

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. Ф. МР. 1858 «С». 2021. 11.01. 10 ПЗ

НУБІП України

МАРТИНЮК АНДРІЙ ІВАНОВИЧ

2022

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Декан факультету Завідувач кафедри
захисту рослин, біотехнологій та екології екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В.
(підпис)

Патика М.В.
(підпис)

“ ” 2022 р. “ ” 2022 р.
МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Біологічні особливості збудника бактеріальної плямистості
соняшнику та біотехнологічні аспекти контролю»
Спеціальність 202 Захист і карантин рослин
Освітня програма захист рослин
(код і назва)
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Керівник магістерської роботи
д.с.-г.н., професор

Коломієць Ю.В.

(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Виконав Мартинюк А.І.
(підпис) (ІМБ студента)

КИЇВ – 2022

НУБІП України

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Культура соняшнику та його використання	9
1.2. Будова соняшнику	10
1.3. Біологічні особливості	13
1.4. Сорти соняшника однорічного в Україні	14
1.5. Хвороби соняшника	16
1.6. Бактеріальна плямистість соняшника	22
1.7. Регенерація рослин	24
1.8. Роль макроелементів для живлення соняшника	26
1.9. Роль бору та інших мікроелементів для живлення соняшника	26
1.10. Біотехнологічні підходи для соняшника	28
1.11. Мікроклональне розмноження	29
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	31
2.1. Стерилізація лабораторного посуду та інструментів	31
2.2. Метод мікроклонального розмноження	33
2.2.1. Етапи мікроклонального розмноження рослин	33
2.3. Підбір експлантів та введення їх в культуру <i>in vitro</i>	34
2.4. Техніка виділення меристеми	35
2.4.1. Активація розвитку меристем з експланту	35
2.5. Розмноження рослинного матеріалу	36

2.6. Укорінення рослин.....	37
2.7. Адаптація рослин та перенесення їх із стерильних умов <i>in vitro</i> в ґрунтові умови вирощування.....	38

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 41

3.1. Підбір найоптимальніших умов стерилізації насіння соняшника.....	41
3.1.1 Обробка і стерилізація насіння.....	41
3.2. Вирощування калюсу.....	45
3.3. Вплив збудника на розвиток рослин соняшника.....	50

ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	55

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП України РЕФЕРАТ

Тема дипломної роботи – біологічні особливості збудника бактеріальної плямистості соняшнику та біотехнологічні аспекти контролю.

Пояснювальна записка до дипломної роботи містить 51 сторінку, 11 таблиць, 16 рисунків, висновки та 46 джерел літератури.

НУБІП України

Об'єктом дослідження є збудник бактеріальної плямистості соняшнику.
Метою досліджень є впливу збудника бактеріальної плямистості соняшнику з підбором різних концентрацій.

НУБІП України

Ключові слова: соняшник, культура *in vitro*, бактеріальна плямистість соняшнику, мікроклональне розмноження.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ
НУБІП України
2,4 Д - 2,4 дихлорфеноксіоцтова кислота;
НОК - 1 нафтилоцтова кислота;

ІОК - індолілоцтова кислота;
НУБІП України
ІМК - індолілмасляна кислота;
МС - Мурасіге - Скуга

ІК - інактивовані клітини
НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП УКРАЇНИ

ВСТУП

Соняшник (*Helianthus L.*) – це рослина родини айстрових. В Україні ця культура є основною за олійним виробництвом. Його насіння містить в собі 30 – 36 % олії, а ядра – 50 – 60 %. Серед олійних культур соняшник посідає перше місце, а соняшникова олія за своїми смаковими характеристиками вважається однією з найкращих [11].

Біологічне значення бору в живленні рослин було вперше встановлено в 1923 р. Бор (В) належить до групи 13 періоду 2 періодичної системи елементів і має проміжні властивості між металами та неметалами. Незважаючи на низький рівень присутності в природі, елемент широко поширений як у літосфері, так і в гідросфері. Хоча численні дослідження виявили потребу в елементі, було виявлено його присутність у ґрунтах та рослинах, були проведені тривалі експерименти з борними добривами, на сьогоднішній день фізіологічними механізмами живлення бором є одними з небагатьох вивчених питань.

Традиційні селекційні дослідження привели до отримання сортів соняшнику з поліщеними агрономічними характеристиками. Проте відсутність відповідних генетичних ресурсів у вирощуваних рослин соняшнику негативно позначаються на отриманні нових гібридів, які мають високу стійкість до хвороб, виробництві олій з покращеними якостями, прожиттєвій якості сировини, перенесенні стресових умови (посуха, засолення і т.п.). Наразі необхідні нові технології для розширення генетичної мінливості культури соняшнику. Біотехнології з використанням культури тканин і генної інженерії можуть бути корисним інструментом для отримання генетичних варіацій. Основна мета використання культури клітин, тканин, органів в умовах *in vitro* і молекулярних методів це поліпшення врожаю, а також вони є потужним інструментом для вивчення фундаментальних і прикладних задач в селекції рослин і в комерційному застосуванні [2].

Технології тканинних культур також мають значний потенціал для генетичного поліпшення соняшнику за рахунок регенерації соматоклональних

варіантів, трансгенних і соматичних гібридів даної культури. Дані методи сприяють також розвитку традиційної селекції. Молекулярні методи полегшують вибір пермоплазми для використання в селекційній програмі соняшника [10].

Застосування біотехнологічних методів для більшості селекційних робіт з культурою соняшника щодо поліпшення характеристик (стійкість до засолення, стійкість до посухи і хвороб, мутагенез *in vitro* і соматичний ембріогенез) обмежені в основному труднощами регенерації рослин в умовах *in vitro*. Різні сорти і гібриди соняшнику важко регенерувати *in vitro*. Отже, перший і важливим кроком культури тканин – це розробка біотехнологічної схеми регенерації *in vitro*. Одержання тканин з високим ступенем регенерації багатьох видів *Helianthus* можливо за допомогою таких методів, як соматична гібридизація, соматональна мінливість і морфогенез [6].

Здатність соняшнику до регенерації за рахунок органогенезу сильно варіюється і залежить від генотипу, конкретних компонентів середовища, типу експлантату, віку проростків, концентрації гормонів в середовищі для індукції калусу, умов освітлення і методів культивування тканин. Наші дослідження будуть спрямовані на визначення впливу мікроелементу бору на регенераційну здатність сортів соняшника. Одержані результати культивування будуть використані для поліпшення врожаю соняшнику, за рахунок повного відновлення через органогенез і соматичний ембріогенез, міжвидову гібридизацію і культивування ембріонів.

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

1.1. Культура соняшнику та його використання

Соняшник (*Helianthus L.*) – це рослина родини айстрових, з латинської – квітка сонця. (рис. 1.1) В Україні ця культура є основною по олійному виробництві [20]. Його насіння містить в собі 30-35% олії, а ядра цілих 50-60%. Серед олійних культур соняшник посідає перше місце, а соняшникова олія по своїм смаковим характеристикам вважається однією з найкращих. Велика кількість олії іде для виготовлення маргарину, гірші сорти олії використовуються в технічних цілях. При спалюванні стебел соняшника отримують золу, яка є багата на Калій, її використовують переважно для виробництва поташу, також в якості калійних добрив [38].



Рис. 1.1. Генеративні і вегетативні органи соняшника однорічного [34]

Соняшник застосовується в багатьох галузях та цілях. Він має велике значення як кормова культура. При переробці насіння отримують макуку, яка містить 20-36% білків і є чудовим концентрованим кормом тваринам, особливо

молодній худобі [22]. Соняшник ціниться як силосна культура. Завдяки гарному покриттю листям, деякі сорти соняшнику дають гарний врожай зеленої маси, з якого готують силос. Соняшник, може дати 500-600 ц зеленої маси і навіть більше з 1 га землі, при розумній агротехніці. Соняшник гарно силосується в чистому виді, а також в суміші з іншими рослинами. Силос виготовлений із соняшника складається із легко перетравлюваних білків, вітамінів і вуглеводів і є дуже поживним. Годівля таким силосом тварин значно підвищує їх продуктивність [45].

Препарати виготовлені із соняшника використовуються в народній медицині в якості спазмолітичного засобу, раніше їх застосовували і як засіб проти малярії. Олія із соняшника є цінним харчовим дієтичним продуктом. Її застосовують розчинником для лікувальних речовин у сучасній медицині.

Соняшникова і також кукурудзяна олія вживається при жовчнокам'яній хворобі, в якості жовчогінного засобу при холангіогепатиті, холангіті, холециститі. Для лікування і профілактики атеросклерозу потрібно в тиждень вживати соняшкову олію хоча б 2 - 3 рази, також це корисно для перистальтики кишківника. Із крайових квіток соняшника готують спиртову настойку щоб отримати спазмолітичний засіб. Цю настойку приймають при шлункових і кишкових коліках, важкому затяжному кашлі, бронхоспазмі, ядузі тощо [32].

1.2. Будова соняшнику

Існує три форми соняшнику

- Олійні (низькорослі, з тонким стеблом, сім'янка невелика, ядра добре розвинені, 1000 сім'янок, мають масу 30 - 80 г)
- Лузальні (високі стебла, з великими листками, висока лущинність, 1000 сім'янок, мають масу 100 - 180 г)
- Межеумки (це середнє між лузальними і олійними відносно стебел, кошиків і листків, сім'янки більш наближені до лузальних)

Культурні сорти соняшнику мають пряме стебло, зазвичай не розгалужене, ребристе або ж кругле, воно покрите шорсткими волосками, середина стебла заповнена губчастою тканиною. Коли соняшник вже досягає, він нахилиється,

тому що зростає маса кошика, але коли насіння висихає, то знову частково виправляється. Різні сорти соняшника мають різну довжину стебла, скоростиглі

сорти близько 50-70 см, олійні 120 – 150 см, а сиїосні майже 4 м. Зазвичай соняшник одностеблій, але може розгалужуватися, в такому випадку на сусідніх гілках з'являються суцвіття.

Суцвіття у соняшника це кошик, що містить велике квітколоже і оточений

обгортковим листям, при дозріванні буває увігнутої, опуклої чи плоскої форми.

Різні сорти мають різний розмір суцвіття, в загальному бувають від 15 до 45 см в діаметрі. Кошики в молодому віці «тягнуться» до сонця і протягом дня

змінюють орієнтацію від сходу до заходу, але по мірі дозрівання соняшник фіксується в певному положенні [37]

Квітки розташовуються по краю суцвіття у декілька рядів. Квітки що розташовуються скраю язичкові, в довжину мають 4-7 см, зазвичай безплідні, жовтого забарвлення. Посередині знаходяться трубчасті квітки, вони є

двостатевими і плодоносними. У кошику їх міститься 500 – 2000 шт. Тичинок 5

штук, вони зростаються з пилляками навколо маточки. У квітках соняшнику виділяється нектар спеціальними органами нектарниками. Соняшник

перехреснозапильний, запилюється комахами, вітром, але переважно

бджолами, цвіте у липні – серпні від 20 до 30 днів. Суцвіття розкриваються вже

від самого ранку.

Плодом є сім'янка із шкірястим оплоднем. (рис.1,2.) Ядро вкрите тоненькою прозорою плівкою. Частка лушпиння високоодійних сортів складає

18-23%, а гібридів 21-29%. Лушпиння складається із трьох шарів клітин:

- епідерміс,
- гіподермальна паренхіма,
- склеренхіма,

від зовнішнього до внутрішнього відіовідно.



