции растений, растениеводства и агрономии. Т. 5. М.— Л., «Наука», 1965, 786 с, рис., табл., 7 вкл. Л, портр., рис., табл., карт.
4. *Базилевская Н.А., Мауринь А.М.* Интродукция растений: История и методы отбора исход. материала. – Рига. – 1982, 103 с.
5. *Де Кандоль А.* География растений / Перевод с французского Андрея Николаевича Бекетова // Вестник Императорского Русского географического общества, 1856. Ч. 16: Ст. первая и вторая. С. 45-92, 161—208 ; ч. 17: Ст. третья. Ст. четвёртая и последняя. С. 121—166, 184—221.
6. *Базилевская Н.А.* Теории и методы интродукции растений. – М.: Изд-во Московск. гос. ун-та, 1964. – 129 с.
7. *Вавилов Н.И.* Центры происхождения культурных растений // Избр. произведения в 2-х т. – Л.: Наука, 1967. – 1. – С. 88 – 202.
8. *Vodouhè R., Dansi A.* (2011). Plant domestication and its contributions to in situ conservation of genetic resources in Benin. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. **3**(2):40-56.
9. *Adéoti K., Ahoton L.* (2009). Selection of sites for the in situ conservation of four traditional leafy vegetables (*Ceratotheca sesamoides*, *Sesamum radiatum*, *Acemella uliginosa* and *Justicia tenella*) consumed in Benin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **3**(6):1357-1374.
10. *Дубинин Н.П.* Основы генетики популяций // Актуальные вопросы современной генетики. – М.: Изд-во Московск. гос. ун-та, 1966. – С. 221 – 265.
11. *Малеев В.П.* Теоретические основы акклиматизации. – Л.: Сельхозиздат, 1933. – 112 с.
12. *Культиасов М.В.* Эколого-исторический метод в интродукции растений // Бюл. Гл. ботан. сада. – 1953. – Вып. 15. – С. 24 – 39.
13. *Bai Y., Lindhout P.*(2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Ann. Bot.*, 100: 1085-1094.
14. *Camposa D., Betalleluz I.* (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*. **135**(3): 1592-1599. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.088.
15. *Cruz P.N., Fetzer D.L.* (2019). Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO₂ + ethanol solvent. *Journal Of Supercritical Fluids*. **146**:55-64. doi: 10.1016/j.supflu.2019.01.007.
16. *Ribeiro P.V.D., Machado A.M.* (2021). Effect of the consumption of yacon flour and energy-restricted diet on glycation markers, and association between these markers and factors linked to obesity in adults with excess body weight: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrition*. **91**(92):111395. doi 10.1016/j.nut.2021.111395.
17. *Шабетя О. В.* Методологія формування банку генетичних ресурсів овочевих і баштанних видів рослин та його практичне використання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с.-г. наук: спец. 06.01.05 «селекція і насінництво» / О.В. Шабетя. –Харків, 2013. – 41 с.
18. *Cao Y., Ma Z.F., Zhang H.* (2018). Phytochemical Properties and Nutrigenomic Implications of Yacon as a Potential Source of Prebiotic: Current Evidence and Future Directions. *Foods*. **7**(4):59. doi: 10.3390/foods7040059.

19. Mercado M.I., Coll M.V. (2014). Variability in sesquiterpene lactones from the leaves of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) accessions of different geographic origin. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **61**(6):1209–1217. doi: 10.1007/s10722-014-0103-8.
20. Caetano B.F., Moura N.A. (2017). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients*. **8**(7):436. doi: 10.3390/nu8070436.
21. Paula H.A., Abranches M.V. (2015). Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*): A Food with Multiple Functions. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*. **55**(1):32-40. doi: 10.1080/10408398.2011.645259.
22. Pedrosa J.L., Oliveira F.L. (2020). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), propagation from rhizophores with different numbers of buds. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias*. **52**(2): 52-63.
23. Зубко М. К. (1988). Методи культивування рослинних об'єктів *in vitro* / М. К. Зубко, І. В. Кириченко, В. Б. Куксова [и др.]. - 37 с.
24. Івченко Т.В. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro*: методичні рекомендації; підгот.: Т.В. Івченко, С.І. Корнієнко, С.І. Кондратенко та ін. / НААН. Інститут овочівництва і баштанництва. – Х.: Плеяда, 2013. – 47 с.
25. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
26. Oliveira R.B., Chagas D.A. (2014). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **23**(3): 497-505. doi: 10.1590/S0102-695X2013005000032.
27. Reis F.R., Marques C. (2021). Effect of processing methods on yacon roots health-promoting compounds and related properties. *Trends In Food Science & Technology*. **113**:346-354. doi: 10.1016/j.tifs.2021.05.010.
28. Lisboa D., Gomes J.P. (2018). Effective diffusivity in yacon potato cylinders during drying. *Revista Brasileira De Engenharia Agricola E Ambiental*. **22**(8): 564-569. doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v22n8p564-569.
29. Kampa L., Hartung J. (2019). Plant growth, tuber yield formation and costs of three different propagation methods of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Industrial Crops and Products*. **132**:1-11. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.02.006.
30. Hammond S.D.H., Viehmannova I., et al. (2021). Droplet-vitrification methods for apical bud cryopreservation of yacon. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. **147**(2):197–208. doi: 10.1007/s11240-021-02116-0.
31. Marques C., Toazza C.E. (2021). Long-term storage of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice: Phytochemical profile, *in vitro* prebiotic potential and discriminant bioactive properties. *Food Bioscience*. **41**:100970. doi: 10.1016/j.fbio.2021.100970.
32. Івченко Т. В. Визначення умов інтродукції рослин якону в умовах Східного Лісостепу України /Т. В. Івченко, Т. І. Віценья // Овочівництво і баштанництво. – Х., 2011. – Вип. 57. – С. 12–18.
33. Munoz-Rodriguez P., Carruthers T. (2019). A taxonomic monograph of *Ipomoea* integrated across phylogenetic scales. *Nature Plants*. **5**(11):1136. doi: 10.1038/s41477-019-0535-4.
34. Wood J.R., Munoz-Rodriguez P. (2020). A foundation monograph of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the New World. *Phytokeys*. **143**:1-823. doi: 10.3897/phytokeys.143.32821.
35. Alam M.K. (2021). A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): Revisiting the associated health benefits. *Trends In Food Science & Technology*. **115**:512-52. doi: 10.1016/j.tifs.2021.07.001.
36. Song H.G., Choi I. (2021). Comparative study on physicochemical properties of starch films prepared from five sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars. *International Journal Of Biological Macromolecules*. **189**:758-767. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.106.
37. Mohammad K., Sams A.S. (2020). Minerals, vitamin C, and effect of thermal processing on carotenoids composition in nine varieties orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. **92**:103582. doi: 10.1016/j.jfca.2020.103582.

