

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

КЛЯЧЕНКО ОКСАНА ЛЕОНІДІВНА

УДК 606:581.1:631.527:633.6/.81

**ФІЗІОЛОГІЧНІ І БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ПІДВИЩЕННЯ
ЕФЕКТИВНОСТІ СЕЛЕКЦІЇ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ
(*BETA VULGARIS L.*) ТА РІПАКА (*BRASSICA NAPUS L.*)**

03.00.12 «Фізіологія рослин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора сільськогосподарських наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному університеті біоресурсів і природокористування України

Науковий консультант доктор біологічних наук, професор,
академік НААН
Мельничук Максим Дмитрович

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Пида Світлана Василівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка,
завідувач кафедри ботаніки та зоології

доктор біологічних наук, професор
Кірізій Дмитро Анатолійович,
Інститут фізіології рослин
і генетики НАН України
провідний науковий співробітник
відділу фізіології та екології фотосинтезу

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Поєдинок Наталія Леонідівна,
Державна наукова установа
«Український інститут науково-технічної
експертизи та інформації»,
старший науковий співробітник
відділу наукової та науково-технічної експертизи

Захист відбудеться «28» квітня 2017 року о 9⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий «27» березня 2017 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ю. В. Коломієць

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із визначних шляхів підвищення продуктивності буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.) і ріпака (*Brassica napus* L.), які забезпечують вагомий внесок в українську та світову економіку є створення нових сортів й гібридів з оптимальною реакцією на зміни довкілля, що регулюється технологією вирощування та генетично зумовленою стійкістю проти нерегульованих екологічних чинників на окремих етапах онтогенезу (Роїк, Корнеєва, 2010; Балков, 2011; Гусев та ін., 2011; Дубчак та ін., 2015). Прогрес в селекції цих важливих культур не може бути досягнутий без використання наукових розробок фізіології і біохімії рослин, біотехнології для одержання і оцінки вихідного матеріалу, створення сортів і гібридів на основі реалізації принципово нових технологічних схем (Богомолів, Федулова, 2012; Корниенко, Буторина, 2013; Присяжнюк, 2015).

Фізіологічний підхід і розроблення шляхів покращення та оцінки популяції за фізіолого-біохімічними показниками сприяє більш глибокому розумінню продукційного процесу сільськогосподарських культур в мінливих умовах навколишнього середовища та визнаних чинників, які впливають на урожай, що забезпечує теоретичні основи селекції. Розвиток фізіологічних досліджень підвищує ефективність генетичних і генно-інженерних технологій, розширює їх завдання і створює нову експериментальну базу (Шадчина, 2010; Parry et al., 2011; Суслов и др., 2012; Прядкина, Моргун, 2016).

Стратегією сучасної селекції рослин стає управління продукційними процесами, такими як фотосинтез на різних рівнях його організації (Стасик и др., 2016), оптимізація донорно-акцепторних відносин (Кірізії, 2015), світлове (Zhu, 2010) і темнове дихання (Головко, 1998). Тому актуальним залишається пошук інформативних фізіолого-біохімічних показників, які пов'язані з продуктивністю в широкому діапазоні умов вирощування і можуть бути використані як фізіологічні і біохімічні маркери для підвищення ефективності селекційного процесу.

Нові гібриди буряків цукрових містять 75–76 % цукру у розрахунку на суху речовину, тобто подальше підвищення цукристості є надзвичайно трудомістким процесом. Установлено, що в основу закономірності уповільнення темпів зростання цього показника покладено анатомічну будову запасуючого органа (Эллиот и др. 1996). Отже, для удосконалення існуючої методології селекційних робіт зі створення високоцукристих матеріалів постає необхідність вивчення взаємозв'язку між анатомічною структурою і цукро-накопичувальною здатністю коренеплодів.

Важливою проблемою в гетерозисній селекції буряків цукрових є виведення гібридів з поліпшеними технологічними якостями коренеплодів, які полягають у площині подолання генетично-детермінованої фізіологічно-граничної межі накопичення сахарози запасуючим органом і планомірної зміни хімічного складу рослин (Роїк, Корнеєва, 2010; Корнеєва, Мельник, 2012).

З розвитком ДНК-технологій актуальним напрямом досліджень стає ідентифікація і диференціація генотипів буряків цукрових за допомогою

ДНК-маркерів, серед яких поширеними є RAPD-PCR (Роїк та ін., 2010; Богачева, 2012; Чесноков и др., 2013; Федулова, 2014; Федулова, Федорин, 2015), SSR-PCR (Smulders et al., 2010) та ISSR-PCR (Izzatulayeva, 2014).

Значну роль в селекційному процесі відіграють біотехнологічні методи, які уможливають з високою ефективністю створювати вихідний матеріал, отримувати стійкі проти хвороб (Prins et al., 2008; Черкасова, 2010), шкідників (Yang et al., 2015) і природних стресових факторів генотипи (Saad, Raja, 2003; Дубровна, Моргун, 2009), безпосередньо впливати на генетичний апарат рослин, що скорочує обсяги та тривалість селекційних схем.

Пріоритетним напрямом у сучасній інноваційній біотехнології рослин є метод експериментальної гаплоїдії (Жамбакин и др., 2012; Сорока, 2015), клітинної селекції (Чугункова, 2009; Дубровна та ін., 2012), клонального мікророзмноження і збереження рослинного матеріалу, який знаходить своє місце на всіх етапах селекційного процесу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Основні експериментальні дослідження з дисертаційної роботи виконано в лабораторії біотехнології рослин і проблемній лабораторії фітовірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України) в рамках науково-технічних програм за темами: «Створити сорти та гібриди ріпаку на основі сучасних методів селекції» (номер державної реєстрації 0199U002580, 1999–2003 рр.); «Фізіолого-біохімічні та біотехнологічні дослідження в селекції цукрових буряків» (номер державної реєстрації 0104U004555, 2004–2009 рр.); «Створити сорти ярого та озимого ріпаку з поліпшеними якісними показниками насіння» (номер державної реєстрації 0104U004366, 2004–2006 рр.); «Створення високоолеїнових та низькофітинових сортів і гібридів ріпаку «ОО», «ООО» типу придатних для виробництва біопалива» (номер державної реєстрації 0107U0002467, 2007–2011 рр.); «Біотехнологічні підходи ідентифікації фітопатогенів, генетичної паспортизації, розмноження та переробки цінних сільсько-господарських культур» (номер державної реєстрації 0113U003828, 2013–2015 рр.). З 2012 року до теперішнього часу продовжується робота за науковою темою «Біотехнологічні методи отримання стійких до біотичних та абіотичних факторів технічних культур» (номер державної реєстрації 0112U001677).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – виявити найбільш інформативні фізіолого-біохімічні показники у формуванні високої продуктивності буряків цукрових та розробити і удосконалити прийоми і способи культивування *in vitro* органів і тканин буряків цукрових і ріпака для збільшення їх генетичної гетерогенності та прискорення і підвищення ефективності селекційного процесу.

Відповідно до поставленої мети передбачалось вирішити наступні завдання:

– з'ясувати бар'єрні функції перикарпіїв буряків цукрових та провести екстракцію біологічно активних речовин з решток перикарпіїв;

- провести порівняльну фізіолого-біохімічну оцінку показників продукційного процесу різних генотипів буряків цукрових;
- встановити зв'язок довговічності і тіньовитривалості листкового апарату рослин буряків цукрових з цукристістю і формуванням біомаси рослин;
- визначити взаємозв'язок анатомо-морфологічної структури і цукронакопичувальної здатності коренеплодів буряків цукрових;
- дослідити хімічний склад коренеплодів різних генотипів буряків цукрових і розподіл основних макро- і мікроелементів в тканинах та встановити їх зв'язок з цукристістю;
- провести ідентифікацію та диференціацію різних генотипів буряків цукрових за допомогою RAPD- і SSR-маркерів;
- визначити участь тритерпенових глікозидів в адаптивному потенціалі буряків цукрових;
- оптимізувати умови калюсогенезу і морфогенезу буряків цукрових, ріпака озимого та ярого; дослідити процеси диференціації клітин в калюсних тканинах *in vitro* різних генотипів буряків цукрових;
- удосконалити методику отримання гаплоїдів ріпака озимого та ярого в умовах *in vitro* на основі встановлення оптимальних умов і режиму культивування пиляків і регенерованих структур;
- отримати стійкі лінії буряків цукрових і ріпака проти абіотичних стресових чинників довкілля методом клітинної селекції *in vitro*.

Об'єкт дослідження – фізіолого-біохімічні процеси формування продуктивності різних генотипів буряків цукрових та біотехнологічні методи і прийоми, які забезпечують прискорене отримання селекційних матеріалів буряків цукрових, ріпака озимого та ярого.

Предмет дослідження – фізіолого-біохімічні показники продукційного процесу, анатомо-морфологічна структура і цукронакопичувальна здатність, вміст основних макро- і мікроелементів в коренеплодах різних генотипів буряків цукрових, експериментальна гаплоїдія ріпака, особливості морфогенезу та клітинна селекція *in vitro* буряків цукрових ріпака ярого і озимого.

Методи дослідження: фізіологічні; біохімічні; високоефективна та рідинна тонкошарова хроматографія; молекулярно-біологічні; світлова і флуоресцентна мікроскопія; гістохімічні; цитологічні; біотехнологічні методи і прийоми; методи статистичної обробки.

Наукова новизна одержаних результатів. Базуючись на принципах комплексного підходу і системного аналізу виявлено найінформативніші фізіолого-біохімічні показники складових продукційного процесу, оптимізовано й розроблено біотехнологічні методики та запропоновано їх застосування в селекційній практиці буряків цукрових, ріпака озимого та ярого.

Вперше розроблено модель функціонування системи біохімічного регулювання проростання насіння буряків цукрових на основі досліджень бар'єрних функцій перикарпіїв і формування фітоактивних захисних сфер проростків від потенційних конкурентів та патогенів. В екстрактах перикарпіїв виявлено таніни (проантоціанідини), флавоноли та їх глікозиди, які є

високоактивними інгібіторами й стимуляторами росту і можуть бути використані як природні біологічно активні речовини.

Вперше встановлено, що вміст каротиноїдів в листках буряків цукрових і співвідношення каротиноїди/хлорофіли можуть слугувати фізіологічними маркерами ознаки на високу цукристість і масу коренеплоду на ранніх етапах онтогенезу рослин та для скринінгу новостворених гібридів за рівнем цукристості і врожайності.

Вперше методом макровідбитків досліджено анатомо-морфологічну структуру коренеплодів сортів, ди- і триплоїдних гібридів однонасінних буряків цукрових української і зарубіжної селекції. Експериментально встановлено комплекс провідних анатомічних ознак коренеплодів, взаємопов'язаних з їх цукро-накопичувальною здатністю, за яким можна оцінювати вихідний селекційний матеріал при доборах на підвищену цукристість.

Досліджено сортоспецифічність хімічного складу коренеплодів низько- і високоцукристих генотипів буряків цукрових та розподіл золи і основних макро- і мікроелементів в різних морфологічних частинах, ділянках коренеплодів, сегментах головки та встановлено їх негативний корелятивний зв'язок з цукристістю. Вперше показано особливості розподілу основних макроелементів в зонах кілець судинно-провідних пучків та міжкільцевої паренхіми в зв'язку із локалізацією сахарози.

Виявлено молекулярно-генетичний поліморфізм різних генотипів буряків цукрових на основі проведеного RAPD- та SSR-аналізу, визначено специфічні алелі для ідентифікації генотипів і за допомогою кластерного аналізу встановлено їх генетичну подібність.

Вперше виявлено біохімічні зміни в листках рослин-регенерантів буряків цукрових за умов довготривалого культивування *in vitro* і проведено кластерний аналіз спорідненості між різними генотипами за якісним станом метаболічного профілю. Встановлено взаємозв'язок між вмістом тритерпенових глікозидів та адаптивним потенціалом рослин, що може слугувати маркерною ознакою для первинної діагностики селекційного матеріалу.

Вперше на основі схрещування дигаплоїдів, які одержано методом культури мікроспор *in vitro* створено сорти ріпака ярого Аіра та ріпака озимого Антарія та розроблено метод виявлення апоміктичних форм ріпака в культурі *in vitro*.

На підставі визначення цитофотометричних показників морфогенного калюсу і апікальних меристем буряків цукрових з'ясовано, що високодиференційовані морфогенні структури утворюються як на поверхні, так і усередині тканин та встановлено їх модульну організацію.

Розроблено і запропоновано схеми клітинної й тканинної селекції *in vitro* для отримання ліній буряків цукрових з комплексною стійкістю проти посухи і засолення та ріпака озимого і ярого проти посухи та дії низьких температур.

Наукову новизну роботи підтверджено свідоцтвом про реєстрацію авторського права на твір «Однонасінні цукрові буряки: від насінини до коренеплоду. Анатомія. Морфологія» (№ 63043, 2015 р) та двома авторськими

свідоцтвами на сорт Аіра (А. с. № 05120, 2005 р.) і Антарія (А. с. № 06113, 2006 р.).

Практичне значення одержаних результатів. Виявлено найбільш інформативні фізіолого-біохімічні показники листкового апарату буряків цукрових, які можна використовувати як допоміжні ознаки у гетерозисній селекції буряків цукрових.

Установлено, що у більшості досліджених генотипів буряків цукрових в перикарпіях плодів містяться комплекси сполук з вираженою біологічно активною дією.

На основі проведених кількісних порівняльно-анатомічних досліджень структури коренеплодів сортів і гібридів буряків цукрових з різною цукро-накопичувальною здатністю встановлено провідні анатомічні ознаки, які супроводжують найбільш продуктивний розвиток цукропровідних і цукро-накопичуючих тканин та можуть бути використані при селекційному доборі як допоміжні ознаки потенційного підвищення цукристості.

Виявлено закономірний характер зв'язку між концентрацією сахарози, основних макро- і мікроелементів і золи та сортоспецифічні особливості їх накопичення, що дозволяє використовувати одержані результати для розроблення способів управління процесом цукронакопичення фізіологічними і селекційними методами.

Вперше методом індивідуального добору з гібридної популяції від схрещування дигаплоїдів, одержаних в культурі пилку *in vitro* створено сорти ріпака ярого Аіра і озимого Антарія, які занесено до Реєстру сортів рослин України.

Отримані на основі оптимізованого методу та розроблених схем клітинної селекції *in vitro* лінії буряків цукрових з комплексною стійкістю проти посухи і засолення та посухостійкі лінії ріпака озимого і ярого передано у Всеукраїнський науковий інститут селекції для використання в селекційних підрозділах.

Результати дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі під час викладання дисциплін «Біотехнологія», «Біотехнологія в агросфері», «Екологічні біотехнології» для підготовки студентів ОС «Бакалавр» за напрямом «Агрономія» і «Екологія та охорона навколишнього середовища» та «Біотехнологія рослин» й «Мікроклональне розмноження рослин» для ОС «Магістр» за напрямом «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України та включені в підручники і навчальні посібники.

Особистий внесок здобувача. Здобувачу належить постановка проблеми, визначення мети та завдань дослідження, розроблення теоретико-методологічних й методичних підходів при фізіологічних, біохімічних, біотехнологічних та молекулярно-генетичних дослідженнях, встановлення їх обсягу, удосконалення методики експериментальної гаплоїдії, клітинної селекції, мікроклонального розмноження.

Основна частина, наведених у дисертаційній роботі наукових положень, висновків і пропозицій належить особисто здобувачу та є її науковим доробком.

У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у визначенні завдань, виборі методів, проведенні аналізів, обговоренні результатів та їх інтерпретації, узагальненні експериментальних даних, формулюванні висновків та участі у написанні статей. Здобувачем здійснено узагальнення теоретичних і практичних положень, підготовлено текст дисертації, обґрунтовано висновки за результатами власних досліджень.

Значну частину досліджень виконано на базі відділів біотехнології, селекції і дослідно-селекційних станцій Інституту біоенергетичних культур та цукрових буряків НААН.

Апробація результатів дисертації. Основні теоретичні положення, висновки і практичні рекомендації дисертаційної роботи апробовано на міжнародних конференціях, симпозіумах та конгресах: «Адаптивная селекция растений. Теория и практика» (м. Харків, 2002 р.); «Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье» (м. Алушта, 2002 р.); «Biotechnology approaches for Exploitation and Preservation of Plant resource» (м. Ялта, 2002 р.); «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (м. Москва, Російська Федерація, 2005 р., 2013 р.); «Клеточная биология и биотехнология растений» (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2013 р.); «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (м. Казань, Російська Федерація, 2013 р.); «Біорізноманіття України в світлі ноосферної концепції академіка В. І. Вернадського» (м. Полтава, 2014 р.); «Селекція, насінництво, технології вирощування круп'яних та інших сільськогосподарських культур» (м. Кам'янець-Подільський, 2016 р.); «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 2016 р.).

Публікації. Результати досліджень за темою дисертації опубліковано у 64 наукових працях, з яких 2 монографії, 26 статей у наукових фахових виданнях України, стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 4 статті у наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у наукових виданнях інших держав, 11 статей в інших наукових виданнях, 3 авторські свідоцтва, посібник, 2 науково-методичні рекомендації та 12 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, восьми розділів, висновків і рекомендацій, списку використаних джерел. Матеріали дисертаційної роботи викладено на 380 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація містить 109 таблиць і 72 рисунки. Список використаних джерел включає 575 найменування (з них 190 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ «Огляд літератури» присвячено детальному аналізу сучасного стану досліджень з фізіології та біохімії рослин, біотехнології для підвищення ефективності селекційного процесу, розширення генетичної мінливості у культивованих рослин, молекулярно-генетичних методів досліджень. Висвітлено процеси цукронакопичення і їх регулювання у буряків цукрових та застосування фізіолого-біохімічних показників в продукційному процесі

рослин. На основі здійсненого аналізу обґрунтовано актуальність і перспективність проведення дисертаційного дослідження.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень використовували сорти, три- і диплоїдні гібриди та їх компоненти, інбредні лінії, багатонасінні запилювачі, О-типи і прості міжлінійні гібриди буряків цукрових, дикі види буряків *Beta cicla* L., *Beta vulgaris* ssp. *maritima* L., які було надано Інститутом біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН та сорти ріпака озимого і ярого з колекційного розсадника кафедри селекції та насінництва НУБіП України. Загальну схему досліджень представлено на рис. 1.

