**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра генетики та рослинних ресурсів**

**Кваліфікаційна робота**

**магістра**

На тему:ПОРІВНЯННЯ ІНДУКОВАНИХ IN VITRO МОРФОЛОГІЧНИХ МУТАНТІВ СОНЯШНИКА З ЇХ ВИХІДНИМИ ЛІНІЯМИ ЗА ДЕЯКИМИ КІЛЬКІСНИМИ ОЗНАКАМИ

Виконав: студент 2 курсу, групи 8.0911-г

Спеціальності 091 «Біологія»

Освітньої програми «Генетика»

Булавин Д. О.

Керівник д.б.н., проф. Лях В.О.

Рецензент к.б.н., доц. Бойка О. А.

Запоріжжя

2022

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ФакультетБіологічний

Кафедра Генетики та рослинних ресурсів

Освітній рівень Магістр

Спеціальність091 «Біологія»

Освітня програма **«**Генетика»

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри генетики та

рослинних ресурсів

д.б.н., проф. В.О. Лях

«\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2022 року

**Завдання**

на дипломну роботу студенту

Булавину Дмитру Олеговичу \_

(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи: Порівняння індукованих *in vitro* морфологічних мутантів соняшника з їх вихідними лініями за деякими кількісними ознаками Comparison of in vitro induced morphological mutants of sunflower with their base lines by some quantitative traits

керівник роботи д.б.н., проф. Лях Віктор Олексійович

затверджена наказом ЗНУ від «12» 07 2022  року № 834-с

2. Строк подання студентом роботи  грудень 2022 року

3. Вихідні дані до роботи: насіння вихідної лінії ЗЛ 809 та мутантних ліній, отриманих методом індукованого мутагенезу на основі вихідної лінії - ЗЛ 809 (низький габітус), ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*), ЗЛ 809 (зменшена кількість язичкових квітів на кошику).

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Порівняти мутантні лінії з вихідною та між собою за кількісними характеристиками. 2. Статистично довести різницю або її відсутність між лініями, використовуючи t-критерій Стьюдента.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): 9 рисунків, 5 таблиць. Рисунок 1.1 – *Helianthus annuus.* Рисунок.1.2 – Новоутворення з мікроспор на середовищі 3 лінії Х762В (а) та H. giganteus (б). Рисунок 1.3 – Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації насіння гібриду Од123. Рисунок 3.1 – Вихідна лінія ЗЛ 809 (контроль). Рисунок 3.2 – Мутантна лінія ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квітів. Рисунок 3.3 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за висотою рослин. Рисунок 3.4 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за кількістю листків. Рисунок 3.5 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластини. Рисунок 3.6 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластни.

Таблиця 1.1 – Характеристика ознак соняшнику за їх успадкуванням. Таблиця 3.1 – Порівняння ліній соняшнику за висотою. Таблиця 3.2 – Порівняння ліній соняшнику за кількістю листків. Таблиця 3.3 – Порівняння мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластинки. Таблиця 3.4 – Порівняння мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластини.

6. Консультанти розділів роботи

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Консультант | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
| 4 | Бойка О.А., к.б.н., доц. |  |  |

7. Дата видачі завдання

Календарний план

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №з/п | Назва етапів дипломної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітки |
|  | Огляд наукової літератури. Написання розділу 1 | вересень-грудень 2021 | Виконано |
|  | Засвоєння техніки безпеки під час виконання експериментальної частини. написання відповідного розділу | січень-лютий 2022 | Виконано |
|  | Проведення експериментальних досліджень, оформлення результатів досліджень. Статистична обробка даних. Написання відповідного розділу | березень - вересень 2022 | Виконано |
|  | Оформлення кваліфікаційної роботи магістра | жовтень – листопад 2022 | Виконано |
|  | Передзахист. Рецензування кваліфікаційної роботи | грудень 2022 | Виконано |
|  | Захист кваліфікаційної роботи | грудень 2022 | Виконано |

Студент  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Булавин Д. О. \_

(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи  Лях В.О.

(підпис) (прізвище та ініціали)

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер Бойка О. А.

(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана робота викладена на 61 сторiнці друкованого тексту, мiстить 5 таблиць, 9 рисункiв. Перелік посилань включає 52 джерела.

Об’єктом дослідження були вихідна лінія соняшника ЗЛ 809 та мутантні лінії, отримані методом індукованого мутагенезу на основі вихідної лінії - ЗЛ 809 (низький габітус), ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*), ЗЛ 809 (зменшена кількість язичкових квітів на кошику). мутантні лінії соняшнику ЗЛ 809.

Метою роботи було порівняти мутантні лінії з вихідною лінією та між собою за кількісними ознаками висоти рослини, кількості листків на рослині, розміром листка та статистично довести різницю або її відсутність, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Методи дослідження – біометричні вимірювання, методи статистичної перевірки гіпотез (t-критерій Стьюдента) для встановлення суттєвості різниці між лініями за кількісними ознаками.

В результаті проведення роботи було встановлено різницю між мутантними лініями соняшника та вихідною лінією, а також між самими мутантними лініями за такими кількісними ознаками як висота рослини, кількість листків на рослині та розмір листової пластинки. З’ясовано, що мутантна лінія ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квіток не має суттєвих відмінностей від вихідної лінії та може використовуватися як така, що несе відмітну маркерну ознаку. Лінія з хлорофільною недостатністю суттєво поступається вихідній лінії за розміром листкової пластинки, що може негативно вплинути на продуктивність.

Вираженість вказаних ознак є важливою характеристикою ліній, оскільки вони суттєво впливають на рівень продуктивності як самих ліній, так і того селекційного матеріалу, у створенні якого ці лінії будуть брати участь.

Отримані в ході порівняння дані дозволяють більш цілеспрямовано використовувати мутантні лінії у подальших селекційних дослідженнях.

СОНЯШНИК КУЛЬТУРНИЙ, КІЛЬКІСНА ОЗНАКА, ВИСОТА РОСЛИНИ, КІЛЬКІСТЬ ЛИСТКІВ НА РОСЛИНІ, ШИРИНА ТА ДОВЖИНА ЛИСТКА, СУТТЄВІСТЬ ВІДХИЛЕНЬ

ABSTRACT

This work is presented on 61 pages of printed text, contains 5 tables, 9 figures.  The list of references includes 52 sources.

The object of the study was the initial sunflower line ZL 809 and mutant lines obtained by the method of induced mutagenesis based on the original line - ZL 809 (low habit), ZL 809 (chlorophyll deficiency of the Viridis type), ZL 809 (reduced number of reed flowers on the basket).  mutant sunflower lines ZL 809.

The aim of the work was to compare the mutant lines with the original line and with each other by quantitative characteristics of plant height, the number of leaves on the plant, the size of the leaf and to statistically prove the difference or its absence using the Student's t-test.

 Research methods – biometric measurements, methods of statistical testing of hypotheses (Student's t-test) to establish the significance of the difference between the lines in quantitative terms.

The expression of these traits is an important characteristic of the lines, as they significantly affect the level of productivity of both the lines themselves and the selected material in the creation of which these lines will participate.

 The data obtained during the comparison allow for more purposeful use of mutant lines in further breeding studies.

 CULTURAL SUNFLOWER, QUANTITATIVE MARK, PLANT HEIGHT, NUMBER OF LEAVES ON THE PLANT, LEAF WIDTH AND LENGTH, SIGNIFICANCE OF DEVIATIONS

ЗМІСТ

[ВСТУП 9](#_Toc121682951)

[1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ 11](#_Toc121682952)

[1.1 Народно-господарське значення соняшнику 11](#_Toc121682953)

[1.2 Походження та поширення соняшнику 13](#_Toc121682954)

[1.3 Морфобіологічні та екологічні особливості соняшнику 14](#_Toc121682955)

[1.4 Характеристика геному соняшнику однорічного 18](#_Toc121682956)

[1.4.1 Каріотип роду *Heliantus* 18](#_Toc121682957)

[1.4.2. Опис геному соняшнику 18](#_Toc121682958)

[1.5 Основні напрями селекції соняшнику 23](#_Toc121682959)

[1.6 Сорти і гібриди соняшнику 24](#_Toc121682960)

[1.7. Основні етапи наукової селекції соняшнику 25](#_Toc121682961)

[1.8. Характеристика методів для проведення генетико-селекційних робіт з культурою соняшнику 28](#_Toc121682962)

[1.8.1. Методи отримання мутантних генотипів соняшнику 28](#_Toc121682963)

[1.8.2 Метод індукованого андрогенезу в культурі in vitro різних видів соняшнику 30](#_Toc121682964)

[1.8.3 Метод ідентифікації та реєстрації генотипів соняшнику 33](#_Toc121682965)

[1.8.4 Методи контролю генетичної типовості ліній та рівня гібридності 35](#_Toc121682966)

[1.8.5 Молекулярно-генетичний поліморфізм соняшнику на між- і внутрішньовидовому рівнях 39](#_Toc121682967)

[2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ 41](#_Toc121682968)

[2.1 Об’єкти дослідження 41](#_Toc121682969)

[2.2 Статистична обробка отриманих даних 41](#_Toc121682970)

[3 ЕКСПЕРИМЕНТAЛЬНA ЧAСТИНA 43](#_Toc121682971)

[3.1 Порівняння мутантних ліній соняшнику за висотою рослин 44](#_Toc121682972)

[3.2 Порівняння мутантних ліній соняшнику за кількістю листків на рослині 46](#_Toc121682973)

[3.3 Порівняння мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластинки 48](#_Toc121682974)

[3.4 Порівняння мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластинки 49](#_Toc121682975)

[4 ОХОРОНА ПРАЦІ 52](#_Toc121682976)

[4.1 Правила безпечного користування персональним комп’ютером 52](#_Toc121682977)

[4.2 Вимоги до техніки безпеки в лабораторії 53](#_Toc121682978)

[4.3 Пожежна безпека 54](#_Toc121682979)

[ВИСНОВКИ 55](#_Toc121682980)

[ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 56](#_Toc121682981)

[ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ: 57](#_Toc121682982)

ВСТУП

Соняшник належить до основних сільськогосподарських культур України. Завдяки високому вмісту жиру та білка продукти переробки його використовуються у харчовій та кондитерській промисловості, в годівлі тварин, мають технічне застосування. В Україні соняшник вирощують в усіх регіонах, проте найбільше в південних та центральних областях.

Зацікавленість аграріїв до соняшнику пояснюється його високою рентабельністю[1].

Селекцію соняшника проводять більш ніж за 30 ознаками. В залежності від зони вирощування, вимоги до сорту або гібриду, можуть уточнюватися, але виділено низку ознак і особливостей, які необхідні для всіх зон. До них відносяться врожайність, стійкість до хвороб і шкідників, висока олійність і якість олії, технологічність, адаптивність [2].

Основними завданнями, які ставилися перед виконанням роботи були:

1. Порівняти мутантні лінії з вихідною лінією та між собою за кількісними характеристиками.

2. Статистично довести різницю або її відсутність між лініями, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Метою даної роботи є статистичне доведення різниці між мутантними лініями та вихідною лінією, а також між самими мутантними лініями за такими кількісними ознаками як висота рослини, кількість листків на рослині та розмір листової пластинки, використовуючи t-критерій Стьюдента.

В цій роботі було вперше проведено порівняння нових мутамутантних ліній соняшника, отриманих методом індукованого мутагенезу, з вихідною лінією ЗЛ 809, селекції Інституту олійних культур Національної академії аграрних наук, за кількісними ознаками: висота рослини, кількість листків на рослині, розмір листка.