Рисунок 1.2. Насіння соняшника [40]

Система коренів у соняшника стрижнева, але сильно розгалужена, заглиблена в ґрунт на відстань 2 – 3 м. Від основного стрижневого кореня відходять розгалуженні бічні корені. Вони можуть утворювати 2-3 яруси зв'язаних коренів, в залежності від розміщення поживних речовин і та рівня зволоження ґрунту. Перший ярус росте горизонтально не глибоко від поверхні, а на відстані 15 - 40 см знову заглиблюється, стає майже паралельно головному кореню, пускаючи дрібні корінці. Другий ярус утворює розгалужені бічні корені, що знаходяться на глибині 35 - 50 см. Заглиблюючись під кутом вони тісно сплітаються між собою і утворюються міцні сплетіння. Деякі бічні корені можуть досягати глибини 85 - 100 см [25].

Не враховуючи бічних коренів та стрижневого, на соняшнику з'являються і стеблові корінці. Вони ростуть від підсім'ядольного коліна. Це глибоко, у вологому ґрунті. Ростуть горизонтально, під малим кутом до стебла, на відстані 15 - 35 см від основного кореня заглиблюються [299]. (Рис. 1.3.)

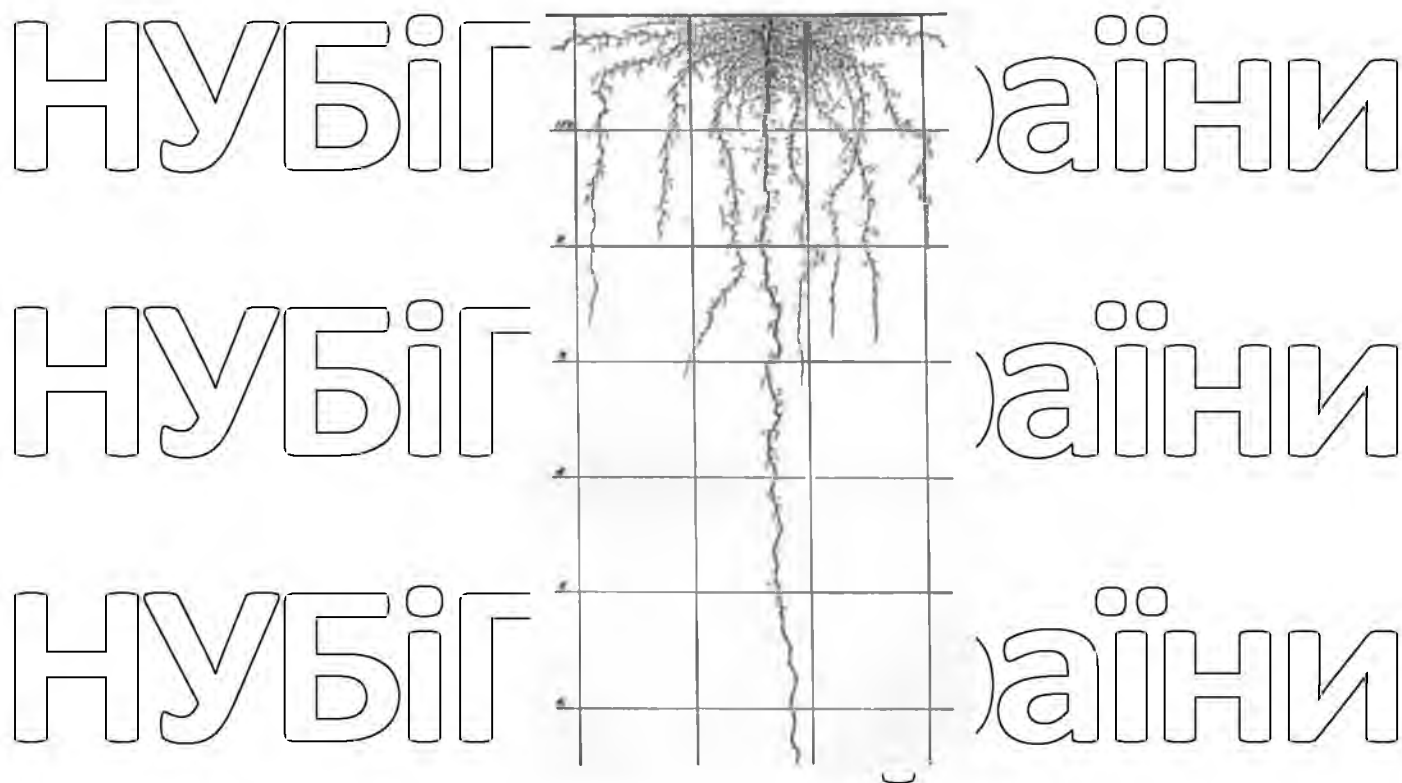


Рисунок 1.3. Корінь соняшнику [8]

1.3. Біологічні особливості

Соняшник – це переважно теплолюбива культура. Хоча насіння може прорости при низьких температурах близько 2-4 °С, але сходити воно починає в такому випадку майже через місяць. При 20 °С сходить вже через 6 днів. Якщо садити рослину в ще холодний ґрунт вегетаційний період збільшується. На початку вегетації рекомендується температура 22 °С, під час цвітіння 25 °С, щоб соняшник повністю дозрів температури мають бути в межах 23 – 27 °С [36].

Вологість землі для посадки і росту соняшника має бути досить висока, насіння всмоктує від 75 % до 100 % вологи відносно своєї маси, хоча і соняшник вважається посухостійкою рослиною [31]. Він може брати вологу з глибини ґрунту до 3 м, при цьому висушувати його майже повністю до 1,5 м. Соняшник вибагливий до сонячного проміння і поживних речовин. На 1 м насіння із землі він бере таку кількість добрив:

- калію – 10 – 12 кг,
- фосфору – 2 – 2,5 кг,
- азоту – 5 – 6 кг.

Рівень рН для соняшника є найбільш підходящим в районі 6,0–6,8. Грунти в яких найкраще ростиме соняшник це каштанові і чорноземи різних типів, а от на грунтах що схильні до зболочування, глинистих і піщаних, навпаки – погано [30].

Якщо садити соняшник на одному й тому самому місці декілька раз він стає дуже вразливим до хвороб, шкідників, бур'янів і паразитів. Наприклад, якщо сіяти соняшник на тому ж ґрунті другий раз враженість вовчком збільшується до 86%, проти 13% якщо вирощувати у сівозміні. Для соняшника найкращим попередником є озимі культури і кукурудза. Глибина на якій садять насіння для легких і середніх ґрунтів є 7–8 см, для важких 4–6см [13].

1.4. Сорти соняшника однорічного в Україні

Рід соняшнику містить в собі більше ніж 50 видів, переважна кількість багаторічні. Найпопулярнішим з однорічних видів є соняшник однорічний або олійний (*Helianthus annuus*). У свою чергу він ділиться на два окремих види:

- соняшник дикорослий (*H. ruderalis wenz.*);
- соняшник культурний (*H. cultus wenz.*) [299].

Соняшник культурний поділяється на два підвиди:

- польовий (*ssp. sativus*)
- декоративний (*ssp. ornamentalis*)

В Україні переважно розповсюдженні високоврожайні селекційні гібриди та сорти соняшнику із високим вмістом олії в насінні, великою стійкістю проти найвідоміших рас вовчка, різних шкідників та хвороб.

Практично всі площі соняшнику засаджують сортами і гібридами олійної групи.

За тривалістю вегетаційного періоду сорти і гібриди діляться на:

- середньостиглі (120 – 145 діб),
- середньоранні (105 – 130 діб),
- ранньостиглі (100 – 125 діб),

• Швидкостиглі (80 – 100 днів) [411].
Вирощування гібридів різних типів стиглості в умовах єдиного господарства допомагає знизити дію кліматичних факторів, циклу від хвороб і ураження шкідниками на валовий збір насіння соняшнику, а також збільшити термін збирання без зайвих втрат і витрат.

Нові гібриди і сорти соняшнику виділяються не лише високою врожайністю, низькою лушпинністю (24-30%), великим вмістом олії у насінні, а й збільшеною стійкістю проти соняшnikової молі і вовчка.

У виробництві найбільш популярними є гібриди і сорти, які створені у Всеросійському інституті олійних культур і його станціях, Селекційно-генетичному інституті УААН та Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва. В Україні є найбільш поширеними такі гібриди:

• Дніпр – міжлінійний, простий, середньоранній гібрид. Кількість олії в насінні складає 53,6%. Районований переважно в степовій і лісовій зонах.

• Харківський 49 – міжлінійний гібрид на стерильній основі. Помірностійкий проти посухи, добре стійкий проти полягання і обсіпання. Генетично стійкий проти несправжньої борошнистої роси і вовчка, витривалий до гнилей. Лузгуватість 28%, вміст олії 52%. Районований у лісостепових і степових зонах.

• Одеський 504 – міжлінійний, простий середньоранній гібрид, на стерильній основі. Вміст олії складає 50,5%. Районований в степовій і лісостеповій зонах.

• Красотка – міжлінійний, простий, ранньостиглий гібрид, на стерильній основі. Кількість олії 52,2%. Районований в степовій і лісостеповій зонах.

• Флоріан – міжлінійний, простий середньоранній гібрид, на стерильній основі. Кількість олії складає 51,9%. Районований в степовій і лісостеповій зонах.

Найбільш поширені сорти соняшнику в Україні:

• **ВНДЮК 6540** покращений – середньостиглий, високоврожайний. Кількість олії складає близько 44 – 50%. Районований у лісостеповій і степовій зонах.

• **Армавірський 3497** покращений. Районований переважно у степовій зоні. Кількість олії складає 46-50%.

• **ВНДЮК 8883** покращений – середньоранній, високоврожайний. Вміст олії в насінні межах 50,4 – 53,5. Стійкий проти зараження вовчком. Районований у лісостеповій та степовій зонах.

• **Одеський 63** – середньостиглий сорт. Районований у степовій зоні. Кількість олії в насінні складає 49,6 – 50,45.

• **Донський 60** – середньостиглий, високоврожайний сорт. Кількість олії в насінні 49,4 – 50,4%. Стійкий проти ураження вовчком. Розміщується в степовій зоні.

• **Харківський 7** – ранньостиглий сорт. Кількість олії складає 55,2%. Районований у степовій і лісостеповій зонах.

• **Первенець** – середньостиглий сорт. Розміщується у лісостеповій і степовій зонах [28].

1.5. Хвороби соняшника

Щорічне збільшення посівних площ під культурою соняшника, порушення принципів сівозміни (розташування соняшнику на тому самому місці другий раз), наявність і збільшення вмісту на полях рослинних решток, засміченість посадкових полів бур'янами, що утримують збудників захворювань, стали причиною критичної ситуації із соняшниковими хворобами. За минулі декілька років рівень втрат від захворювань став вдвічі більший, також збільшується географічне поширення збудників захворювань і їхня шкодочинність.

Соняшник може бути вражений більш ніж двадцятьма видами різних збудників хвороб, найпопулярнішими з них є:

• перноспороз (*Plasmopara halstedii* nobot),

- фомопс (*Diaporthe helianthi* Hunt),
- біла гниль (*Sclerotinia sclerotiorum* de Bary),
- фомоз (*Phoma macdonaldii* Sacc.),
- сіра гниль (*Botrytis cinerea* Pers.) та інші [19].