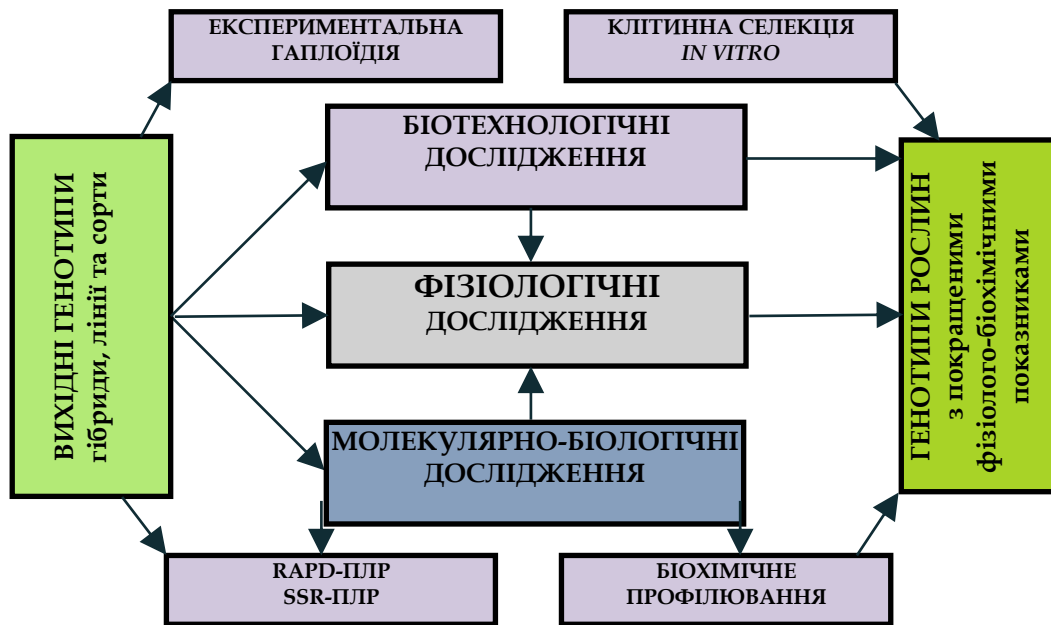


Рис. 1. Схема досліджень

Вивчення фізіолого-біохімічних особливостей листкового апарату, коренеплодів і продуктивності різних генотипів буряків цукрових проводили в умовах вегетаційних і польових дослідів. Рослини вирощували у посудинах Вагнера місткістю 14 кг у ґрунтовій культурі на поживному середовищі ВНЩ за природного освітлення і оптимального водозабезпечення 60 % ПВ. Частина 15-добових рослин затіняли екранами із марлі (2–3 шари) і білої тканини. Зменшення природної освітленості під екранами становило 30 і 60 % від природної. Біологічна повторність – 15–20 рослин. Для вирощування проростків використовували вегетаційні посудини місткістю 2,8 кг промитого річного піску, вологість якого підтримували на рівні 70 % ПВ. Польові дрібноділянкові досліді проводили згідно методичних рекомендацій «Методика і техніка проведення робіт в селекційній сівозміні» (2002) та з використанням гексагонального способу посіву (Fasoulas, 1973) на полях Ялтушківської ДСС (с. Ялтушки Вінницької обл.), Білоцерківської ДСС (м. Біла Церква Київська обл.) та в колекційному розсаднику ріпака ярого і озимого Національного університету біоресурсів і природокористування України (с. Дослідне Київська обл.).

При вивченні бар'єрних функцій перикарпіїв буряків цукрових полярні сполуки екстрагували бідистильованою водою за температури 4 °С протягом 24 год (у співвідношенні 1:10) і оцінювали їх біологічну активність на тест-об'єктах за допомогою чистих культур *Chlorella vulgaris* 106 і *Erwinia aroideae*, які висівали на тверді агаризовані живильні середовища. Біологічну активність екстрагованих речовин оцінювали за зоною пригнічення розвитку тест-культури на 5, 7 і 12 добу, алелопатичний потенціал визначали за методом стандартних біологічних тестів (Гродзинський, 1973). Профілювання вторинних метаболітів виконували за допомогою високоефективної зворотно-фазової рідинної хроматографії (ВЕРХ) з діодно-матричним детектуванням (DAD-RP-HPLC), обладнання – хроматографічна система Agilent 1100. Відтворюваність аналізу перевіряли з використанням суміші дев'яти алкілфенонів (Sigma – Aldrich). Обробку і візуалізацію хроматографічних даних проводили за допомогою програмного забезпечення Agilent Chem Station і Corel Draw X3. Хімічний склад метаболітів плодів буряків цукрових визначали методом ТШХ на шарі силікагеля (Sorbfil F₂₅₄) (Практикум по фармакогноезии, 2003). Загальний вміст фенольних сполук у плодах визначали спектрофотометричним методом (СФ Optizen Pop, Південна Корея) за допомогою реактиву Фоліна-Чекольтеу (Singleton et all., 1965), сухих розчинених речовин (Brix, %) у водних екстрактах плодів – з використанням цифрового рефрактометра Reichert (USA). Цитологічний аналіз перикарпіїв і стан тест-культур виконували на мікроскопі Nikon Eclipse E-200. Автофлуоресценцію клітин і тканин перикарпіїв досліджували на мікроскопі Axio Scope A-1 Carl Zeiss. Фотодокументацію матеріалів здійснювали з використанням Camera Control Pro-2 Nikon. Морфометричні показники довжини коренів проростків редису і результати біотестів аналізували в спеціалізованих програмах Image Pro-Premier 9,1 і AxioVision 4,7 Carl Zeiss.

Площу листової поверхні, питому масу листків (ПМЛ) і накопичення сухої речовини в органах рослин визначали згідно методичних вказівок ВНЦ «Анатомо-морфологические и физиолого-биохимические тесты при изучении селекционных материалов сахарной свеклы» (1989). Мезоструктурні характеристики листків буряків цукрових установлювали на фіксованому матеріалі (Мокроносов, Борзенкова, 1978) і визначали їх розміри під світловим мікроскопом Carl Zeiss (Німеччина).

Інтенсивність фотосинтезу реєстрували за контрольованих умов на установці, змонтованій на базі оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М, увімкненого за диференційною схемою. Показники газообміну розраховували за стандартними методиками (Фотосинтез: Методы определения, 1989). Вміст хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів визначали в ацетонових екстрактах листків буряків цукрових спектрофотометрично на СФ-46 (Російська Федерація) і розраховували за формулами (Мусієнко та ін., 2001). Фотохімічну активність хлоропластів (ФХА) оцінювали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 420 нм на СФ-46 (Російська Федерація) за відновленням фериціаніду калію. Реакційне середовище містило 100 мкМ трис-буферу (рН 8,0), 10 мкМ MgCl₂, 6 мкМ K₃[Fe(CN)₆]. Вміст хлорофілу в

суспензії хлоропластів вимірювали за методом (Arnon, 1949). Ступінь фенотипового проявлення ознаки (hr) визначали за Брюбейкером (1966), ефект гетерозису – за Савченко (1984).

Інтенсивність дихання листків вимірювали на респіраційному апараті (Толмачев, 1950). Активність ферментів пероксидази визначали за оптичною густиною продуктів реакції окислення гваяколу (Ермаков, 1987), каталази – йодометричним методом за Починком (1976), нітратредуктази за (Овчаренко и др., 1987). Сумарний вміст альбумінів і глобулінів, білкового азоту та водорозчинних вуглеводів визначали за (Ермаков, 1972, 1987), вміст сахарози – методом холодної дигестії за (Починок, 1976) з використанням цукрометра СУ-4 (Україна); нуклеїнових кислот – спектрофотометрично на СФ-46 (Російська Федерація) за Кулаєвою і Поповою (1965).

При визначенні хімічного складу зразки коренеплодів, листових пластинок і черешків озолювали за (Гинзбург и др., 1963) з наступним визначенням кількості азоту за К'ельдалем, фосфору – Труогом і Мейером (Агрохимические методы исследований почв, 1975), калію і натрію – на полум'яному фотометрі. Вміст мікроелементів визначали за допомогою атомно-абсорбційної спектрофотометрії С-115 (Федеративна Республіка Німеччина) після мокрого озолення зразків (Ринькис и др., 1989).

Для порівняльно-анатомічних досліджень структурних індексів коренеплодів ножом Герлеса в ділянці шийки вирізали свічки, із яких за допомогою заморожуючого мікротому МЗ-2 (Україна) виготовляли зрізи товщиною 25–30 мкм. Зрізи забарвлювали конго-рот з хризоїдином і поміщали в желатино-гліцеринову суміш (Анатомо-морфологические и физиолого-биохимические тесты при изучении селекционных материалов сахарной свеклы, методические рекомендации, 1989).

Молекулярно-біологічний аналіз рослинного матеріалу буряків цукрових проводили за допомогою полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР). ДНК виділяли з використанням катіонного детергента ЦТАБ (Великов, 2013). Якість і концентрацію ДНК оцінювали на СФ BioPhotometr (Eppendorf, Федеративна Республіка Німеччина). Реакцію ампліфікації ДНК проводили у програмованому термостаті «ТС 48». При SSR-аналізі ПЛР здійснювали з однією парою SSR-праймерів (для МС-локусу GZM 086) (Великов, 2013). RAPD-аналіз здійснювали з використанням підібраних праймерів: GEN 2-80-7, GEN 1-80-5 GEN 1-70-9/2 GEN 4-70-2. Електрофорез продуктів ампліфікації ДНК проводили в 2 % агарозному гелі забарвленому бромистим етидієм. Для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму використовували маркер молекулярної маси Gene Ruler™ 100bp (Fermentas, Литовська Республіка) (Роїк та ін., 2007). Розрахунки проводили за допомогою комп'ютерних програм Trees, Excel, Statistica 6,0, Clustal W Clustal X version 2.0. Ідентифікацію тритерпенових глікозидів виконували методом тонкошарової хроматографії, викладеним в «Практикуме по фармакогнозії» (2003) на пластинах з параметрами 100×150 мм, сорбент – Silica gel G60 (Merck, Федеративна Республіка Німеччина). Фотодокументацію матеріалів проводили з

використанням програми Axio Vision 40V Carl Zeiss, цифрову обробку даних – в програмі Image Pro Premier 9,0 (Trial Version).

При вивченні морфогенетичних потенцій органів і тканин досліджуваних культур в умовах *in vitro* використовували базові живильні середовища МС (Murashige, Skoog, 1962), В₅ (Gamborg, Evelyne, 1968), які при виконанні експериментів було модифіковано. Для регулювання процесів калюсо- та морфогенезу *in vitro* до складу живильного середовища вводили фітогормони цитокінінового (0,2–0,5 мг/л БАП), ауксинового типу дії (0,01–0,1 мг/л; 0,5–2 мг/л НОК; 0,2–2,0 мг/л ІМК; 0,5–0,8 мг/л 2,4Д) та гібереліни (0,05–0,2 ГК₃). Експлантати культивували за температури +25 °С, освітленні 4 клк і 16-годинного фотоперіоду. Частину експлантатів поміщали до термостату з температурою 25 °С. Субкультивування тканин і органів проводили через 21–30 діб. Приготування та забарвлення препаратів для цитологічних та гістохімічних досліджень калюсних тканин буряків цукрових проводили за (Паушева, 1988). Фотодокументацію матеріалів і цифрову обробку експериментальних даних виконували в програмі Axio Vision 40V Carl Zeiss.

Гаплоїди і дигаплоїди ріпака озимого та ярого одержували за модифікованою методикою (Кляченко, Ситнік, 2002). Виявлення апоміктичних форм ріпака проводили в польових умовах та в умовах *in vitro* на розроблених нами середовищах.

Клітинну селекцію *in vitro* на стійкість буряків цукрових та ріпака озимого і ярого проти абіотичних чинників проводили за розробленими нами схемами. Активність ферменту сахарозофосфатсинтази в листках рослин-регенерантів буряків цукрових *in vivo* визначали за (Huber, 1983) і (Lafta et al., 1995), вміст білка – за (Lowry, 1951), активність аніонних пероксидаз – спектрофотометрично за окисненням бензидину на спектрофотометрі СФ Optizen Pop (Південна Корея). Концентрацію хлорофілу *a*, *b* і каротиноїдів у рослинному матеріалі регенерантів визначали в метанольних екстрактах (662 нм, 644 і 440 нм) за (Hand book..., 2005) на СФ Optizen Pop (Південна Корея).

Статистичну обробку одержаних експериментальних даних виконували з використанням електронних таблиць Microsoft Excel, Statistica 6,0; польових досліджень за Доспеховим (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ОЦІНКА ПАРАМЕТРІВ ПРОДУКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

Вивчення бар'єрних функцій перикарпіїв та екстракція БАР з їх решток. Основні потенційні інгібітори проростання насіння буряків цукрових добре відомі (Barnabas, Arnott, 1990). Однак відомості щодо механізмів регуляції цього процесу в літературі недостатні і вкрай суперечливі. У результаті проведених досліджень в перикарпіїх плодів буряків цукрових, крім відомих вторинних метаболітів (Dictionary..., 2014), вперше виявлено також конденсовані таніни (проантоціанідіни), флавоноли і глікозиди

останніх (рис. 2, 3). Спектральні характеристики вторинних метаболітів, які виділено з метанольних екстрактів перикарпіїв буряків, представлено на рис. 3. Встановлено істотну генотипну різницю за загальним вмістом у перикарпіїх сухих розчинених речовин, що пов'язано з наявністю в оплоднях різних солей і органічних кислот. Загальна кількість водорозчинних фенолів (оксикоричних кислот, танінів, кумаринів і флавоноїдів), тритерпенових сапонінів та інших біологічно активних сполук у перикарпіїх є одним із найважливіших адаптивних показників проростання насіння, росту і розвитку проростків буряків цукрових.

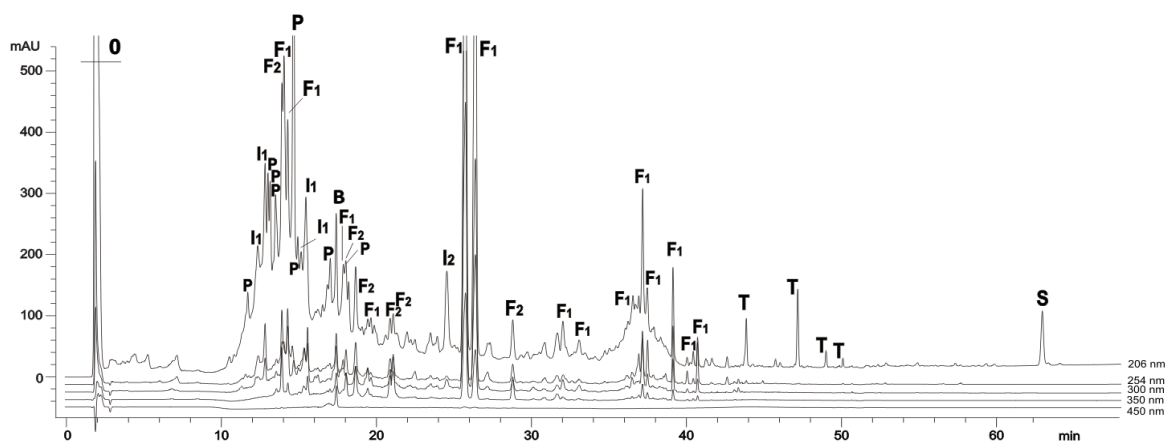
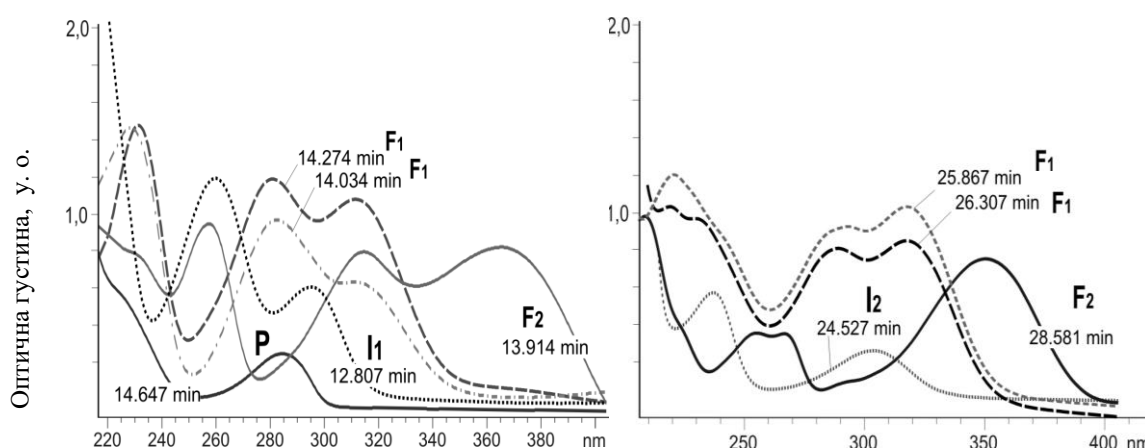


Рис. 2. Профіль ВЕРХ метанольного екстракту оплоднів насіння гібриду Іванівський ЧС 33: О – загальний пул водорозчинних сполук, кислот та ін.; В – беталамова кислота; Р – конденсовані таніни (проантоцианідини); F₁ – ізофлавонони, флаванони, дигідрофлавоноли та їх глікозиди (іризон В, бетавульгарин, бетагарин); F₂ – флавонони, флавоноли та їх глікозиди; I₁ – прості індоли і *біс*-індольні алкалоїди; I₂ – ізоіндоли (інгібітори проростання); Т – ди- і тритерпеноїди (сапоніни – глікозиди карофілліну й гедерагеніну та бісдесмозиди); S – стерини і їх ефіри.



Спектральні характеристики вторинних метаболітів, які виділено із перикарпіїв гібриду Іванівський ЧС 33: Р – проантоцианідини; F₁ – ізофлавонони, флаванони, дигідрофлавоноли та їх глікозиди; F₂ – флавонони, флавоноли та їх глікозиди; I₁ – прості індоли; I₂ – ізоіндоли (інгібітори проростання).

Показано, що локалізація вторинних метаболітів в перикарпіях досліджених гібридів буряків цукрових обумовлюється функціональними особливостями тканин і клітин. Зовнішні шари екзокарпію складаються зі здерев'янілих клітин з потовщеними оболонками, внутрішньоклітинний простір яких заповнений поліфенольними сполуками. Клітини мезокарпію – живі, палисадні, з тонкими слабо лігніфікованими вторинними клітинними стінками, які містять на стадії дозрівання плодів пластиди. У них також виявлено багаточисельні включення, кристали і друзи оксалату кальцію (рис. 4, а–г). В окремих клітинах зустрічаються нечисленні гіфи клітинного міцелію ендоефітних грибів, які з клітини в клітину переміщуються через пари простих нерозгалужених пор (рис. 4, д–е). Ознак протеолітичного руйнування тканин мезо- і ендоекарпію при цьому не спостерігалось.