Проведення даного дослідження є важливим етапом селекційного процесу, тому що ознаки, які порівнюються в даній роботі, а саме висота рослини, кількість листків на рослині, розмір листка є важливою характеристикою ліній, оскільки вони суттєво впливають на рівень продуктивності як самих ліній, так і того селекційного матеріалу, у створенні якого ці лінії будуть брати участь.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Народно-господарське значення соняшнику

Соняшник – основна олійна культура в Україні. Насіння його районованих сортів і гібридів містить 50–52 % олії, а селекційних – до 60 %. Порівняно з іншими олійними культурами соняшник дає найбільший вихід олії з одиниці площі (750 кг/га в середньому по Україні). На соняшникову олію припадає 98 % загального виробництва олії в Україні [1].

Соняшник вирощують переважно для отримання насіння, з якого виробляють високоякісну олію, що за смаковими якостями прирівнюють до оливкової і широко використовується на харчові потреби [3].

Соняшникову олію широко використовують як продукт харчування в натуральному вигляді. Харчова цінність її зумовлена високим вмістом поліненасиченої жирної лінолевої кислоти (55–60 %), яка має значну біологічну активність і прискорює метаболізування ефірів холестерину в організмі, що позитивно впливає на стан здоров’я. До склада соняшникової олії входять і такі дуже цінні для організму людини компоненти, як фосфатиди, стерини, вітаміни (А, D, Е, К). Соняшникову олію використовують в кулінарії, хлібопеченні, для виготовлення різних кондитерських виробів і консервів. Вона є основним компонентом при виробництві маргарину. Соняшникову олію використовують також при виготовленні лаків, фарб, стеарину, лінолеуму, електроарматури, водонепроникних тканин тощо [1].

Побічні продукти переробки насіння соняшнику — макуха при пресуванні і шрот при екстрагуванні (близько 35 % від маси насіння) є цінним концентрованим кормом для худоби. Стандартна макуха містить 38–42 % перетравного протеїну, 20 – 22 % безазотистих екстрактивних речовин, 6 – 7 % жиру, 14 % клітковини, 6,8 % золи, багато мінеральних солей. За поживністю 100 кг макухи відповідають 109 корм. од. Шрот містить близько 33–34 % перетравного протеїну, 3 % жиру, 100 кг його відповідають 102 корм. од [1].

Лузга (вихід 16 – 22 % від маси насіння) є сировиною для виробництва гексозного й пентозного цукру. Із гексозного цукру виробляють етиловий спирт і кормові дріжджі, із пентозного — фурфурол, який використовують при виготовленні пластмас, штучного волокна та іншої продукції. Кошики соняшнику (вихід 56–60 % від маси насіння) є цінним кормом для тварин. Їх добре поїдають вівці і велика рогата худоба. В них міститься 6,2–9,9 % протеїну, 3,5 – 6,9 % жиру, 43,9 – 54,7 % безазотистих екстрактивних речовин та 13,0 – 17,7 % клітковини. За поживністю борошно з кошиків прирівнюється до пшеничних висівок. З кошиків виробляють харчовий пектин, який використовується в кондитерській промисловості [1].

Соняшник вирощують і як кормову культуру. Він може дати до 600 ц/га і більше зеленої маси, яку в чистому вигляді чи в сумішах з іншими кормовими культурами використовують при силосуванні. Силос із соняшнику добре поїдається худобою і за поживністю не поступається силосу з кукурудзи [1].

Соняшник є чудовою медоносною рослиною. З 1 га його посівів під час цвітіння бджоли збирають до 40 кг меду. При цьому значно поліпшується запилення квіток, що підвищує врожай насіння [1].

Олійний соняшник – достатньо нова технічна культура. Він створений руками українських та російських селекціонерів. Площі посіву у світі складають понад 18 млн га. В Україні соняшник висівають на площі близько 4 млн га [2].

Середня врожайність соняшнику в Україні в останні роки становила 16–18 ц/га. Найвища вона в господарствах, де соняшник вирощують за прогресивною технологією, — по 30 ц/га і більше, а в умовах зрошення – 38,7–40 ц/га [2].

1.2 Походження та поширення соняшнику

Батьківщиною соняшнику вважається південно-західна частина Північної Америки (Північноамериканський центр), де й нині ростуть дикі форми соняшнику [1].

За даними С. Хайзера, індіанці, які мешкали на Американському континенті, вирощували соняшник разом з кукурудзою і картоплею. Насіння диких видів, крупу і муку з соняшнику використовували в їжу, з них готували фарби та ліки. А квіти соняшника широко використовували в різних своїх ритуалах. Індіанським народам було відомо про вміст жиру в насінні, його використовували для змащення волосся [2].

У Європу соняшник був завезений з Нової Мексики на початку ХІ ст. до Іспанії. У період 1568–1570 рр. в Падуанському ботанічному саду (Італія) вирощували гігантський одностебловий соняшник під назвою *Planta Massima*. Але окультурений індіанцями соняшник, який опинився в Європі, довгий час залишався декоративною рослиною [2].

Свідчення щодо вирощування цієї культури в Україні знаходимо в травнику Д. С. Сиренія за 1613 р [12].

Наприкінці 60-х років ХVІІІ сторіччя в наукових виданнях було висловлено думку щодо розведення соняшнику з використанням сім'янок на олію, а стебла на паливо. В 1780 р. газета "Экономический магазин" розмістила дві статті: "О масле особого ряда" і "О подсолнечнике", в яких автор відмічав, що йому пощастило куштувати олію "…в одном знатном доме…", після чого висловив думку про видобуток такої олії з соняшнику, що дасть можливість скоротити витрати на закупівлю імпортованої прованської олії. Вільне Економічне Товариство в 1791 р. зробило заяву про нагородження того "…кто масло из рыжечного семени и подсолнечных семян во множестве приготовит…" [12].

Першу спробу використати насіння соняшнику для отримання олії зробив у 1829 р. житель слободи Олексіївка Воронезької губернії селянин Д.С. Бокарьов [1].

У 1816-1817 рр. Харківське філотехнічне товариство розглянуло питання щодо вирощування соняшнику в південних губерніях з метою отримання олії і використання стебел на паливо [2].

На теперішній час олійний соняшник поширений на всіх континентах земної кулі. За даними ФАО, світова площа його посівів становить близько 15 млн га. На великих площах його висівають в Україні, Аргентині, США, Китаї, Іспанії, Туреччині, Румунії, Франції та багатьох інших державах [1].

1.3 Морфобіологічні та екологічні особливості соняшнику

Систематичне положення:

|  |  |
| --- | --- |
| [Царство](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Рослини](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%B8) *(Viridiplantae)* |
| [Відділ](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%B4%D1%96%D0%BB_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Покритонасінні](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D1%81%D1%96%D0%BD%D0%BD%D1%96) *(Magnoliophyta)* |
| [Клас](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B0%D1%81_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Дводольні](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%96)  *(Dicotyledones)* |
| [Ряд](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D1%8F%D0%B4_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Айстроцвіті](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B9%D1%81%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%86%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%96) *(Asterales)* |
| [Родина](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%B0_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Айстрові](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B9%D1%81%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%96) *(Asteraceae)* |
| [Рід](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D1%96%D0%B4_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)): | [Соняшник](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BE%D0%BD%D1%8F%D1%88%D0%BD%D0%B8%D0%BA) *(Helianthus)* |

Соняшник *(Helianthus annuus)* (рис.1.1) належить до родини айстрових (*Asteraceae*) роду *Helianthus*. Розрізняють два види соняшнику — культурний (*Helianthus cultus Wenzl*) і дикорослий (*Helianthus ruderalis Wenzl*). У культурного соняшнику виділяють два підвиди – посівний (*subsp. sativus*) і декоративний *(subsp. ornamentalis*). Культурний соняшник посівний (польовий) – однорічна рослина [1].

Соняшник має стрижневий корінь, що проникає в ґрунт на глибину до 2–4 м і розгалужується в сторони на 100 – 120 см. Стебло прямостояче, грубе, заповнене всередині губчастою серцевиною, вкрите жорсткими волосинками, має висоту 0,7 – 2,5 м (у силосних форм – 3 – 4 м і більше). Є карликові форми з висотою стела 50 – 70 см. Листя черешкове, велике, густо опушене. Пластинки звичайно овально-серцеподібні із зазубреними пилчастими краями. Нижні листки супротивні – 1–2 пари після сім’ядоль, решта – почергові. На одній рослині розвивається у скоростиглих сортів і гібридів 15–25, у пізньостиглих – 30 – 35 і більше листків [1].



Рисунок 1.1 – *Helianthus annuus*

Суцвіття соняшнику – багатоквітковий кошик, що має обгортку з кількох рядів листочків. Основою суцвіття є велике квітколоже. У кошику є квітки двох типів: трубчасті і язичкові . Язичкові розміщуються в один або кілька рядів по краю кошика. Вони безплідні, великі, жовті. їх функція полягає в тому, щоб приваблювати комах запилювачів. Трубчасті плодоносні квітки займають основну частину квітколожа. Діаметр кошика соняшника коливається від 10 до 25 см у гібридів і до 40 см у сортів [2].

Приймочка маточки дволопатева. За сприятливих умов в одному кошику закладається 1000–1200 квіток. Їх кількість може різко зменшуватися при запізненні з прорідженням загущених посівів до утворення 3–5 пар справжніх листочків у середньоранніх і 5–7 – у середньопізніх сортів. Саме в цей період у соняшнику відбувається диференціація точки росту на квіткові бугорки, тобто закладається основа майбутнього врожаю. Тому в цей період (2–3 тижні після появи сходів) потрібен особливо добрий догляд за рослинами [1].

Трубчасті квітки розкриваються в певній послідовності — від периферії до центра кошика. Цвітіння одного кошика триває 8 – 10 днів [3].

Соняшник – рослина виключно перехресного запилення. Пиляки його дозрівають раніше, ніж приймочки, що сприяє перехресному запиленню. В польових умовах частина квіток залишається незаплідненою, що призводить до пустозерності та зниження врожаю насіння. Якщо пустозерні сім’янки зосереджені в центрі кошика, це свідчить про нестачу в ґрунті води, коли в різних місцях кошика – про неповне запилення квіток через недостатність бджіл. Пустозерність сім’янок можна знизити, якщо на посіви соняшнику вивозити вулики з бджолами [1].

Плід соняшнику – сім'янка з шкірястим оплоднем (лузга), який не зростається з насіниною. У кращих високоолійних гібридів сім'янки відносно дрібні (довжина 8–14 мм) з низькою лузжистістю (19-25%). Насінина (ядро) вкрита тонкою прозорою оболонкою і складається із зародка з сім'ядолями та корінця. Кращі гібриди соняшнику мають вміст олії до 52–55% [3].

Оболонка плода (лузга) вкрита зверху епідермісом, забарвлення якого буває білого, чорного, сірого, чорно-фіолетового, коричневого кольору та ін [1].

За морфологічними ознаками розрізняють три типи культурного соняшнику:

* Лузальний – має товсте, високе стебло (до 4 м), велике листя і кошики діаметром від 17 до 46 см. Сім’янки великі з товстою лузгою. Ядро (насінина) лише наполовину заповнює сім’янку. Маса 1000 сім’янок 100 – 200 г. Процент плодових оболонок (лузжистість) 46–56, олійність незначна.
* Олійний – з порівняно тонким стеблом 1,5–2 м заввишки. Сім’янки дрібніші, ніж у лузального. Лузга тонка, ядро заповнює 362 всю внутрішню порожнину сім’янки. Маса 1000 сім’янок 50 – 100 г, лузжистість 22–30 %. Вміст олії в насінні кращих сортів і гібридів 48–50 %.
* Межеумок – рослина проміжної групи, яка за окремими ознаками нагадує лузальний або олійний соняшник. За висотою і товщиною стебла, розмірами листя і кошиків межеумок подібний до лузального, а за виповненістю сім’янок — до олійного соняшнику [1].