38. Lin H.H., Jiang J.Y. (2021). Comparisons between yellow and green leaves of sweet potato cultivars in chlorophyll fluorescence during various temperature regimes under high light intensities. *Scientia Horticulturae*. **288**:110335. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110335.
39. Cioloca M., Tican A. (2021). In vitro medium term conservation of sweet potato genotypes using mannitol and sorbitol. *Romanian Agricultural Research*. **38**:123-132.
40. Doliński R. (2013). Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) from node explants. *Acta Sci. Pol.* **12** (4):117–127.
41. Dewir Y.H., Aldubai A.A. (2021). Optimization of media formulation for axillary shoot multiplication of the red-peeled sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.). *Chilean Journal Of Agricultural Research*. **80**(1):3-10. doi: 10.4067/S0718-58392020000100003.
42. Aboulila A. (2017). Molecular genetic diversity and efficient plant regeneration system via somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*. **45**(2):347-365. doi: 10.21608/ejgc.2016.9586.
43. Nermein A., Rashed M. (2017). Regeneration and transformation system in egyptian sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) cultivars. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*. **46**(2):329-347. doi: 10.21608/ejgc.2018.9207.
44. Івченко Т.В., Мозговська Г.В. та ін. Методичні підходи щодо селекції та сучасних технологій розмноження і вирощування батату (*Ipomoea batatas* L.). Селекційне: ІОБ НААН, 2018. - 36 с.
45. Kassahun A., Habtamu Z. (2018). In Vitro propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) through apical meristem culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **7**(1): 2386-2392.
46. Masekesa R.T., Gasura E. (2016). Effect of BAP, NAA and GA3, either alone or in combination, on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*. **16**(1):10653-10669. doi: 10.18697/ajfand.73.15875.
47. Berihu M., Chimdessa M. (2018). In vitro propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) through lateral bud culture. *IJPSR*. **6**(7):1-12. doi: 10.21276/IJPSR.2018.06.07.721.
48. Мозговська Г.В., Івченко Т.В. (2018). Підбір компонентів живильних середовищ для мікроклонального розмноження пробіркових рослин батату. Теоретичні і практичні аспекти розвитку галузі овочівництва в сучасних умовах. **1**:49.
49. Мозговська Г.В., Івченко Т.В. (2019). Мікроклональне розмноження пробіркових рослин батату (*Ipomoea batatas* L.). Підвищення ефективності селекції та рослинництва у сучасних умовах. **1**:225-227.
50. Пат. 129760 Україна, МПК (2006) A01H 4/00. Спосіб прискореного розмноження генотипів-інтродуцентів батату в культурі *in vitro*. Івченко Т. В., Мозговська Г.В. та ін. Заявник та патентовласник Інститут овочівництва і баштанництва НААН. № u201805186; заявл. 11.05.2018; опубл. 12.11.2018, Бюл. № 21.
51. Шевченко С.В., Куц О.В. (2020). Динаміка змін біометричних параметрів рослин батату (*Ipomoea batatas*) за різних систем удобрення. Теоретичні і практичні аспекти розвитку галузі овочівництва в сучасних умовах. **2**:113-115.
52. Шевченко С.В., Куц О.В. (2021). Технологія вирощування батату. Агробізнес сьогодні. **7**:60-62.
53. Івченко Т.В., Мозговська Г.В. та ін. (2020). Характеристика генотипів-інтродуцентів батату (*Ipomoea batatas* L.) за умов вирощування в зоні Лісостепу України. Овочівництво і баштанництво. **58**:6-12.
54. Івченко Т.В., Мозговська Г.В. та ін. (2020). Інтродукція нової нішевої культури батату (*Ipomoea batatas* L.) в умовах Східного Лісостепу України. Генетичні ресурси рослин. **25**:61-70.

ГЛАВА 8. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ В СЕЛЕКЦІЇ І НАСІННИЦТВІ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН

8.1. Застосування молекулярних ДНК-маркерів в селекції і насінництві

На сьогодні використання молекулярних маркерів є одним із найбільш ефективних методів ДНК-профілювання генотипів рослин, оцінки їх генетичної різноманітності та спорідненості між ними. Завдяки своїй простоті та високій ефективності цей метод досить широко застосовується в різних лабораторіях світу і є об'єктом стандартизації міжнародних інституцій – ISTA (International seed testing association, Міжнародна асоціація з контролю за якістю насіння), UPOV [1].

ДНК-маркери широко застосовуються як у фундаментальних, так і в прикладних дослідженнях для вирішення актуальних завдань генетики, селекції, збереження біорізноманіття, вивчення механізмів еволюції, картування хромосом, а також у насінництві, племінній справі тощо. Молекулярні ДНК-маркери, які пов'язані з генами, що відповідають за господарсько-цінні ознаки сортів сільськогосподарських рослин, дозволяють здійснювати добір на рівні індивідуальної рослини або селекційних ліній, в результаті чого зростає роль ДНК-технологій в прискоренні процесу селекції [2-5].

Наразі практично жодне актуальне генетичне дослідження не відбувається без використання молекулярних маркерів. За їх допомогою створено генетичні карти геномів десятків видів рослин, на які нанесено найважливіші гени, що зумовлюють ріст і розвиток організмів, морфологічні ознаки, стійкість до хвороб й інше. Їх використано у популяційній та порівняльній генетиках і геноміці, у філогенетичних дослідженнях [6, 7].

Молекулярні маркери, що найчастіше використовуються можна розділити на такі типи: маркери ділянок структурних генів, що кодують

амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти білків); маркери некодуючих ділянок структурних генів; маркери різних послідовностей ДНК, відношення яких до структурних генів, як правило, не відомо – розподілення коротких повторів за геном (RAPD); ISSR – інвертовані повтори; AFLP – поліморфізм в сайтах рестрикції і мікро сателітні локуси (тандемні повтори з довжиною елементарної одиниці в 2-6 нуклеотидів [8].