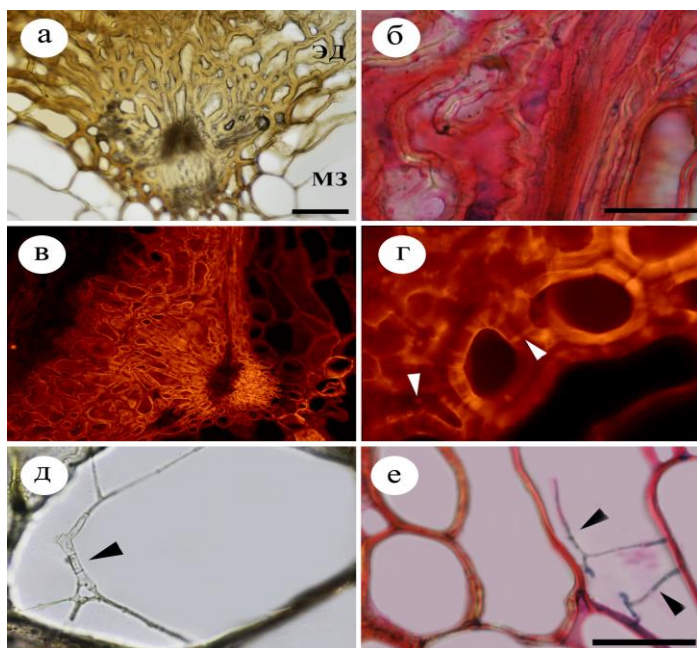


Рис. 4. Особливості мікроскопічної будови мезо- (МЗ) і ендоекарпію (ЕД) (а–г) та локалізація клітинного міцелію ендоефітних грибів (д, е) в палисадних клітинах мезокарпію плодів буряків цукрових, де б, е – забарвлення тканин сафраніном водним синім; в, е – флуоресценція склереїд, стрілками показано інтенсивне світіння простору навколо простих пор (спектр емісії – 640 нм).

У клітинах ендоекарпію, представлених склереїдами з численними поровими отворами, також виявлено кристали оксалату кальцію і везикули, заповнені поліфенольними сполуками. Від периферії до центру розміри склереїд зменшуються, а клітинні оболонки стають більш пігментованими, потовщеними з чітко вираженою багатошаровістю (рис. 4, в–е).

Фенольний комплекс та інші активні метаболіти, що містяться в тканинах перикарпіїв плодів буряків, в певних умовах здатні виконувати функцію біохімічного тригера, який за високих концентрацій підтримує стан спокою насіння, а за низьких – стимулює їх проростання. На підставі отриманих результатів розроблено модель утворення ендое- та екзогенних біохімічних бар'єрів у перикарпіях плодів буряків цукрових (рис. 5).

Акумулюючись в тканинах мезо- і ендоекарпіїв плодів, біологічно активні речовини формують ендоегенні (тканинні) і екзогенні (фітогенні сфери) біохімічні бар'єри, екологічне значення яких полягає в активному регулюванні процесів пробудження насіння і пригніченні фітопатогенних мікроорганізмів на стадії формування проростків буряків цукрових.

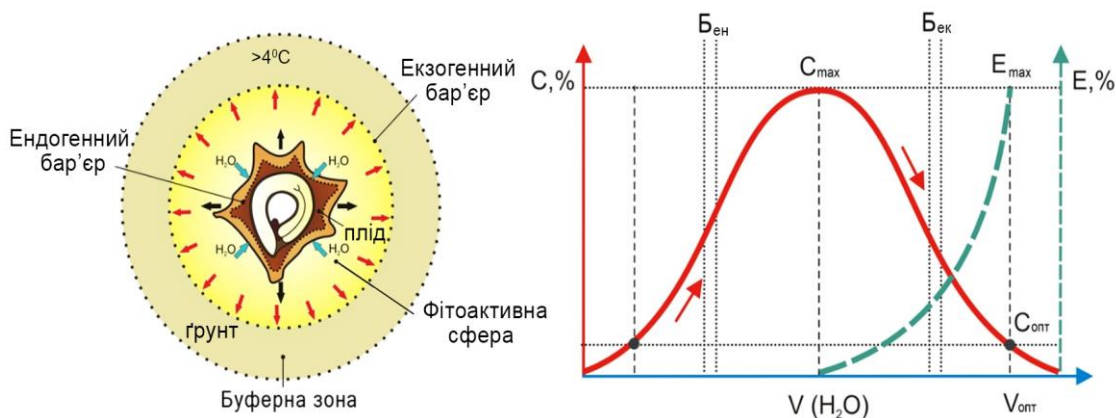


Рис. 5. Модель утворення ендогенних і екзогенних біохімічних бар'єрів, які перешкоджають розвитку патогенів усередині і навколо плоду буряків цукрових у результаті дифузії ендометаболітів: C – концентрація в тканинах розчинених ендометаболітів, (%); $V(H_2O)$ – об'єм води в тканинах плоду; E – енергія активації проростання насіння, (%); $B_{ен}$ – ендогенний (тканинний) бар'єр; $B_{ек}$ – екзогенний (фітогенний) бар'єр.

Розроблена модель за емпіричними даними знайшла підтвердження в процесі експериментальних випробувань при посіві плодів у ґрунт (рис. 6). При збільшенні їх кількості у одиниці об'єму ґрунту число колоній мікроорганізмів на твердому живильному середовищі зменшувалось (рис. 6, в–г). Схожість насіння зростала із підвищенням вологості ґрунту, а кількість колоній мікроорганізмів при цьому, навпаки, зменшувалась.

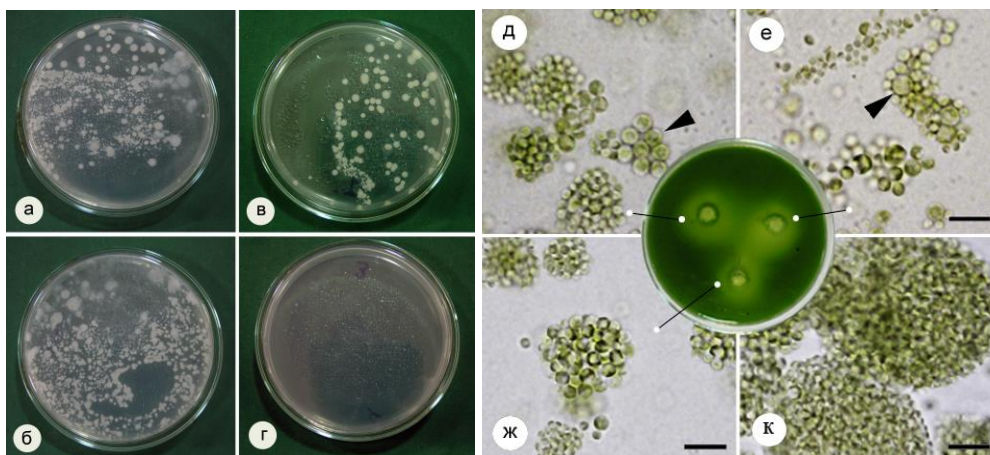


Рис. 6. Вплив водних екстрактів перикарпіїв на ґрунтові мікроорганізми і розмноження клітин хлорели: а, б – результати посівів ґрунтових мікроорганізмів у пробних зразках ґрунту; в, г – за умов внесення у ґрунт плодів буряків цукрових; д, е, ж – агрегації клітин хлорели за умов додавання екстрактів плодів; к – контроль.

В екстрактах із перикарпіїв плодів буряків цукрових містяться високоактивні інгібітори і стимулятори росту, які представляють комерційний інтерес й можуть бути використані як природні біологічно активні речовини.

Вивчення фізіолого-біохімічних особливостей буряків цукрових і деяких видів роду *Beta* L. Дикі форми буряків, як донори цінних генетично

обумовлених ознак, дедалі частіше використовують у селекційній практиці буряків цукрових (Буренин, 2007; Grimmer, 2008). Зокрема, листові форми мангольдів *Beta cicla* L. мають добре розвинену цукропровідну систему в коренеплоді. Дикий вид *Beta vulgaris* ssp. *maritima* L. може забезпечити нову генетичну мінливість для підвищення цукристості (Jolliffe, 1990). Встановлено, що дикий вид *Beta vulgaris* ssp. *maritima* L. характеризувався добре розвиненим листовим апаратом. Однак в сухій масі гички порівняно з культурними буряками переважала частка черешків – не фотосинтезуючих елементів листового апарату (Кірізій, 2002), яка становила ~ 50 %. У дикого виду *Beta cicla* L. просліджувалась невисока інтенсивність листоутворення, що призводило до зменшення площі листової поверхні. На відміну від культурних буряків, у листках диких видів спостерігалась значно нижча концентрація суми цукрів і уповільнювався їх відтік із черешків у коренеплід та формувались коренеплоди з низькими масою і цукристістю та високим рівнем накопичення речовин нецукрової природи (від 36,2 до 41,5 %). Виявлено істотну різницю за вмістом білкового азоту в листках протягом онтогенезу, показники якого були значно меншими та зростання величини фонду і окремих вільних амінокислот. Особливості досліджених ланок метаболізму диких форм буряків певною мірою визначають інтенсивність процесу росту рослин та цукронакопичення, що необхідно враховувати за умов залучення їх в селекційний процес.

Оцінка селекційного матеріалу та прогнозування гетерозису на ранніх етапах онтогенезу рослин буряків цукрових. Селекціонери зазнають труднощів особливо при доборах вихідних комбінаційноцінних матеріалів та прогнозуванні продуктивності на ранніх стадіях розвитку рослин. Встановлено, що з поміж досліджених 30-денних багатонасінних ліній-запилювачів, коли досягається їх генетична ідентичність і проявляється найінтенсивніша мінливість, гетерозисний компонент гібриду Ювілейний вирізнявся за характеристиками фотосинтетичного апарату, а саме: вмістом хлорофілів *a*, *b*, каротиноїдів, ФХА хлоропластів, низькими показниками товщини листової пластинки і розмірами її структурних елементів, відношенням величини РНК/ДНК і загального білка. Це супроводжувалось найвищою концентрацією сахарози в листках і корені, накопиченням маси сухої речовини рослин та величиною відношення маси кореня і гіпокотіля до маси листових пластинок, високою інтенсивністю темного дихання і зниженою активністю ферментів каталази та пероксидази. За визначеними показниками виявлено також істотні генотипні відмінності між диплоїдними багатонасінними сортами – кандидатами для створення гетерозисних ліній-запилювачів, що є важливим у процесі відбору їх родоначальних форм.

У результаті проведеної фізіолого-біохімічної оцінки інбредних ліній І₁–І₄ покоління львівської і верхняцької генплазм комбінаційноцінних за масою і цукристістю встановлено, що за дії інбридингу зменшується товщина листової пластинки внаслідок інгібування росту хлоренхіми (стовпчастої і губчастої паренхіми) – основної фотосинтетичної тканини листка. Вплив інбридингу на фотосинтетичну продуктивність реалізується і через хлоропластогенез (рис. 7).

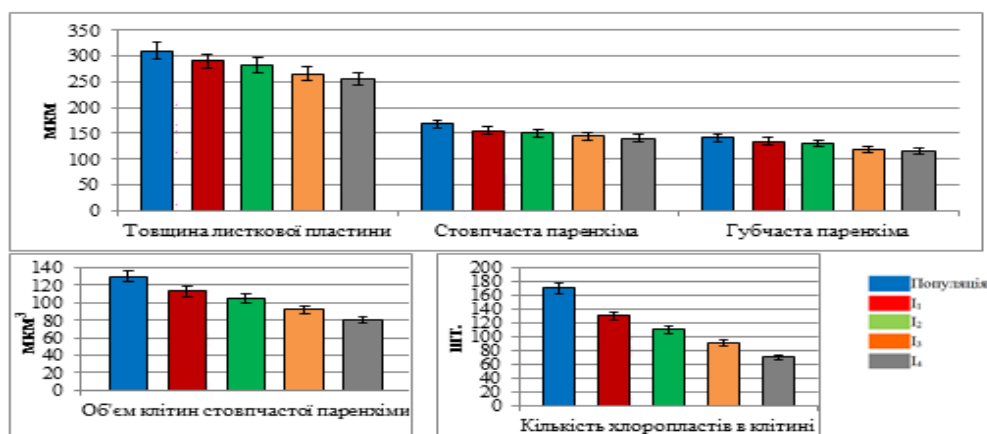


Рис. 7. Мезоструктурні показники листків інбредних ліній буряків цукрових льговської генплазми

При цьому у відповідності до глибини інбридингу знижуються показники ПМЛ, ФХА, вмісту хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів. Поряд з цим величина відношення хлорофілів *a/b* у інбредних ліній і вихідних гетерозиготних популяцій залишається постійною. Це свідчить, що зміни геному буряків цукрових в процесі селекції не зачепили функціонування системи біосинтезу хлорофілу і активності світлозбиральних комплексів фотосистем I і II.

В результаті досліджень на ранніх етапах онтогенезу рослин простих міжлінійних ЧС гібридів, одержаних за участю різних за комбінаційною здатністю ліній O-типу на фоні одного ЧС тестера встановлено, що у гібриду, одержаного від схрещування з комбінаційноцінною за цукристістю лінією Ot1, найбільший ефект гетерозису визначено за ознаками ФХА (+50,85 %) і кількістю сахарози в коренях (+9,16), між якими встановлено позитивну кореляційну залежність ($r=0,55\pm 0,03$) (табл. 1). Гібрид, створений від схрещування з комбінаційноцінною за масою коренеплоду лінією Ot2 вирізнявся позитивним гетерозисом за ПМЛ, інтенсивністю фотосинтезу і масою коренеплоду. Гібрид, одержаний від схрещування з лінією з низькою комбінаційною здатністю за масою і цукристістю коренеплоду Ot3 проявляв негативний гетерозис за цими ознаками (−11,24 і −9,5 % відповідно) та позитивний гетерозис за ПМЛ та інтенсивністю фотосинтезу.

Таблиця 1

Ефект гетерозису за низкою ознак у простих ЧС гібридів, %

Ознака	ЧС×Ot1	ЧС×Ot2	ЧС×Ot3	HP ₀₅
ФХА	50,85	−3,53	−2,67	7,0
ПМЛ	−8,46	4,70	3,76	3,5
ІФ	−3,54	20,93	14,28	8,5
Хлорофіл <i>a</i>	−18,95	−1,48	−6,69	8,7
Хлорофіл <i>b</i>	3,93	−16,00	−16,00	3,8
Каротиноїди	−6,79	−30,11	−25,39	5,5
Маса коренеплоду	−1,95	32,15	−11,24	10,0
Сахароза	9,16	−3,89	−9,56	1,1

За умов аналізу простих міжлінійних пробних гібридів, які створено в сортолінійних схрещуваннях за участю різних за комбінаційною здатністю

диплоїдних багатонасінних ліній-запилювачів на фоні одного ЧС-тестера, виявлено, що в усіх досліджених гібридних комбінаціях проявлявся позитивний гетерозис за вмістом хлорофілів ($a+b$), площею листової поверхні рослин і ПМЛ. При цьому коефіцієнт кореляції між величиною показників останніх становив $r=0,79\pm 0,01$. За ознакою ФХА тільки у однієї гібридної комбінації фенотипово проявлялось позитивне домінування, а в інших – негативний гетерозис, що очевидно пов'язано з материнським типом успадкування хлоропластів у буряків цукрових, оскільки величина ФХА у ЧС лінії була значно нижчою, ніж у ліній-запилювачів.

За вмістом сахарози в коренях, яка в сортолінійних схрещуваннях на 80 % залежить від комбінаційної здатності батьківських форм (Петренко, 1985), у різних гібридних комбінаціях проявлявся як позитивний, так і негативний гетерозис. Отже, досліджені показники можуть бути використані для характеристики комбінаційної здатності селекційних матеріалів буряків цукрових і прогнозування очікуваного гетерозису на початкових етапах селекційного процесу.

Формування і функціонування листового апарату та адаптивні можливості рослин буряків цукрових до затінення. На сьогодні увагу дослідників спрямовано на генетико-селекційну оптимізацію продукційного процесу буряків цукрових через зміну донорно-акцепторних відносин, які в системі цілісного організму регулюються в онтогенезі рослин шляхом інтенсифікації ростових процесів і фотосинтезу (Мокроносов, 1981; Кірізії, 2004). Вивчення динаміки росту і розвитку листового апарату гібридів буряків цукрових і їх компонентів показало, що найбільша площа поверхні життєдіяльних виростлих листків, у яких експортна функція проявляється після досягнення 50 % своєї остаточної величини (Giaquinta, 1980), формувалась у період інтенсивного цукронакопичення в коренеплодах і збільшення їх маси (75–120 діб), особливо у гібриду Уладівський ЧС 30 та його багатонасінного диплоїдного компонента і ЧС форми гібриду Льговсько-Верхняцький ЧС 21 (рис. 8).

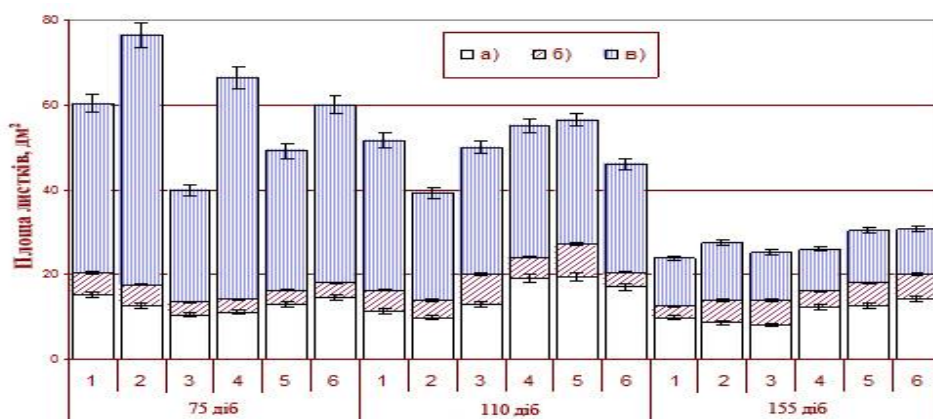


Рис. 8. Динаміка формування листового апарату гібридів буряків цукрових та їх компонентів: 1 – Льговсько-Верхняцький ЧС 21; 2,5 – ЧС-компонент; 3,6 – багатонасінний диплоїдний компонент; 4 – Уладівський ЧС30; а – молоді листки; б – старі листки; в – життєдіяльні листки, що завершили ріст.

Подовження періоду життєдіяльності старих листків у передзбиральний період, особливо у гібриду Уладівський ЧС 30 і його батьківських форм, свідчить їх тривале функціонування як донорів фотоасимілятів та посилення атрагувальної здатності коренеплодів, що спричинює формування високої цукристості. Максимум площі молодих листків у цей період, як і протягом вегетації, становив значну частку асиміляційної поверхні рослин у гібриду Льговсько-Верхняцький ЧС 21 і його багатонасінного диплоїдного компонента. Молоді листки, експортна функція яких ще не сформувалась, виступають по відношенню до коренеплоду конкурентами за асиміляти і не мають переваги в продуктивності рослин.