**Вимоги до температури.** Соняшник – рослина степової зони. Незважаючи на підвищені вимоги до тепла, насіння його починає проростати при температурі 3-4°С, але сходи з'являються лише на 20-28-й день. Оптимальною температурою для проростання є 20°С. За цієї температури сходи з'являються на 7-8-й день. Набубнявіле та насіння яке проклюнулось в ґрунті задовільно переносить зниження температури до мінус 10°С. Молоді сходи рослин витримують весняні приморозки до 4-6°С. Це дає змогу сіяти соняшник рано навесні.

Оптимальна температура для росту у першій половині вегетації – близько 22°С, а в період цвітіння-достигання – до 24-25°С. Температура вище 30°С негативно відображається на рості і розвитку рослин.

Для швидкорослих сортів та гібридів сума температур вища за 10°С за період їхньої вегетації становить 1850°С, ранньостиглих – 2000°С, середньостиглих – 2150°С [4].

**Вимоги до вологи.** Соняшник є посухостійкою культурою*.* Але він одночасно добре реагує на достатнє забезпечення вологою. Транспіраційний коефіцієнт 450–570. Завдяки сильно розвиненій кореневій системі і високій всмоктувальній силі кореня він використовує вологу з глибини до 3 м, при цьому може майже повністю висушувати 1,5-метровий шар ґрунту.

Від початку розвитку до утворення кошиків, соняшник витрачає 20–25% від загальної потреби у воді, засвоюючи її в основному з верхніх шарів ґрунту. Найбільше вологи (60%) він засвоює у період утворення кошика, під час цвітіння. При нестачі вологи в цей період кошики і насіння бувають недорозвиненими. Тому заходи з накопичення вологи в ґрунті є основою отримання високих врожаїв [4].

1.4 Характеристика геному соняшнику однорічного

1.4.1 Каріотип роду *Heliantus*

Рід *Heliantus* представлений поліплоїдним рядом з основним числом хромосом n = 17. Існують диплоїдні (2n = 34), тетраплоїдні (2n = 68) і гексаплоїдні (2n = 102) види. Деякі дикі види використовуються як джерела стійкості до хвороб і шкідників.

Каріотип виду *Helianthus annuus –* (2n = 34).

У соняшника встановлена істотна внутрішньо- і міжпопуляційна мінливість ознак, що сприяло успіхам при використанні різноманітних прийомів добору[1].

1.4.2. Опис геному соняшнику

У соняшника, у порівнянні з іншими культурами, ідентифіковано досить мало генів морфологічних, фізіологічних та біохімічних ознак. По деяких із них відомий лише тип успадкування — домінантний, проміжний або рецесивний.

У табл. 1.1. приведено дані по деяких ознаках.

Таблиця 1.1 – Характеристика ознак соняшнику за їх успадкуванням

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Домінантний** | **Рецесивний** | **Символ гена** |
| Антоціанове забарвлення стебла та листків | Зелене | T > t |
| Значна опушеність верхівки стебла | Слабка опушеність |  |
| Нормальна висота рослини | Короткостебловість |  |
| Нормальна нервація листкової пластинки | Посилена нервація |  |
| Дуже груба зубчастість листка | Дрібна зубчастість |  |
| Прямостоячий кошик | Пониклий кошик з різним ступенем | Hba, Hbb, Hbc, Hbd |
| Плеската форма кошика | Деформована |  |
| Білий колір сім’янки | Усі інші кольори |  |
| Оранжеве забарвлення пиляків | Безбарвлені пиляки |  |
| Жовте забарвлення пилку | Безбарвний пилок |  |
| Язичкова форма краєвих квітків | Трубчаста форма |  |
| Протерандрія | Протерогінія |  |
| Антоціанове забарвлення приймочки Темно-фіолетове забарвлення приймочки | Відсутність жовте | A-B-C, A-bbC- |

Пдовження табл. 1.1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Зелений колір листків обгортки | темно-зелений | Dg |
| Наявність галуження рослини | Відсутність | Br1, Br2, Br3 |
| Відсутність  галуження рослини | Наявність | b1…b7 |
| Без галуження рослини | Базальне |  |
| Без галуження | Апікальне | b2, b3 |
| Зелений колір листків | світло-, темно-зелений | Cg1, Cg2, Cg3, Cg4 |
| Колір язичкових квіток: антоціанов. жовтий оранжевий лимонний блідо-жовтий |  | G L-La llLa — L-lala, lllala ly |
| Смугастість плодової оболонки | Відсутність |  |
| Основа сім’янкі без рубчика | З рубчиком |  |
| Слабка пухирчастість | Сильна пухирчаст. | Cld – cld |
| Звичайний черешок листка (ЧЛ) | Еректоїдний ЧЛ | er1, er2 |
| Наявність підковки | Відсутність |  |
| Панцирність | Безпанцирність |  |
| Груболузжистість | Тонколузжистість |  |
| Колір сім’янки: білий чорний коричневий | Усі інші коричневий сірий |  |
| Ядерна чоловіча фертильність | Ядерна чоловіча стерильність | Ms10>ms10 Ms11>ms1 |

**Антоціанове забарвлення**. Існує один домінантний ген T, що контролює синтез антоціану у рослини в цілому, і лише на фоні його присутності можлива дія одного, двох або трьох комплементарних йому генів, які відповідають за антоціанове забарвлення окремих органів рослини. Антоціанове забарвлення гіпокотиля має моногенний контроль та зчеплений з геном Ms, рецесивна алель якого визначає ядерну чоловічу стерильність. Наявність сильного антоціанового забарвлення гіпокотиля вказує на високу стійкість до низьких температур (до -5ºС).

**Листова пластинка.** У різних форм соняшнику колір листків коливається від світло- до темно-зеленого. Різноманіття забарвлення листка визначається присутністю генів Cg1–Cg4, а зелений колір домінує по відношенню до світло- та темно-зеленого.

У залежності від будови губчастої та стовбчастої тканини листка у соняшнику представлена різноманітність за пухирчастістю в діапазоні від дуже слабкої до дуже сильної і контролюється геном clb.

Відомі два рецесивних гена еректоїдності — er1 і er2

**Опушення верхівки стебла** — це домінантна ознака, яка пов’язана з посухостійкістю та перешкоджає проникненню збудників інфекції.

**Язичкові квітки.** Жовте основне забарвлення язичкових квіток визначається каротиноїдами, його різноманіття контролюється не менше ніж 8 різними генами (табл. 1.1). Антоціанове забарвлення (ген G) язичкових квіток контролюється моно- або дигенно і домінує над жовтим, оранжевим або лимонним. Рецесивний ген l визначає оранжеве забарвлення, ген la — лимонне. Жовте забарвлення обумовлено комплементарною взаємодією домінантних алелей L-La, оранжеве — llLa, лимонне - L-lala, блідо-жовте — ly.

Щільність язичкових квіток може бути 7-ми типів від нещільною, середньої щільності до щільної; форма — 6-ти типів від веретеновидної, яйцевидної, дзвоникоподібної до зрозшейся в трубочку з прапорцем; за положенням 4-х типів — приплеснуті, зігнуті за довжиною, хвилясті, зігнуті у напрямку кошика; за довжиною 3-х типів: короткі, середні та довгі [15].

**Трубчасті квітки.** Генетичне різноманіття трубчастих квітків у генотипів соняшника спостерігається за наступними ознаками: колір, антоціанове забарвлення приймочки та продукування пилку.

Колір визначається забарвленням віночка, приймочки та приквіток. У фрмуванні забарвлення приймочки беруть участь зчеплені гени А, В і С. Антоціанове забарвлення проявляється за наявності гена А та одного з генів В або С. Темно-фіолетове забарвлення приймочки домінує над жовтим з червоною облямівкою та успадковувається моногенно. Інтенсивність антоціанового забарвлення приймочки варіює від слабкого до сильного.

**Висота рослини.** Висоту рослини контролює велика кількість рецесивних генів — чим їх більше в генотипі, тим менше висота.

**Галуження.** Класифікація галуження базується на розташуванні бічних пагонів на головному стеблі: лише біля основи — базальне, лише біля верхівки — апікальне і за всією висотою (суцільне). Дану ознаку контролюють дві системи генів: домінантні — Br1, Br2, Br3 та рецесивні - b1 – b7.

**Кошик.** У період дозрівання експресуються 4 головні гени — Hba, Hbb, Hbc, Hbd, що контролюють генетичне варіювання нахилу кошика від 0 до 180˚. Кожен із 4-х локусів включає три алелі. Таким чином, за нахил кошика відповидають 12 генів з адитивним ефектом, кожен з яких змінює нахил кошика на 15˚. Усього регєструють 9 типів положення кошика відносно стебла від горизонтального (0˚) до вертикального (90˚), напівоберненого (135˚) та оберненого донизу (180˚).

Розмір кошика залежить від генотипу та середовища, тобто успадкування цієї кількісної ознаки має епігенетичний характер. Окремі генотипи мають домінантні гени, що сприяють збільшенню діаметра кошика [15].

**1.5 Основні напрями селекції соняшнику**

Селекцію соняшника проводять більш ніж за 30 ознаками. В залежності від зони вирощування, вимоги до сорта або гібриду, можуть уточнюватися, але виділено низку ознак і особливостей, які необхідні для всіх зон. До них відносяться врожайність, стійкість до хвороб і шкідників, висока олійність і якість олії, технологічність, адаптивність.

До основних напрямів селекції соняшнику належать:

1) селекція на отримання високої стабільної врожайності гібридів першого гібридного покоління та їх батьківських компонентів (потенціал врожайності гібридів не менш ніж 4,0 т/га, вміст олії в насінні 50-52 %);

2) селекція на належний рівень технологічності (вирівняність за висотою, достиганням; кут нахилу кошика 45º, кошик тонкий, швидко висихає; стійкість до вилягання – 9 балів, стійкість до обсипання – 9 балів);

3) селекція на високий вміст окремих жирних кислот (олеїнова – 88%, пальмітинова – 25%, стеаринова – 11%, лінолева – 86%);

4) селекція на стійкість до абіотичних факторів середовища (посухостійкість, стійкість до високих температур);

5) селекція на стійкість до хвороб і шкідників (біла, сіра гниль, фомопсис, іржа, вовчок, несправжня борошниста роса, соняшникова міль);

6) селекція на стійкість до гербіцидів (групи імідазолінонів, сульфанілсечовин);

7) селекція гібридів соняшнику кондитерського напряму використання;

**8) селекція на оптимальний вегетаційний період;**

**9) селекція кормових сортів**[1, 14];

10) селекція на гетерозис (соняшник займає друге місце після кукурудзи за використанням гетерозисних гібридів) [2].

1.6 Сорти і гібриди соняшнику

В Україні поширені високоврожайні селекційні сорти й гібриди соняшнику із значним вмістом олії в насінні, низькою лузжистістю (22 – 27 %) та високою стійкістю проти найбільш відомих видів вовчка, шкідників і хвороб. За тривалістю вегетаційного періоду сорти (гібриди) соняшнику поділяють на:

* середньостиглі (вегетаційний період 120 – 140 днів)
* середньоранні (110 – 130)
* ранньостиглі (100 – 120)
* скоростиглі (80 – 100 днів).