За даними Національної асоціації соняшнику, було визначено приблизно тридцять хвороб, але переважна кількість з них не заважає збору соняшникового насіння. Серед цих захворювань найпоширеніші:

- соняшникова іржа (*Puccinia helianthi*),
- несправжня борошниста роса (*Plasmopara halstedii*),
- суха гниль головки соняшнику (*Rhizopus arrhizus*),
- фомопс (*Diaporthe helianthi*),
- бура плямистість (*Alternaria helianthi*),

- сіра гниль (*Botryotinia fuckeliana*),
- фомоз (*Phoma macdonaldii*) [44].

Ці захворювання при достатньому рівні вологості інтенсивно прогресують і площі ураження соняшнику можуть бути навіть до 55 – 70%. В суху погоду збудники захворювань навпаки погано розвиваються і вражають не більше 5% [33].

Фомоз. Збудником захворювання є недосконалий гриб *Phoma helianthi* Aleks. Він має чорну або темно-сіру грибницю, кулясті спорогонії, в діаметрі до 300 мкм, з'являються під епідермісом у вигляді концентричних тіл. Спороції одноклітинні, мають еліптичну форму, безбарвні, розміром 6 – 8 x 2,3 – 4 мкм. Джерелом інфекції зазвичай являється заражене насіння і рослинні рештки. Заражається соняшник при температурі 6 - 29°C і відносній вологості повітря 40 – 75%.

Стає видимим у фазі створення на соняшнику 3-4 пар листків. На кінчиках листків, від нижнього ярусу, виникають темно-бурі плями з жовтизною по краю. Вони збільшуються і оточують всю пластинку черешок і листка. Заражені листки

в'януть, але не падають із стебла. На стеблі в місцях де тримаються черешки і в короневої шийки, утворюються темно-коричневі плями. Вони стають більшими, охоплюють нижню частину стебла і до початку коли соняшник починає рости, вони зливаються, створюючи чорну смугу. На зовнішній стороні кошиків з'являються бурі плями, які розростаються і починають оточувати весь кошик. В цих місцях тканина стає м'якою, але не згниває. Насіння робиться тонким і бурим, в суцвітті квіти стають бурими [43].

Біла гниль або склеротиніоз. Збудником хвороби є сумчастий гриб *Sclerotinia sclerotiorum de bary*. Вражає соняшник, морку, буряк, кукурудзу та ін.

Весною гриби проростають і створюють грибницю, що потрапляє в рослину, або ж утворюють апотеці – це блюдцевидні тільця на циліндричних ніжках. Верхня частина апотеці утворюється з шару щільних сумок, які містять по 8 безкольорових сумкоспор еліптичної форми. Розмір сумкоспор 7 – 13 x 4 – 7 мкм, а сумок - 115 – 145 x 7 – 9 мкм. В залежності від розміру склеронція на ньому може з'явитися до 40 апотенціїв. Формування сумок із сумкоспорами і проростання склеронціїв триває зазвичай 29 – 37 днів, якраз в той час коли проводяться весняно-польові роботи.

Корені які уразилися, стають м'якими, мокріють і викриваються білим нальотом. Стебло в місцях нальоту стає буро-коричневого кольору. Потім руйнується кора стебла і оголюються провідні пучки, під виглядом тонких ниток. Таке стебло надломлюється і рослина висихає та відмирає. На поверхні і в середині засохлої рослини виникають темні щільні склеронції [12]. (рис.1.4.)



Рисунок 1.4. Соняшник та його органи уражені білою гниллю [14]

Суша гниль. Збудником є нижчий гриб *Rhizopus nodosus* Namysl. Він створює спорангії, спорангієносці, спорангієспори та рясну грибницю. На грибниці з'являються тістовщення розміром 45 – 100 мкм в довжину і 29 – 45 мкм в діаметрі, на них утворюються 3 – 12 спорангієносці висотою 1 – 3 мм. На вершині спорангієносця з'являються круглі спорангії 100 – 190 мкм в діаметрі. Спорангієспори мають округлу або нерівну форму, світло-бурого або блідо-сірого кольору, розміром 5 – 9 х 4 – 6 мкм.

З тильної сторони кошика, зазвичай по всій поверхні, з'являються бурі сухі плями (рис. 1.5.) Тканина, що урадилася стає твердою, сім'янки не тримаються і легко випадають, злипаються і не розвиваються повністю. Якщо в період дозрівання соняшнику відбувається часта зміна дощової і сухої погоди, спостерігається посилення прогресування захворювання.

НУБІГ



аїни

НУБІГ

аїни

Рисунок 1.5. Плями на кошику від сухої гнилі

НУБІП УКРАЇНИ

Аскохітоз. Збудником являється незавершений гриб *Ascochyta helianthi* Abramov. Пікноспори безкольорові, циліндричної форми, з однією перегородкою, розміром 11 – 13 x 2 – 4 мкм.

НУБІП УКРАЇНИ

Хвороба проявляється через весь період вегетації рослини, але найбільше помігний в другій частині літа. На листках, а інколи на кошиках і стеблах утворюються темно-бурі плями, неправильної або округлої форми, шириною 1,5

НУБІП УКРАЇНИ

– 2 см. Пізніше серед плям з'являються чорні пікніди діаметром до 200 мкм. В період вегетації рослини гриб поширюється пікноспорами, зиму проводить на залишках рослин у вигляді пікнід, з яких пізніше весною розлітаються пікноспори і таким чином заражають рослини. Якщо захворювання сильно розвивається, урожай від соняшника зменшується.

НУБІП УКРАЇНИ

Сіра гниль. Збудником є недосконалий гриб *Botrytis cinerea* Fr. Крім соняшника, він може вражати плоди винограду, суниця, малини, коренеплода моркви, буряку та інших культур. Зберігається у формі грибниці і склеротіїв в рослинних залишках та насінні.

НУБІП УКРАЇНИ

Сіра гниль шкідлива тим, що зменшує якість і схожість насіння, зменшує сход і з'являються великі втрати врожаю.

Ембелізія. Збудник захворювання – недосконалий гриб *Embellisia Helianthi* *Pidopl.* Конідієносці циліндричні, мають блідо-сіро-жовте забарвлення, розмір 30 – 120 x 8 – 12 мкм, мають до 6 перегородок, розміщуються групами, підлясті

або прості. Форма конідій циліндрична, світло-коричневого або сіро-жовтого забарвлення, розмір 35 – 120 x 14 – 29 мкм, мають 4 – 12 поперечних перегородок. Гриб зберігається конідіями, що можуть потрапити в насіння.

При зараженні, на стеблах з’являються округлі або у вигляді смуг чорні плями. На листках плями менші, але потім збільшуються до 1 – 3 см в діаметрі, забарвлення мають темно – коричневе із світлим краєм. На чашолистках плями

мають коричнево-чорний колір, зазвичай концентричні, а на пелюстках – коричневий, еліптичної форми, часто зливаються, розмір – 5 x 3 мм. [14]

Крім мікробних хвороб, соняшникове насіння також може бути знищене такими шкідниками:

- бавовняною совкою,
- чорним жуком кукурудзи,
- довгоносиками,
- міллю,
- соняшnikовою вогнівкою,
- клопами і тд [33].

Соняшникові хвороби зменшують якість насіння і урожайність, вражають органи рослини. Необхідно своєчасно втрутитися, щоб встигнути запобігти та

застосувати захисні методи для обмеження поширення хвороби та її розвитку [26].

При вирощуванні соняшника, значної шкоди приносить вовчок соняшниковий – дуже шкідливий квітковий паразит. Поселяючись на

соняшниковому корінні, він дуже пригнічує його розвиток, що є причиною зменшення продуктивності на 40 – 60% а в деяких випадках навіть більше.

Паразитична діяльність вовчка приносить високі втрати насіння соняшнику, за це його прозвали «чумою XXI століття» або «економічним терористом».

Вовчок соняшниковий паразитує на даній культурі практично в усіх регіонах її вирощування. В Україні вовчка соняшникового знаходять на посівах Миколаївської, Херсонської, Луганської, Запорізької, Донецької областей.

На соняшнику зазвичай паразитує вид вовчка - *Orobanchae cumanica* Wally., інколи зустрічається *O. ramosa* L., *O. aegyptiaca* Pers [39].

1.6. Бактеріальна плямистість соняшника

Бактеріальну плямистість соняшника викликають бактерії роду *Pseudomonas*. Цю хворобу також інколи називають бурею незграбна плямистість або апікальний хлороз соняшника. Основними збудниками захворювання є:

- *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*

- *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*

- *Pseudomonas cichorii*

- Іноді в патологічному процесі присутня *Pseudomonas. syringae* pv. *mellea*

Pseudomonas syringae pv. *helianthi* – грамнегативна бактерія, патогенна для рослин, яка вражає соняшник.

Вперше хворобу викликану *P. syringae* pv. *helianthi*, було описано в Японії в 1934 р. Пізніше в 1970-80-х роках його зафіксували в Канаді, в Індії, країнах Європи (Чехословаччині, Іспанії, Югославії, Румунії), в 90-і роки – на Африканському континенті. На даний час бактеріальна плямистість соняшника реєструється скрізь, де вирощують культуру соняшник. В деяких країнах хвороба викликає великі втрати врожаю. Кількість рослин що мають симптоми бактеріальної плямистості здебільшого не перевищують 5-7%, але іноді показник сягає 10-12%. Дане захворювання вражає лише соняшник.

Інший збудник *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*, що викликає бактеріальну плямистість та апікальний хлороз соняшника був виявлений в Південній Африці, Австралії, Мексиці, США та нещодавно в Сербії.

Представники цього збудника викликають бактеріози не лише в соняшника, а й рослин видів *Asteraceae*, включаючи бур'яни, зокрема *Cirsium arvense* (L.) Scop і *Ambrosia artemisiifolia* L., що робить їх перспективними в якості агентів біоконтролю. Нещодавні дослідження показали, що ці два патогени є генетично близькими і їх можна віднести до одного виду, а *P. syringae* pv. *helianthi* можна розглядати як позбавлену токсину форму *Pseudomonas syringae*

pv. *tagetis*. За останній час все частіше ураженим бактеріальною плямистістю соняшник виявляють в якості збудника *Pseudomonas cichorii*. Патоген виявляють в Німеччині, Бразилії, США, на о. Тайвань.

Дані патогени *Pseudomonas* викликають невеликі некротичні плями, що розповсюджуються та об'єднуються, цим самим викликаючи всихання зараженого листа. Окрім листа патоген також вражає стебла і черешки, сім'ядолі та крайові квіти-кошики. Під впливом токсину, що виділяється *P. syringae* pv. *tagetis*, вражається судинна система рослини, що викликає апікальний хлороз.

Перші симптоми хвороби з'являються вже на початку літа. На заражених листках починають з'являтися невеликі коричневі плями, близько 2 мм в діаметрі, оточені хлоротичним гало. Інколи відмерла тканина плям стає тоншою, кришиться і випадає. З часом плями стають більші і набувають неправильної форми. Тканини все більше вражаються і некротизуються, в процесі з'являються симптоми, які схожі на бактеріальний опік. Пошкоджене листя деформується та всихає, бактеріальний ексудат на них з'являється рідко.

На стеблах виникають маслянисті плями, спершу водонасичені, світло-коричневого кольору, пізніше вони стають сухі і темно-коричневі. Плями поширюються та об'єднуються, створюючи широкий некротичний ореол. Черешки також вражаються некротичним процесом, зазвичай на їх базальній частині. Пошкоджені тканини сильно розтріскуються та вкриваються виразками.