Окремі вікові групи листків і їх співвідношення на різних етапах онтогенезу рослин роблять різний внесок у накопичення маси сухої речовини, кількість якої залежно від дослідженого генотипу, відповідала питомій фотосинтетичній активності їхніх асимілюючих тканин, яку оцінювали за ПМЛ, вмістом хлорофілів *a* і *b*, розчинних вуглеводів і сахарози в листових пластинках та черешках. У середині вегетації (75 діб) у формуванні сухої маси рослин переважно беруть участь життєдіяльні і повністю сформовані листки, а в кінці періоду вегетації зазначений показник значно збільшувався за рахунок площі поверхні старих листків (рис. 9).

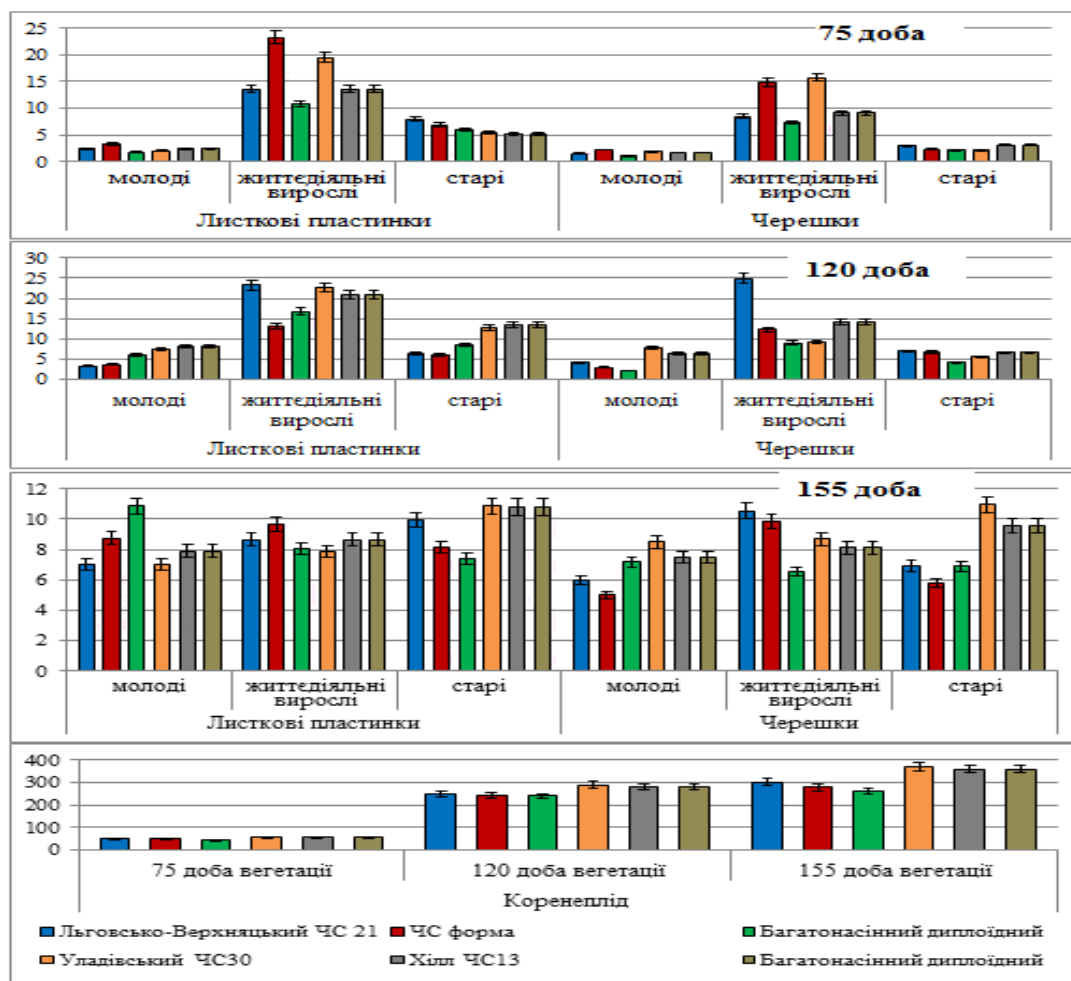


Рис. 9. Динаміка накопичення маси сухої речовини органами рослин буряків цукрових (г)

Генотипи з оптимальною динамікою донорно-акцепторних відносин характеризуються довговічним листковим апаратом, що сприяє раціональному використанню асимілятів на ріст коренеплодів і запасанню в них сахарози (рис.10).

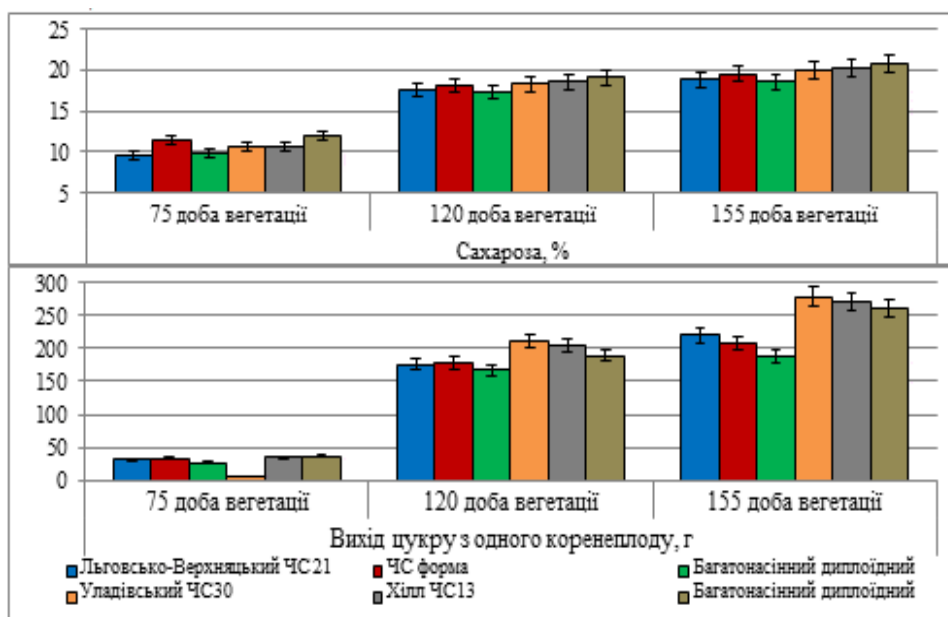


Рис. 10. Динаміка цукристості (%) та вихід цукру (г) з одного коренеплоду буряків цукрових

При використанні затінення, як методичного прийому виявлено як загальні фізіолого-біохімічні закономірності адаптивних змін листкового апарату та елементів продуктивності ЧС ліній, гібридів буряків цукрових та їх компонентів, так і значні генотипні відмінності. Встановлено чітку тенденцію до підвищення вмісту хлорофілів *a* і *b* та зниження їх співвідношення (*a/b*), що є ознакою набування фотосинтетичним апаратом тіншовитривалості. При цьому відповідно до напруженості стресового чинника (30 і 60 % світлового потоку) спостерігалось зменшення ПМЛ, сумарного вмісту альбумінів і глобулінів та простежувались істотні зміни у пулі водорозчинних вуглеводів листкових пластинок і черешків, вміст яких порівняно з контролем знижувався залежно від генотипу в межах 11,09–54,3 %. За умов затінення фотоасиміляти спрямовуються переважно на ріст листкового апарату рослин, площа поверхні якого наприкінці вегетації у досліджених генотипів у 1,5–2 рази перевищувала аналогічний показник у контрольних рослин.

Залежно від величини світлового потоку у досліджених генотипів суттєво знижувались темпи накопичення маси сирової і сухої речовини коренеплодів (від 21,3 до 53,2 %), що супроводжувалось збільшенням співвідношення гичка/коренеплід, зменшенням величини відношення маси коренеплоду до маси цілісної рослини і підвищенням частки маси сухої речовини черешків у масі гички. Оскільки у затінених рослин у другій половині вегетації подовжувався період формування листкового апарату, це обмежувало надходження фотоасимілятів у коренеплід і призводило до гальмування активності його ростових процесів та відкладання сахарози у запас (на

0,9–4,6 %), які у буряків цукрових відбуваються одночасно. Результати польових дослідів показали, що досліджені генотипи проявляли різну адаптивну стійкість проти умов загушення (за густоти 100 і 120 тис./га). У найстійкіших генотипів урожайність зростала в середньому на 4,3 т/га, а збір цукру – 0,77 т/га.

При створенні стійких проти загушення в умовах інтенсивних технологій вирощування гібридів буряків цукрових оцінку і відбір селекційних матеріалів необхідно проводити за найінформативнішими фізіолого-біохімічними показниками життєдіяльності рослин за дії затінення, добираючи потомства з меншою реакцією на зниження освітленості.

Взаємозв'язок між вмістом каротиноїдів у листках та формуванням цукристості і маси коренеплоду буряків цукрових. В останні роки значний інтерес представляють наукові дослідження щодо ролі каротиноїдів в оцінюванні селекційного матеріалу сільськогосподарських культур з врахуванням їх поліфункціональності (Терек та ін., 2008; Феденко та ін., 2013). Згідно експериментальних результатів, динаміка вмісту каротиноїдів у досліджених генотипів характеризувалась тенденцією до підвищеного накопичення їх загального пулу на ранніх етапах онтогенезу рослин. Надалі рівень накопичення каротиноїдів поступово знижувався, а починаючи з періоду інтенсивного цукронакопичення і до збору коренеплодів – підвищувався (рис. 11). Характер динаміки цукристості коренеплодів свідчить про поступове підвищення вмісту сахарози в коренеплоді водночас з ростом його маси.

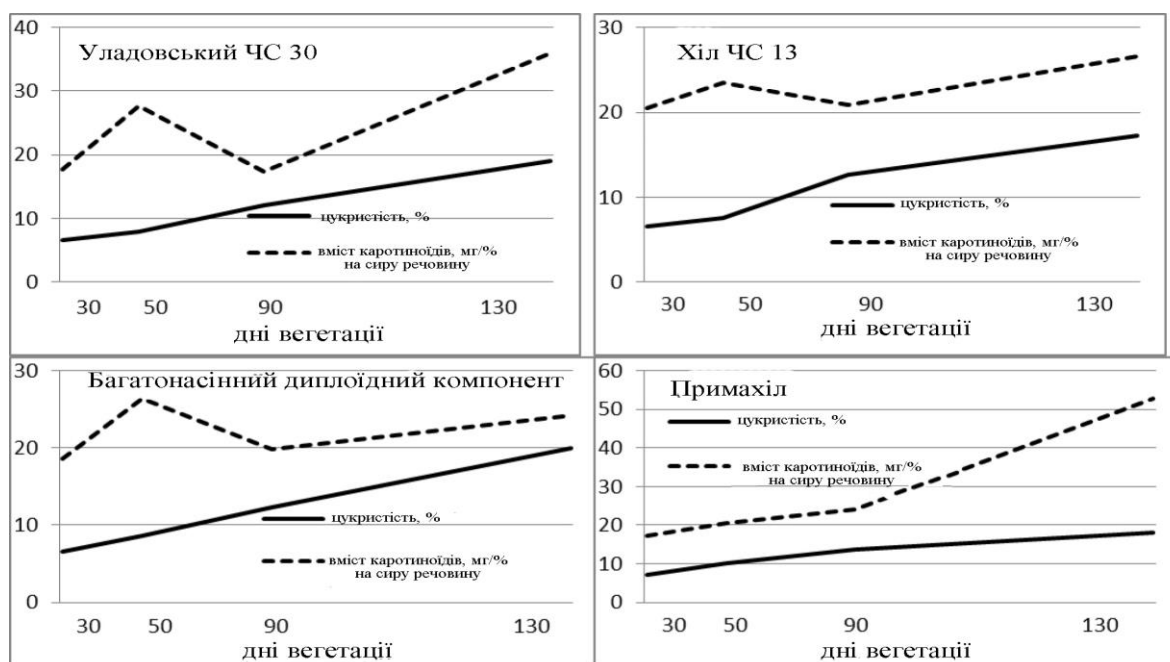


Рис. 11. Динаміка вмісту каротиноїдів у листках і накопичення сахарози в коренеплодах різних генотипів буряків цукрових.

Виявлено високий ступінь кореляції між вмістом каротиноїдів і цукристістю коренеплодів у різних генотипів буряків цукрових протягом вегетаційного періоду (рис. 12), яка виразніше апроксимувалась окремими залежностями для кожного вивченого генотипу та періоду спостереження.

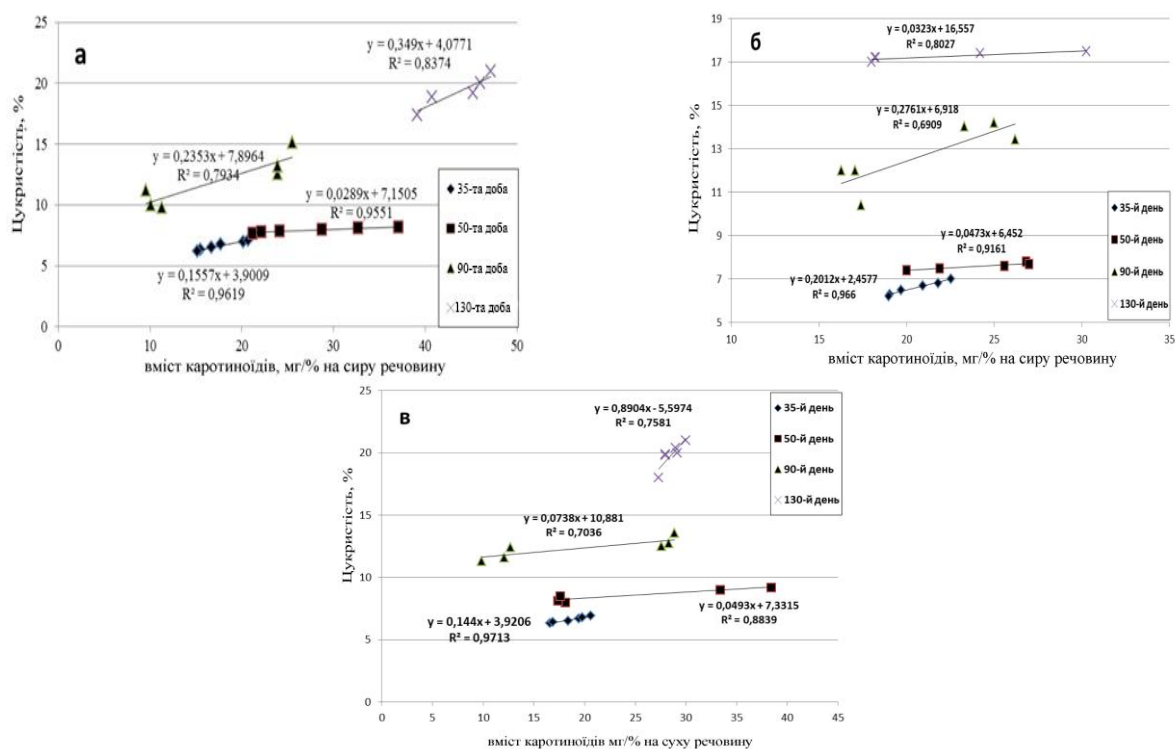


Рис. 12. Кореляційні залежності між вмістом каротиноїдів у листках і цукристістю коренеплодів різних генотипів буряків цукрових протягом вегетаційного періоду рослин: а – Уладівський ЧС 30; б – Хілл ЧС 13; в – багатонасінний диплоїдний компонент.

Найбільш тісний кореляційний зв'язок між досліджуваними показниками просліджувався на 35 добу вегетації рослин, про що свідчить коефіцієнт достовірності апроксимації 0,97. Разом з тим, між цукристістю коренеплодів і кількістю каротиноїдів у листках для масиву одержаних у різні періоди визначення експериментальних даних у гібриду Ювілейний встановлено тісний позитивний кореляційний зв'язок ($R=0,96$ на рівні достовірності 95 %) (рис. 13 а). Коефіцієнт кореляції між масою коренеплоду і вмістом каротиноїдів становив $R=0,90$ на рівні достовірності 95 % (рис. 13 б).

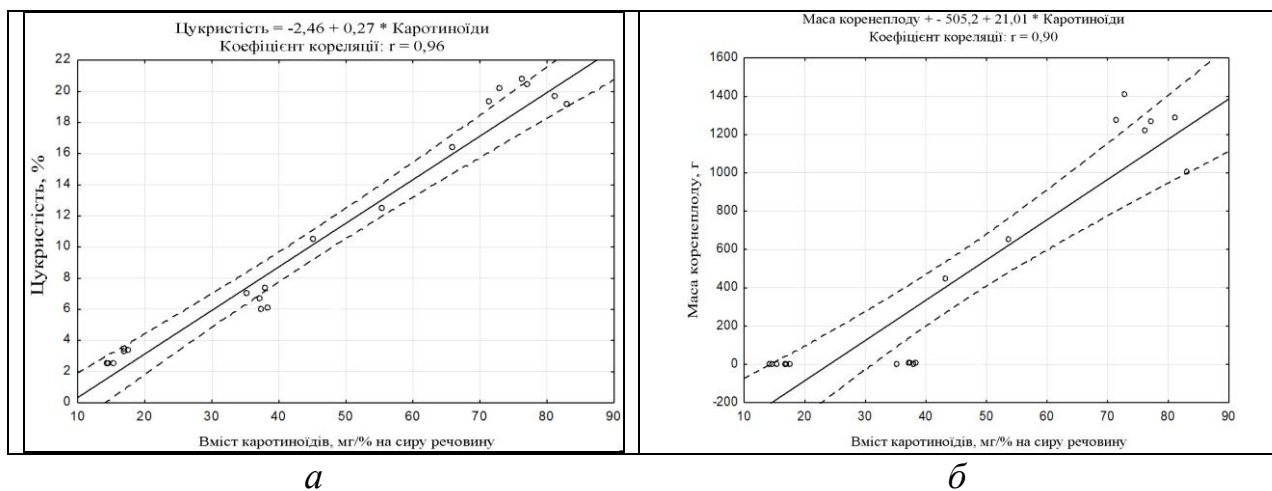


Рис. 13. а – кореляційно-регресійна залежність між вмістом каротиноїдів і цукристістю у гібриду Ювілейний; б – кореляційна залежність між вмістом каротиноїдів і масою коренеплоду у гібриду Ювілейний.