Відповідно до основного методу аналізу ДНК-маркери поділяють на три групи – маркери досліджувані за допомогою блот- гібридизації (1), ПЛР (2) і ДНК-чипів (3). Маркери за типом успадкування можуть бути домінантними (виявляти алель тільки в домінантному стані) і кодомінантними (визначати алель як у домінантному, так і рецесивному станах). На думку деяких вчених, бажаними для молекулярно-генетичних маркерів (МГМ) є наступні ознаки: високий рівень поліморфізму, кодомінантний характер успадкування, незалежність прояву від умов навколишнього середовища, оптимальний рівень частоти виявлення їх у геномі для вирішення конкретних завдань, рівномірний розподіл у геномі в хромосомах, селективно-нейтральна поведінка, простота оцінки параметрів маркера; можливість застосування автоматизації та висока відтворюваність оцінки їх параметрів [9].

Розрізняють ще маркери з відомою локалізацією (у певній хромосомі чи ділянці хромосоми, або поблизу конкретного гена) і маркери, про локалізацію яких нічого не відомо. Як правило, як одні, так і інші, знаходять своє застосування в генетичних дослідженнях і в селекції. Молекулярні маркери з невідомої локалізацією не використовують для маркування певного гена або хромосоми, проте їх успішно застосовують у філогенетичних дослідженнях та паспортизації сортів рослин і порід тварин [10].

На сучасному етапі широко впроваджуються новітні методи оцінки та добору вихідного матеріалу, які ґрунтуються на аналізі молекулярно-генетичного поліморфізму. Такій підхід дає можливість проводити моніторинг генетичної структури селекційних зразків незалежно від умов вирощування. У новому напрямі селекції – маркер-асоційованої селекції (MAS) – використання

молекулярних маркерів, тобто послідовностей ДНК з відомою локалізацією, є перспективним для встановлення спорідненості селекційних зразків, прогнозування ступеня гетерозису, маркування господарських ознак [11, 12].

Згідно вимогам Світової Організації Торгівлі (СОТ), генетична однорідність сортів є однією з основних передумов для їх реєстрації за кордоном. Саме генетична неоднорідність, яка суперечить міжнародним вимогам, – один з головних факторів, що стримує або ж блокує реєстрацію українських сортів і гібридів за кордоном. Більшість вітчизняних сортів овочевих культур відносяться до гетерогенних, представлених декількома генотипами, які непридатні для правового захисту за кордоном відповідно до положень ВОС–тесту UPOV. Сорти овочевих культур, що характеризується унікальним сполученням алелів генів, відповідальних за вираженість агрономічно важливих ознак, є об'єктом особливої форми інтелектуальної власності. Авторські права на сорти охороняються відповідними міжнародними угодами і законодавчими актами держави. У зв'язку з цим, диференціація, ідентифікація та реєстрація сортів за допомогою молекулярних маркерів набуває надзвичайної актуальності [13].

Для паспортизації генотипів рослин прийнято використовувати системи молекулярних маркерів із високим дискримінаційним потенціалом, які уможливають не тільки з'ясування ступеня однорідності зразка та диференціювання їх між собою, а й встановлення ступеня відмінності одного селекційного зразка від іншого та ідентифікування генотипів [14].

Головними критеріями добору молекулярних методів для диференціації сортів є: відтворюваність даних ДНК-типування між лабораторіями, повторюваність у часі, дискримінаційна здатність, можливості для створення бази даних, розробка відповідної методології. За цими критеріями серед інших показано доречність використання мікросателітного аналізу (МС-аналізу), який впродовж більш ніж 15 років широко застосовується в селекції рослин, геномних дослідженнях і є основою картування генів, локусів якісних ознак, визначення філогенетичних зв'язків [2].

Для ідентифікації генотипів серед варіантів ПЛР-аналізу одним із найбільш перспективних вважають SSR-аналіз, за допомогою якого можна відслідковувати стан поліморфних ділянок ДНК, що виник через мутації хромосомного типу – делеції, дуплікації, інсерції, транслокації та визначати алельний стан варіабельних локусів. Через використання 15-20 локусів можна провести диференціацію й ідентифікувати генотипи. Представлена система уможливорює контролювати критерій однорідності селекційного матеріалу навіть у випадку, коли сорт складається з декількох генотипів, які відрізняються один від одного алельним складом.

ДНК-паспортизація полягає у процесі складання ДНК-паспортів (ДНК-профілів), тобто збиранні інформації про специфічність послідовності нуклеотидів ДНК, яка властива лише певному генотипу та зафіксована у вигляді певної формули – послідовності літер і цифр. За результатами SSR-аналізу сорту створюється його особистий генетичний (молекулярно-генетичний) паспорт. Останній являє собою документ, який засвідчує характерні особливості ДНК профілю даного сорту, лінії, гібрида. Профіль ДНК – специфічний розподіл фрагментів ДНК – продуктів ампліфікації в електрофорезному гелі, який відображає особливості структури ДНК сорту, лінії, гібрида, і за допомогою якого можна його ідентифікувати [13, 15]. ДНК-паспорти уможливають також вирішення важливих питань насінневого контролю сортів і гібридів. Їх можна використовувати для перевірки типовості в процесі добору кращих рослин у первинному насінництві, виявлення природи нетипових рослин, контролю за спонтанним засміченням, перезапиленням і генетичною цілісністю та ін.

Принципи і методологію застосування ПЛР-аналізу для ідентифікації та реєстрації сортів сільськогосподарських культур у вигляді генетичних формул розроблено у Південному біотехнологічному центрі під керівництвом Ю. М. Сиволапа [16]. Вагомі дослідження проведено з ідентифікації сортів і гібридів зернових культур – пшениці [16-20], ячменю [20], кукурудзи [21, 22, 23], соняшнику [16], жита [24]).

На овочевих культурах досліджень з розробки ДНК-паспортів в нашій країні не було, а тому розробки за даним напрямом є надзвичайно актуальними. Впровадження їх у селекцію та насінництво уможливить створить ефективний юридичний захист селекційними установами прав на сорти і гібриди, спростить та удосконалив контроль за якістю насіння (особливо національних сортів-еталонів), створить умови для залучення значних коштів на розвиток вітчизняних селекційних і насінницьких установ усіх форм власності, дозволить нашим державним селекційним установам здійснювати експортні програми з реалізації комерційних сортів овочевих культур вітчизняної селекції. Але для реалізації вище викладених можливостей необхідно розробити уніфікований та стандартизований метод, який дозволить розробляти генетичні паспорти і за їх допомогою здійснювати захист інтелектуальних прав уже створених селекційних інновацій.