Уражені тканини коричневого кольору, інколи при вологих погодних умовах вони схожі на побризкані краплі ексудату бурштинського кольору. Пошкоджені бактеріальною рослини, зазвичай, не гинуть, але кількість пошкодженого листя зростає, плями виникають на крайових квітках кошиків, що збільшує можливість зараження насіння. Основними джерелами інфекції є заражені бур'яни та залишки. [45]



Рисунок 1.6 Бактеріальна плямистість на листі сояшнічку [45]

1.7. Регенерація рослин

Регенерація тканин (або ж репарація) – це здатність до відновлювання пошкоджених ділянок на тілі рослини, з яких були видалені тканини. Зазвичай це відбувається при пошкодженні молодих рослинних тканин, наприклад поверхня листка чи коріння. Основна функція цього процесу це відновлення втрачених або пошкоджених частин рослини. Це схоже на процеси деяких тварин, як наприклад, вродження планарій чи гідр або регенерація кінцівок амфібій.

Є велика різноманітність форм регенерації. Це спричинено такими причинами, по-перше, регенерація – це один із найголовніших неспецифічних способів захисту рослин, які мають прикріплений спосіб життя, від різних типів пошкоджень. По-друге, велика кількість форм регенерації вдало застосовуються

рослинами, що мають вегетативний спосіб розмноження. Вміння рослин до регенерації полягає в основі технології мікроклонального розмноження [18].

У випадку пошкодження рослини регенерація відбувається за участі меристем, а при їх відсутності клітини спеціалізованих тканин в місці механічного пошкодження диференціюються і набувають вміння до поділу.

Клітини, що знаходяться біля рани починають периклінальний поділ, відокремлюючи нові клітини в напрямку до рани. Після цього на поверхні рани утворюється фелоген, що формує захисну тканину – перидерму. Рани також заживляються калусною тканиною [355].

Розрізняють такі види регенерації:

- Фізіологічна – проходить протягом всього життя організму, супроводжується безперервним оновленням клітин епідермісу, волокнистих структур та їхньої основної речовин, в залежності від зміни умов існування в процесі виконання своїх функцій.

- Репаративна (відновлювальна) – відбувається при впливі різноманітних патогенних чинників, які спричиняють ушкодження тканин і клітин та їх відмирання – фізіологічна регенерація в хворому організмі.

Репаративна регенерація буває у двох формах:

1. Повна (реституція) – процес заміщення недоліку тканини ідентичні тій, що відмерла. Обов'язкова умова – не пошкоджений судинний і нервовий апарат.

2. Неповна (субституція) – процес часткового заміщення виниклого дефекту іншою тканиною.

- Патологічна – така, що проходить не так як в звичайних умовах. Виникає при спотворенні перебігу регенераторного процесу (надмірним або недостатнім, також при перетворенні в ході регенерації одного виду тканин в інший (метаплазмія). Надмірна (гіперрегенерація) – характерна посиленням формуванням тканин в місці пошкодження, протилежна їй гіпорегенерація [15].

1.8. Роль макроелементів для живлення соняшника

Протягом вегетації соняшник засвоює елементи живлення нерівномірно, при чому процес їх поглинання соняшником розтягнтий в часі. Через це соняшнику потрібно набагато більше макроелементів ніж, наприклад, зернові чи якісь інші культури.

- Фосфор. Це важливий елемент для формування і наливу сім'янок, тому для отримання врожаю соняшника не менше ніж 2 т/га рослинам необхідно близько 23 кг фосфору. Цей макроелемент сприяє росту кореневої системи і через це є важливим на початкових етапах розвитку. Достатня кількість фосфору збільшує олійність насіння і покращує посухостійкість соняшника.

- Азот. Засвоєння азоту соняшником відбувається протягом всього вегетаційного періоду, але найбільше споживається до періоду цвітіння, коли формуються стебло, листки, корінь, кошик, соняшник засвоює 75 – 80% всього об'єму азоту. Для утворення насіння 2 т/га необхідно приблизно 58 кг азоту. Але надлишок цього макроелементу, може негативно впливати на якість урожаю. При надмірному споживанні утворюється зайва вегетативна маса, через це підвищується ризик вилягання рослин, збільшується вміст білка у насінні і зменшується вміст олії.

- Калій. Соняшнику потрібно велика кількість цього макроелемента, для 2 т/га урожаю насіння необхідно внести не менше 30 кг калію. Соняшник це рослина, яка споживає найбільшу кількість калію порівняно з іншими культурами. Він споживає його протягом всього періоду росту, але найбільше споживає під час утворення кошика і цвітіння [177].

1.9. Роль бору та інших мікроелементів для живлення соняшника

- Бор. Для нормального росту і розвитку соняшника бор є одним із найважливіших елементів живлення, він забезпечує ріст кореневої системи та вегетативних органів. Грає важливу роль в заплідненні квіток та проростанні пилку. Бор приймає безпосередню участь в синтезі нуклеїнових кислот,

транспортуванні вуглеводів та загальному метаболізмі соняшнику. В ґрунті більшість бору перетворюється у важкодоступні форми, через це його доцільніше вносити в якості позакореневого підживлення. Соняшник потребує бор протягом всього періоду вегетації, але критично необхідним є під час періоду цвітіння [42].

- **Цинк.** Бере участь у синтезі хлорофілу та деяких вітамінів, підвищує стійкість рослини до кліматичних стресів (різкі перепади атмосферних температур, заморозки, тощо)

- **Молібден.** Бере участь в утворенні здорової кореневої системи та є учасником азотного обміну. Додавати в ґрунт його краще в поєднанні з бором, тому що два елементи «підтримують» роботу один одного.

- **Мідь.** Бере участь в синтезі лігніну клітинної стінкою, збільшує активність продукування насіння, включає окисно-відновні процеси.

- **Марганець.** Має важливу роль в процесах азотного обміну, білкового синтезу та фотосинтезу в рослині. Бере участь у відновленні нітратів, активує деякі ферменти, впливаючи на метаболізм соняшника. Марганець найбільше споживається у фазі коли з'явилися 2-4 листки або у фазі бутонізації. В ґрунт марганець вносити неефективно, тому що в такому випадку він погано засвоюється рослинами. Краще його вносити в якості позакореневих підживлень. Для профілактики дефіциту марганцю потрібно звертати увагу правильному обробітку ґрунту: уникати надмірного поверхневого обробітку або занадто глибокого.

Дефіцит бору При недостатній кількості бору призупиняються ростові процеси рослин, деформується точка росту, відмирають тканини біля основи листків, деформуються кошики і листки. Зменшується кількість насіння в кошику і розміщується нерівномірно, інколи в центральній частині кошика насіння не формується взагалі. Основними причинами дефіциту бору є погане підживлення, надмірна волога та холодна погода тривалий проміжок часу, піщані ґрунти або ж підвищені норми додавання кальцію та азоту [27].

1.10. Біотехнологічні підходи для соняшника

Соняшник є перехреснозапильною культурою, тому через це зустрічається дуже різний спектр генотипів рослин соняшнику. Ця властивість робить селекційний процес соняшнику доволі складним, бо гомозиготні лінії складно ідентифікувати. Окрім цього генетична варіація створює затримки коли використовуються будь-які біотехнологічні методики [5]. Традиційні методи покращення (селекція, відбір, інтродукція) застосовуються до сьогоднішнього дня, але поєднання в одне ціле методики регенерації рослин і культури тканин, рослинні біотехнологічні підходи зможуть прискорити виготовлення соняшнику з вдосконаленими характеристиками і використання широкої генотипової варіабельності [1].

Вчені більше тридцяти років намагаються вирішити це питання, але соняшник і досі є однією з найбільш складних і цінних сільськогосподарських культур для маніпуляцій *in vitro* [46].

Проведення досліджень регенераційної здатності генотипів соняшнику є досить важливим етапом як в фундаментальних питаннях, так і в практичних генетичній інженерії.

Основними завданнями біотехнології соняшнику є:

- Покращення стійкості до хвороб (бактеріальних, вірусних);
- Підвищення стійкості до комах;
- Поліпшення складу олії, без змін інших важливих сільськогосподарських ознак [4].

Регенерація соняшнику можлива при органогенезі або соматичному ембріогенезі.

Органогенез – це процес утворення зачатків органів і їх поділ в процесі онтогенезу в багатоклітинних організмів. Виділяють два види органогенезу: онтогенетичний, що досліджується ембріологією і біологією розвитку, а також філогенетичний органогенез, який досліджується порівняльною анатомією [24].

Соматичний ембріогенез – це розвиток диплоїдних чи гаплоїдних соматичних клітин в рослині через певні ембріологічні стадії без злиття гамет. Процес розвитку соматичної клітини до ембріогенної виражається об'єднаними абіотичними стресами складу живильного середовища і інтервалом субкультування. Декілька видів стресу, таких як осмотичний тиск, іони важких металів, поранення, великі концентрації солей і великі рівні регуляторів росту рослин було запропоновано використовувати, щоб викликати соматичний ембріогенез в рослинах [7].

Соматичний ембріогенез це найяскравіший приклад тотипотентності рослинних клітин. Соматичний ембріогенез на відмінну від зиготичного поділяється на дві стадії:

- 1) Первинна клітинна стадія;
- 2) Перехід до ембріогенезу та розвиток зародку *in vitro*, через такі етапи: глобулярну стадію, стадію серця і торпеди до сім'ядельної фази та розвитку проростку. (рис 1.6.)

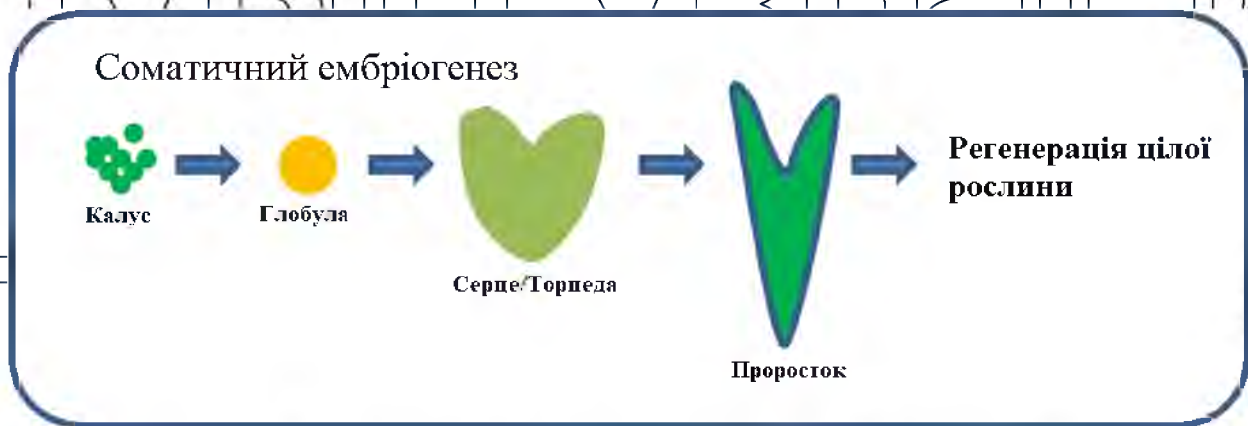


Рисунок 1.7. Стадії соматичного ембріогенезу [9]

1.11. Мікроклональне розмноження

«Мікроклональне розмноження – це масове (вегетативне) розмноження рослин в стерильних умовах *in vitro* при забезпеченні оптимального фізико-хімічного балансу, що виключає появу генетично змінених форм.» [23].

Культура ізольованих меристем є розповсюдженою для таких практичних

питань як створення генетичного банку матеріалу, отримання чистих безвірусних зразків, розмноження рослин.

Суть методу полягає в здатності регенерації тотипотентних клітин рослини [3].