В Україні районовано понад 70 сортів і гібридів соняшнику. Майже всі площі його засівають сортами й гібридами олійної групи. До районованих сортів і гібридів соняшнику, поширених у Степу, Лісостепу України, належать: середньостиглі — Запорізький кондитерський, Краснодарський 885, СПК, Харківський 3 та ін.; середньоранні — Казіо, Одеський 123, Одеський 504, Оріон, Харківський 58 та ін.; ранньостиглі — Одеський 122, Одеський 249, та ін.; скоростиглі — Одеський 149 та Харківський 49 [2].

Скоростиглі сорти й гібриди поступаються ранньостиглим і середньостиглим за урожайністю та олійністю насіння. Проте короткий вегетаційний період скоростиглих типів дозволяє вирощувати їх на півдні України в повторних посівах при зрошенні. Високою врожайністю з високим вмістом олії в насінні відзначаються середньостиглі й середньоранні сорти та гібриди соняшнику [2].

Щороку до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні заносяться нові сорти і гібриди соняшнику. Зростає і загальна чисельність заявників сортів і гібридів соняшнику. Якщо у 2013 р. до Держреєстру було занесено 449 гібридів соняшнику від 60 заявників, то у 2015 році їх кількість становила 624 і 71. Тільки за останні 3 роки кількість заявників зросла на 11 компаній, а кількість гібридів на 193 одиниці [5].

За кількістю гібридів на ринку насіння соняшнику французькі компанії є безумовними лідерами в українському Держреєстрі (202 гібриді у 2015 р.) На другій позиції вітчизняні компанії із 176 гібридами у 2015 р. Третя позиція – за сербськими селекційними компаніями – 73 гібриди у 2015 р. [5]

Видатними є успіхи селекціонерів В.С Пустовойта, Л.А. Жданова, В.І. Щербини, К.І. Прохорова, Г.В. Пустовойт та багатьох інших, які створили високоолійні сорти-популяції, соняшника. Ці сорти-популяції відрізняються високою екологічною пластичністю, груповим імунітетом до багатьох патогенів, високою олійністю і іншими цінними ознаками. Вони в значній мірі сприяли росту посівних площ соняшнику в світі і вирощуються до тепрішнього часу [2].

Безумовно важливою умовою подальших успіхів в селекції соняшника є вивчення, підбір, оцінка і використання різноманітного вихідного матеріалу. Провідну роль в селекційній роботі з соняшником в Україні відіграють Селекційно-генетичний інситут (м. Одеса), Інститут рослинництва (м. Харків), Інститут олійних культур (м. Запоріжжя).

1.7. Основні етапи наукової селекції соняшнику

Справжнім батьком наукової селекції соняшника вважається великий селекціонер Василь Степанович Пустовойт, який почав селекцію соняшника в 1912 р. на дослідній станції «Круглик» на Кубані. Олійність соняшника була підвищена з 20 до 50% і більше [7].

Планомірні роботи щодо вивчення і розвитку наукової селекції соняшнику були розпочаті трьома дослідними установами: у 1910 році – Харківською дослідною станцією (сучасна назва – Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААНУ), у 1912 – дослідним селекційним полем «Круглик» (ВНДІОК ім. В.С. Пустовойта, Росія). У 20-ті роки було розпочато масштабні роботи з вивчення біології соняшнику, що стало фундаментом наукової селекції. Зібрано і вивчено величезну колекцію зразків, з яких методом індивідуального та масового доборів були створені високопродуктивні селекційні номери. Внаслідок проведеної наукової роботи професор Б. К. Єнкен створив перший в Україні сорт соняшнику Зеленка Харківська 76, а у 1929 році на Харківській дослідній станції – сорт-популяцію Харківський 22–82. У період з 1920 по 1929 рр. на приватних полях вирощували селекційні сорти, такі як Саратовський 169, Фуксинка воронезька, Круглик А41, Зеленка Харківська 76 та інші, які не вражалися вовчком (*Orobanche cumana*). Перші селекційні сорти перевищували місцеві популяції за врожаєм на 0,2–0,5 т/га, вмістом олії на 3-5%. Вони були вже стійкими до існуючих рас вовчка, іржі та проти соняшникової вогнівки [12].

Завдяки зусиллям селекціонерів, до 1934 року вже було створено сорти Жданівський 8281, Жданівський 6432, Вейделевський 61, Вейделевський 62, Армавірський 762, Армавірський 768, які значно менше вражалися вовчком раси Б. За недовготривалий термін сорт соняшнику, створений академіком Л.А. Ждановим, Жданівський 8281, зайняв понад 1 млн га. Впровадження у сільськогосподарське виробництво України жданівських сортів відіграло значну роль у збільшенні виробництва олії у передвоєнні роки [17].

Використовуючи класичний метод, який було розроблено академіком В.С. Пустовойтом, заснований на індивідуальному доборі рослин із сортів та гібридних популяцій, індивідуального оцінювання за нащадками і наступним направленим перезапиленням кращих сімей за вільного цвітіння на ізольованих ділянках, в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН було створено і впроваджено у виробництво сорти-популяції: Харківський 100, Харківський 50, Харківський 101, Харківський скоростиглий [2].

Напряму підвищення стійкості рослин до різного роду патогенів відведено особливий період у селекції соняшнику. Селекція на груповий імунітет є одним з важливих завдань покращення цієї олійної культури. Вона будувалась на мутаціях, що штучно виникли в генофонді, Вони присутні в промислових сортах, дикорослих формах, та у гібридах соняшнику.

Також собливе місце в історії науково обгрунтованої селекції відведено вивченню явища гетерозису і використанню цитоплазматичної чоловічої стерильності. До створення промислових гібридів соняшнику був період планомірного вивчення гібридних комбінацій, які отримували завдяки вільному запиленню на основі вибіркового запліднення [2].

Використанню гетерозису у соняшнику, як резерву підвищення врожайності цієї культури, приділяв значну увагу академік В.С. Пустовойт, але його рекомендації з отримання міжсортових гібридів не знайшли широкого розповсюдження. Навіть сортолінійні гібриди, створені в Селекційно-генетичному інституті (м. Одеса) В.В. Бурловим (Одеський 91, Одеський 96) недовго трималися в промисловому виробництві [12].

За період з 1985 по 1995 рр. Державна комісія по сортовивченню і охороні сортів рослин України внесла в Реєстр значну кількість гібридів вітчизняної та закордонної селекції. На 2009 рік в Реєстрі сортів рослин України налічується 271 гібрид. Кожен рік Реєстр поповнюється новими гібридами, потенціал урожайності яких складає від 4,2 до 5,0 т/га. Це відомі гібриди: Ясон, Оскіл, Дарій, Зорепад, Капрал, Квін, Боєць, Кий, Максимус, Етюд, Еней та інші харківської селекції; Згода, Злива, Одеський 122, Одол, Сонячний одеської селекції; Запорізький 28, Запорізький 32, Рябота, Надійний запорізької селекції; Титанік, Імператор, Президент, Гена та ін. селекції ІПіОК (Нові Сад) та багато інших. [2].

Селекціонерами Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, Інституту олійних культур, Селекційно-генетичного інституту, були започатковані нові напрями селекції, які пов'язані з поліпшенням жирокислотного складу олії, а також зі стійкістю гібридів до гербіцидів імадозолової групи.

1.8. Характеристика методів для проведення генетико-селекційних робіт з культурою соняшнику

1.8.1. Методи отримання мутантних генотипів соняшнику

Для одержання нового селекційного матеріалу соняшника використовують метод індукованого мутагенезу, шляхом обробки рослинного матеріалу фізичними та хімічними мутагенами, де мутагенній обробці піддають зріле насіння, вегетуючі рослини чи пилок. Також використовують біотехнологічні методи. Зокрема, можливо отримувати новий вихідний матеріал за рахунок використання явища сомаклональної мінливості. Однак цей метод поки що не знайшов широкого застосування в зв'язку з нестабільністю одержання позитивного результату та складністю регенерації цілісних рослин з генетично змінених клітин в культурі in vitro [9,23, 42].

Для одержання нових генотипів використовують біотехнологічний метод культури пиляків, недоліком якого є те, що він потребує спеціального обладнання та реактивів високої вартості, є досить трудомістким та малоефективним.

Відомі методи розширення генетичної мінливості з використанням міжвидової та міжродової гібридизації. Однак широке застосування методів в цьому випадку стримується високим ступенем стерильності міжвидових та міжродових гібридів, а також досить тривалим часом одержання константного матеріалу [23].

Спосіб отримання мутантних генотипів соняшника, включає виділення незрілих сім'янок з суцвіть лінійних зразків, їх обробку хімічним мутагеном, виділення з сім'янок і посадку незрілих зародків на поживне середовище для їх подальшого розвитку, висадку одержаних з незрілих зародків рослин М1 у ґрунт, одержання насіння з рослин покоління М1, посів цього насіння для одержання покоління М2, оцінку та добір рослин зі зміненими або новими ознаками в поколінні М2, ізоляцію виділених в поколінні М2 мутантних рослин та одержання з них насіння, відповідно до винаходу, з суцвіть лінійних зразків виділяють сім'янки через 9- 15 днів після запліднення, обробляють їх при температурі 18-25 °C хімічним мутагеном етилметансульфонатом у концентрації 0,02 % впродовж 16 годин, промивають водою, а виділені з сім'янок незрілі зародки 9-15-денного віку культивують на модифікованому поживному середовищі до стадії рослин, при цьому поживне середовище має половинний вміст неорганічних солей та підвищений в два рази вміст вітамінів [38].

Метод проводять наступним чином. З суцвіть лінійного матеріалу соняшника виділяють сім'янки через 9-15 днів після самозапліднення, вміщують їх в марлеві мішечки та опускають у водний 0,02 % розчин етилметансульфонату при кімнатній температурі, періодично помішуючи. Через 16 годин сім'янки в мішечках виймають з розчину мутагену, промивають у проточній воді та поверхнево стерилізують. Звільнені від насіннєвої оболонки незрілі зародки 9-15-денного віку асептично культивують на штучному поживному середовищі з половинним вмістом неорганічних солей та підвищеним в два рази вмістом вітамінів за стандартними умовами. Після формування повноцінних рослин покоління М1 їх пересаджують у ґрунт, провівши попередню акліматизацію. Перед цвітінням рослини ізолюють для наступного самозапилення, під час цвітіння їх при необхідності доопилюють вручну. Після настання фізіологічної стиглості проводять збір насіння з кожної рослини М1 індивідуально. Насіння кожної рослини М1 висівають посімейно для отримання покоління М2. Під час вегетації, починаючи зі стадії сходів, проводять ретельну оцінку рослин М2, відмічаючи рослини зі зміненими або новими ознаками та ізолюють їх перед цвітінням з метою отримання насіння. Після настання фізіологічної стиглості проводять збір насіння з цих рослин. Отримане насіння буде представляти собою мутантний матеріал з новими ознаками.

Даний спосіб дозволяє отримувати генотипи рослин з новими ознаками, й тим самим збільшувати генетичну мінливість, зокрема у соняшника [23].

1.8.2 Метод індукованого андрогенезу в культурі in vitro різних видів соняшнику

Створення подвоєних гаплоїдів – важливий сучасний метод біотехнології, що дозволяє прискорювати селекційний процес завдяки подвоєнню гаметофітної кількості хромосом бажаного генотипу. Дослідження в цьому напрямі проводяться ще з 60-х років ХХ сторіччя. Отримували як спонтанні подвоєні гаплоїди, так і індуковані при створенні певних експериментальних умов. Найпоширенішою технікою отримання подвоєних гаплоїдів є метод індукції андрогенезу шляхом культивування ізольованих пиляків [8, 45].