8.2 Використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації генотипів овочевих рослин

Диференціація та ідентифікація сортів, ліній, гібридів сільськогосподарських рослин є важливим елементом селекції та насінництва й актуальним у захисті авторських прав. За визначенням Закону України “Про охорону прав на сорти рослин” [25] “сорт рослин” це окрема група рослин (клон, лінія, гібрид першого покоління, популяція) в рамках нижчого з відомих ботанічних таксонів, яка, незалежно від того, задовольняє повністю чи ні умови надання правової охорони, може:

- бути визначена ступенем прояву ознак, що є результатом діяльності даного генотипу або комбінації генотипів;
- бути відрізнена від будь-якої іншої групи рослин ступенем прояву, принаймні, однієї з цих ознак;
- розглядатись як єдине ціле з точки зору її придатності для відтворення в незмінному вигляді цілих рослин сорту.

Тобто, сорт є генотип або комбінація генотипів, які за своїми ознаками відрізняються від інших груп рослин. Генотип – складна система спадкових ознак даного організму, включаючи аллелі та характер зчеплення їх у хромосомах.

Існуюча система ідентифікації сортів, прийнята UPOV, визначає сорти сільськогосподарських рослин за трьома категоріями (ВОС-тест): відмінність, однорідність і стабільність. ВОС-тест базується на фенотипових ознаках, для опису яких потрібно вирощувати рослини до повної стиглості, але на ці ознаки можуть впливати екологічні й агротехнологічні фактори. Тому вказана процедура досить тривала, трудоемка та необ'єктивна.

Сорти овочевих культур, що характеризується унікальним сполученням алелів генів, відповідальних за вираженість агрономічно важливих ознак, є об'єктом особливої форми інтелектуальної власності. Авторські права на сорти охороняються відповідними міжнародними угодами і законодавчими актами держави. У зв'язку з цим, диференціація, ідентифікація та реєстрація сортів за допомогою молекулярних маркерів набуває надзвичайної актуальності [13].

8.2.1 Використання мікросателітних ДНК-маркерів для генетичної ідентифікації та паспортизації сортів цибулі ріпчастої.

Цибуля ріпчаста (*Allium cepa* L.) – одна з найбільш цінних рослин, що входять до переліку основних поширених в Україні овочів. Щорічно площа під нею в країні займає від 45 до 80 тис. га. Культура цибулі ріпчастої як основного виду цибулевих в Україні має значні історичні та наукові традиції. До Реєстру сортів рослин придатних для вирощування в Україні, занесено 45 довгоденних сортів, з яких 53 % вітчизняної селекції [26]. Сорт як об'єкт інтелектуальної власності потребує захисту авторських прав селекціонерів за використання сучасних підходів, зокрема на основі молекулярних маркерів. В диплоїдному наборі цибулі ріпчастої ($2n = 2X = 16$) міститься 32830 Мbp [5], що перевищує, наприклад, розмір геному рису в 34 рази. Геному цибулевих на 92-95 % представлено некодуючою ДНК, у т.ч. фракцією мікросателітних повторів. Молекулярні маркери, розроблені на їхній основі, є

високоєфективним інструментом оцінки генетичного різноманіття сільськогосподарських культур, який широко використовується для сортової ідентифікації, зокрема і цибулі ріпчастої [27, 28].

Матеріалом наших досліджень слугували 8 сортів цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.) селекції Інституту овочівництва і баштанництва НААН (табл. 8.1). ДНК виділяли із сухого насіння.

Таблиця 8. 1 – Сорти цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.), використані в дослідженнях з ДНК-ідентифікації (середнє за 2015-2016 рр.)

Сорту	Селекціонери	Передано до Держсорт-випробування, рік	Занесено у Реєстр, Рік
Золотистий	Ткаченко Ф.А., Белошенко А.Д.	1967	1972
Ткаченківська	Ткаченко Ф.А., Тимчук В.М., Белошенко А.Д., Цибульник В.О.	1985	1991
Веселка	Тимчук В.М., Ящук Г.І., Гайдукова Л.М., Біленька О.М.	1991	1994
Глобус	Тимчук В.М., Шевченко М. Г., Линник Т.А.	1995	1997
Мавка	Тимчук В.М., Біленька О.М., Чорнишенко Т.В.	2000	2003
Біляночка	Шабетя В.В., Тимчук В.М., Шабетя О.М.	2001	2015
Амфора	Шабетя В.В., Тимчук В.М., Шабетя О.М.	2001	2004
Любчик	Тимчук В.М., Біленька О.М., Чернишенко Т.В., Горова Т.К., Ящук Г.І.,	2003	2006

Диференціація сортів цибулі ріпчастої. Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму сортів цибулі за літературними рекомендаціями дібрано 6 мікросателітних (МС) локусів за критеріями: розташування їх на різних хромосомах, наявність тринуклеотидних повторів, значення PIS (Polymorphism information content) понад 0,25. В таблиці 8.2 представлено інформацію щодо обраних МС локусів.

Таблиця 8.2 – Характеристика МС-локусів для диференціації сортів цибулі ріпчастої селекції ІОБ НААН

Мікросателітний локус	Тип повтору	PIS	Розмір фрагменту ампліфікації (п. н.) згідно	
			Mitrova et al., 2015 [29]	Jakse et al., 2005 [30]
АСМ004	(CAA) ₄	0,36	201, 205,212	203, 206,213
АСМ013	(TCC) ₉	0,31	165, 168,174	183, 186,192
АСМ018	(CTT) ₆	0,28	275, 278	275, 278
АСМ091	(TCT) ₁₀	0,29	172, 174,178	177, 183
АСМ115	(CAC) ₆	0,31	220, 223	239, 242
АСМ151	(ACA) ₅	0,37	243, 245,247	264, 266

За допомогою ПЛР-аналізу шістьох МС-локусів досліджено поліморфізм 8 сортів цибулі ріпчастої української селекції, електрофореграму продуктів ампліфікації яких засвідчує рис. 8.1. Розміри алелів (у п. н.) визначали за допомогою комп'ютерної програми на підставі порівняння довжин пробігів ампліфікованих фрагментів з довжиною пробігу набору фрагментів відомого розміру стандартної ДНК.

Детектовано 12 алелів від 1 до 3 на локус. Так, локус АСМ115 виявився неполіморфним у даній вибірці сортів – встановлено один алель розміром 237 п.н. (табл. 8.3). Для решти локусів кількість алелів на локус становила по два - для локусів АСМ004, АСМ013, АСМ018, АСМ151 та три - для локусу АСМ091. За локусом АСМ091 для чотирьох сортів виявлено по три алеля.