На рис. 14 наведено рівняння регресії між цукристістю коренеплодів і відношенням каротиноїди/хлорофіли, які достовірні на рівні 95 % і з достатньою точністю описують одержані експериментальні дані.

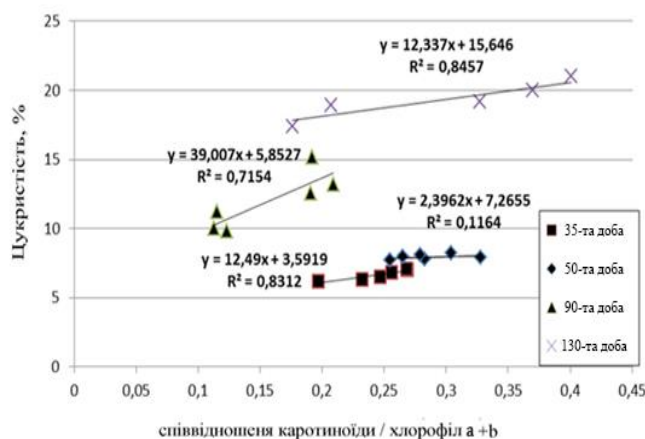


Рис. 14. Кореляційний взаємозв'язок між цукристістю коренеплодів і співвідношенням каротиноїди/хлорофіли на різних етапах вегетації у гібриду Уладівський ЧС 30

Виходячи із аналізу величин коефіцієнтів апроксимації (R^2), можна констатувати, що найбільш тісний кореляційний зв'язок між досліджуваними показниками проявлявся на 35, 90 і 130 добу вегетації рослин буряків цукрових.

Узагальнюючи отримані результати, можна дійти висновку, що показники загального вмісту каротиноїдів у листках і співвідношення каротиноїди/хлорофіли можуть бути використані в селекційному процесі буряків цукрових, як фізіологічні маркери для відбору на високу цукристість за умов створення високопродуктивних гібридів на ранніх етапах онтогенезу, а також для оцінки новостворених гібридів за рівнем цукристості та врожайності.

СТРУКТУРА ТА ЦУКРОНАКОПИЧУВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ КОРЕНЕПЛОДІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

За умов порівняльного анатомічного вивчення будови коренеплодів різних за цукристістю сортів і ЧС гібридів буряків цукрових встановлено значні сортоспецифічні особливості за макро- й мікроанатомічними індексами, які пов'язані з їх цукронакопичувальною здатністю. Показано, що відмінності між коренеплодами низько- і високоцукристих сортів і гібридів найчіткіше виражені за такими ознаками як кількість судин ксилеми і розмір флоєми. Позитивна залежність простежувалась також між рівнем цукристості і кількістю судинно-провідних пучків (СПП) на одиницю площі січення коренеплоду, кількістю кілець СПП та їх густотою. Меншою мірою проявлявся взаємозв'язок між підвищеною цукристістю і дрібноклітинністю зон міжкільцевої паренхіми. Гібридизація вносить значну корекцію в розвиток анатомічної структури коренеплодів. Диплоїдний гібрид Ювілейний порівняно з сортом Білоцерківський однонасінний 45 (табл. 2, 3) вирізнявся нижчою густотою кілець судинно-провідних пучків і їх кількістю на одиницю площі січення коренеплодів, меншою кількістю судин ксилеми, слабше розвиненою флоємою, більшими величинами ширини ксилеми і всіх зон міжкільцевої паренхіми (рис. 15 а).

Таблиця 2

Структура судинно-провідних пучків кілець коренеплодів сортів і гібридів буряків цукрових

Сорт, гібрид	Радіус, мм			Кількість кілець **СПП			Коефіцієнт щільності кілець СПП, шт./мм	Кількість СПП на 1 см січення кореня			Кількість судин ксилеми в СПП		
	кореня	3-го кільця	периферії	загальне	диференційованих	недиференційованих		1*	2	3	1	2	3
Білоцерківський однонасінний 45	42,8	23,4	19,4	13	9	4	0,30	16	19	24	30	20	13
Бійський однонасінний	41,0	24,5	16,5	9	7	2	0,21	9	11	12	20	15<	10
Ювілейний	44,0	26,8	17,7	11	8	3	0,25	12	14	20	25	21	15
Кавемайя	43,0	27,5	15,5	10	7	3	0,23	9	10	13	26	18	13
НІР ₀₅	0,9	0,5	0,6					1,8	1,6	1,2	1,1	1,3	1,1

Примітки: *1–3 – номер кільця; **СПП – судинно-провідні пучки.

Таблиця 3

Особливості анатомічної структури, цукристість і вміст сухої речовини коренеплодів сортів і гібридів буряків цукрових

Сорт, гібрид	Ширина зон, мкм			Діаметр клітин, мкм			Ширина, мкм						Сахароза, %	Вміст сухої речовини, %
	міжкільцевої паренхіми			міжкільцевої паренхіми			ксилеми			флоеми				
	1–2*	3–4	5–6	1–2	3–4	5–6	1	3	5	1*	3	5		
Білоцерківський однонасінний 45	4279	3384	1598	165	135	97	2098	1758	1182	846	826	746	19,3	26,1
Бійський однонасінний 50	4862	3763	1849	173	128	84	1931	1099	533	557	513	333	16,9	23,4
Ювілейний	5511	3530	1915	176	139	88	2554	1718	869	776	666	623	18,5	25,7
Кавемайя	5927	3773	2171	195	151	110	2058	1415	750	766	500	472	17,8	24,9
НІР ₀₅	112	97	63	3	2	3	96	71	47	53	49	16	0,5	

Примітка. *1–6 – номер кільця

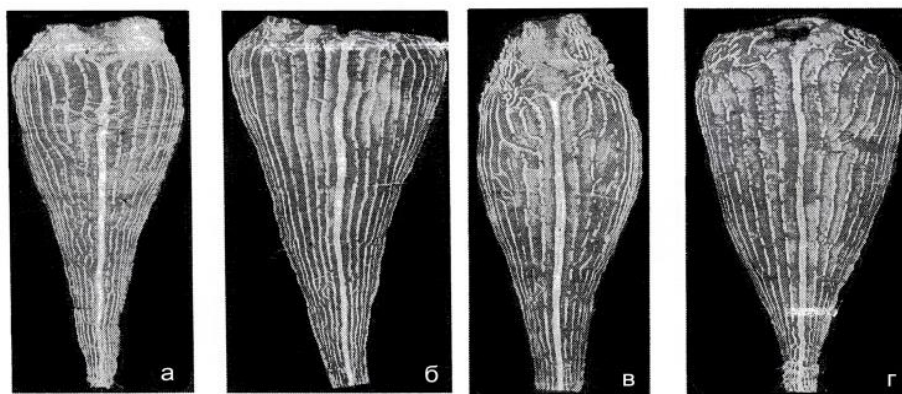


Рис. 15. Повздовжній розріз коренеплодів буряків цукрових: *а* – гібрид Ювілейний; *б* – Білоцерківський однонасінний 45; *в* – Бійський однонасінний 50; *г* – Кавемая.

Характерною особливістю більш низькоцукристого триплоїдного гібриду Кавемая є посилене розростання внутрішніх паренхімних зон (рис. 15 г), менша кількість судин ксилеми і СПП та найменша ширина периферійної зони (табл.3), що підтверджує його скоростиглість.

У табл. 4 показано розподіл сахарози в зонах міжкільцевої паренхіми і зонах СПП у високоцукристого сорту Білоцерківський однонасінний 45 та тканинах периферії. Найчіткіші відмінності між низько- і високоцукристими коренеплодами генотипів буряків цукрових за умов проведення вегетаційних та польових досліджень за різної густоти насадження рослин виявлено за такими структурними індексами як густина розміщення кілець СПП і їх кількість на одиницю площі січення коренеплоду, розміри флоєми й середня кількість судин ксилеми, що підтверджено наявністю позитивного кореляційного зв'язку між цими ознаками і цукристістю.

Таблиця 4

Розподіл сахарози (%) в коренеплодах буряків цукрових сорту Білоцерківський однонасінний 45

Зони коренеплоду по довжині	Паренхіма зірочки	*1		2		3		4		5		Тканини периферії
		**СПП	Паренхіма	СПП	Паренхіма	СПП	Паренхіма	СПП	Паренхіма	СПП	Паренхіма	
Шийка	15,4	17,8	17,1	18,4	18,0	18,6	18,4	18,8	19,0	19,4	19,8	19,0
Верхня частина кореня	16,2	18,0	17,8	19,0	18,9	19,6	19,4	20,2	20,4	20,6	20,8	19,6
Нижня частина кореня	16,3	17,5	17,1	18,0	18,2	18,3	18,0	19,0	19,4	19,9	20,2	19,4
Хвостова частина	–	–	–	17,8	18,0	18,0	18,2	–	–	–	–	18,4
НІР ₀₅	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,01	0,9

Примітки: *1–5 – номер кільця; **СПП – судинно-провідні пучки.

Встановлений комплекс анатомічних ознак коренеплодів, які пов'язані з їх цукронакопичувальною здатністю, а саме: коефіцієнт густоти кілець СПП,

кількість СПП і судин ксилеми на 1 см січення коренеплоду та ширина флоєми може бути використаний для диференціювання і відбору селекційних матеріалів буряків цукрових на високу цукристість.

ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ЛИСТКОВОГО АПАРАТУ ТА КОРЕНЕПЛОДІВ ГЕНОТИПІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

За багаторічними результатами вивчення хімічного складу різних за цукристістю сортів і гібридів буряків цукрових встановлено сортову специфічність їх накопичення в коренеплодах і розподіл в морфологічних частинах. Високоцукристі генотипи відрізнялись менш інтенсивним накопиченням золи і макроелементів N, P, K, Na, а також зниженим їх вмістом у морфологічних частинах коренеплоду, де найвища їх концентрація була у низькоцукристій головці (рис. 16). Визначено розподіл основних макро- і мікроелементів у різних сегментах головки в зв'язку з концентрацією сахарози (табл. 5).

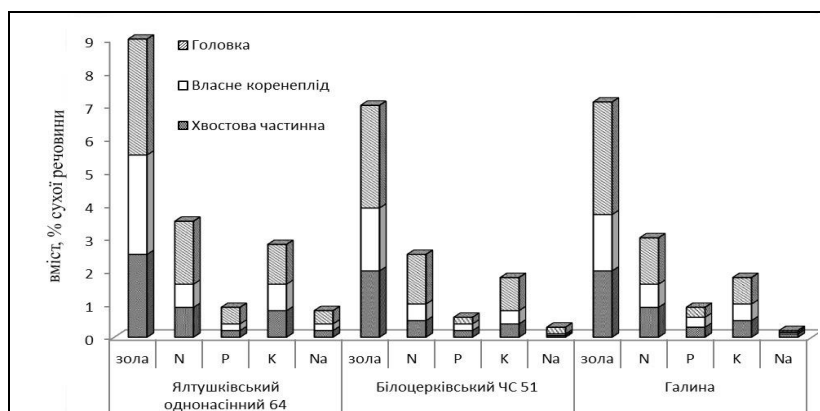


Рис. 16. Розподіл золи і макроелементів в морфологічних частинах коренеплодів буряків цукрових. $HP_{05} = 0,1$

Таблиця 5

Вміст золи та макро- і мікроелементів у сегментах головки гібридів буряків цукрових

№ сегмента	Величина сегмента, мм	Сахароза, % маси сирої речовини	% маси сухої речовини					мг/кг					
			Зола	N	P	K	Na	Ca	Mg	Zn	Cu	Mn	Fe
Галина													
1	0-5	8,14	5,30	2,07	0,23	1,14	0,26	0,62	0,96	2,49	1,71	5,22	23,75
2	15	10,52	4,12	1,67	0,21	0,58	0,20	0,55	0,83	2,17	1,49	6,07	19,41
3	25	11,93	3,97	1,59	0,19	0,53	0,18	0,49	0,74	1,45	1,29	6,59	17,43
4	35	13,95	3,47	1,23	0,17	0,49	0,10	0,41	0,40	1,05	1,14	6,95	16,19
5	50	15,85	2,55	1,16	0,14	0,41	0,08	0,35	0,33	0,89	1,00	7,47	15,31
HP_{05}		0,60	0,19	0,07	0,01	0,03	0,01	0,02	0,03	0,08	0,06	0,32	0,92

При дослідженні вмісту золи і основних макро- і мікроелементів в тканинах кілець СПП і зон міжкільцевої паренхіми в різних морфологічних частинах на повздовжньому й поперечному розрізах коренеплодів вперше

показано їх розподіл в зв'язку з локалізацією сахарози, який обумовлюється генотипними особливостями буряків цукрових. Встановлено високі негативні коефіцієнти кореляції між вмістом золи та макро- і мікроелементів і цукристістю коренеплодів, величина яких залежить від концентрації окремого хімічного елемента.

За умов затінення вміст загальної золи, N, P, K, Na в листових пластинках, черешках і коренеплодах досліджених генотипів буряків цукрових значно зростає відповідно до ступеня зменшення світлового потоку під екранами. Найістотніше підвищення їх кількості відмічалось у більш низькоцукристих гібридів та їх компонентів. Установлені закономірності вмісту та розподілу золи і основних макро- і мікроелементів та сахарози в тканинах коренеплодів різних генотипів буряків цукрових дозволяє використовувати їх для поліпшення хімічного складу і технологічної якості коренеплодів селекційними методами.

Показано, що досліджені сорти і гібриди буряків цукрових відрізнялись за селективністю щодо поглинання й акумуляції нітрат-іону в коренеплодах, яка коливалась залежно від генотипу в межах від 35 до 190 мг/кг. На підставі визначення активності ферменту нітратредуктази у листках буряків цукрових встановлено розмір метаболічного фонду нітратів, що майже не збільшувався при внесенні підвищених доз азотних добрив в процесі вегетації рослин і залежно від генотипних особливостей становив 17,1–22,4 % від їх загального вмісту.

Отже, при створенні гібридів буряків цукрових їх оцінку необхідно проводити за величиною метаболічного фонду, яка відображає реальну інтенсивність асиміляції клітиною нітратів і є генетично детермінованою ознакою (Овчаренко и др., 1993). Відсутність або недооцінка цієї інформації призводить до нераціонального застосування доз і строків внесення азотних добрив і надлишкового накопичення нітратів, між вмістом яких і цукристістю коренеплодів встановлено високу негативну кореляційну залежність.

Виявлено значні генотипні відміни за вмістом пектинових речовин в коренеплодах буряків цукрових залежно від ареалу їх вирощування в різних зонах бурякосіяння України. При проведенні порівняльної комплексної оцінки технологічної якості коренеплодів районуваних сортів і гібридів буряків цукрових за умов зберігання встановлено, що у гібридів зарубіжної селекції значно більше нагромаджувалось редуруючих цукрів і розчинних азотистих речовин. Це негативно впливало на чистоту соку, вміст цукру в мелясі і стійкість до фітопатогенних мікроорганізмів. Кількість гнилої маси у останніх досягала 3,6–7,0 % проти 0,3–0,4 % у вітчизняних гібридів, а частка загнилих коренеплодів становила 33,2–53,4 %.

МОЛЕКУЛЯРНІ І ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

У селекційно-наукових дослідженнях буряків цукрових все більше застосування знаходять методи, засновані на ПЛР-ампліфікації ДНК, які дозволяють проводити ідентифікацію і диференціацію різних генотипів (видів,

сортотипів, ліній, гібридів) (Роїк, 2007; Smulders, 2010; Федулова, 2014). У результаті проведених досліджень з використанням маркерних систем та підібраних праймерів виявлено молекулярно-генетичний поліморфізм сорту та гібридів буряків цукрових, визначено специфічні алелі для ідентифікації генотипів і встановлено їх генетичну подібність. За маркерними даними RAPD-аналізу відповідно до генетичних дистанцій за допомогою кластерного аналізу досліджені генотипи було об'єднано в чотири кластери (рис. 17 А). Згідно результатів ідентифікованого молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітного локусу GZM 086 встановлено наявність двох генетично віддалених груп генотипів (рис. 17 Б). Отже, досліджені молекулярно-генетичні маркери можна використовувати для ідентифікації сортів і гібридів буряків цукрових при сертифікації партій насіння та захисту авторських прав селекціонерів.

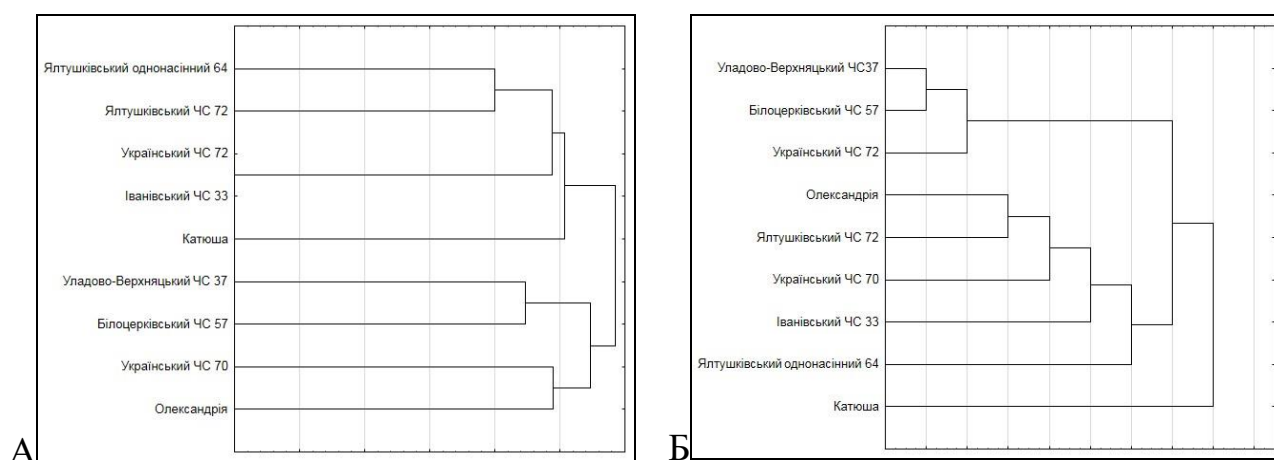


Рис. 17. Результати кластерного аналізу різних генотипів буряків цукрових: А – дендрограма розподілу згідно генетичних дистанцій, розрахованих за даними RAPD-аналізу; Б – дендрограма генетичних відстаней за SSR-маркером.

В умовах *in vitro* у вегетативних органах рослин-регенерантів буряків цукрових відбувається накопичення вторинних метаболітів, в тому числі фенолкарбонових кислот, флавоноїдів і сапонінів, які відіграють важливу роль у формуванні конституційної стійкості рослинного організму і його адаптивності до несприятливих факторів навколишнього середовища.