Фактично за останні 30 років культуру пиляків спробували майже для всіх сільськогосподарських культур. Створенню подвоєних гаплоїдів соняшнику присвячені окремі роботи. Описано андрогенез *in vitro* для таких видів соняшнику, як *Helianthus annuus L., H. occidenthalis Riddell., H.decapetalus L., H.tuberosus L*. та міжвидових гібридів *H. annuus* х *H. occidenthalis, H. annuus* х *H.tuberosus.* Визначено значний ефект генотипу на здатність до індукції калюсогенезу та новоутворень [39].

Враховуючи перспективність використання диких видів соняшнику при схрещуванні з культурними та важливу роль методу створення подвоєних гаплоїдів у прискоренні селекційного процесу, було визначено особливості андрогенезу ліній культурного соняшнику та різних видів дикого соняшнику для встановлення їх здатності до андрогенезу та подальшого застосування для створення подвоєних гаплоїдів.

Приклад використання методу: Матеріалом для досліджень були лінії культурного соняшнику (*H. annuus L*.) селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва: Х114В, Х526В, Х711В, Х720В, Х762В — відновники фертильності пилку та дикі диплоїдні види соняшнику (2n=34*): H. divaricatus L., H. giganteus L., H. microcephalus Torrey & Gray, H. nuttallii Torrey & Gray, H. decapetalus L.* Рослини вирощували в польових умовах на території наукової сівозміни Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харківська обл.) в 2010 році.

Щоб отримати пиляки, використовували кошики культурного соняшнику діаметром приблизно 5,5 см та вищезазначених диких видів діаметром 0,7-0,9 см, що відповідало наявності стадії одноядерних вакуолізованих мікроспор. Фазу розвитку пилку визначали під світловим мікроскопом із використанням цитологічних методів на тимчасових препаратах, забарвлених ацетокарміном. В подальшому кошики або їх фрагменти (для культурних ліній) піддавались поверхневій обробці детергентом, потім 96% етанолом (30 с), 50% розчином комерційного засобу, що містив гіпохлорит (20 хв.) [8].

Пиляки, що були на відповідній стадії, ізолювали з квіток під бінокуляром в асептичних умовах ламінар-боксу (КПГ-1М, СРСР), розміщували в пробірках на індукційному поживному середовищі. Основу індукційного поживного середовища складали макро- і мікросолі, вітаміни середовища Murashige & Skoog (MS). Пиляки у кількості 150 шт. на один зразок висівали на чотири індукційні поживні середовища. В середовище 1 додавали 250 мг/л гідролізату казеїну; 1,0 мг/л НОК; 2 мг/л 2,4-Д ; 0,5 мг/л БАП; в середовище 2 додавали 0,1 мг/л НОК; 0,2 мг/л БАП. В середовище 3 додавали 500 мг/л гідролізату казеїну, 2 мг/л НОК; 1,0 мг/л БАП; в середовище 4 – 0,1 мг/л НОК; 0,5 мг/л БАП. В усі середовища додавали 30 г/л цукрози; в середовища 1-3 – 8 г/л агару, в середовище 4 – 6 г/л агару. [25]

Культивування проводили у темряві за температури +24°С протягом 7 діб. Після цього пробірки з новоутвореннями переносили в кімнати зі штучним кліматом і продовжували культивувати за температури +24оС +2°С, 16-годинного світлового періоду та освітлення 3000 лк. Частоту формування новоутворень визначали шляхом підрахунку кількості пиляків з новоутвореннями у відношенні до загальної кількості введених в умови in vitro пиляків та виражали у відсотках [8].

Через 28 діб з моменту введення в умови *in vitro* пиляки зі сформованими на їх поверхні макроструктурами з центром регенерації були перенесені на регенераційне середовище, до складу якого входили компоненти середовища MS з додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну та регуляторів росту (0,5 мг/л БАП; 0,5 мг/л кінетин).

Кількість хромосом підраховують стандартним методом у рослин- регенерантів на тимчасових препаратах листочків. Після культивування протягом 30 діб регенеранти переносять на нові середовища з додаванням 3 мг/л НОК [24].

Аналіз показників калюсо- та морфогенезу проводили за допомогою методів варіаційної статистики.



Рисунок.1.2 – Новоутворення з мікроспор на середовищі 3 лінії Х762В (а) та H. giganteus (б) [8]

В результаті проведених досліджень встановлено, що при культивуванні пиляків соняшнику на індукційних поживних середовищах спостерігали різну частоту новоутвореннь. Ця частота відрізнялась у різних генотипів соняшнику на різних середовищах культивування [8].

1.8.3 Метод ідентифікації та реєстрації генотипів соняшнику

Однією з найбільш розповсюджених систем ДНК-аналізу є ампліфікація мікросателітних послідовностей (SSR — simple sequence repeat) за ПЛР. Принциповими особливостями SSR-маркерів є їх локус-специфічність, поліалельність, кодомінантний тип успадкування, широке розповсюдження у геномі, відносна простота у використанні та відновлюваність результатів дослідження. Проаналізовано поліморфізм мікросателітної ДНК 21 виду роду *Helianthus*, що активно залучаються до міжвидової гібридизації з культурним соняшником як донори агрономічно цінних ознак [28, 29, 40].

Виявлено видоспецифічні алелі, що є потенційними маркерами наявності чужорідного генетичного матеріалу в геномі віддалених гібридів. Властива мікросателітним маркерам кодомінантна природа успадкування дає змогу досліджувати алельне різноманіття певних локусів геному та виявляти гетерозиготи. Саме тому цей тип маркерів є незамінним при визначенні генетичної чистоти сорту, лінії, а також для встановлення рівня гібридності та ідентифікації генотипів. Розроблено технологію ідентифікації і реєстрації інбредних ліній та гібридів соняшнику у вигляді генетичної формули генотипу за результатами ПЛР-аналізу мікросателітної ДНК [26, 36].

Даний метод забезпечує високу точність, надійність та унікальність ідентифікації генотипів. Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак та досягнутим результатом (підвищення точності, надійності та унікальності ідентифікації) можна пояснити наступним чином: аналіз мікросателітів дозволяє отримувати стабільні кодомінантні маркери за умов використання будь-якої частини рослини та на усякій стадії її розвитку. Мікросателітні локуси є високополіморфними в геномі соняшника, тому набір алелів за кількома такими локусами є унікальною характеристикою генотипа [27, 28].

Спосіб здійснюється таким чином:

1. Виділення ДНК. Сегменти насіння, паростків, листків або коріння соняшника гомогенізувати в 1,5 млпробірках в лізуючому буфері (20,0мМ Na3EDTA, 0,1М тріс-НСl рН8,5 при 25°С, 1,4М NaCl, 2,0% СТАВ) до повної мацерації тканин. Лізат інкубувати 45хв. при 60°С. Додати рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішати до утворення білої емульсії. Центрифугувати 5хв при 14000об./хв. на мікрофузі "Eppendorf 5415", водну фазу перенести в чисті пробірки та додати рівний об'єм ізопропілового спирту, перемішати, осадити ДНК центрифугуванням при 10000 об./хв. протягом 4хв на мікрофузі "Eppendorf 5415". Осадок промити двічі 0,5мл 70% етанола, центрифугувати при 10000об./хв. протягом 4хв на мікрофузі "Eppendorf 5415". Осадок ДНК підсушити при кімнатній температурі 15хв та розчинити в 0,3мл ТЕ-буферу (10,0мМ трис-НСl, 1,0мМ ЕДТА).

2. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР проводити на приладі "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Вміст реакційної суміші для проведення ПЛР об'ємом 20мкл: 50мМ КСl, 20мМ тріс-НСl (рН 8,4 при 25°С), 0,01% Tween-20, 2мМ MgCl2, 0,2мкМ праймеру, 200 мкМ кожного dNTP, 20 нг геномної ДНК, 1 од. Taq - полімерази. Ампліфікація: денатурація - 94°С - 2хв., далі - 40с.; відпал - 60°С - 30с. - 35 циклів; синтез - 72°С - 2хв.; елонгація - 5хв.

3. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації. Оцінювати продукти ампліфікації (5 мкл-аліквоту ПЛРсуміші) у 10 % денатуруючому поліакриламідному гелі. Склад гелю: 10% акриламід, 7М мочевина, 1х ТВЕ-буфер (50мМ тріс-Н3ВО3, 2мМ ЕДТА, рН8,0). Умови електрофорезу: напруга 500V протягом 90хв. при 65°С. Для .приготування одного гелю необхідно змішати 12,5мл 8М сечовини, 12,5мл розчину 30% поліакриламіду з 8М сечовиной, 2,5мл 10 х ТВЕ-буферу, 25мкл ТМЕД, 50мкл 10% ПСА. Для контролю за просуванням фрагментів ДНК в гелі зразок змішати з 1 мкл денатуруючого буфера для нанесення (98% формамід, 10мМ ЕДТА рН8,0, 0,2% (w/v) бромфеноловий синій, 0,2% (w/v) ксиленціанол) та денатурувати протягом 1,5хв при 95°С, після чого швидко охолодити на льодяній бані та за допомогою шприца нанести в лунку гелю. Одна доріжка гелю повинна містити зразок ДНК з відомою молекулярною вагою. Як стандарт молекулярної маси використовувати ДНК pUC19, рестриктовану MspІ.

4. Візуалізація продуктів ампліфікації. Поліакриламідний гель фарбувати відповідно до методики: гель покласти на 5хв у 10% етанол, перенести у 1% НNО3 на 3хв. Гель промити кілька разів дистильованою водою. Витримати 20хв у 0,012М AgNO3 у темряві, промити кілька разів дистильованою водою. Інкубувати гель у відновлюючому розчині (0,28М Na2CO3 (безводний), 0,019% формалін), змінюючи розчин у кожному разі його потемніння, до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Промити кілька разів бідистильованою водою. Гелі зберігати між двома листами прозорої поліетиленової плівки.

5. Документування отриманих електрофореграм. Документувати отримані електрофореграми відеосистемою VDS ("Amersham Pharmacia Biotech"). Молекулярну вагу поліморфних фрагментів ДНК встановлювати за допомогою комп'ютерної програми "Image Master ID Elite" згідно стандарту молекулярної ваги. 6. Запис ідентифікаційної формули. За результатами аналізу мікросателітних локусів записати для аналізуємого генотипу характерний для нього набір алелів в вигляді формули, де латинськими літерами позначити коди локусів, а у нижніх індексах цифрами - розміри відповідних локусам алелів (в парах нуклеотидів) [27].

1.8.4 Методи контролю генетичної типовості ліній та рівня гібридності

Генетично однорідні інбредні лінії є підставою для отримання насіння F1 з високим рівнем гібридності, що забезпечує прояв ефекту гетерозису та значну врожайність соняшника. Тому необхідні надійні методи контролю генетичної типовості ліній та рівня гібридності [32].

Основним методом оцінки цих показників є грунт-контроль, що вимагає значних посівних площ і часу та в значній мірі є суб'єктивним аналізом.