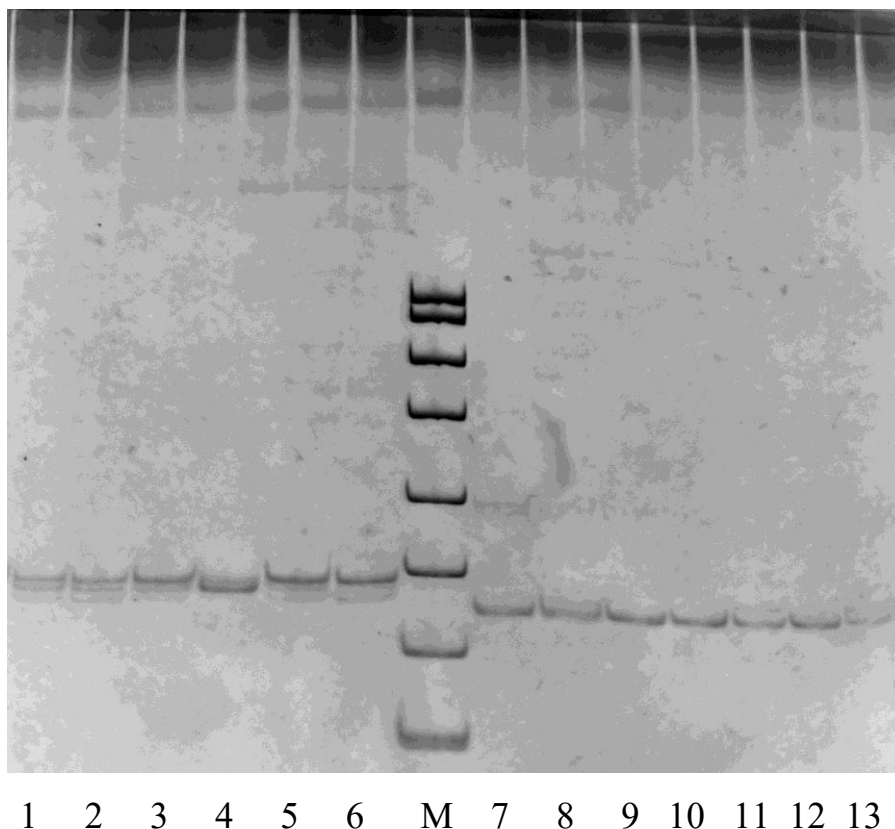


Рис. 8. 1 Електрофореграма продуктів ампліфікації MS-локусів АСМ091 (1-6) та АСМ013 (7-13) сортів цибулі ріпчастої: 1, 9 – Мавка; 2, 10 – Веселка; 3, 11 – Ткаченківська; 4, 12 – Глобус; 5, 13 – Біляночка; 6 – Амфора, 7 – Золотиста; 8 – Любчик; М – маркер рUC18/Mspl.

Це пов'язано з тим, що ДНК виділено з суміші насіння. Даний факт свідчить про гетерогенність деяких сортів, тому необхідна перевірка сортової чистоти за ПЛР-аналізом індивідуальних зразків кожного сорту. Отримані результати засвідчили також ефективність використання валідованих ДНК-маркерів, оскільки всі з дібраних за результатами пошуку в інтернеті MS були результативними [30].

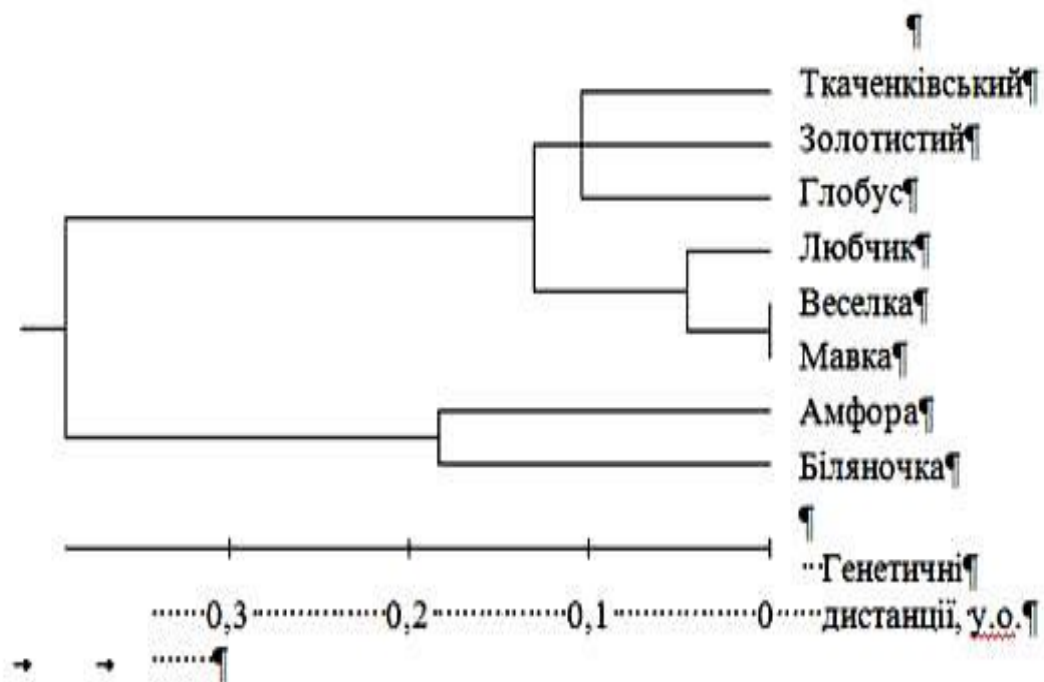
Таблиця 8. 3 – Результати аналізу мікросателітних локусів у сортів цибулі ріпчастої

Сорт	Розмір фрагменту ампліфікації мікросателітного локусу, п.н.					
	АСМ004	АСМ013	АСМ018	АСМ091	АСМ115	АСМ151
Амфора	212, 212	165, 165	270, 270	172, 183	237, 237	245, 264
Біляночка	212, 212	165, 165	277, 277	172, 177, 183	237, 237	245, 264
Веселка	213, 213	165, 165	277, 277	172, 177, 183	237, 237	245, 245
Глобус	213, 213	165, 165	277, 277	177, 183	237, 237	245, 264
Золотиста	213, 213	165, 165	277, 277	183, 183	237, 237	245, 245
Любчик	212, 213	165, 165	277, 277	172, 177, 183	237, 237	245, 245
Мавка	213, 213	165, 165	277, 277	172, 177, 183	237, 237	245, 245
Ткаченківська	213, 213	165, 174	277, 277	177, 183	237, 237	245, 245

Примітка. Наявність трьох алелів пов'язана з тим, що ДНК виділено з суміші насіння.