Встановлено, що вміст сапонінів в екстрактах листків рослин-регенерантів гібридів Уладово-Верхняцький ЧС 37 і Атаманша в середньому у 2–3 рази перевищував цей показник у сорту Ялтушківський однонасінний 64 (стандарт) (рис. 18). Необхідно відзначити, що відносний вміст тритерпенових сапонінів з $R_f=0,32$ і $0,35$ для всіх досліджених зразків був стабільним і практично не залежав від генотипу.

Враховуючи абсолютно ідентичний склад живильних середовищ та однаковий фото- і терморезим культивування рослин в умовах *in vitro* тритерпенові сапоніни з електрофоретичною рухомістю $R_f = 0,56$ та $0,62$ є біохімічними маркерами, які визначають адаптивний потенціал рослин-регенерантів і можуть бути використані для первинної діагностики селекційних матеріалів.

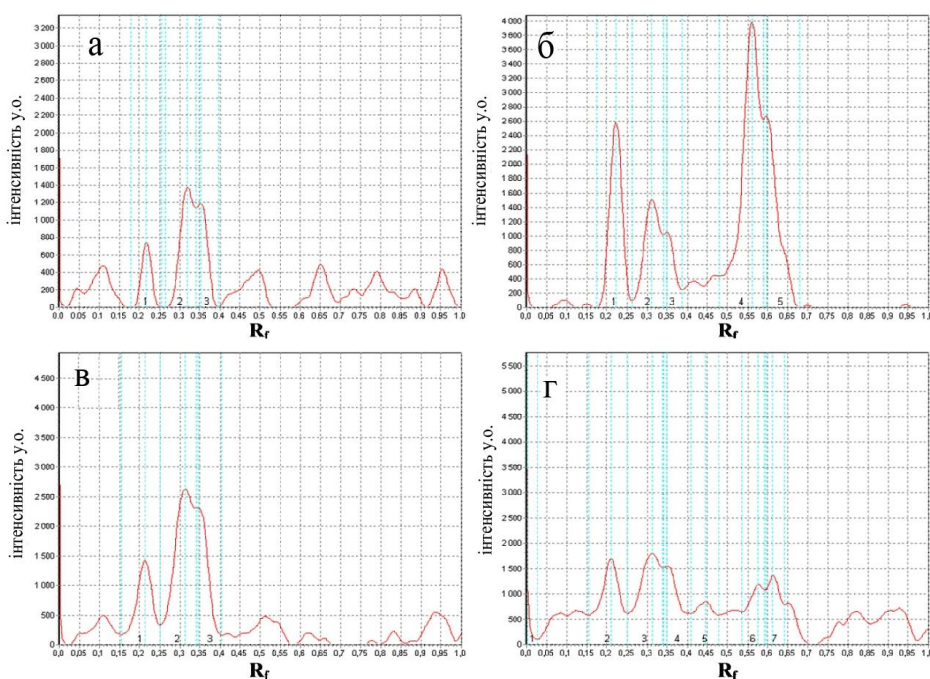


Рис. 18. Денситограма тритерпенових сапонінів листків буряків цукрових, які розділено методом ТШХ: а) сорт Ялтушківський однонасінний 64; б) гібрид Уладово-Верхняцький ЧС 37; в) гібрид Олександрія; г) гібрид Атаманша.

ГАПЛОЇДІЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ТА ВИКОРИСТАННЯ ЇЇ В СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ РІПАКА

Отримання гаплоїдів та дигаплоїдів ріпака озимого та ярого. Для забезпечення ембріогенезу із мікроспор, ізольованих із суцвіть різних генотипів ріпака ярого та озимого, було застосовано ступінчасту передобробку ізольованих бутонів зниженими (+4 °С протягом 36 год) і підвищеними температурами (+22 °С протягом 21 доби та +30 °С – 10, 14, 21 діб), що завершувало процес диференціації. Для індукції ембріогенного розвитку незалежно від генотипу оптимальною була температура +30 °С за тривалості культивування упродовж 21 доби. Регенераційна здатність отриманих ембріодів обумовлювалась вихідним генотипом (табл. 6). Одержані укорінені гаплоїдні рослини-регенеранти з нормальною гео- і фототропічною реакцією переводили на диплоїдний рівень ($2n=38$) за допомогою дії водного розчину 0,1 % колхіцину на кореневу систему при експозиції 4 год та визначали рівень плоїдності. Отримані рослини-регенеранти висаджували в ґрунт і перед цвітінням поміщали під ізолятори. В 50 % випадків у дигаплоїдних рослин формувались фертильні квітки з подальшим дозріванням насіння.

На основі одержаних методом культури пилку *in vitro* дигаплоїдів у співавторстві створено ранньостиглий сорт ріпака озимого Антарія (Авторське свідоцтво № 06113, 2006 р.) та середньостиглий сорт ріпака ярого Аіра (Авторське свідоцтво № 05120, 2005 р.).

Основним природним джерелом утворення гаплоїдів є апоміктичне розмноження. Одним з методів пошуку рослин ріпака, схильних до апоміксису є здатність квіток після кастрації до утворення насіння під ізоляторами. Із 40 досліджених сортів ріпака ярого в польових умовах було виявлено 9 генотипів,

із яких лише у п'яти сортів в умовах *in vitro* на розроблених живильних середовищах (найефективнішим було середовище МС з додаванням 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК і 0,05 мг/л ГК₃), ізольовані маточки росли протягом 40–50 діб (рис. 19), тоді як маточки квіток інших сортозразків за таких умов не розвивались.

Таблиця 6

Регенерація рослин із пилкових ембріодів генотипів ріпака ярого і озимого

Сорт, гібрид	Висаджено ембріодів, що регенерують, шт.	Частота коренеутворення, шт.	Частота морфогенетичних реакцій, %
Форте	415	211	50,8
Квантум	460	186	40,4
Марія	510	307	60,2
Форте × Квантум	280	163	37,6
Тисменецький	180	150	83,3
Карина	190	135	71,1
НІР ₀₅		5,6	1,2

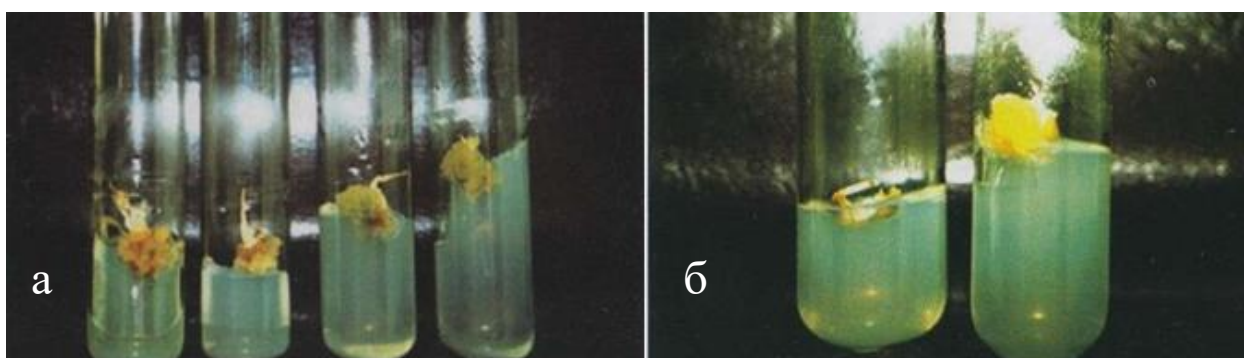


Рис. 19. Ріст і розвиток калюсних тканин маточок сортів ріпака ярого: а – Марія; б – Форте.

Отже, даний метод є перспективним для виявлення апоміктичних форм ріпака з елементами регулярного апоміксису в умовах *in vitro* для використання в практичній селекції ріпака.

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ І РІПАКА НА СТІЙКІСТЬ ПРОТИ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Стійкість – це кінцевий результат адаптації, що є генетично детермінованою ознакою процесів формування захисних систем організму, які забезпечують підвищення резистентності та перебіг онтогенезу в раніше не сприятливих до цього умовах (Чиркова, 2002). Відомо, що сорти і гібриди буряків цукрових та ріпака створені на близькоспоріднених матеріалах і відрізняються звуженою генетичною основою, що перешкоджає збереженню в них стійкості проти несприятливих чинників довкілля абіотичної природи. На сьогодні одним із перспективних напрямів, які дають можливість створювати нові форми основних сільськогосподарських культур, толерантних проти стресових чинників, є клітинна селекція, теоретичну основу якої становить морфогенез *in vitro*.

Калюсогенез і морфогенез буряків цукрових. У літературі наявні нечисленні і вкрай суперечливі відомості щодо ініціації утворення морфогенних зон у калюсах буряків цукрових - із клітин верхніх епідермальних шарів експлантатів або із глибоко розташованих тканин (Schneider et al., 1999). У результаті досліджень з'ясовано особливості утворення меристемоїдів у калюсних тканинах буряків цукрових і визначено специфіку трансформації клітин в морфогенних зонах. За оптимальних умов культивування утворюються дрібні густоплазмові клітини, які ініціюють формування меристемоїдів. При дослідженні морфогенного калюсу буряків цукрових показано, що функціонально активні меристемоїди утворювались на поверхні і усередині калюсних тканин (рис. 20 а, г).

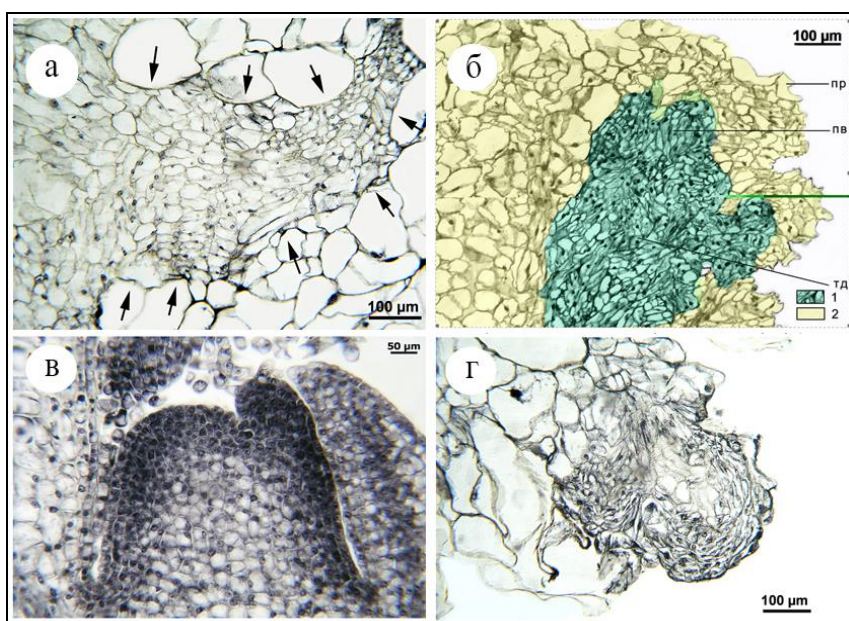


Рис. 20. Диференціація клітин у калюсах гібриду Ялтушківський ЧС 72 в умовах *in vitro*: а – проваскулярна зона калюсу в оточенні лігніфікованих клітин паренхіми (стрілками позначено зону відкладення компонентів лігніну); б – формування морфогенних модулів у калюсі гібриду Український ЧС 70: 1 – морфогенний модуль з проваскулярними тяжами; 2 – паренхіматозні клітини калюсу; пр – паренхіма; пв – проваскулярні клітини; тд – трахеїдоподібні елементи (гідроцити); в – пазушна апікальна меристема; г – меристемоїдна структура, що сформувалась на поверхні калюсу третього пасажу гібриду Уладово-Верхняцький ЧС 37.

Проте формування нових упорядкованих клітинних структур не завжди завершувалось розвитком аксіальних органів, гемо- чи ризогенезом. Первинні меристемоїдні зони морфогенного калюсу складаються з групи 4–5 дрібних (12–15 мкм) щільнозімкнених клітин, розвиток яких залежав від складу живильного середовища, просторового положення експлантату, функціонального стану і конституційних властивостей клітин, які їх оточують та генотипу. За умов диференціації клітин за васкулярним типом у морфогенних структурах утворюються видовжені клітини – гідроцити, в яких поступово формувались сітчасті та спіральні потовщення вторинних клітинних

стінок. Зокрема, у периферійних зонах калюсів гібриду буряків цукрових Український ЧС 70 (рис. 20, г) у клітинах паренхіми відмічалось значне збільшення об'ємних показників її структурних елементів. На відміну від клітин проваскулярних тяжів цей процес відбувався відносно рівномірно в усіх напрямках.

За оцінкою цитометричних показників виявлено суттєву різницю між клітинами периферійної паренхіми і клітинами проваскулярних тяжів, апікальних меристем та верхівкових меристемоїдів. За просторово-структурною організацією морфогенні зони в системі калюсних тканин буряків цукрових можна розглядати як окремі модулі (рис. 20, б), кожний з яких частково або повністю відокремлений від неморфогенної зони калюсу крупними паренхімними клітинами із розвиненими вторинними клітинними стінками. Далі реалізація морфогенного потенціалу структур, які утворені *de novo*, залежала від умов культивування культури та функціональної активності меристемоїдних зон. Отже, утворення високодиференційованих морфогенних структур з розвиненою системою гідроцитів на поверхні або усередині калюсних тканин започатковано з формування модулів групою дрібних, щільнозімкнених густоплазмових клітин.

КОМПЛЕКСНА СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* НА СТІЙКІСТЬ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ ПРОТИ ПОСУХИ ТА ЗАСОЛЕННЯ

У результаті проведення клітинної селекції *in vitro* на комплексну стійкість проти посухи і сульфатного засолення отримано калюсні лінії та рослини-регенеранти буряків цукрових за сублетальної концентрації ПЕГ6000 – 20 % та Na₂SO₄ – 2,0 %. В листках буряків цукрових за дії комплексного стресу відбувались суттєві зміни функціональної активності ферменту СФС, які носять сортоспецифічний характер. Це знаходить підтвердження у формуванні цукристості коренеплодів за умов *in vivo*, яка коливалась залежно від генотипу в межах 15,8–17,2 % і знижувалась відносно контрольних рослин на 0,2–0,6 %, що свідчить про можливість їх використання у практичній селекції.

Довготривале культивування рослин-регенерантів буряків цукрових. Встановлено специфічні та неспецифічні якісні і кількісні зміни у регенерантів, що довготривало культивувались в умовах *in vitro* за концентрацією фотосинтетичних пігментів (хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів), активності ферментів аніонних пероксидаз і вмістом фенольних сполук, які відіграють важливі регуляторні і захисні функції та виявлено значні генотипні відмінності за дослідженими показниками (табл. 7).

Проведено кластерний аналіз спорідненості досліджених генотипів за якісним біохімічним станом метаболічного профілю і виявлено їх особливості щодо формування екологічної пластичності рослин, що має важливе значення для підвищення ефективності селекційного процесу буряків цукрових.

Калюсогенез і морфогенез ріпака озимого та ярого. У проведених дослідженнях з отримання калюсної тканини різних генотипів ріпака ярого вивчали залежність цього процесу від первинного експлантату, в якості якого було використано сегменти пагона 12–14-добових рослин, які поміщали на

живильне середовище МС, доповнене: 0,5–2 мг/л НОК, 0,5–1,5 БАП та 0,05–0,2 мг/л ГК₃. Через декілька тижнів культивування в темряві експлантати проліферували калюсну тканину (табл. 8).

Таблиця 7

**Вміст і співвідношення фенольних сполук у листках генотипів
буряків цукрових *in vitro***

Сорт, гібрид	Фенольні сполуки, мг/г			
	Фн	Фл	Фл/Фн, %	Кт
Білоцерківський однонасінний 45	59,5±2,27	6,3±0,32	10,6±0,11	9,0±0,45
Ялтушківський однонасінний 64	8,2±0,51	0,51±0,03	6,2±0,06	1,7±0,09
Іванівський ЧС 33	35,0±1,70	2,0±0,10	5,8±0,06	13,6±0,68
Уладово-Верхняцький ЧС 37	26,6±1,23	1,7±0,09	6,4±0,06	6,5±0,33
Український ЧС 70	30,0±1,57	1,4±0,07	4,8±0,05	23,4±1,17
Іванівсько- Веселоподільський ЧС 84	10,6±0,53	2,0±0,10	18,9±0,19	2,4±0,12
Олександрія	48,9±2,05	6,8±0,34	13,9±0,14	13,5±0,68

Примітки: Фн – феноли; Фл – флавоноїди; Кт – катехіни.

Таблиця 8

**Залежність калюсогенезу ріпака від вмісту регуляторів росту
в живильному середовищі**

№ варіанту	Склад живильного середовища	Кількість експлантатів		Маса калюсу, г	Морфотипи калюсу
		висаджено, шт.	що утворили калюс, %		
1	МС + 0,5мг/л БАП + 0,5мг/л НОК + 0,05 мг/л ГК ₃	40	100	0,92±0,04	щільний із зеленими ділянками
2	МС + 1мг/л БАП + 1 мг/л НОК + 0,1 мг/л ГК ₃	40	100	0,59±0,02	- // -
3	МС + 2мг/л БАП + 1 мг/л НОК + 0,2 мг/л ГК ₃	40	100	0,28±0,01	світлий, пухкий

Максимальну здатність до пагоноутворення на середовищі МС, з додаванням 0,5 мг/л БАП проявляли експлантати сім'ядолей 2–3-денних проростків ріпака ярого із довжиною черешка 2 мм. Отримані маточні рослини живцювали через 3–4 тижні і висаджували на середовище М-С, яке містило БАП у концентрації 2 мг/л (рис. 21). За умов вивчення регенерації ріпака озимого як експлантат використовували гіпокотилі і сім'ядолі. Регенерація пагонів відбувалась двома шляхами – непрямого і прямого органогенезу. При висадженні експлантатів на живильне середовище МС, доповнене 2–3 мг/л БАП та 0,1–0,9 мг/л НОК просліджувався непрямий органогенез з утворенням щільної калюсної тканини із значною кількістю меристематичних зон, з яких у подальшому формувались бруньки.

Розроблений спосіб отримання *in vitro* рослин ріпака ярого та озимого може бути використаний у традиційній селекції ріпака ярого і озимого і слугувати основою для розмноження селекційного матеріалу при створенні нових сортів.