Переваги мікроклонального розмноження над традиційним методом розмноження рослин

- 1) Великий коефіцієнт розмноження експлантів.
- 2) Отримання чистого безвірусного посадкового матеріалу.
- 3) Можливість великого обміну рослинами між країнами або регіонами.
- 4) Можливість отримання цінного генетичного матеріалу у будь-яку пору року, в не залежності від погодних умов.
- 5) Можливість виготовлення «банку» неінфікованого цінного селекційного біоматеріалу [23]

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Стерилізація лабораторного посуду та інструментів

Лабораторний посуд, що буде використовуватися в процесі роботи має бути гарно вимитий з миючими засобами, щоб не було забруднень, після цього декілька раз промитий дистильованою водою та добре висушений. Посуд та інструменти: колби, стакани, мірні циліндри, скальпель, пінцети, фільтрувальний папір, чашки Петрі та інші скляні або металеві інструменти стерилізують сухим жаром в сухожаровій шафі (рис. 2.1.), першчим помістивши це все в алюмінієві бокси або обгорнувши в декілька шарів фольги. Стерилізація відбувається за температури 100°C протягом 2 годин.



Рис. 2.1. Сухожарова шафа

Мікропробірки, пластикові носики для самплерів, посуд для введення рослин в культуру, дистильована вода стерилізуються вологим жаром в автоклаві (рис. 2.2.) на протязі 20 хв, при температурі 121°C і тиску 1 атм.



Рисунок 2.2. Автоклав

Вся робота проводиться в ламінарному боксі з горизонтальним потоком повітря в стерильних умовах. (рис. 2.3.) Перед тим як почати працювати в ньому, необхідно увімкнути вентиляцію на 20 – 30 хвилин для забезпечення обміну повітря. Сівши за ламінарний бокс, необхідно протерти всі поверхні, в тому числі скло, 70% етиловим спиртом. Потрібно одягнути чистий халат та вимити руки з дезінфікуючим засобом [16].



Рисунок 2.3. Ламінарні бокси з горизонтальним потоком повітря

2.2. Метод мікроклонального розмноження

2.2.1 Етапи мікроклонального розмноження рослин

Технологія включає в себе п'ять етапів (рис. 2.4.):

1. Відбір, стерилізація та введення експланта в культуру *in vitro*
2. Розвиток меристем з експланту.
3. Розмноження біоматеріалу до необхідних об'ємів.
4. Укорінення пагонів.
5. Адаптація рослин та перенесення їх із стерильних умов *in vitro* в ґрунтові умови вирощування.

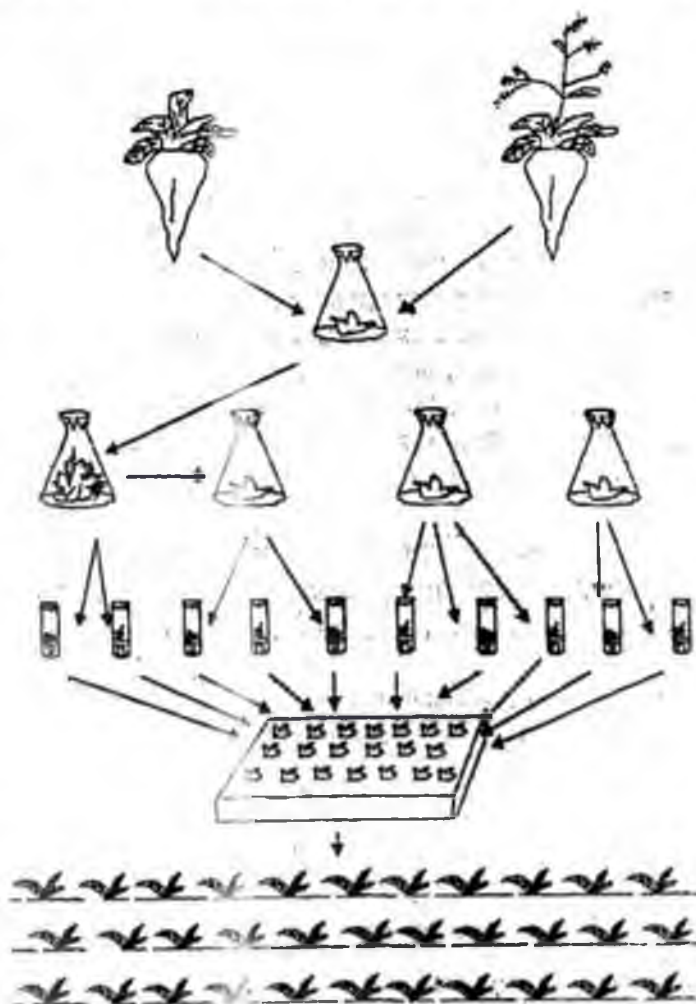


Рисунок 2.4. Схема мікроклонального розмноження рослин буряку [23]

2.3. Підбір експлантів та введення їх в культуру *In vitro*

Щоб правильно провести мікроклональне розмноження рослин підбір експлантів грає ключову роль. Найкраще підходить матеріал, взятий із здорових, не заражених рослин, які вирощували в гарних умовах.

При виборі експлантів потрібно звертати увагу на фазу розвитку рослини-донора, вид біоматеріалу, сезон року.

Не дорослі молоді органи є більш гнучкими з точки зору вміння до морфогенезу *in vitro*, ніж тканини, що вже зрілі. При відборі експлантів краще обирати меристематичні тканини, тому що вони мають велику інтенсивність до наростання і тотипотентність, а також швидко адаптуються до умов ізолюваної культури.

Розмір експланту може бути в межах від 0,1 мм до 1,0 см в залежності від біоматеріалу.

Апикальну меристему, де формується конус наростання пагона і корення, що має висоту 0,1 мм і ширину 0,25 мм важко виділити не пошкодивши його та індукувати до росту. Тому частіше за все виділяють саме меристему і один чи два листових примодія. Експланти що мають більший розмір мають більший шанс вижити і швидше набирають масу рослинного матеріалу в культурі *in vitro*.

Брати меристеми з квітконосних пагонів для мікроклонального розмноження не радять.

Перед тим як брати меристеми та вводити їх в ізолювану культуру, необхідно простерилізувати верхівки пагонів конкретними стерилізаторами, які є ефективні для певного біовиду та типів тканин.

Виділення меристем проводиться у стерильному ламінар-боксі, використовуючи біокулярний мікроскоп із двадцяти чи сорока кратним збільшенням. При проведенні процедури використовуються такі інструменти:

- леза;
- пінцети з тонким кінчиком;
- голки;

- скальпелі, тощо.

2.4. Техніка виділення меристеми

На столику мікроскопа однією рукою тримаючи пинцетом верхівку пагонів, другою беруть голку і не сильно натискаючи відділяють листочки та листові зачатки, що прилягають до меристеми, або ж вирізають лезом меристему разом з одним чи двома листовими примордіями. Для цього роблять чотири надрізи біля основи меристеми під прямим кутом.

Експланти, що виділили переносять у культуральну пробірку на поверхню живильного середовища і поміщають в контрольовані умови вирощування.

2.4.1. Активація розвитку меристем з експланту

Щоб запустити процес розвитку апікальної меристеми з експланту, потрібно зробити певний фізико-хімічний баланс, що буде найкращим для біовиду, який будуть розмножувати.

Для вдалого розвитку меристем важливою частиною є вибрати оптимальний склад живильного середовища та точний баланс екзогенних регуляторів росту відповідно до конкретного типу тканин біоматеріалу (ауксинові, цитокінінові, гіберелінові цитокініно-ауксинові, тощо).

Для кращої стимуляції розвитку нарощування біоматеріалу в ізольованій культурі, в живильні середовища в які вводяться меристеми додаються регулятори росту що мають концентрацію на 15% вищу ніж основні живильні субстрати для розмноження. Також це запобігає впливу не великої інгібуєчої дії антибіотиків, які вводяться в живильне середовище щоб обеззаразити меристеми від бактеріально-грибкових інфекцій на початкових етапах розвитку.

Біоматеріали, які висадили на живильні середовища поміщають у культуральних кімнатах і підтримують оптимальні умови середовища для найкращого розвитку:

- температура – 22 – 25 °C;
- відносна вологість – 75 – 80 °C;
- фотоперіод 16 годин з інтенсивністю освітлення 3-5 кілолюкс.

Спершу відбувається розвиток ексиланту. Він швидко збільшує розміри, інколи змінюючи власний колір. Потім в пазухах листків з'являються бруньки. Після 20 – 30 днів (це залежить від живильного середовища, генотипу,

біоматеріалу) пагони, що утворилися відмежовують від вихідних тканин і поміщають на середовище для розмноження. Інколи регенерація бруньок починається лише після другої пересадки експлантів.

2.5. Розмноження рослинного матеріалу

Щоб збільшити кількість біоматеріалу потрібно черенкувати (клонувати) рослину отриману з меристем.

При мікроклональному розмноженні в залежності від напрямку наростання і розвитку рослинного матеріалу та закладення вегетативних бруньок виділяють два типи клонування: горизонтальне і вертикальне.

Для тканин що мають ауксинову природу (картопля, гвоздика, спаржа) більше характерний вертикальний тип клонування.

Для таких тканин у ростове живильне середовище додають великі концентрації ауксинів, щоб стимулювати ріст апікальної меристеми і зменшити утворення бокових пагонів. Біоматеріал швидко збільшується, створюючи центральне стебло з листками.

Коли вже буде близько 7 – 10 листків рослину можна клонувати. Її дістають з пробірки і гострим скальпелем розрізають на клони. Кожний клон повинен мати частину стебла з листком. Матеріал, що клонували садять на оновлене поживне середовище, яке буде стимулювати ріст бокової бруньки, що розташована поміж стеблом і черенком листка.

При даному типі клонування з однієї рослини можливо отримати 7 – 10 клонів.

Для тканин що мають цитокінінову природу (такі рослини як суниця, буряк, цикорій, тощо) характерний горизонтальний тип клонування. Щоб такі рослини росли і розмножувалися до живильного середовища додають великі концентрації цитокінінів (кінетин, 6-бензиламінопурин).

Цитокініни потрібні для того щоб зменшувати апікальне домінування та стимулювати зародження і ріст бокових бруньок.

Під цитокініновим впливом з'являється висока здатність до утворення бруньок, що дає можливість отримати приблизно від 15 до 35 клонів лише з однієї рослини. Кожен клон має групу меристематичних клітин і легко відділяється від всієї колонії.

Коли клон переносять на оновлене поживне середовище відбувається масове закладання і ріст бруньок на пазухах листків.

Рослини що помістили на живильне середовище вирощують в лабораторних умовах в культуральній кімнаті.

Час від часу оновлюючи живильний субстрат біоматеріал розмножують до потрібних об'ємів [21].

2.6. Укорінення рослин

Після того як отримають потрібну кількість клонів, їх поміщають на середовище щоб укорінити та отримати повноцінні рослини. Основні індуктори що слугують для коренеутворення є ауксини.

Щоб сформувалися корені, пагони рослин розділяють і садять на поживне середовище для ризогенезу, яке має містити збільшені концентрації регуляторів росту ауксинової природи. Це є головним правилом коренеутворення *in vitro*.

Під дією ауксинів (гетероауксин, нафтилшотова кислота) зростає поділ клітин паренхіми пагона, що стає причиною диференціації клітин у базальній частині клона і виникнення кореневих зачатків.

Найлініше укорінюються клони, які мають висоту вищу за 7 мм.

Для кращого укорінення пагонів, в поживне середовище для розмноження, додають збільшені концентрації гіберелінової кислоти (для розтягування пагона) та додають менше або взагалі виключають вміст цитокінінів, в залежності від біовиду.