Кластерний аналіз сортів цибулі ріпчастої. З метою графічної візуалізації відмінностей між проаналізованими сортами дані щодо алелів кожного сорту використано для визначення між ними генетичних дистанцій, за якими й побудовано дендрограму (рис. 8. 2).

Асоціації між проаналізованими сортами, графічно представлені на дендрограмі, виявили реконструкцію етапів генезису сортів селекції ІОБ НААН з 1967 по 2006 р. Сформовані основні кластери включають визначені етапи селекції під керівництвом конкретних селекціонерів. сорти, створенні за часів плідної наукової праці Ф. А. Ткаченка (1967–1997) з місцевих форм (Ткаченківська, Золотиста).



Генетичні дистанції, у.о.

Рис. 8.2 Дендрограма сортів цибулі ріпчастої за даними мікросателітного аналізу

Так, сорти Амфора (темно-малинове забарвлення лусок), та Біляночка (білі луски), які увійшли до першого кластера, створено під керівництвом В. В. Шабеті під час створення та вивчення ним колекції генетичних ресурсів для НЦГРРУ (1990–2004).

До іншого основного кластера увійшла селекційна школа Ф. А. Ткаченка, всередині кластера також існує розподіл на дві групи. Перша – У даний кластер також увійшов сорт Глобус – створений за авторськими методиками добору з залученням іноземних форм з Півдня Європи, які мали жовто-коричневе забарвлення покривних лусок і форму, наближену до кулястої. Друга група – сорти, створені його учнями: В. М. Тимчуком та О. М. Біленькою (1991–2006 рр.) з залученням гермоплазми з країн Центральної Європи. До того ж сорти з фіолетово-червоним забарвленням покривних лусок (Мавка та Веселка) розташовані окремо від сорту Любчик, який має еліптичну форму та жовте забарвлення лусок. В результаті ПЛР-аналіз за допомогою шести пар МС-праймерів дозволив нам диференціювати досліджені сорти цибулі ріпчастої.

Порівняння з даними МС-аналізу інших вибірок. Наведемо кілька прикладів аналогічних досліджень зразків цибулі з різних географічних регіонів за МС-маркерами. Так, за даними МС-аналізу зразків з Індії, за 60 МС-локусами під час кластеризації відокремилася група місцевих короткоденних сортів [32].

Впродовж дослідження колекції з 85 місцевих зразків та дикорослих родичів цибулі з Іспанії за 12 (з 18) МС-локусами всі зразки диференційовано, а для трьох місцевих форм встановлено наявність специфічних алелів [33]. Кластеризація відбулася не на основі географічного походження.

З 21 МС локусів 15 дозволили диференціювати 16 комерційних сортів цибулі Чеської Республіки [28]. 96 місцевих зразків, селекційних ліній та комерційних сортів цибулі Туреччини диференційовано за 46 МС локусами [34, 35].

Для наведених досліджень характерно більша кількість використаних МС маркерів, що призвело до диференціації всіх зразків. Слід зазначити, що обрані шість МС маркерів в нашому дослідженні не дозволили диференціювати два сорти – Веселка та Мавка. Отже, необхідним є розширення панелі маркерів та її перевірка на певній вибірці сортів.

8.3. Стандартизація методу молекулярно-генетичної ідентифікації генотипів овочевих культур.

Для впровадження в селекцію та насінництво сучасного методу ідентифікації, здатного сприяти ефективному юридичному захисту селекційними установами прав на сорти та гібриди, спростити й удосконалити контроль за якістю насіння, нами розроблено та впроваджено в Україні національний стандарт “Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів”[35].

Мета розробки стандарту – встановити оптимальні вимоги на метод молекулярно-генетичної ідентифікації основних овочевих рослин (моркви, цибулі ріпчастої, огірка, томата) за допомогою техніки полімеразної

ланцюгової реакції з використанням SSR-праймерів. Поки що впровадження в селекцію та насінництво овочевих культур прогресивної біотехнології, яка відповідає сучасному розвитку науки та техніки, стримувалось через відсутність уніфікованого та стандартизованого способу, який уможливить розробляти генетичні паспорти в різних установах за єдиною методикою. Застосування стандартизованих методик дозволить мати об'єктивні дані про структуру сорту, гібрида, лінії.

Процедура ідентифікації генотипів передбачає п'ять основних етапів:

1) добір проб та попередня підготовка досліджуваного матеріалу; 2) виділення ДНК із зразків; 3) проведення полімеразно-ланцюгової реакції; 4) візуалізація отриманих даних; 5) документування результатів складанням формул і розробка генетичних паспортів.

Стандартом визначено, що середні (репрезентативні) проби добирають згідно з ДСТУ 4138, після чого складають акт установленної форми, який разом із відібраними пробами відправляють до лабораторії. Для підготування проб використовують одноразові поліпропіленові пробірки, пінцети, скальпелі, ножиці. Дібрані проби зберігають в холодильнику за температури мінус 20°C до 1 місяця (на випадок проведення повторного аналізу).

ДНК виділяють з будь-якої рослинної тканини: насіння, паростків, листків тощо. Насіння повинно бути здоровим, без теплового пошкодження під час сушіння, мати нормальні запах і колір, без ураженості шкідниками. З середньої проби для аналізу виокремлюють 100 насінин, ДНК виділяють окремо з кожної. Готують п'ять сумішей розчинів ДНК із 20 індивідуальних насінин і здійснюють ДНК-аналіз. Молоді листки добирають зі здорових рослин, без ураженості шкідниками, які мають усі апробаційні ознаки сорту. Для виділення рослинної ДНК використовують рослинний матеріал масою до 0,1 г. Висічки листків одержують зі 100 окремих рослин закриванням кришки поліпропіленової пробірки об'ємом 1,5 см³. У разі використання паростків, насіння пророщують у термостаті за температури 25 °C на зволоженому фільтрувальному папері згідно з ДСТУ 4138.

Виділену ДНК розводять до концентрації 0,01 г/см³ і зберігають у холодильнику не довше ніж 1 тиждень за температури 4 °С та не довше 1 року – за мінус 20 °С.