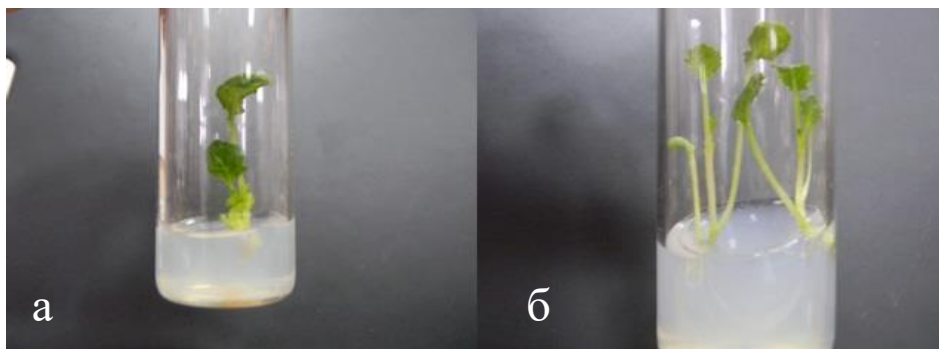


Рис. 21. Рослини-регенеранти, які отримані із сформованих калюсів сім'ядолі ріпака: а – ярого сорту Марія, б – озимого сорту Карина.

Клітинна селекція *in vitro* на стійкість ріпака ярого та озимого проти посухи та низьких температур. З поширенням ареалу вирощування ріпака в різних агрокліматичних зонах України важливою проблемою є підвищення посухо-, холодо- та морозостійкості рослин. Успішне вирішення цієї проблеми великою мірою залежить від наявності ефективних методів діагностики і джерел високої стійкості вихідного матеріалу для селекції. Було проведено попередню оцінку сортів ріпака фізіологічними методами на стійкість проти посухи та низьких температур. При одержанні в культурі *in vitro* ліній ріпака озимого і ярого, стійких проти посухи встановлено, що 12 % концентрація ПЕГ 6000 та 17 % концентрація манітолу можуть бути селективними агентами, при дії яких виявлено істотні генотипні відмінності за зменшенням приросту калюсної маси на 50 % і більше. В результаті було виділено сім ліній ріпака ярого і п'ять ліній ріпака озимого.

Для отримання холодостійких ліній ріпака ярого проводили холодове ушкодження калюсних тканин за температури $+1\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 6 год з подальшим культивуванням при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 14 діб. При створенні морозостійких ліній ріпака озимого за аналізом ступеня ушкодження калюсних тканин низькими температурами виявлено, що найкраща диференціація за відносним приростом калюсної маси відбувалась при температурі $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ і експозиції протягом 5 год. В результаті досліджень були відібрані морозостійкі калюсні лінії із сортів ріпака Аліот, Декатлон, Синтетік і отримані рослини-регенеранти.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі виявлено найінформативніші фізіолого-біохімічні показники листкового апарату, анатомічні індекси коренеплодів та закономірності розподілу в них золи і основних макро- і мікроелементів, які пов'язані з цукристістю і формуванням продуктивності буряків цукрових, що може слугувати підґрунтям для підвищення ефективності селекційного процесу. Розроблено нові і удосконалено існуючі біотехнологічні методи для отримання гаплоїдних рослин ріпака та ліній, стійких проти стресових чинників середовища абіотичного типу буряків цукрових та ріпака озимого і ярого, що уможливує збільшення генетичного різноманіття їхніх селекційних матеріалів.

1. Розроблено модель утворення ендо- і екзогенних біохімічних бар'єрів, які перешкоджають розвитку патогенів усередині і навколо плоду буряків цукрових у результаті дифузії ендометаболітів. Встановлено, що адаптивними показниками проростання насіння і росту та розвитку проростків буряків цукрових є загальний вміст водорозчинних фенолів, тритерпенових сапонінів та інших біологічно активних сполук у перикарпіїх, що здатні за певних умов виконувати функцію тригера, який за високих концентрацій підтримує стан спокою насіння, а за низьких – стимулює його проростання. В перикарпіїх плодів буряків цукрових виявлено високоактивні інгібітори й стимулятори росту, що можуть бути використані як біологічно активні речовини.

2. Показано, що подовження тривалості життєдіяльності листків буряків цукрових у кінці періоду вегетації є цінною ознакою для підвищення цукристості коренеплодів селекційними методами. Виявлено суттєві генотипні відміни за внеском окремих вікових груп листків та їх співвідношень у формування цукристості і маси коренеплоду. З'ясовано, що при створенні стійких проти загушення селекційних матеріалів буряків цукрових їхню оцінку й відбір необхідно проводити за інтегральними фізіолого-біохімічними показниками адаптивності фотосинтетичного апарату за умов затінення, добираючи потомства рослин, які менше реагують на зниження освітленості.

3. Установлено, що показники загального вмісту каротиноїдів і співвідношення каротиноїди/хлорофіли в листках буряків цукрових можуть бути використані як фізіологічні маркери на високу цукристість для оцінки вихідних матеріалів на ранніх етапах онтогенезу рослин та скринінгу гібридів за рівнем цукристості та врожайності.

4. Порівняльним дослідженням диких видів буряків *B. vulgaris* ssp. *maritima* L. і *B. cicla* L. і культурних буряків виявлено значні морфологічні та біохімічні відмінності за показниками листкового апарату і коренеплодів, що необхідно враховувати при їх залученні в селекційний процес.

5. Встановлено генотипні особливості багатонасінних диплоїдних запилювачів за фізіолого-біохімічними показниками окремих ланок метаболізму на ранніх етапах онтогенезу рослин та виявлено вплив інбридингу на фотосинтетичну продуктивність рослин.

6. У простих ЧС гібридів, одержаних за участю комбінаційноцінної за цукристістю лінії О-типу на фоні одного ЧС тестера виявлено високий позитивний гетерозис за ФХА і цукристістю та встановлено позитивну кореляційну залежність між цими ознаками. У гібридних комбінаціях, створених при схрещуванні комбінаційноцінних диплоїдних запилювачів на фоні одного ЧС тестера показано позитивний гетерозис за площею листкової поверхні, вмістом хлорофілів ($a+b$) та сахарози в коренях.

7. За результатами дослідження анатомічної структури і особливостей локалізації сахарози в тканинах низько- і високоцукристих генотипів буряків цукрових встановлено комплекс анатомічних ознак коренеплодів, які сприяють найпродуктивнішому розвитку цукропровідних та цукронакопичуючих тканин і можуть бути використані для удосконалення методології добору високоцукристих селекційних матеріалів.

8. Експериментально доведено сортоспецифічність хімічного складу коренеплодів однонасінних сортів та ди- і триплоїдних гібридів буряків цукрових і встановлено особливості розподілу золи та основних макро- і мікроелементів в морфологічних частинах коренеплодів, сегментах головки та зонах кілець СПП і запасаючої паренхіми за умов природного освітлення й затінення, між вмістом яких та концентрацією сахарози встановлено негативну кореляційну залежність.

9. Показано, що відновлення нітратів є лімітуючою ланкою засвоєння азоту однонасінними сортами і гібридами буряків цукрових та встановлено генотипне варіювання за розміром метаболічного фонду нітратів і їх накопиченням у коренеплодах, що необхідно враховувати при створенні гібридів з підвищеною ефективною асиміляцією азоту.

10. Доведено, що тритерпенові глікозиди доцільно використовувати як біохімічні маркери стійкості за умов первинної діагностики і селекційного відбору рослин-регенерантів буряків цукрових з потенційно високим адаптивним потенціалом.

11. Виявлено молекулярно-генетичний поліморфізм сорту і гібридів буряків цукрових за використання маркерних систем (RAPD- та SSR-маркерів) та підібраних праймерів. Визначено специфічні алелі для ідентифікації генотипів і встановлено їх генетичну подібність.

12. Методом експериментальної гаплоїдії і індивідуального добору з гібридної популяції від схрещування дигаплоїдів, одержаних у культурі пилку *in vitro* у співавторстві створено сорти ріпака ярого Аіра і ріпака озимого Антарія та розроблено метод виявлення апоміктичних форм ріпака з елементами регулярного апоміксису в культурі *in vitro*.

13. Розроблено просторово-структурну модель ініціації первинних структур у калюсних тканинах буряків цукрових у вигляді морфогенних модулів, що складаються з меристемоїдного конуса, проваскулярної зони з системою гідроцитів і декількох шарів дрібних паренхімних клітин, утворення яких синхронізовано з лігніфікацією та значним відкладанням калози на клітинних стінках паренхіми і оптимізовано метод отримання рослин-регенерантів із морфогенних структур калюсу.

14. Розроблено та запропоновано схеми і методи клітинної селекції *in vitro* та отримано лінії буряків цукрових з підвищеною комплексною стійкістю проти посухи і засолення та ріпака озимого і ярого, стійких проти посухи і низьких температур.

15. Установлено, що за умов довготривалого культивування *in vitro* знижується інтенсивність поглинання листками рослин-регенерантів буряків цукрових світлової енергії в короткохвильовій частині спектра, що супроводжується генотипними відмінами за накопиченням вмісту хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів, фенольних сполук (фенолів, флавоноїдів і катехінів) та підвищенням активності аніонних пероксидаз в 1,5–2,5 рази. Виявлено генотипну специфічність синтезу тритерпенових сполук і сапонінів та формування двох окремих кластерів спорідненості генотипів за біохімічним

станом метаболічного профілю, які відрізняються за активністю процесів вторинного метаболізму та адаптивним потенціалом.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Отримані методом експериментальної гаплоїдії і індивідуального добору з гібридної популяції від схрещування дигаплоїдів, одержаних у культурі пилку *in vitro* ранньостиглий сорт ріпака озимого Антарія та середньостиглий сорт ріпака ярого Аіра занесено в Реєстр сортів України і рекомендуються для висіву в зонах Лісостепу та Полісся України.

2. Рекомендується при створенні гібридів буряків цукрових проводити добір селекційних матеріалів з низьким вмістом в коренеплодах золи, азоту, фосфору, калію, натрію та мікроелементів міді, цинку, які негативно впливають на процес цукронакопичення і цукровиробництва та з більшим розміром метаболічного фонду нітратів.

3. Для оцінки та відбору вихідних матеріалів на високу цукристість на ранніх етапах онтогенезу рослин та проведення скринінгу новостворених гібридів рекомендується використовувати показники загального вмісту каротиноїдів в листках і співвідношення каротиноїди/хлорофіли.

4. При створенні стійких проти загущення селекційних матеріалів буряків цукрових рекомендується проводити їх оцінку і відбір за умов затінення.

5. Рекомендується використовувати комплекс анатомічних індексів коренеплодів, які пов'язані з їх високою цукронакопичувальною здатністю на всіх етапах селекційного процесу буряків цукрових.

6. При збиранні коренеплодів гичкозбиральними машинами рекомендується для зменшення втрат цукроносною маси зріз головки проводити на рівні розмежування зон «сплячих вічок» і зелених черешків.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії:

1. **Кляченко О. Л.**, Ситнік І. Д., Гальчинська О. К. Озимий та ярий ріпак. Біологія. Селекція. Біотехнологія: [монографія]. К.: Фітосоціоцентр, 2012. 244 с.

2. **Кляченко О. Л.**, Коломієць Ю. В. Цукрові буряки. Біологія. Фізіологія. Біотехнологія: [монографія]. К.: НУБіП України, 2013. 351 с.

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. **Кляченко О. Л.**, Кляченко В. І., Борисюк В. О. Селективна специфічність накопичення нітратів цукровими буряками // Цукрові буряки. 1998. № 4. С. 15–17. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

4. Роїк М. В., **Кляченко О. Л.** Структурні і біохімічні аспекти цукронакопичення в коренеплоді цукрових буряків // Цукрові буряки. 1998. № 5. С. 6–8. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

5. Роїк М. В., **Кляченко О. Л.** Фізіологічні аспекти селекції цукрових буряків на якість // Цукрові буряки. 1999. № 4. С. 6–7. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

6. **Кляченко О. Л.**, Роїк М. В. Селекція цукрових буряків на тіньовитривалість // Цукрові буряки. 1999. № 6. С. 12–13. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

7. Кляченко В. І., **Кляченко О. Л.**, Борисюк В. О. Фотосинтетичні показники як основа продукційного процесу рослин цукрових буряків // Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків УААН. 2000. Вип. 2. Кн. 1. С. 131–137. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

8. Кляченко О. Л. Фізіолого-біохімічні ознаки в селекції цукрових буряків // Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків. 2000. Вип. 3. С. 90–98.

9. Кляченко О. Л. Селекція цукрових буряків на довговічність листкового апарату // Цукрові буряки. 2000 № 2. С. 10–12.

10. Кляченко О. Л. Продуктивність і якість сортів та гібридів цукрових буряків // Цукрові буряки. 2000. № 4. С. 14–16.

11. **Кляченко О. Л.**, Фуніна І. Р. Хімічний склад коренеплодів цукрових буряків в залежності від їх сортових відмін // Науковий вісник Національного аграрного університету. 2002. № 47. С. 100–104. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

12. **Кляченко О. Л.**, Ситнік І. Д. Особливості морфогенезу ярого ріпаку (*Brassica napus* L.) в культурі *in vitro* // Аграрна наука і освіта. 2002. № 2. С. 9–12. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

13. Ситнік І. Д., **Кляченко О. Л.** *Brassica napus* L. в культурі *in vitro* // Аграрна наука і освіта. 2002. № 3–4. С. 15–17. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

14. **Кляченко О. Л.**, Роїк М. В. Сортоспецифічні особливості хімічного складу коренеплодів // Цукрові Буряки. 2003. № 2. С. 8–9. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

15. Кляченко О. Л. Фізіолого-біохімічні основи адаптації цукрових буряків до затінення // Аграрна наука і освіта. 2003. Т. 4. № 1–2. С. 15–19.

16. Кляченко О. Л. Морфологічна різноякісність калусних тканин О-типів цукрових буряків та її зв'язок з регенераційною здатністю // Аграрна наука і освіта. 2003. Т. 4. № 3–4. С. 24–26.

17. **Кляченко О. Л.**, Шевченко І. Л. Прогнозування гетерозису за фізіолого-біохімічними ознаками в селекції цукрових буряків // Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків. 2003. Вип. 5. С. 73–77. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

18. Кляченко О. Л. Фізіолого-біохімічні особливості інбредних ліній цукрових буряків // Аграрна наука і освіта. 2004. Т. 5. № 3–4. С. 28–31.

19. Кляченко О. Л. Оцінка багатонасінних запилювачів цукрових буряків за фізіолого-біохімічними ознаками // Аграрна наука і освіта. 2004. Т. 5. № 5–6. С. 15–20.

20. **Кляченко О. Л.**, Фуніна І. Р. Сортоспецифічні особливості накопичення пектинових речовин в коренеплодах цукрових буряків // Науковий вісник Національного аграрного університету. 2005. Вип. 84. С. 264–269. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

21. Кляченко О. Л. Використання фізіолого-біохімічних показників в адаптивній селекції цукрових буряків // Аграрна наука і освіта. 2005. Т. 6. № 1–2. С. 24–28.

22. Кляченко О. Л. Вплив затінення на хімічний склад та продуктивність різних генотипів цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) // Вісник аграрної науки. 2006. № 2. С. 44–47.

23. Кляченко О. Л. Особливості анатомічної структури і цукристість різних генотипів цукрового буряка // Аграрна наука і освіта. 2006. Т. 7. № 3–4. С. 29–34.

24. Кляченко О. Л. Структура коренеплодів сучасних гібридів цукрових буряків як показник їх цукронакопичувальної здатності // Вісник аграрної науки. 2007. № 4. С. 36–39.

25. Ситнік І. Д., **Кляченко О. Л.** Методи визначення морозостійкості сортів озимого ріпаку // Аграрна наука і освіта. 2008. Т. 9. № 5–6. С. 21–28. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

26. Ситнік І. Д., **Кляченко О. Л.** Скринінг вихідного матеріалу ріпаку на стійкість до абіотичних факторів навколишнього середовища // Біоресурси і природокористування. 2010. Т. 2. № 1–2. С. 10–21. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

27. Кляченко О. Л. Отримання холодостійких ліній ріпаку в культурі *in vitro* // Збірник наукових праць Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків. 2011. Вип. 12. С. 115–123.

28. Klyachenko O. Using of cellular breeding for obtaining of resistans rape (*Brassica napus* L.) lines // Збірник наукових праць Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків. 2012. Вип. 14. С. 543–546.

Стаття у науковому фаховому виданні України,

включеному до міжнародних наукометричних баз даних

29. **Кляченко О. Л.**, Присяжнюк Л. М. Диференціація та ідентифікація різних генотипів цукрового буряку *Beta vulgaris* L. за допомогою ДНК-маркерів // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016 Режим доступу до журналу: <http://journas.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6946>. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

Статті у наукових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

30. Кляченко О. Л., Шевченко И. Л. Структура и сахаронакапливающая способность корнеплодов сахарной свеклы при различной густоте насаждения // Физиология и биохимия культурных растений. 2007. Т. 39. № 2. С. 151–157. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

31. Кляченко О. Л., Лиханов А. Ф., Грахов В. П. Барьерные функции перикарпиев сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) различных генотипов // Физиология растений и генетика. 2015. Т. 47. № 5. С. 420–429. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

32. Кляченко О. Л. Взаимосвязь содержания каротиноидов в листьях сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и сахаронакапливающей способности корнеплодов // Физиология растений и генетика. 2015. Т. 47. № 6. С. 474–481.

33. Кляченко О. Л. Фізіолого-біохімічні показники цукрового буряку і диких видів роду *Beta* L. // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2016. Вип. 234. С. 89–99.

Статті у наукових виданнях інших держав:

34. Klyachenko O. L., Likhanov A. F., Krylovska S. A. Morphogenetic modules formation in sugar beet callus tissues in vitro // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2013. Vol. 2. № 4. P. 1396–1408. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

35. Кляченко О. Л., Присяжнюк Л. М. Изучение аллельного состояния микросателлитных локусов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Живые и биокосные системы. 2014. № 8. С. 125–137. Режим доступа до журналу: <http://www.jbks.ru/archive/issue-8/article-5/>. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

Статті в інших наукових виданнях:

36. Кляченко О. Л. Сортовая специфичность распределения макро- и микроэлементов и сахарозы в корнеплодах сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений. 2001. Т. 33. № 2. С. 140–146.

37. Кляченко О. Л. Особенности распределения макроэлементов в тканях корнеплодов в связи с локализацией сахарозы // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. № 6. С. 481–491.

38. Ситнік І. Д., Кляченко О. Л. Оцінка колекційного матеріалу ярого ріпаку на ступінь вияву форм з елементами регулярного апоміксису // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2003. С. 199–203. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

39. Кляченко О. Л. Особливості хімічного складу і локалізації сахарози в різних сегментах головки коренеплодів цукрових буряків // Вісник Запорізького державного університету. Біологічні науки. 2004. № 1. С. 79–83.

40. Klyachenko O. L. Features microclonal reproduction of O-types of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Biotechnolodgy, agriculture and the food industry. 2005 P. 133–139.