Приблизно через 15 – 25 днів після того як рослини висадили на середовище для ризогенезу, утворюється гарно розвинена коренева система і

після цього рослина готова до пристосування і переміщення в природні умови вирощування.

Тканини, що мають ауксинову природу можуть утворювати корені на ростовому середовищі. Цей процес пришвидшується фітогормонами, що формуються самою рослиною в культурі. Це зменшує час мікроклонального розмноження і також економічні витрати на укорінення біоматеріалів.

Частота ризогенезу рослин *in vitro* залежить від часу їх культивування до укорінення. При зростанні кількості пасажів включається процес укорінення рослин ауксинової природи і зменшується термін формування коренів рослинного матеріалу, але для тканин цитокінінової природи процес навпаки – ускладнюється.

2.7. Адаптація рослин та перенесення їх із стерильних умов *in vitro* в ґрунтові умови вирощування

Перенесення рослин із умов *in vitro* в умови *ex vitro* є одним із найважливіших і найбільш трудомістким завершальним етапом в мікроклональному розмноженні.

Найкращим для пересаджування є момент, коли у рослини молоді листки які здатні до фотосинтезу, а коренева система гарно розростається, щоб поглинати мікроелементи з ґрунту.

При перенесенні рослинного матеріалу з культуральних умов вирощування в умови природнього ґрунту, спершу слід їх акліматизувати та адаптувати матеріал до звичайних умов освітлення, вологості і температурного режиму.

Існує два способи адаптації:

- адаптація рослин у лабораторії;
- використання фітотронів для проміжного укорінення рослин.

Спосіб з використанням лабораторії полягає у використанні адаптаційних кімнат обладнаних за типом культуральних приміщень, в яких плавно із стерильних умов вирощування, рослини підводять до природних умов, куди потім їх переміщують.

Після того як рослини адаптуються, їх переносять із пробірок в ґрунтові природні умови під плівку.

Спосіб з використанням фітотронів полягає в перенесенні рослин із пробірок в горщики або ящики і їх культивування в комплексі, що складається з теплиць і має контрольовані параметри мікроклімату.

В якості субстрату використовують суміш перліту і піску, в якій додають необхідні мікроелементи перед посадкою рослин. В пропорціях 3/4 частини перліту і 1/4 частини піску варто додавати в діючій речовині 1 - 2 г азоту, 2 г калію і 2 г фосфору.

Для укорінення рослин також використовують суміш яка є водоутримуючою та має гарну повітряну проникність, вона складається з 2/4 частини ґрунту, 1/4 частина перліту і 1/4 частини торфу. Для кращого приживання рослинного матеріалу в суміші зверху насипають шар перліту 2 – 3 см. Загальна висота живильного субстрату має не бути меншою ніж 7 – 10 см, а площа живлення для рослин не менша ніж 5 см².

Субстрат, що приготували, змочують поживним розчином, який містить регулятори росту, що сприяють ризогенезу.

Світловий період у фітотроні, повинен бути не менше 14 годин на добу, а температура в межах від 20 – 25 °С, відносна вологість – 70 – 80 %. Рослини, що висадили на субстрат накривають плівкою.

Процес посадки рослин в ґрунтову суміш роблять вручну. В субстраті утворюють мале заглиблення і у вертикальному положенні поміщають в нього коріння клонів. Субстрат гарно ущільнюють навколо рослини, поливають і посудину накривають склом чи плівкою.

Після 7-10 діб, коли рослини вже приживуться і будуть рости, потрібно провести їх загартування. Спершу знімають скло чи плівку по 10 – 15 хв на день, пізніше час загартування збільшують до 1 – 2 годин. Через 4 – 6 днів плівку (скло) можна повністю зняти.

Після 30 – 50 днів адаптації рослини створюють гарно розвинену, міцну галузеву кореневу систему. Такі рослини вже готові для пересадки в природні умови вирощування.

На перших стадіях росту рослини можуть мати невеликі морфологічні зміни стебла і листкового апарату, але в кінці вегетації рослини матеріали набувають звичайного вигляду, це є характерно для рослини-донора вихідного експланта.

Обов'язково проводять ідентифікацію рослинного матеріалу використовуючи цитологічний метод [23].

Схеми мікроклонального розмноження зображено на рисунках 2.4, 2.5

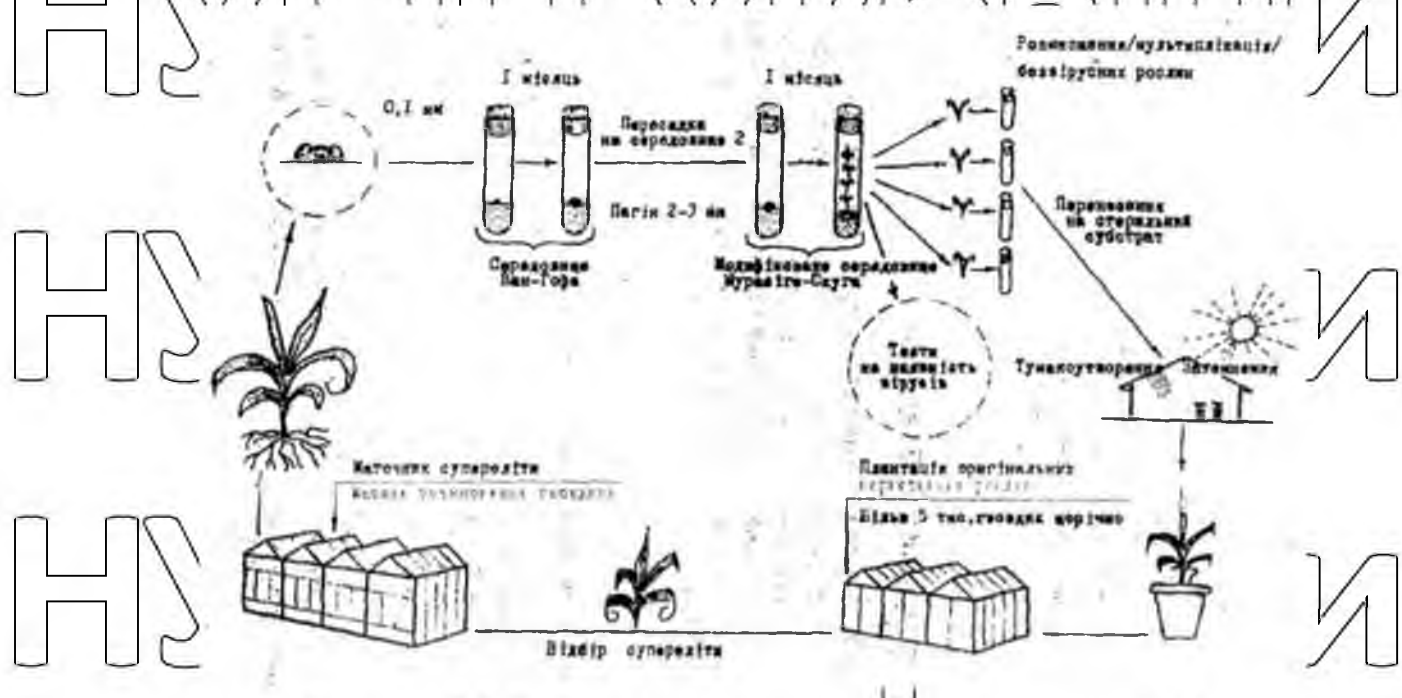


Рисунок 2.5 Схеми мікроклонального розмноження [23]

НУБІП України

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Підбір найоптимальніших умов стерилізації насіння соняшника

Дослідження впливу збудника бактеріальної плямистості соняшника виконувалося в лабораторії в асептичних умовах. Одержання чистого, стерильного матеріалу є важливою задачею, через можливе зараження біоматеріалу бактеріями, мікроміцетами або їх спорами. При поганій стерилізації можливе зараження рослинного матеріалу мікроорганізмами, що є згубними для роботи з цими рослинами в культурі *in vitro*. Але водночас не потрібно створювати занадто жорсткі умови стерилізації, для того щоб тканини рослин не були пошкоджені і залишалися життєздатними. Як правило режим стерилізації визначають експериментально для окремих об'єктів. Підбір найкращих умов стерилізації соняшника є першою експериментальною задачею.

Для проведення дослідів ми взяли три різних сорти соняшника:

- Донський 60 – середньостиглий, високоврожайний сорт;
- Первенець – середньостиглий, високоолеїновий сорт;
- ВНДЮК 8883 покращений – середньоранній, високоврожайний;

3.1.1 Обробка і стерилізація насіння

Процес стерилізації соняшникового насіння проводили в стерильних умовах в ламінарному боксі. Готуємо різні концентрації білизни та стерильну дистильовану воду для промивання. Беремо такі концентрації в пропорції білизни до дистильованої води: 1:2, 1:3 та 1:4. Кожен сорт соняшника поміщаємо в різні концентрації білизни на різний час: 10 хв, 15 хв, 20 хв, для визначення найкращих умов стерилізації. Після кожного часу стерилізації, насіння переміщаємо у дистильовану воду на 10 хв в одній посудині, потім переносимо в дистильовану воду в іншу посудину, також на 10 хв.

Простерилізоване насіння садимо на агаризоване поживне середовище Мурасіге-Скуга, для його пророщення, а в майбутньому – для виділення різних форм експлантів. Поміщаємо посаджений рослинний матеріал в термостат і культивуємо його при температурі 24-26°C, з 16-годинним фотоперіодом протягом 5-7 діб в залежності від експланта. (рис. 3.1., рис. 3.2.)

Через декілька днів можна оцінити результати стерилізації. Визначаємо ріст контамінаційної мікрофлори та життєздатність рослинного матеріалу на всьому висадженому насінні та для зручності переводимо у відсотки і заносимо у таблиці. (таблиця 3.1.1., таблиця 3.1.2., таблиця 3.1.3.) Високий відсоток показує гарний стан експлантів, що добре проростають, а низький відсоток – контамінацію або загибель експлантів.



Рис. 3.1. Насіння різних сортів на 5 день культивування та після стерилізації і поміщення в живильне середовище



Рис. 3.2. Насіння різних сортів на 6 день культивування та після стерилізації і поміщення в живильне середовище.

Таблиця 3.1.1

Ефективність стерилізації насіння сорту «Донський 60»

Сорт «Донський 60»

Концентрація близни	Час стерилізації, хв	Кількість насінин	Ефективність, %
1:2	10	50	81
	15	50	84
	20	50	88
1:3	10	50	71
	15	50	78
	20	50	81
1:4	10	50	59
	15	50	65
	20	50	69

Аналізуючи таблицю 3.1., можемо побачити які саме умови стерилізації виявилися найкращими, для деконтамінування насіння сорту «Донський 60».

Найнижча ефективність була при стерилізації протягом 20 хв та концентрації білизни 1:4, яка склала 59 %. Найкраща ефективність вийшла при часу стерилізації 15 хв і концентрації 1:2 та склалає 88%, найбільша кількість експлантів не була заражена та гарно проросла.

Таблиця 3.1.2.

Ефективність стерилізації насіння сорту «Первенець»

Сорт «Первенець»

Концентрація білизни	Час стерилізації, хв	Кількість насінин	Ефективність, %
1:2	10	50	78
	15	50	82
	20	50	87
1:3	10	50	73
	15	50	74
	20	50	78
1:4	10	50	53
	15	50	65
	20	50	68

Результати по стерилізації насіння сорту «Первенець» показують, що найкращими умовами були при часу стерилізації 20 хв, концентрації 1:2 – 87% ефективність. Найгірші умови при часу стерилізації 10 хв, концентрації 1:4, ефективність складає 53%.