Відомий спосіб встановлення типовості та гібридності за допомогою електрофорезу запасного білку - геліантину. У відповідності з даним способом з окремих насінин лінії соняшника виділяють геліантини та проводять електрофорез у поліакриламідних гелях. Після фіксації та фарбування аналізують білкові спектри на електрофореграмах. Про типовість ліній говорять виходячи з відсотка насінин, що мають ідентичні спектри. Рівень гібридності визначається відсотком насінин, у спектрах яких поєднуються компоненти спектрів материнської та батьківської ліній. До недоліків даного способу треба віднести слідуючи: серед комерційних гібридів соняшника поліморфним є лише один з шести локусів, кодуючих геліантини, та більша частина ліній не відрізняються одна від іншої.

З метою усунення вказаних недоліків, пропонується спосіб встановлення типовості та рівня гібридності комерційних генотипів соняшника, оснований на ДНК-типуванні ліній та гібридів за окремими мікросателітними локусами геному соняшника [30, 31, 37].

Спосіб здійснюється таким чином:

1. Виділення ДНК. Сегменти 3 денних паростків 100 окремих насінин досліджуваної партії насіння соняшника гомогенізувати в 1.5мл-пробірках в лізуючому буфері (20.0мМ Na3EDTA, 0.1М тріс-НСl рН 8.5 при 25°С, 1.4М NaCl,) до повної мацерації тканин. Лізат інкубувати 45 хв. при 60°С. Додати рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішати до утворення білої емульсії. Центрифугувати 5хв. при 14000об./хв. на мікрофузі "Eppendorf 5415", водну фазу перенести в чисті пробірки та додати рівний об'єм ізопропілового спирту, перемішати, осадити ДНК центрифугуванням при 10000об./хв. протягом 4хв. на мікрофузі "Eppendorf 5415". Осадок промити двічі 0.5мл 70% етанолу, центрифугувати при 10000об./хв. протягом 4хв. на мікрофузі "Eppendorf 5415". Осадок ДНК підсушити при кімнатній температурі 15хв. та розчинити в 0.3мл ТЕбуферу (10.0мМ трис-НСl, 1.0мМ ЕДТА).

2. Проведення полімеразної ланцюгової реакції. ПЛР проводити на приладі "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Вміст реакційної суміші для проведення ПЛР об'ємом 20мкл: 50мМ КСІ, 20мМ тріс-НСl (рН 8,4 при 25°С), 0,01% Tween-20, 2мМ MgCl2, 0,2мкМ праймеру, 200мкМ кожного dNTP, 20нг геномної ДНК, 1 од. Taq-полімерази. Ампліфікація: денатурація - 94°С - 2хв., далі - 40с.; відпал - 60°С - 30с. - 35 циклів; синтез - 72°С - 2хв.; елонгація - 5хв.

3. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації. Оцінювати продукти ампліфікації (5мкл-аліквоту ПЛР-суміші) у 10 % денатуруючому поліакриламідному гелі. Склад гелю: 10% акриламід, 7М мочевина, 1 х ТВЕ-буфер (50мМ тріс-Н3ВО3, 2мМ ЕДТА, рН 8.0). Умови електрофорезу: напруга 500V протягом 90хв. при 65°С. Для приготування одного гелю необхідно змішати 12.5мл 8М сечовини, 12.5мл розчину 30% поліакриламіду з 8М сечовиною, 2.5мл 10 х ТВЕ-буферу, 25мкл ТМЕД, 50мкл 10% ПСА. Для контролю за просуванням фрагментів ДНК в гелі зразок змішати з 1мкл денатуруючого буфера для нанесення (98% формамід, 10мМ ЕДТА рН 8.0, 0.2% (w/v) бромфеноловий син синій, 0.2% (w/v) ксиленціанол) та денатурувати протягом 1.5хв. при 95°С, після чого швидко охолодити на льодяній бані та за допомогою шприца нанести в лунку гелю. Одна доріжка гелю повинна містити зразок ДНК з відомою молекулярною вагою. Як стандарт молекулярної маси використовувати ДНК pUC19, рестриктовану MspI.

4. Візуалізація продуктів ампліфікації. Поліакриламідний гель фарбувати відповідно до методики: гель покласти на 5хв. у 10% етанол, перенести у 1% HNO3 на 3хв. Гель промити кілька разів дистильованою водою. Витримати 20хв. у 0.012М AgNO3 у темряві, промити кілька разів дистильованою водою. Інкубувати гель у відновлюючому розчині (0.28М Na2CO3 (безводний), 0.019% формалін), змінюючи розчин у кожному разі його потемніння, до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Промити кілька разів бідистильованою водою. Гелі зберігати між двома листами прозорої поліетиленової плівки.

5. Документування отриманню електрофореграм. Документувати отримані електрофореграми відеосистемою YDS ("Amersham Pharmacia Biotech"). Молекулярну вагу поліморфних фрагментів ДНК встановлювати за допомогою комп'ютерної програми "Image Master ID Elite" згідно стандарту молекулярної ваги.

6. Встановлення типовості та рівня гібридності. Порівнюючи ампліфікаційні спектри окремих насінин, встановити кількість типових для даної лінії, що в відсотковому виразі буде являти собою показник типовості. В разі встановлення рівня гібридності, порівняти ампліфікаційні спектри окремих насінин гібриду та його вихідних форм за тим локусом, що є поліморфним для батьківських ліній. Кількість зразків, ампліфікаційні спектри яких утримують алелі обох батьківських ліній, в відсотковому виразі буде являти собою показник гібридності [27].

**Приклад:** Встановлення рівня гібридності насіння гібриду Од123.



Рисунок 1.3 – Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації насіння гібриду Од123 [27].

Для дослідження було взято насіння гібриду Од123, виділяли ДНК зі 100 насінин, ампліфікували ДНК окремих насінин з праймерами до мікросателітного локусу ORS 78 та проведено електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації. Серед дослідженого насіння зустрічалися зразки двох типів. У насіння першого типу в спектрах поєднувалися алель 162 п.н. (як у материнської лінії) та алель 156 п.н. (як у батьківської лінії) (фіг.2: доріжки 3, 4, 6, 7), що свідчить про їх гібридну природу. У спектрах насіння другого типу були присутні лише алелі 162 п.н. (фіг.2: доріжки 2, 5), що виключає можливість їх походження від лінії Од4В. Оцінка, згідно заявленому способу, 100 насінин дозволила встановити відсоток гібридних рослин: зі 100 такими були 72, тобто рівень гібридності даної партії насіння гібриду Од123 дорівнює 72% [27].

1.8.5 Молекулярно-генетичний поліморфізм соняшнику на між- і внутрішньовидовому рівнях

Встановлено, що однорічні дикорослі види (2n = 34) легко вступають в гібридизацію з культурним соняшником і дають фертильне потомство при будь-якому напрямку схрещувань. На основі гібридів культурного соняшнику з однорічними дикими видами отримані селекційні лінії, які володіють генами стійкості до хвороб. Особливу цінність для селекції представляють багаторічні види, які служать джерелами ознак, відсутніх у однорічних видів, зокрема групового імунітету до хвороб і шкідників. У звичайних умовах багаторічні та однорічні види роду *Helianthus* схрещуються з великими труднощами (при цьому утворюються стерильні або несумісні гібриди). Встановлено, що несумісність однорічних і багаторічних видів соняшнику при схрещуванні обумовлена відмінностями в їх геномному складі [32, 41].

Порівняльний аналіз спектрів ампліфікації дав змогу визначати генетичні дистанції між різними *Helianthus sp.* Отримано схему, що відображає генетичні зв’язки між дикорослими видами *Helianthus sp*. і представниками культурного *Helianthus annuus.* Розподіл видів у цілому відповідає морфологічному поділу цього роду на секції. Виявлено, що селекційні лінії відрізняються одна від одної більше, ніж представники різних підвидів дикорослих видів *Helianthu*s. Найближчими до *Helianthus annuus* є види (*H. laetiflorus, H. salicifolius, H. bolandery, H. petiolaris, H. tuberosus*), які можна розглядати як вірогідних донорів господарсько цінних ознак для культурного соняшнику. Аналіз генетичних дистанцій, розрахованих на підставі даних поліморфізму ДНК, дає змогу класифікувати інбредні лінії соняшнику згідно зі ступенем генетичної віддаленості, розподілити лінії на групи материнських і батьківських форм [31].

Знання генетичної спорідненості ліній, що базується на результатах молекулярно-генетичного аналізу, може бути використане в гібридній селекції під час добору батьківських пар. Показана можливість прогнозування низькогетерозисних гібридів і відбраковка на початкових етапах селекційного процесу, базуючись на результатах дослідження поліморфізму ДНК ліній [32, 34, 44].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об’єкти дослідження

Об’єктом дослідження є мутантні лінії соняшнику з різною морфологією, що були отримані в результаті селекційної роботи в Інституті олійних культур. Мутантні лінії отримані методом хімічного мутагенезу, шляхом обробки хімічним мутагеном етилметансульфонатом незрілих зародків вихідної лінії ЗЛ 809 з подальшим їх дорощуванням в умовах in vitro.

Для проведення дослідження було взято вихідну лінію ЗЛ 809 та три мутантні лінії: ЗЛ 809 (низький габітус), ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*), ЗЛ 809 (зменшена кількість язичкових квітів на кошику).

2.2 Статистична обробка отриманих даних

Одержані результати були опрацьовані статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Критерій Стьюдента застосовується для перевірки гіпотез про рівність генеральних середніх, якщо статистичні дані можуть бути розподілені за нормальним законом.

t-критерій Стьюдента призначений для вирішення одного з завдань, що найбільш часто зустрічається при обробці даних – виявлення достовірності відмінностей між двома або більше рядами значень [51].

t-критерій Стьюдента обчислюється за формулою:



де ***t St*** - величина обчисленого емпіричного критерію, який необхідно порівнювати з критичним; ***М1*** і ***М2*** - значення порівнюваних середніх арифметичних; ***т1*** і ***т2*** - відповідні величини статистичних помилок середніх арифметичних.

Розраховане значення t-критерія порівнюється з критичним значенням ***tкр*,** де  ***tкр*** – критичне значення розподілу Стьюдента, яке надається в статистичних таблицях .

Число ступенів свободи визначається за формулою:

***v = n1*** + ***n2*  - 2,**

де ***n1*** i ***n2*** – обсяги порівнюваних вибірок.

Рішення про достовірність відмінностей приймається в тому випадку, якщо обчислена величина ***t St*** перевищує табличне значення для даного числа ступенів свободи ***(d (v)).*** У тексті публікації або наукового звіту вказують найбільш високий рівень значущості з трьох: ***р <*** 0,05; <0,01; <0,001 [52].

3 ЕКСПЕРИМЕНТAЛЬНA ЧAСТИНA

Для статистичного порівняння було взято три мутантні лінії соняшнику ЗЛ 809: ЗЛ 809 (низький габітус), ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*), ЗЛ 809 (зменшена кількість язичкових квітів на кошику) (рис. 3.2). В якості контролю використано вихідну лінію ЗЛ 809 (контроль) (рис. 3.1).



Рисунок 3.1 – Вихідна лінія ЗЛ 809 (контроль)



Рисунок 3.2 – Мутантна лінія ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квітів

Порівняння проводилося з метою статистичного доведення різниці між мутантними лініями та вихідною лінією, а також між самими мутантними лініями за такими кількісними ознаками як висота рослини, кількість листків на рослині та розмір листової пластинки, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вираженість вказаних ознак є важливою характеристикою ліній, оскільки вони суттєво впливають на рівень продуктивності як самих ліній, так і того селекційного матеріалу, у створенні якого ці лінії будуть приймати участь.