На етапі проведення ПЛР важливо використовувати алгоритм щодо добору ефективних ДНК-маркерів. Найбільш доцільно й економічно вигідно використовувати інформацію, представлену в авторитетних інтернет-базах даних, в яких, як правило, зібрано інформацію про вже апробовані на селекційному матеріалі МС-маркери [36]. Серед найбільш відомих баз молекулярно-генетичних даних овочевих рослин слід відмітити Veg Marks (<http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp>) [37].

Рослинний матеріал, представлений в оригінальних статтях, можна замовляти в Національних колекціях генетичних ресурсів. Також у дослідях з ДНК-ідентифікації генотипів використовують результати, отримані робочою групою UPOV, яка координує міжнародні проекти оцінки сортів рослин на відмітність, однорідність і стабільність (<http://www.upov.int/portal/index.html.en>) [16]. Великий обсяг інформації щодо вивчення геному пасльонових культур здійснено під егідою Корнельського університету (США) в рамках міжнародного наукового проекту “International *Solanaceae* Genome Network” (ISGN) (<http://sgn.cornell.edu/solanaceaeproject/>) [38]. Використання стандартизованих підходів до проведення молекулярно-генетичних досліджень уможливило науковцям із 12 країн за короткий термін провести повний сіквенс геному томата на значній кількості селекційного матеріалу.

Таким чином, використання валідованих ДНК-маркерів, а також оригінального рослинного матеріалу, на якому їх вперше протестували, дозволяє суттєво скоротити не тільки часові та фінансові витрати, а й підвищити ефективність молекулярно-генетичних досліджень овочевих рослин.

Такий підхід дозволив нам підібрати систему МС-маркерів для паспортизації сортів і гібридів томата, цибулі ріпчастої, моркви, огірка [39, 40].

Опрацювання результатів. Для реєстрації генотипу використовують не менше п'яти мікросателітних локусів, локалізованих на різних хромосомах.

Реєстрацію генотипів здійснюють записом формули, в якій відображено алельний склад варіабельних мікросателітних локусів. Для цього отримані розміри фрагментів ампліфікації кожного мікросателітного локусу, тобто розміри алелів у п. н. (пар нуклеотидів), записують у вигляді ідентифікаційної формули, в якій літера латинського алфавіту означає код локусу, нижній індекс – розмір алеля в п.н. У випадку гомозиготного стану локусу вказують тільки один алель.

За розробленим нами ДСТУ, встановлено наступну послідовність створення ДНК-паспортів овочевих культур. На першому етапі записують ідентифікаційні формули для кожної з п'яти сумішей ДНК аналізованого генотипу. Формули повинні бути ідентичними між собою. Різниця у формулах між сумішами навіть за одним алелем свідчить про генетично неоднорідний матеріал, наданий для аналізу. В таких випадках проводять ПЛР-аналіз окремих розчинів ДНК даної суміші та виявляють нетипові зразки. Відсоток нетипових зразків не повинен перевищувати 1. У випадку більшої їх кількості реєструють усі біотики, зібрані в даному зразку, або, за наявності формули еталонного зразка, відносять нетипові зразки до забруднення.

Далі складають формули генотипів згідно з додатком В: записують код проаналізованого мікросателітного локусу (літеру латинського алфавіту), розмір алеля (алелів), отриманий під час аналізу даного локусу, у вигляді нижнього індексу; код наступного проаналізованого локусу і розмір алелів тощо. Формула повинна мати вигляд: A₂₁₆B₂₀₄C₁₇₉D₁₇₅E₁₂₈ [41].

Приклад складання формули сорту цибулі ріпчастої Глобус. Генотип проаналізовано за мікросателітними локусами АСМ 004 (А), АСМ 013 (В), АСМ 018 (С), АСМ 091(Д), АСМ 115 (Е), АСМ151 (F). В дужках вказано коди локусів.

За локусом АСМ 004 для сорту Глобус (усіх п'яти сумішей ДНК) отримано алель розміром 213 п. н. За локусом АСМ 013 отримано алелі розмірами 165 п. н. За локусом АСМ 018 отримано алелі розмірами 277 п. н. За локусом АСМ 091 отримано алелі розмірами 177 і 183 п. н. За локусом АСМ

115 отримано алелі розмірами 237 п. н. За локусом АСМ 151 отримано алелі розмірами 245 п. н. Таким чином, формула сорту цибулі ріпчастої Глобус має вигляд: $A_{213}B_{165}C_{277}D_{177, 183}E_{237}F_{245}$.

Таким чином, проведеними дослідженнями сформульовано принципи оформлення результатів ДНК-аналізу овочевих культур записом генетичних формул з відображенням алельного складу варіабельних мікросателітних локусів. Незважаючи на те, що генетична основа комерційних сортів цибулі ріпчастої обмежена, використана панель маркерів є придатною для їхньої диференціації, але потребує розширення. Подальші експерименти будуть направлені на вивчення додаткових маркерів та генетичних ресурсів, що використовуються в селекційних програмах для створення гібридів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сиволап Ю. М. (1994). Геном растений и его улучшение. Урожай, – 192 с.
2. Хлесткина Е. К. (2013). Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. **17**(4/2):1044–1054.
3. Созінов О. О., Глазко В. И (1999). Сучасні технології у вирішенні традиційних питань генетики та селекції. Цитологія та генетика. **33**(6):53–76.
4. Картель Н. А. Макеева Е. Н., Мезенко А. М. (1999). Генетика.. Энцикл. Словарь. – Минск.: Тэхналогія. – 275 с.
5. Горова Т. К., Гончаренко В. Й., Могільна О. М., Івченко Т. В. (2006). Напрямки робіт у насінництві овочевих рослин. Овочівництво і баштанництво. **52**:151–157.
6. Rieger R., Michaelis A., Green M. M. (1991). Glossary of Genetics. Classical and Molecular. NY: Springer-Verlag. – 553 p.
7. Чесноков Ю. В. (2005). Молекулярные маркеры и управление генетическими ресурсами растений. Идентифицированный генофонд растений и селекция: ВИР. – С. 240–249.
8. Сатарова Т. М. Молекулярно-генетичні та біохімічні методи контролю за сортовими якостями насіння кукурудзи. Насінництво кукурудзи: навчальний посібник. Київ: Аграрна наука, 2019. С. 150–175.
9. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно-методическое руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. (1998) – К.: Аграрна наука, – 158 с.
10. Конарев В.Г. (2004). Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. Изд. 2-е, доп. – СПб.: ВИР,. – 417 с.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984). Молекулярное клонирование. –М.: Мир – 399 с.
12. Сатарова Т. М. Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю, Борисова В. В., Таганцова М. М. (2014). SNP-аналіз у паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. **3**:4–9.
13. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Календарь Р. Н. (2011). Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одеса: Астропринт, – 336 с.
14. Кожухова Н. Е. Сиволап Ю. М., Вареник Б. Ф. (2011). Геном кукурудзи та його поліпшення. Вісник аграрної науки. (2):26–29.

15. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э. (2011). Молекулярные маркеры и тестирование сортов растений на отличимость, однородность и стабильность: состояние проблемы. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. **9**(1):147–154.
16. Сиволап Ю. Волкодав В., Бальвінська М., Кожухова Н., Солоденко А., Чеботар С (2004). Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшнику за допомогою аналізу мікросателітних локусів (метод. реком.). Одеса. — 14 с.
17. Пат. 19828 UA, МПК (2006.1) A01H 1/04 Спосіб визначення новизни сортів та ліній м'якої пшениці за ДНК-типуванням: патент на корисну модель / Чеботар С. В., Сиволап Ю. М.; заявник та патентовласник Південний біотехнологічний центр у мрослинництві УААН. – № u2006 7029; заявл. 15.09.2006; опубл. 20. 01. 2007, Бюл. № 1.
18. Fait V.I., Balashova I.A. (2021). Allele frequencies of Ppd-d1a, Ppd-b1a, and Ppd-b1c of photoperiodic sensitivity genes in spring bread wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) of various origin. *Agricultural Science And Practice*. **8**(1):3-13. doi:
19. Сиволап Ю. М., Топчиева Е. А., Чеботарь С. В. (2000). Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и SSRP-анализа. *Генетика*. **36**(1):44–51.
20. Кондрацкая И. П., Юхимук А. Н., Чижик О. В. (2018). ДНК паспортизация сортозразків і гібридів багаторічних злакових трав Фактори експериментальної еволюції організмів. **22**:267-273.
20. Бальвінська М.С., Нагуляк О.І., Файт В.І. Поліморфізм та добір морозостійких генотипів ячменю осіннього строку сівби за ДНК-маркерами хромосоми 5Н. (2020). Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. **3**(51):87-97.
21. Сатарова Т. Н., Черчель В. Ю., Черенков А. В. (2013). Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты диплоидии: монография. Днепропетровск: Новая идеология. –552 с.
22. Галаева М.В., Файт В.І. (2021). Ідентифікація алелів генів дегідринів Dhn1 та Zmdhn13 у сортів та ліній кукурудзи. Фактори експериментальної еволюції організмів. **28**:42-47.
23. Solodenko A., Sivolar Yu. (2005). Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences. *Helia*. **28**(42):19–26.
24. Деклар. пат. на кор. модель 10230 Україна. Спосіб реєстрації сортів жита за ДНК - типуванням / Чеботар С. В., Сиволап Ю. М. – 2005. – Бюл. № 11.
25. Закон України Про охорону прав на сорти рослин (Відомості Верховної Ради України (ВВР), В редакції Закону № 2986-III (2986-14) від 17.01.2002, ВВР, 2002, N 23, ст.163.
26. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні». Режим доступу: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>.
27. McCallum J. Baldwin S., Shigyo M., Deng Y., Heusden S., Pither-Joyce M., Kenel F. (2012). *Allium* Map-A comparative genomics resource for cultivated *Allium* vegetables. *BMC Genomics*. **13**:168.
28. Masuzaki S. Araki S., Yamauchi N., Yamane N., Wako T., Kojima A., Shigyo M. (2006). Chromosomal locations of microsatellites in onion. *Hort. Sci.* **41**(2):315–318.
29. Mitrova K. Mitrova K., Svoboda P., Ovesna J. (2015). The Selection and Validation of a Marker Set for the Differentiation of Onion Cultivars from the Czech Republic . *Czech J. Genet. Plant Breed.* **51**(2):62–67
30. Jakse J., Martin W, McCallum J, Havey MJ (2005). Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *J Amer Soc Hort Sci* **130**:912–917.
31. Івченко Т. В. Баштан Н. О., Корнієнко С. І. (2016). Мікросателітний аналіз сортів цибулі ріпчастої української селекції. Вісник Центру наукового забезпечення АПВ Харківської області. **21**(2):155–152.
32. Khar A. Lawande K. E., Negi K. S. (2011). Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium spp.* *Genet Resour Crop Evol.* **58**:741–752.
33. Mallor C., Arnedo-Andrés M.S., Garcés-Claver A (2014). Assessing the genetic diversity

of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*. **170**:24–31.

34. Hanci F., Gokce A. F. (2016). Molecular Characterization of Turkish Onion Germplasm Using SSR Markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **52**(2):71–76.

35. ДСТУ 8667:2016 Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів / Т. В. Івченко, Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Н. О. Баштан А. В. Солоденко, О. Є. Гузеватий [Чинний від 2017–01–01]. – Київ: Держспоживстандарт України, 2016. – 21с. (Національний стандарт України).

36. Акініна Г.Є., Попов В. М., Тереняк Ю. М., Твердохліб О. В. (2015). Валідація ДНК-маркерів та використання інтернет-баз даних. Теоретичні основи оптимізації селекційного процесу основних видів сільськогосподарських рослин: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (23 червня 2015 р., сел. Селекційне Харківської обл.) / Інститут овочівництва і баштанництва НААН. – Пляда,. – С. 23–26.

37. VegMarks [Електронний ресурс] Integbio Database Catalog - integbio.jp Режим доступу.<http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp>.

38. International Union for the Protection of New Varieties of Plants [Електронний ресурс] (UPOV) Режим доступу до журн. <http://www.upov.int/portal/index.html.en>.

39. International *Solanaceae* Genome Network [Електронний ресурс] (ISGN) Режим доступу: <http://sgn.cornell.edu/solanaceaeoproject/>.

40. Івченко Т. В., Баштан Н. О., Кондратенко С. І. (2010). Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів томата (методичні рекомендації. Мерефа. – 20 с.

41. Івченко Т.В., Могильна О.М., Баштан Н.О. (2018). Методичні рекомендації з ідентифікації сортів цибулі ріпчастої за допомогою аналізу мікросателітних локусів. Селекційне: Пляда – 14 с.