НУБІП УКРАЇНИ

Таблиця 3.1.3.

Ефективність стерилізації насіння сорту «ВНДЮК 8883 покращений»

Сорт «ВНДЮК 8883 покращений»			
Концентрація білизни	Час стерилізації, хв	Кількість насіння	Ефективність, %
1:2	10	50	88
	15	50	92
	20	50	90
1:3	10	50	81
	15	50	85
	20	50	87
1:4	10	50	66
	15	50	70
	20	50	75

Результати показують що найефективнішою була стерилізація 92% при 1:2 концентрації і 15 хв часу. Найгірша стерилізація 66%, як і в попередніх сортів це концентрація білизни 1:4 і час проведення 10 хв.

Аналізуючи дані стерилізації всіх сортів, можна підсумувати, що в загальному найефективнішою комбінацією стерилізуючого агенту експозиції рослинного матеріалу була концентрація білизни 1:2, протягом 20 хвилин. Виходячи з цих даних деконтамінація рослинного матеріалу в дослідях буде базуватися на вище сказаних умовах.

3.2. Вирощування калюсу

В експериментах використовувалися різні типи експлантів – сім'ядольні листки (рис. 3.2.1.), справжні листки, стебло, корінь від 5 до 7-денних проростків

різних сортів, які культивувалися на різних варіаціях живильного середовища, що відрізнялися за складом і концентрацією Бору.

Переважає кількість експлантів, утворених калюсо, що відрізнявся за кольором (зелений, світло-зелений, білий) та консистенцією (щільний, середньої щільності і рихлий) в залежності від експланту та варіації гормонів.



Рис. 3.2.1. – добові сім'ядольні листки зрілих зародків соняшнику

сорту ВНДЮК 8883 покращений

Для індукції калюса використовувалися такі живильні середовища:

- Мурасіге-Скуга;
- Еріксона;
- Гамборга

Калюсо культивувався при температурі 26°C, в темряві. Через кожні 20 днів проводилося пасивування. Візуально визначали кількість утворених

регенерантів на експлант, частоту регенерації, індукцію калюсоутворення та морфологію калюса. До середовища Гамборга ми додали ауксин ІОК з

концентрацією 1,0 мг/л, до середовища Еріксона – ауксин 2,4-Д з концентрацією 2,0 мг/л, а в середовищі МС два варіанти фітогормонів – з ІОК з концентрацією

1,5 мг/л та ІМК з концентрацією 0,5 мг/л. Результати що отримали обробляли методами статистичного аналізу та занесли в таблиці.

Корені досліджуваних ліній сорту Донський 60 майже на всіх варіаціях поживного середовища утворювали неморфогенний калюс і при подальшому його субкультивуванні, спостерігалася деградація калюсу. Найкращий відсоток утворення калюсу спостерігається із пагона на середовищі МС, з додаванням НОК.

Таблиця 3.2.1.

Вплив регуляторів росту на утворення калюсу в різних середовищах

сорту «Донський 60»

Сорт «Донський 60»

Середовища і регулятори росту	Гамборга	Ерікссона	Мурасіге-Скуга	
	НОК, 1 мг/л	2,4-Д, 2 мг/л	НОК, 1,5 мг/л	ІМК, 0,5 мг/л
Експланти				
Корінець	-	+	-	-
Листок	+	+	-	+
Сім'ядольні листки	-	+	-	+
Стебло	+	-	+	+

Таблиця 3.2.2.

Якість утвореного калюсу з різних експлантів сорту «Донський 60»

Експланти	Індукція калюсу	Маса, г	Консистенція	Колір
Корінець	+	154	рихла	білий
Листок	+++	175	гнїльна	зелений

Сім'ядольні листки	++	164	найвщільна	Світло-зелений
Стебло	+++	186	щільна	світло-зелений

На сорт Первенець регулятори росту та середовище вплинули по іншому, найкращим результатом було утворення калюсу на сім'ядольних листках на середовищі Еріксона з регулятором росту 2,4-Д.

Таблиця 3.2.3.

Вплив регуляторів росту на утворення калюсу в різних середовищах сорту «Первенець»

Сорт «Первенець»				
Середовища і регулятори росту	Гамборга	Еріксона	Мурасіге-Скуга	
Експланти	ІОК, 1 мг/л	2,4-Д, 2 мг/л	НОК, 1,5 мг/л	ІМК, 0,5 мг/л
Корінець	+	+	-	-
Листок	-	+	-	+
Сім'ядольні листки	-	+	+	+
Стебло	-	-	+	+

Якість утвореного калюсу з різних експлантів сорту «Первенець»

Експланти	Індукція калюсу	Маса, г	Консистенція	Колір
Корінець	++	166г	рихла	білий

Листок	++	178г	напівщільна	Зелений
Сім'ядольні листки	+++	184г	щільна	світло-зелений
Стебло	++	180г	напівщільна	світло-зелений

Сорт ВНДЮК 8883 покращений має результати схожими на сорт Донський 60. Найкращий відсоток утворення калюсу спостерігається також із пагона на середовищі МС, але вже з додаванням ІМК. Також гарні результати калюсоутворення були з листка.

Таблиця 3.2.5.

Вплив регуляторів росту на утворення калюсу в різних середовищах

сорт «ВНДЮК 8883 покращений»

Середовища і регулятори росту	Гамборга	Ерікссона	Мурасіге-Скуга	ІМК, 0,5 мг/л
Експліанти	НОК, 1 мг/л	2,4-Д, 2 мг/л	НОК, 1,5 мг/л	ІМК, 0,5 мг/л
Корінець	+	+	-	-
Листок	-	+	+	+
Сім'ядольні листки	-	+	-	+
Стебло	+	+	+	+

НУБІП УКРАЇНИ

Таблиця 3.2.6.

Якість утвореного калюсу з різних експлантів сорту «ВНДЮК 8883 покращений»

Експланти	Індукція калюсу	Маса, г	Консистенція	Колір
Корінець	++	171	напівщільна	світло-зелений
Листок	+++	181	щільна	зелений
Сім'ядольні листки	++	184	щільна	світло-зелений
Стебло	+++	190	напівщільна	світло-зелений

Дивлячись на результати можемо сказати, що найкраще калюс індукується із експлантів пагона майже в усіх сортах, окрім сорту Первенець, тут найкраща індукція була на сім'ядольних листках.

3.3. Вплив збудника на розвиток рослин соняшника

Для дослідження було використано штам *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* – який виділили з листя соняшнику сорту Альзан у фазі утворення кошиків, що зберігається в колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Для моделювання бактеріального стресу, до складу живильного середовища добавляли інактивовані клітини (ІК) *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* в концентраціях 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0%. Для контролю використовували живильне середовище, що не містить стресового чинника. Культивування калюсних культур проводили при температурі 26°C, в темряві. Через кожні 22 доби проводили пасирування калюсних тканин. В кінці циклу культивування визначали ростовий індекс та масу сирого калюсу. Індекс

стійкості вираховували як відношення кількості колоній калюсу в третьому пасажі до кількості колоній калюсу в першому пасажі, виражене у відсотках.

Для відбору клітинних ліній соняшника використовували листкові експланти і в якості базового живильного середовища взяли МС із додаванням регулятора росту ІМК 0,5 мг/л, оскільки воно показало себе найкраще в більшості випадків, також до середовища додавали інактивовані за температури 100°C клітини *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* у вищенаведених концентраціях. Відмінності генотипів за реакцією на фітотоксичні метаболіти в середовищі були найбільш помітні за основними показниками – приростом калюсу і частотою проліферації. (Таблиця 3.3.1.)

Таблиця 3.3.1.
Вплив концентрації ІК *P. syringae* pv. *helianthi* на частоту проліферації в культурі калюсних клітин сортів соняшника, %

Концентрація ІК, %	Частота профідерації калюсу сортів, %		
	Донський 60	Первеніць	ВНДЮК 8883
0	96,8±2,8	96,3±2,8	97,9±2,5
0,2	84,5±3,1	74±3,2	82,1±3,0
0,4	77,2±2,6	62,3±2,1	75,3±2,6
0,6	53,3±2,3	33,6±2,0	50,5±1,9
0,8	43,4±2,0	16,7±1,5	37,2±1,7
1,0	29,9±1,8	10,4±0,9	20,2±1,6

Сублетальні концентрації інактивованих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*, при яких можна отримати нормально розвинені проростки, залежали від стійкості генотипу. У сортів Донський 60 та ВНДЮК 8883 сублетальна концентрація ІК була 0,8% , при якій частота проліферації калюсу становила 43,4% і 37,2% відповідно. При таких умовах приріст калюсної маси був у межах від 39% до 43% (Рис. 3.3.1).

Для сорту Первенець сублетальна концентрація ІК *P. syringae* pv. *helianthi* становила 0,6% при якій проліферація калюсу була 33,6%, що на 62,7% менше ніж в контролі. При такій концентрації ІК приріст калюсної маси був не більше ніж 40% (Рис. 3.3.1). Сорти Донський та ВНДЮК 8883 виявилися більш стійкими до фітотоксичних метаболітів ніж сорт Первенець.

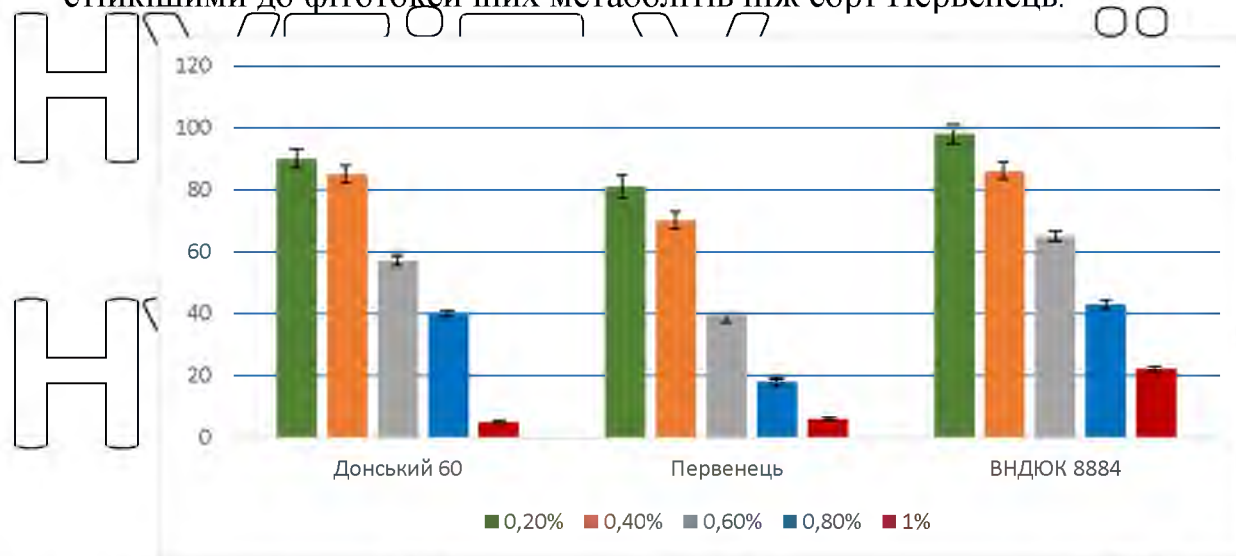


Рис. 3.3.1. Приріст калюсної маси сортів соняшнику в залежності від концентрації ІК *P. syringae* pv. *helianthi*.