3.1 Порівняння мутантних ліній соняшнику за висотою рослин

Порівняння за t-критерієм Стьюдента свідчать про те, що відмінності між мутантною лінією ЗЛ 809 з низьким габітусом та контрольною лінією є суттєвими при рівні вірогідності 0,999. А також, що відмінності між лінією ЗЛ 809 (низький габітус) та іншими мутантними лініями ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) і ЗЛ 809 (мало язичкових квіток) суттєві при рівні вірогідності 0,999.

Таблиця 3.1 – Порівняння ліній соняшнику за висотою

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Лінія | max, см | min, см | CV, % | Висота рослини з похибкою, см |
| ЗЛ809 (контроль) | 124 | 69,5 | 12,41 | 99,41±2,12 |
| ЗЛ809 (низький габітус) | 90,5 | 55,5 | 12,23 | 76,74±1,81\*\*\* |
| ЗЛ809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) | 120 | 76 | 12,9 | 97,33±2,74 |
| ЗЛ809 (мало язичкових квіток) | 122,5 | 73 | 14,28 | 101,25±2,95 |

Примітка: \*\*\* - відмінності від контролю та інших зразків суттєві при рівні вірогідності 0,999

Відмінності між лініями ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу Viridis) та ЗЛ 809 (мало язичкових квіток) між собою та з контролем є несуттєвими (табл. 3.1).

Рисунок 3.3 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за висотою рослин

Отримані в ході дослідження дані про висоту мутантних ліній соняшнику подані також у вигляді графіка (рис. 3.3), в якому показано залежність висот рослин від їх частот. З графіка помітно, що мутантна лінія ЗЛ 809 з низьким габітусом значно відрізняється від контролю та інших ліній.

3.2 Порівняння мутантних ліній соняшнику за кількістю листків на рослині

Проведене статистичне порівняння за t-критерієм Стьюдента показало:

- суттєві відмінності між лінією ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) та контролем при рівні вірогідності 0,999;

- суттєві відмінності між зразком ЗЛ 809 (низький габітус) та контролем при рівні вірогідності 0,99;

- суттєві відмінності між лінією ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квіток та лініями ЗЛ 809 з хлорофільною недостатністю типу *Viridis* і ЗЛ 809 з низьким габітусом при рівні вірогідності 0,99.

Також порівняння показало, що відмінності між лінією ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квіток і контролем є не суттєвими. Відмінності між лініями ЗЛ 809 з хлорофільною недостатністю типу *Viridis* та ЗЛ 809 з низьким габітусом теж не суттєві (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Порівняння ліній соняшнику за кількістю листків

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Лінія | max, см | min, см | CV,% | Кількість листків  з похибкою |
| ЗЛ 809 (контроль) | 27 | 16 | 14,12 | 21,0±0,51 |
| ЗЛ 809 (низький габітус) | 32 | 18 | 14,98 | 23,8±0,70\*\* |
| ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) | 28 | 19 | 10,8 | 23,7±0,56\*\*\* |
| ЗЛ 809 (мало язичкових квіток) | 25 | 17 | 9,13 | 21,6±0,40## |

Примітка: \*\* - відмінності від контролю суттєві при рівні вірогідності 0,99, \*\*\* - відмінності від контролю суттєві при рівні вірогідності 0,999, ## - відмінності між зразком ЗЛ 809 (мало язичкових квіток) і зразками ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) та ЗЛ 809 (низький габітус) суттєві при рівні вірогідності 0,99.

Рисунок 3.4 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за кількістю листків

Отримані дані представлені на графіку залежності кількості листків на одній рослині від частоти рослин за кількістю листків (рис. 3.4). На ньому видно, що мутантна лінія зі зменшеною кількістю язичкових квіток помітно відрізняється від ліній з низьким габітусом та хлорофільною недостатністю, які між собою відрізняються значно менше. У мутантної лінії, що має зменшену кількість язичкових квіток, найбільшою є частота рослин з кількістю листків 20-21 штук на рослині, тоді як у лінії з низьким габітусом – 23 штуки, а у лінії з хлорофільною недостатністю – 25 штук.

3.3 Порівняння мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластинки

За результатами статистичного порівняння мутантних ліній соняшнику за t-критерієм Стьюдента можна зробити висновки, що за довжиною листової пластинки відмінності між мутантною лінією ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) із контролем та іншими лініями суттєві при рівні вірогідності 0,999 (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Порівняння мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластинки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Лінія | max, см | min, см | CV, % | Довжина листка з похибкою, см |
| ЗЛ809 (контроль) | 21,6 | 10,2 | 13,59 | 17,18±0,40 |
| ЗЛ809 (низький габітус) | 23,8 | 10,4 | 16,44 | 17,63±0,56 |
| ЗЛ809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) | 17,4 | 9,5 | 12,5 | 14,80±0,40\*\*\* |
| ЗЛ809 (мало язичкових квіток) | 23,3 | 12,7 | 13,5 | 18,12±0,50 |

Примітка: \*\*\* - відміності від контролю та інших зразків суттєві при рівні вірогідності 0,999

Отримані в ході дослідження дані представлено у вигляді графіка залежності довжини листка на рослинах від частоти рослин (рис. 3.5). З графіка видно, що лінія ЗЛ 809 з хлорофільною недостатністю типу *Viridis* суттєво відрізняється від інших зразків.

Рисунок 3.5 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за довжиною листової пластини

Відмінності між лініями ЗЛ809 (низький габітус) і ЗЛ809 (мало язичкових квіток) із контролем та між собою не суттєві.

3.4 Порівняння мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластинки

Статистичне порівняння мутантних ліній за t-критерієм Стьюдента показало (табл. 3.4):

- відмінності між лінією ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) та контролем суттєві при рівні вірогідності 0,99.

- відмінності між лінією ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) та лінією ЗЛ 809 з низьким габітусом суттєві при рівні вірогідності 0,99.

Таблиця 3.4 – Порівняння мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластини

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Лінія | max, см | min, см | CV, % | Ширина листка з похибкою, см |
| ЗЛ809 (контроль) | 28 | 8,4 | 21,13 | 17,01±0,62 |
| ЗЛ809 (низький габітус) | 23,8 | 9,3 | 21,66 | 16,74±0,70 |
| ЗЛ809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) | 18,4 | 7,5 | 17,04 | 14,49±0,54\*\* |
| ЗЛ809 (мало язичкових квіток) | 25 | 10,8 | 17,14 | 18,15±0,64### |

Примітка: \*\* - відмінності від контролю та від лінії ЗЛ 809 (низький габітус) суттєві при рівні вірогідності 0,99; ### - відмінності між зразком ЗЛ 809 (мало язичкових квіток) та зразком ЗЛ809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) суттєві при рівні вірогідності 0,999.

Рисунок 3.6 – Полігон розподілу мутантних ліній соняшнику за шириною листової пластни

- відмінності між лінією ЗЛ 809 (хлорофільна недостатність типу *Viridis*) та лінією ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квіток суттєві при рівні вірогідності 0,999.

- відмінності між лінією ЗЛ 809 з низьким габітусом та лінією ЗЛ 809 зі зменшеною кількістю язичкових квіток із контролем та між собою є не суттєвими.

За отриманими результатами побудовано графік залежності ширини листової пластини на рослині від частоти рослин (рис. 3.6). З нього помітно, що в лінії ЗЛ 809 з хлорофільною недостатністю рослини з меншою шириною листової пластинки зустрічаються частіше ніж у інших зразків.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці – це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності людини у процесі трудової діяльності [46].

Основна частина моєї роботи відбувається за комп’ютером, тому необхідно знати та дотримуватися вимог при роботі з персональним комп’ютером, що регламентується Державними санітарними правилами і нормами роботи з візуальними дисплейними терміналами електронно-обчислювальних машин ДСанПіН 3.3.2.007-98.

4.1 Правила безпечного користування персональним комп’ютером

Персональний комп'ютер може бути підключений тільки до розетки, яка має заземлення.

В кінці робочого дня або у разі тривалої перерви у роботі (вихідні або святкові дні, на час відпустки тощо) вилку кабеля живлення персонального комп'ютера слід від'єднати від розетки електромережі.

Персональний комп'ютер встановлюється на робочих місцях, на яких обладнанню забезпечується нормальне охолодження. Повітря з вентилятора охолодження персонального комп'ютера повинно мати вільний вихід.

Забороняється пересувати ввімкнений системний блок. Не дозволяється розміщувати персональний комп'ютер у місцях, де він не захищений від: попадання на нього прямих сонячних променів, пилу, механічних ударів, вібрацій, коливань та інших зовнішніх впливів; впливу високочастотного випромінювання (поблизу трансформаторів, ліній високовольтних передач та ін.)[47].

Не допускається перекриття вентиляційних отворів монітора, що знаходяться на верхній та бокових панелях.

Персональний комп'ютер має бути встановлений на міцній горизонтальній поверхні.

Забороняється встановлювати персональний комп'ютер у місцях, де існує небезпека потрапляння на нього води, а також поблизу опалювальних приладів.

У разі короткої перерви в роботі необхідно зберегти всі змінені впродовж останнього часу документи та зробити блокування персонального комп'ютера.

Не слід встановлювати персональний комп'ютер поблизу опалювальних пристроїв, а також бережіть від прямих сонячних променів [48, 49].

4.2 Вимоги до техніки безпеки в лабораторії

У біологічних лабораторіях використовують загальні гігієнічні заходи. Усі працівники лабораторії повинні бути в медичних халатах. На ноги необхідно взувати закрите взуття, що закриває верхню частину стопи. Під час виконання процедур, при яких можуть утворитися інфіковані бризки, необхідно використовувати захисні окуляри або екрани. Для виконання стандартних лабораторних процедур у разі додержання правил гігієни рукавички не використовують. Правильна гігієна рук передбачає ретельне очищення рук відразу після закінчення роботи з мікроорганізмами або будь-коли у разі випадкового контакту мікроорганізмів із шкірою. Очищення рук проводять шляхом миття водою з милом або обробленням спиртом.

Підлога, стіни та поверхні всіх меблів повинні бути гладкими і непошкодженими. У лабораторії повинна бути раковина для вмивання та миття рук. Двері повинні замикатися. Необхідно також запобігти потраплянню шкідників до лабораторії. Особисті речі зберігають за межами робочої зони. З обладнання в лабораторії обов’язково повинний бути автоклав.

Для роботи в лабораторії можна використовувати лише культури, отримані з референтних лабораторій або авторитетних джерел (наприклад, академічні лабораторії або регіональні відділи охорони здоров’я). Забороняється використання мікроорганізмів, виділених із довкілля, оскільки вони можуть бути організмами, які вимагають практики та обладнання. Необхідно ретельно документувати всю інформацію про походження, властивості та рух музейних мікроорганізмів у лабораторії [47,50].

4.3 Пожежна безпека

Забезпечення пожежної безпеки в лабораторії визначається «Правилами пожежної безпеки в Україні»:

– у лабораторії на видному місці повинні бути справжні первинні засоби пожежогасіння: вогнегасники вуглекислотні, пінні або порошкові, які розміщують безпосередньо в лабораторії; ящик або відро з піском (об’ємом близько 0,01 м3) з совком; покривало з вогнетривкого матеріалу;

– загорання у лабораторії слід відразу ліквідувати. У разі пожежі необхідно: повідомити пожежну охорону; вжити заходів щодо евакуації людей з приміщення; негайно вимкнути всі газові та електроприлади, а також забрати всі вогненебезпечні речовини, потім перекрити доступ повітря до вогню, а місце пожежі засипати піском, накрити покривалом з вогнетривкого матеріалу або обробити вуглекислим газом з вогнегасника [47,49].