41. Sitnik I., **Klyachenko O. L.** Selection resistant callus lines rape (*Brassica napus* L.) to stressful factors // Biotechnolodgy, agriculture and the food industry. 2005 P. 169–172. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

42. Кляченко О. Л. Формирование и функционирование листового аппарата и продуктивность сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений. 2005. Т. 37. № 2. С. 117–125.

43. Кляченко О. Л. Взаимосвязь структуры и сахаронакопляющей способности корнеплодов сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений. 2005. Т. 37. № 4. С. 142–148.

44. Кляченко О. Л. Адаптивні можливості цукрових буряків до затінення і загушення // Физиология и биохимия культурных растений. 2006. Т. 38. № 3. С. 255–265.

45. Klyachenko O. Peculiarities of free amino acid in leaves and some aspects of metabolism in Sugar and wild beet (*Beta vulgaris* L.) // Earth bioresources and life quality. 2012. Vol. 2. P. 56–69. Режим доступу до журналу: <http://gchera-ejournal.nubip.edu.ua>.

46. **Klyachenko O. L.**, Likhanov A. F., Krylovska S. A. Tissue differentiation and peculiarities of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants plastic metabolism in the process of indirect morphogenesis in vitro culture // Chemical and Biochemical Engineering. 2015. P. 81–91. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

Авторські свідоцтва:

47. **Кляченко О. Л.**, Антонік І. П., Вишневський П. І., Нагребецький М. І., Ситнік І. Д. Авторське свідоцтво № 05120 на сорт рослин ріпаку на сорт рослин ріпаку Аіра. Заявка № 03016003 // Охорона прав на сорти. Офіційний бюлетень. 2004. № 4. С. 96. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, створено сорт).*

48. **Кляченко О. Л.**, Ситнік І. Д., Вишневський П. І., Антонік І. П., Нагребецький М. І. Авторське свідоцтво № 06113 на сорт рослин ріпаку Антарія. Заявка № 03016002 // Охорона прав на сорти. Офіційний бюлетень. 2005. № 4. С. 71. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, створено сорт).*

49. **Кляченко О. Л.**, Кляченко В. І. Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір. Однонасінні цукрові буряки: від насінини до коренеплоду. Анатомія. Морфологія. № 63043 від 2015 року. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано твір).*

Посібник

50. **Кляченко О. Л.**, Кляченко В. І. Однонасінні цукрові буряки: від насінини до коренеплоду. Морфологія. Анатомія: [наочний посібник]. Вінниця, ТОВ «Нілан – ЛТД», 2014. 128 с. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, підготовлено твір*).

Науково-методичні рекомендації:

51. **Кляченко О. Л.**, Ліханов А. Ф., Клюваденко А. А., Костенко С. М. Молекулярно-біологічні методи в селекції цукрових буряків: [науково-методичні рекомендації]. К., 2015. 28 с. (*Здобувачеві належить ідея, розроблення, узагальнення експериментальних та теоретичних даних, написання рекомендацій*).

52. **Кляченко О. Л.**, Ліханов А. Ф., Клюваденко А. А., Костенко С. М., Ельсаєд С. А. Фізіолого-біохімічні та біотехнологічні дослідження сортів і гібридів цукрових буряків: [науково-методичні рекомендації]. К., 2015. 54 с. (*Здобувачеві належить ідея, розроблення, узагальнення експериментальних та теоретичних даних, написання рекомендацій*).

Тези наукових доповідей:

53. Klyachenko O. L. Obtaining haploid plants of *Brassica napus* L. under *in vitro* conditions // Бюлетень державного Нікітського ботанічного саду. Біотехнологічні підходи у використанні і збереженні рослинних ресурсів: Міжнародний симпозіум, м. Ялта, 26–31 травня 2002 року: матеріали симпозіуму. Ялта, 2002. № 86. Р. 34–35.

54. Кляченко О. Л. Взаимосвязь долговечности листового аппарата инбредных линий сахарной свеклы с сахаристостью // Нетрадиционное растениеводство. Ениология. Экология и здоровье: XI Международный симпозиум, посвящённого 125-летию со дня рождения доктора медицины и богословия В. Ф. Войно-Ясенецкого, 115-летию академика Н. И. Вавилова, 90-летию основателя химического мутагенеза И. А. Рапопорта и 85-летию профессора З. И. Щелоковой, г. Алушта, 9–16 июня 2002 года: материалы симпозиума. Алушта, 2002. С. 277–280.

55. Klyachenko O. L. Obtaining haploid plants of *Brassica napus* L. under *in vitro* conditions // Biotechnology approaches for Exploitation and Preservation of Plant recourse: International Symposium, Yalta, 26–31 May 2002: abstract. Yalta, 2002. P. 73.

56. Кляченко О. Л. Физиолого-биохимические и анатомические признаки в селекции сахарной свеклы // Адаптивная селекция растений. Теория и практика: Материалы конференции, г. Харьков, 12–14 ноября 2002 года: тезисы доклада. Х., 2002. С. 16–17.

57. Кляченко О. Л. Особенности микрклонального размножения О-типов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Биотехнология: состояние и перспективы развития: III Московский Международный конгресс, г. Москва, Российская Федерация, 14–18 марта 2005 года: материалы конгресса. М., 2005. С. 254.

58. **Кляченко О. Л.**, Криловська С. А. Особливості калюсогенезу різних генотипів цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: IX з'їзд Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, присвячений 125-річчю від дня народження М. І. Вавилова: матеріали з'їзду. К., 2012. С. 500–504. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

59. **Кляченко О. Л.**, Лиханов А. Ф., Крыловская С. А. Модульная организация морфогенных зон в каллусной культуре сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Биотехнология: состояние и перспективы развития: VII Московский Международный конгресс, г. Москва, Российская Федерация, 19–22 марта 2013 года: материалы конгресса. М., 2013. С. 388–389. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

60. **Кляченко О. Л.**, Крыловская С. А. Специфика образования меристематических зон в каллусных тканях сахарной свеклы // Клеточная биология и биотехнология растений: Международная научно-практическая конференция, г. Минск, Республика Беларусь, 13–15 февраля 2013 года: тезисы доклада. Минск, 2013. С. 188. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

61. **Кляченко О. Л.**, Крыловская С. А. Тритерпеновые гликозиды как маркеры адаптационного потенциала и продуктивности сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X Международная конференция, г. Казань, Российская Федерация, 14–18 октября 2013 года: тезисы доклада. Казань, 2013. С. 350. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

62. **Кляченко О. Л.**, Крыловская С. А., Холдобина А. В. Створення колекції цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro* // Біорізноманіття України в світлі ноосферної концепції академіка В. І. Вернадського: Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Полтава, 17–18 квітня 2014 року: тези доповіді. Полтава, 2014. С. 91–95. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

63. Кляченко О. Л. Метод выявления склонных в апомиксису форм рапса (*Brassica napus* L.) в культуре *in vitro* // Селекция, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: IV Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та спеціалістів, с. Центральне, 21 квітня 2016 року: тези доповіді. Вінниця, 2016. С. 53–54.

64. **Кляченко О. Л.**, Присяжнюк Л. М. RAPD- та SSR аналіз різних генотипів цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) // Селекция, насінництво, технології вирощування круп'яних та інших сільсько-господарських культур: Міжнародна науково-практична конференція, м. Кам'янець-Подільський, 25–26 квітня 2016 року: тези доповіді. Кам'янець-Подільський, 2016. С. 116–118. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).

АНОТАЦІЯ

Кляченко О. Л. Фізіологічні і біотехнологічні основи підвищення ефективності селекції буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.) та ріпака (*Brassica napus* L.). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 03.00.12 «Фізіологія рослин». – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2017.

Дисертаційну роботу присвячено виявленню найінформативніших фізіолого-біохімічних показників у формуванні високої продуктивності буряків цукрових та удосконаленню й розробленню біотехнологічних методів експериментальної гаплоїдії, технологій клітинної селекції *in vitro* буряків цукрових і ріпака для збільшення генетичної гетерогенності селекційного матеріалу з перспективою їх використання в підвищенні ефективності селекційного процесу.

Розроблено модель функціонування системи біохімічного регулювання проростання насіння буряків цукрових на основі дослідження бар'єрних функцій перикарпіїв і формування фітоактивних захисних сфер проростків від потенційних конкурентів та патогенів. Встановлено, що вміст каротиноїдів і співвідношення каротиноїди/хлорофіли можуть слугувати фізіологічними маркерами ознак на високу цукристість і масу коренеплоду на різних етапах онтогенезу рослин. Доведено, що подовження тривалості життєдіяльності і збереженість вирослих листків у буряків цукрових в завершальний період вегетації є цінною фізіологічною ознакою, пов'язаною з підвищенням цукристості коренеплодів.

Виявлено інформативні показники мезоструктури і функціональної активності фотосинтетичного апарату рослин буряків цукрових та встановлено комплекс макро- і мікроструктурних індексів коренеплодів взаємопов'язаних з цукронакопичувальною здатністю. Досліджено сортоспецифічність хімічного складу органів сортів й ди- і триплоїдних гібридів буряків цукрових та закономірності розподілу макро- й мікроелементів у різних зонах судинно-провідних пучків і міжкільцевої паренхіми коренеплодів буряків цукрових в зв'язку з локалізацією сахарози.

Вивчено регуляцію морфогенних процесів у калюсах, просторову організацію і розвиток меристемодів та індукцію морфогенезу *in vitro* буряків цукрових. Оптимізовано технологію отримання ріпака озимого і ярого із пилку. Встановлено концентрацію фітогормонів в живильних середовищах для калюсогенезу, прямої регенерації та укорінення регенованих пагонів. Розроблено схеми клітинної селекції *in vitro* отримання ліній буряків цукрових з комплексною стійкістю проти посухи і засолення та холодо-, морозо- і посухостійких ліній ріпака озимого та ярого. Виявлено біохімічні зміни у листках рослин-регенерантів буряків цукрових за умов довготривалого культивування *in vitro*, проведено кластерний аналіз спорідненості між різними генотипами за біохімічним станом метаболічного профілю. Показано взаємозв'язок між синтезом тритерпенових глікозидів та адаптивним

потенціалом рослин, що може слугувати маркерною ознакою у первинній діагностиці селекційного матеріалу буряків цукрових. Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм генотипів буряків цукрових з використанням RAPD- і SSR-аналізу.

Ключові слова: фізіолого-біохімічні показники, макро- і мікроелементи, цукристість, коренеплід, калусогенез, морфогенез, ризогенез, клітинна селекція *in vitro*, метаболічний профіль, буряки цукрові, ріпак озимий та ярий.

АННОТАЦІЯ

Кляченко О. Л. Физиологические и биотехнологические основы повышения эффективности селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и рапса (*Brassica napus* L.). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.12 «Физиология растений». – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2017.

Диссертационная работа посвящена поиску наиболее информативных физиолого-биохимических признаков в формировании высокой продуктивности сахарной свеклы, а также усовершенствованию и разработке биотехнологических методов индукции гаплоидии, технологий клеточной селекции *in vitro* сахарной свеклы и рапса для увеличения генетической гетерогенности селекционного материала с перспективой их использования в повышении эффективности селекционного процесса.

Исследованы барьерные функции перикарпиев сахарной свеклы. Установлено, что в перикарпиях различных сортов и гибридов содержится значительное количество фенольных соединений, которые представлены оксикоричными кислотами, флавоноидами и кумаринами. Тритерпеновые соединения, содержащиеся в плодах сахарной свеклы, усиливают действие фенольных веществ, создавая комплексную систему защиты ее проростков от негативного воздействия биотических факторов. Разработана модель функционирования системы биохимической регуляции прорастания семян и формирования вокруг перикарпиев фитоактивных сфер, выполняющих функцию системной защиты проростков от потенциальных конкурентов и патогенов.

В условиях вегетационного опыта в течение онтогенеза исследовали содержание фотосинтетических пигментов - хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях сахарной свеклы различных генотипов, формирование сахаристости и массы корнеплодов. Установлены высокая степень положительной корреляционной зависимости между этими показателями, возможность оценки и отбора селекционных материалов на сахаристость по признакам уровень накопления каротиноидов и соотношению каротиноиды/хлорофиллы, в том числе на ранних этапах роста и развития растений. Исследовали содержание различных форм азота в листьях растений, углеводов, свободных аминокислот, морфофизиологических показателей листьев и формирование продуктивности у

культурной сахарной свеклы и диких видов *Beta vulgaris* ssp. *maritima* L. и *Beta cicla* L.

Установлены генотипические особенности многосемянных диплоидных опылителей и инбредных линий сахарной свеклы по физиолого-биохимическим показателям некоторых звеньев процессов фотосинтеза, темнового дыхания и распределения ассимилятов на ранних этапах онтогенеза растений. У простых МС гибридов, полученных при участии разных по комбинационной способности линий О-типа на фоне одного МС тестера обнаружено высокий положительный гетерозис по ФХА при скрещивании с комбинационно ценной по сахаристости линией, одновременно с эффектом гетерозиса по содержанию сахарозы в корнях и положительную корреляционную связь между этими признаками. У гибридных комбинациях, полученных при скрещивании комбинационно ценных диплоидных опылителей на фоне одного МС тестера показано положительное сверхдоминирование по площади листовой поверхности, содержанию хлорофиллов *a*, *b* и сахарозы в корнях.

Изучены особенности становления структуры листового аппарата растений и накопления сахарозы в корнеплодах гибридов сахарной свеклы и их исходных форм. Установлены генотипические отличия по вкладу отдельных возрастных групп листьев и их соотношений в формировании сахаристости и массы корнеплодов. Показана взаимосвязь между долговечностью листового аппарата и продуктивностью растений сахарной свеклы.

Выявлены информативные показатели мезоструктуры и функциональной активности фотосинтетического аппарата инбредных линий сахарной свеклы. Установлены генотипические особенности структурных элементов проводящей системы и сахарозозапасующих тканей и показана их взаимосвязь с уровнем сахаристости. Обсуждается возможность использования ряда анатомических признаков корнеплодов при селекции на повышенную сахаристость. Изучено распределение макро- и микроэлементов, общей золы и сахарозы в зонах сосудисто-проводящих пучков и зонах межкольцевой паренхимы корнеплодов. Установлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией сахарозы и содержанием макро- и микроэлементов в исследуемых тканях, а также сортоспецифические особенности их накопления.

Исследовано регулирование морфогенетических процессов, развитие меристематических и индуцирование морфогенеза *in vitro* в калусных тканях сахарной свеклы. Разработано пространственно-структурную модель иницирования первичных структур в виде морфогенных модулей, состоящих из меристематического конуса, проваскулярной зоны с системой гидроцитов и нескольких слоев мелких паренхимных клеток. Образование клеток синхронизировано с процессами лигнификации тканей и значительными отложениями калозы на клеточных стенках.

Оптимизировано технологию экспериментальной гаплоидии пыльцевых зерен рапса. Разработаны схемы клеточной селекции *in vitro* для получения устойчивых линий сахарной свеклы к двум стрессовым факторам (засуха и засоление), а также холодо- морозо- и засухоустойчивых линий рапса ярового и озимого. Изучены биохимические изменения в листьях растений-регенерантов

сахарной свеклы в условиях длительного культивирования *in vitro*, проведен кластерный анализ генетического сходства между генотипами за биохимическим состоянием метаболического профиля. Показано наличие взаимосвязи между синтезом тритерпеновых гликозидов и адаптивным потенциалом растений, что можно использовать как биохимический маркер на засухоустойчивость при проведении первичной диагностики селекционного материала сахарной свеклы. Получены результаты исследований молекулярно-генетического полиморфизма сортов и гибридов сахарной свеклы с использованием RAPD- и SSR-анализа. Определены ДНК-профили генотипов, которые можно использовать для их идентификации и дифференциации.

Ключевые слова: физиолого-биохимические показатели, макро- и микроэлементы, сахаристость, корнеплод, калусогенез, морфогенез, ризогенез, клеточная селекция *in vitro*, метаболический профиль, сахарная свекла, рапс озимый и яровой.

ANNOTATION

Klyachenko O. L. Physiological and biotechnological bases of increase of breeding efficiency of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and rape (*Brassica napus* L.). – The Manuscript.

The thesis for the scientific degree of Doctor of Agricultural Sciences in specialties 03.00.12 Plant Physiology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, 2017.

The thesis is inducted to the improvement and development of finding the most informative physiological and biochemical parameters in formation of beet sugar high productiveness with the prospect biotechnological methods of the experimental haploidy, cell selection technologies *in vitro* of sugar beet and rape to increase of the genetic heterogeneity of breeding material and of their using in enhancing of the effectiveness of the selection process.

The model of system functioning of biochemical regulation of the beet sugar seed germination, based on research of pericarps barrier function and the formation of phytoactive protective areas of the plantlets from potential competitors and pathogens was established. It was determined that the carotenoid content and value carotenoids / chlorophyll *a+b* may serve as markers of physiological features of the high sugar content and weight of root at different stages of plant ontogenesis. It was proved that the prolongation of life-sustaining activity and the viability of raised beet sugar leaves in the final period of growth is valuable physiological basis that is associated with increased sugar content at roots.

The informative indicators of mesostructure and functional activity of photosynthetic apparatus in sugar beet plants were discovered and a set of macro- and micro- structured roots indexes, which are interrelated to their ability of sugar accumulation was established. Cultivars peculiarity of the chemical composition of organs varieties and di- and triploid hybrids of sugar beet and patterns of distribution of major mineral elements and minor plant nutrient in various areas of vascular – conducting bundle and intercircular parenchyma sugar beet roots due to the localization of sucrose were studied.

The regulation of callus morphogenic processes, spatial organization and development of meristemoids, and induction *in vitro* of sugar beet morphogenesis were studied. The technology of sugar beet haploids obtaining from the seed germs and winter and spring rape from pollen was optimized. The phytohormones concentration in nutrient media for callusogenesis, direct regeneration and rooting of regenerated shoots was established. The schemes of cell selection *in vitro* of cell lines obtaining of beet sugar, which are resistant to high-temperature, pathogens of bacteriosis, and drought-, and salt resistant, and cold-and frost-, and drought-resistant winter and spring rape were developed. The biochemical changes in plants-regenerants sugar beet leaves at long-term cultivation *in vitro* were revealed, cluster analysis of relationship between different genotypes for the biochemical state of metabolic profile was conducted. The relationship between the synthesis of triterpene glycosides and adaptive potential of plants was shown. It can serve as markers in the primary diagnosis of sugar beet breeding material. The molecular genetic polymorphism of sugar beet genotypes, using of RAPD- and SSR-analysis was investigated.

Key words: physiological and biochemical indicators of macro- and micronutrients, sugar content, root, callusogenesis, morphogenesis, rhizogenesis, cell selection *in vitro*, sugar beets, spring and winter rape, metabolic profile.