Пасажування калюсних культур соняшнику на поживні середовища, що містять ІК показало явну залежність числа колоній, що вижили від генотипу досліджуваних сортів.

В першому пасажі кількість життєздатних клітинних колоній зменшилося до 33,7–46,9%. Після третього пасажування число живих колоній склало 10,1–23,6% (Таблиця 3.3.2.).

Калюсні лінії, що мали стійкість до стресового чинника відзначалися щільною густою будовою і повільним ростом. Індекс стійкості колоній в ході пасирування калюсу склав від 30,4 до 48,1%, що говорить про успішне застосування методу клітинної селекції для отримання рослин-регенератів, які є стійкими до збудника бактеріальної плямистості соняшнику.

Індекс стабільності стійкості в процесі пасирування калюсу різних сортів соняшнику на поживних середовищах з ІК *P. syringae pv. helianthi*.

Сорт	Число живих колоній у пасажах (% від числа висаджених на поживне середовище з ІК <i>P. syringae pv. Helianthi</i>)			Індекс стійкості колоній
	1	2	3	
Донський 60	44,1±3,8	23,3±2,3	17,8±0,8	40,3
Первенець	33,7±3,0	14,5±1,1	10,1±0,8	30,4
ВНДЮК 8883	46,9±4,1	27,2±2,5	23,6±1,0	48,1

Отже, підсумувавши результати досліджень можемо побачити, що сорт ВНДЮК 8883 є найбільш стійкий до збудника, оскільки калюс із додаванням інактивованих клітин ріс на ньому найкраще, також гарний результат показав сорт Донський 60, а сорт Первенець виявився найбільш вразливим до збудника

ВИСНОВКИ

В дипломній роботі було проведено аналіз літературних джерел щодо характеристики сортів соняшнику, використання його в різних сферах та особливості збудника бактеріальної плямистості соняшнику. Визначили вплив збудника на різні сорти соняшнику.

Було визначено найоптимальніші умови для стерилізації насіння соняшнику: концентрація білизни 1:2 та час проведення стерилізації 20 хв.

В результаті проведених досліджень визначено вплив фітотоксичних метаболітів збудника бактеріальної плямистості соняшнику за пасирування на поживні середовища з різними концентраціями ІК *P. syringae pv. helianthi*.

Також було визначено сублетальні концентрації ІК для сортів Донський 60 та ВНДЮК 8883 сублетальна концентрація склала 0,8%, а для сорту Первенець 0,6%.

Встановлено, що за реакцією кахосних клітин соняшника на фітотоксичні метаболіти ІК *P. syringae pv. helianthi*, сорти ВНДЮК 8883 та Донський 60 є більш стійкими до збудника бактеріальної плямистості, тоді як сорт Первенець є менш стійкий.

Одержані результати культивування можна використовувати для захисту соняшнику від збудника та поліпшення врожаю, за рахунок повного відновлення через органогенез і соматичний ембріогенез, міжвидову гібридизацію і культивування ембріонів.

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Akbar S. Mohmand, A. Q. (1994). *Tissue Culture of Sunflower*. Pakistan
2. Dagustu N. In vitro tissue culture studies in sunflower (*Helianthus* spp.)
Journal of Crop Breeding and Genetics. 2018. N4(1). P. 13-21.
3. In vitro culture of isolated living sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryo
sacs. Marzena Popielarska, Leslaw Przywara [Електронний ресурс] – Режим
доступу до ресурсу:
<https://www.researchgate.net/publication/226579071> In vitro culture of isolated li
ving sunflower *Helianthus annuus* L embryo sacs
4. K. Sankara Rao, V. K. (1999). Agrobacterium-mediated Transformation of
Sunflower (*Helianthus annuus* L.): A Simple Protocol. *Annals of Botany* 83, 347-
354.
5. M. Bayraktaroglu, N. D. (2011). Influences of Genotype and Explant on Callus
Induction and Shoot Regeneration in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of
Agricultural Science and Technology*, 226-231.
6. Moghaddasi MS. Sunflower Tissue Culture. *Advances in Environmental
Biology*. 2011. N5(4). P. 746-755.
7. Mujib A. Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications / A.
Mujib. – New Delhi: Springer, 2016. – 266 с.
8. Root habits of sunflower [Електронний ресурс] – Режим доступу до
ресурсу: [https://soilandhealth.org/wp-
content/uploads/01aglibrary/010139fieldcroproots/010139ch16.html](https://soilandhealth.org/wp-content/uploads/01aglibrary/010139fieldcroproots/010139ch16.html)
9. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants / [L. Y. Solís-Ramos, A.
Andrade-Torres, L. Saenz Carbonell та ін.] // Embryogenesis / [L. Y. Solís-Ramos,
A. Andrade-Torres, L. Saenz Carbonell та ін.], 2012. (InTech). С. 652.
10. Vassilevska-Ivanova R, Shtereva L, Kraptchev B, Karceva T. Response of
sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes to PEG-mediated water stress. *Central
European Journal of Biology*. 2014. N9(12). P. 1206-1214.

11. Адаменко С.М., Костюшко І.П. Підживлення сої та соняшника. Агроном. 2015. № 2. С. 58–61.

12. Била гниль, або склеротиніоз - *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

[Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

[https://alfasmartagro.com/alfa-](https://alfasmartagro.com/alfa-science/harmful-objects/diseases-sunflower/sclerotinia-sclerotiorum-lib-de-bary-1/)

[science/harmful-objects/diseases-sunflower/sclerotinia-sclerotiorum-lib-de-bary-1/](https://alfasmartagro.com/alfa-science/harmful-objects/diseases-sunflower/sclerotinia-sclerotiorum-lib-de-bary-1/)

13. Біологічні особливості соняшника [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://agroua.net/plant/catalog/cg-5/c-17/info/cag-242/>

14. Болізни подсолнечника [Електронний ресурс] – Режим доступу до

ресурсу: [https://www.fossehosceneter.com/2014-02-28-11-39-42/2014-11-16-12-58-](https://www.fossehosceneter.com/2014-02-28-11-39-42/2014-11-16-12-58-47/bolezni/1202-podsolnechnik/1140-podsolnechnik)

[47/bolezni/1202-podsolnechnik/1140-podsolnechnik](https://www.fossehosceneter.com/2014-02-28-11-39-42/2014-11-16-12-58-47/bolezni/1202-podsolnechnik/1140-podsolnechnik)

15. Види регенерації [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<https://studfile.net/preview/6650060/page:2/>

16. Види стерилізації [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

https://studopedia.com.ua/1_229438_vidi-sterilizatsii/html

17. Добрива [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://plant-agro.com/product.php?id=312>

18. Дослідження регенераційної здатності ліній культурного соняшнику

(*Helianthus annuus* L.) в умовах *in vitro* / В. О. Бабиц, С. В. Хомутовська, О. Ю.

Куліш, В. А. Смірнова, Я. Ф. Парій, М. Ф. Парій, Ю. В. Симоненко // Фактори

експериментальної еволюції організмів. - 2016. - Т. 19. - С. 68-72. - Режим

доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2016_19_16

19. Захист соняшнику від хвороб [Електронний ресурс] – Режим доступу до

ресурсу: <https://www.syngenta.ua/news/sonyashnik/zahist-sonyashniku-vid-hvorob>

20. Значення соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<https://sites.google.com/site/kvitisimvoliukraieni/znacenna-sonasniku>

21. Індукція калюсу і регенерація пагонів у рослин томата. Богославець В.А.,

Коломієць Ю.В [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<http://confer.uesr.sops.gov.ua/uesr2019/paper/viewFile/18288/10183>

22. Користь насіння соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://bonduelle.ua/stattya/nasinnja-sonjashnyka>

23. Мікроклональне розмноження рослинного матеріалу. Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<https://genetics.udau.edu.ua/assets/files/03.2020.-metod.-ryabovol/osnov-biot-metod-mikroklonalne.pdf>

24. Мікроклональне розмноження Унгернії Віктора В. А. Кунах, Л. П. Можилевська, О. М. Бублик, І. В. Колоніна, В. І. Музика [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

http://biotechnology.kiev.ua/storage/2008/4/2008/Kunah_Moghilevskaya.pdf

25. Морфологические особенности растения Helianthus annuus L [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

https://studbooks.net/1100397/agropromyshlennost/morfologicheskie_osobennosti_rastenija_helianthus_annuus

26. На що хворіє соняшник? [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.syngenta.ua/news/sonyashnik-na-shecho-hvorije-sonyashnik>

27. Обід для сонячної квітки: елементи живлення, що потрібні для росту і розвитку соняшника [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<https://superagronom.com/articles/171-obid-dlya-sonyachnovi-kvitki-elementi-zhivlennya-scho-potribni-dlya-rostu-i-rozvitku-sonyashnika>

28. Олійні й ефіроолійні культури [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://subject.com.ua/agriculture/crop/42.html>

29. Олійні культури [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<http://www.tsatu.edu.ua/rcsl/wp-content/uploads/sites/20/1r.21.sonjashnyk.pdf>

30. Опис та характеристика рослини соняшник однорічний [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://agrarii-razom.com.ua/plants/sonyashnik-odnorichnij>

31. Особливості технології вирощування соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.lnz.com.ua/news/osoblivosti-tehnologii-virosuvannya-sonasniku>

32. Подсолнечник : [монографія / под ред. В. С. Пустовойта]. – М. : Колос, 1975. – 592 с.

33. Поширені шкідники соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://yablukom.ua/ua/interesno-znat/369-rasprostranennye-vrediteli-podsolnechnika/>

34. Растение подсолнечник: фото, виды, выращивание, посадка и уход [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ladyfloor.ru/rasteniya/podsolnechnik.html>

35. Регенерація у рослин [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://lifelib.info/botany/physiology_1/40.html

36. Соняшник [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.agro.basf.ua/Documents/productcatalogue_files/bro_files/crops_2_files/_58.pdf

37. Соняшник. Дмитро Разумов [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://healthapple.info/zdorovya-ta-organizm/sonyashnyk/>

38. Соняшник. Історія виникнення та введення в культуру Косенко Р. О. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://inb.dnsgb.com.ua/2015-4/11.pdf>

39. Соняшникова проблема: вовчок [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://agro-business.com.ua/agro/ahronomiia-sohodni/item/393-soniashnykova-problema-vovchok.html>

40. Соняшикове насіння [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://uk.wikipedia.org/wiki/Соняшикове_насіння

41. Типи соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.yara.ua/crop-nutrition/sunflower/sunflower-key-fact/>

42. Фізіологічні особливості живлення соняшника борними добривами.

Моргун В.В., Чакмак І., Швартау В.В., Михальська Л.М. [Електронний ресурс]

– Режим доступу до ресурсу: <https://www.frg.org.ua/uk/2020/187-195N3V52.htm>

43. Хвороби рослин [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

<https://agrarii-razom.com.ua/plant-diseases/fomoz-sonyashniku>

44. Хвороби соняшнику [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:

https://alfasmartagro.com/alfa-science/harmful-objects/diseases_sunflower/

45. Хвороби соняшнику бактеріальні [Електронний ресурс] – Режим доступу

до ресурсу: <https://analitic.ub.ua/25826-bakterialnye-bolezni-podsolnechnika.html>

46. Цікаві факти про соняшник [Електронний ресурс] – Режим доступу до

ресурсу: <http://vnis.com.ua/useful-information/publications/Cikavi-fakty-pro-sonyashnyk/>

47. Ярошенко Р.Р., Варченко О.І., Антіпов І.О., Парій М.Ф. Адвентивний

органогенез *Helianthus annuus* L. в культурі *in vitro*

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України