ВИСНОВКИ

На теперішній час соняшник залишається найбільш рентабельною сільськогосподарською культурою в Україні. Це обумовлює значну увагу з боку виробників і селекціонерів.

В даний час вже визначено і досліджено багато генів соняшнику, активно ведуться роботи по здійсненню їх маркування та встановленню груп зчеплення.

Виявлені ознаки відкрили нові можливості у селекції цієї культури, тим самим розширивши генетичну різноманітність вихідного матеріалу.

Проведено порівняння, в ході якого з’ясовано різницю між мутантними лініями соняшника та вихідною лінією, а також між самими мутантними лініями за такими кількісними ознаками як висота рослини, кількість листків на рослині та розмір листової пластинки.

Статистично доведено чи є різниця між мутантними лініями та вихідною лінією використовуючи t-критерій Стьюдента.

Встановлено, що мутантна лінія зі зменшеною кількістю язичкових квіток, не має суттєвих відмінностей від вихідної лінії та не поступається вихідній лінії за кількістю листків та їх розміром, і може успішно використовуватися у селекційному процесі як джерело маркерної морфологічної ознаки – зменшена кількість язичкових квіток.

З’ясовано, що мутантну лінію з хлорофільною недостатністю типу *viridis* не бажано включати в селекційний процес, оскільки вона суттєво поступається вихідній лінії за розміром листків, що може негативно вплинути на продуктивність матеріалу, що буде створюватися з використанням даної мутантної лінії

Отримані в ході порівняння дані дозволяють більш цілеспрямовано використовувати мутантні лінії у подальших селекційних дослідженнях.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Проведені експериментальні дослідження з порівняння мутантних ліній соняшника, отриманих методом індукованого мутагенезу, з вихідною лінією ЗЛ 809, селекції Інституту олійних культур Національної академії аграрних наук, дозволяють надати наступні рекомендації:

1. Мутантну лінію з відмітною морфологічною ознакою низький габітус, яка має суттєво збільшену кількість листків у порівнянні з вихідною лінією та не поступається вихідній лінії за розміром листків, бажано включати в селекційний процес як джерело низькорослості.
2. Мутантна лінія зі зменшеною кількістю язичкових квіток, яка не поступається вихідній лінії за кількістю листків та їх розміром, може успішно використовуватися у селекційному процесі як джерело маркерної морфологічної ознаки – зменшена кількість язичкових квіток.
3. Мутантну лінію з хлорофільною недостатністю типу *viridis* не бажано включати в селекційний процес, оскільки вона, хоча і має збільшену кількість листків, але суттєво поступається вихідній лінії за розміром листків, що може негативно вплинути на продуктивність матеріалу, що буде створюватися з використанням даної мутантної лінії.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ:

1. Зінченко О. І., Салатенко В. Н., Білоножко М. А. Рослинництво: навч.посіб. Київ: Аграрна освіта, 2001. 591 с.

2. Бугайов В. Д,. Васильківський С. П, Власенко В.А. та ін. Спеціальна селекція польових культур: навчальний посібник. Біла Церква, 2010. 368 с.

3. Дубова О. В., Єфіменко І. С. Сучасні напрями селекції, технології вирощування та переробки олійних культур: зб. тез доп. міжнар. наук. інтернетконф. м. Запоріжжя, 2017 р. Запоріжжя: ІОК НААН, 2017. 197 с.

4. Орлов О. Негативні чинники при вирощуванні соняшнику та заходи боротьби з ними. *Електронний журнал Агроном.* 2021. URL: https://www.agronom.com.ua

5. Єременко О. А. Агробіологічні основи формування продуктивності олійних культур (*Helianthus annuus L., Carthamus tinctorius L., Linum usitatissimum L.*) в Південному Степу України: кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Київ; Мелітополь. 2018. 483 с.

6. Дубова О.В, Мищук А.О., Лях В.О. Анатомо-морфологічні та фізіологічні особливості деяких диких видів соняшника. *Актуальні питання біології, екології та хімії*. Запоріжжя, 2013. №2. С. 26-35.

7. Чекалин Н.М., Тищенко В.Н., Баташова М.Е. Селекция и генетика отдельных культур. Москва, 2009. 325 с.

8. Чигрин Т. В., Юшкіна Л. Л., Задорожна О. А., Супрун О. Г. Особливості андрогенезу в культурі *in vitro* різних видів соняшнику. *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. 2012. № 105. С 116-121.

9. Лях В.А, Полякова И.А., Сорока А.И. Индуцированный мутагенез масличных культур: монографія. Запорожье: ЗНУ, 2009. 266 с.

10. Міщук А.О., Дубова О.В., Лях В.О. Різноманіття морфологічних ознак вегетативних органів ліній соняшника. *Актуальні питання біології, екології та хімії.* Запоріжжя, 2013. №1. С. 76-84.

11. Дубова О В., Рибальченко Н.В. Особливості будови вегетативних і генеративних органів ліній та міжвидових гібридів соняшнику. *Актуальні питання біології, екології та хімії*. Запоріжжя, 2016. №1. С. 117-129.

12. Кириченко В.В. Селекція і насінництво соняшника. Харків, 2005. 385 с.

13. Приступа І.В. Соняшник, як перспективна алелопатично-активна

рослина південного сходу України. *Науковий бюлетень*. Запоріжжя, 2012. №17. С. 18-21.

14. Бабич В. Сучасні тенденції селекції соняшнику: електронний журнал *«Агроном».* 2020. URL: https://www.agronom.com.ua/suchasni-tendentsiyi-selektsiyi-sonyashnyku.

15 Шкорич Д., Джеральд Дж. Сейлер, Лью Жао. Генетика и селекция подсолнечника: монография. Ассоциация «Селекция и семеноводство подсолнечника». Харьков: НТМТ, 2015. 540 с.

16. Никитчин Д. И. Подсолнечник. Киев: Урожай. 1999. 192 с.

17. Борисонік З. Б. Соняшник. Київ: Урожай. 1996. 240 с.

18. Сегеда С. А. Актуальні проблеми насінництва соняшнику. *Економіка АПК*. 2001. № 8. С. 46-50.

19. Іванова Н.А. Ефективність виробництва товарного насіння соняшнику. *Економіка АПК*. 2004. №6. С. 33-35.

20. Андрієнко А.Л. Фактори впливу на ефективність вирощування соняшнику. *Агроном*. 2010. №4. С. 64.

21. Вавилов М.І. Генетика на службі соціалістичного землеробства: обрані праці. Москва, 1965. Т. 5. 287c.

22. Кириченко В.В., Петренкова В. П., Коломацька В.П. та ін. Ефективність імунологічних досліджень у стабілізації урожайності соняшнику. *Вісник аграрної науки. Генетика, селекція, біотехнологія.* Київ, 2017. № 5. С. 33-36.

23. Спосіб отримання мутантних генотипів соняшника: пат 95344 Україна. № 200910096; заявл. 05.10.2009; опбл. 25.07.2011, Бюл. № 14.

24. Кондратенко С.І., Сергієнко О.Ф., Гончарова С.А., Баштан Н.О. Гаплоїдія овочевих видів рослин in vitro. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології:* зб. наук. пр. Київ, 2007. Т. 2. С. 508-512.

25. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений: уч. пос. 4-е изд. передел. и доп. Москва: Агропромиздат, 1988. 271 с.

26. Сиволап Ю., Волкодав В., Бальвінська М., Кожухова Н., Солоденко А., Чеботар С. Ідентифікація і реєстрація генотипів м’якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшнику за допомогою аналізу мікросателітних локусів: метод. реком. Одеса: ПБЦ в рослинництві УААН, 2004. 324 с.

27. Спосіб встановлення типовості та рівня гібридності генотипів соняшнику: патент на винахід № 63265А Україна; 15.01.2004. Бюл. № 1.

28. Сиволап Ю.М., Солоденко А.Є. Ідентифікація і маркування геному соняшнику. *Вісник аграрної науки. Генетика, селекція, біотехнологія:* Київ, 2010. №11. С 38-40.

29. Солоденко А., Саналатий А., Сиволап Ю.  Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров. *Цитология и генетика*: Одеса, 2006. Т. 40. № 4. C.  37 - 43.

30. Солоденко А. Трояновська A., Сиволап Ю. Система ДHK маркерів для використання в селекцiї та насiнництвi соняшника. Геном pослин: збiрник науковиx статей: Одеса, 2008. C. 121-124.

31. Сиволап Ю., Солоденко А., Бурлов В. Дослідження молекулярно-генетичного різноманіття інбредних лиій і рівня гетерозису у гібридів. *Цитология и генетика*: Одеса, 2008. № 6. С. 47-52.

32. Солоденко А.Е., Вареник В.Ф., Бурлов В.В. Ведмедєва К.В. Використання ДНК-маркерів в генетико-селекційних програмах соняшнику: збірник наукових праць: Одеса СГІ – НЦНС, 2015, № 25.-С 103-115.

33. Кутіщева Н.М., Шудря Л.І., Одинець С.І., Середа В.О. Оцінка рівня генетичного потенціалу врожайності гібридів соняшнику в степовій зоні. *Вісник аграрної науки*. *Генетика, селекція, біотехнологія:* Київ, 2014. № 7. С 38-42.

34. Ведмедева К.В., Толмачев В.В., Солоденко А.Е. Bикористання рецесивних генів морфологічних ознак і ДНК-маркерів у насінництві соняшника. *Вісник Запорізького національного університету*: Запоріжжя, 2014. №1. C 7-13.

35. Спосіб ідентифікації генотипів соняшнику: пат. № 68813 Україна; опубл. 16.08.2004. — Бюл. № 8.

36. Спосіб детекції генотипів соняшника, стійких до вовчка: пат 56691 Україна. № 201007894; заявл. 24.06.2010; опубл. 25.01.2011, 25. Бюл.№ 2.

37. Шугурова Н.О., Дем’яненко Т.Т., Краснокутська Ю.В., Погорільчук З.І. Метод оцінки стійкості селекційних сортозразків соняшнику до вовчка в лабораторних умовах. *Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур:* Запоріжжя: ІОК НААН, 2016. № 23. С 102-108.

38. Lyakh V., Soroka A., Vasin V. Influence of mature and immature sunflower seed treatment with ethylmethanesulphonate on mutation spectrum and frequency. *Helia*. 2005. V. 28. № 43. С 87-98.

39. Vijaya Priya K., Sassikumar D., Sudhagar R. Androgenetic response of sunflower in diferent culture environments. *Helia*: Serbia, 2003. Vol. 26, № 38. P. 39-50.

40. Solodenko A., Sivolap Yu. Genotyping of Helianthus based on microsatellite sequences. *Helia*. V. 28, 2005. № 42. P. 19-26.

41. Sivolap Yu. Inter- and intraspecies differentiation in the genus Helianthus RAPD analysis. *Helia*. 1998. V. 22. № 21. Р. 45-56.

42. Vasic D., Skoric D., Jocic S. Anther culture of sunflower cultivars*.* аctes proceedings of 15th International Sunflower Conference: Toulouse, France, 2000. V. 2.

43. Seiler G.J., Qi L.L., Marek L.F. Utilization of sunﬂower crop wild relatives for cultivated sunﬂower improvement. *Crop Sci*: USA, 2017. Vol. 57. P. 1083–1101.

44. Paniego N., Eschaide M., Munoz M., at.al. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (Helianthus annuus L.). *Genome*. 2002. №.45. P.34-43.

45. Dayan Sergun. History of in vitro culture studies on Helianthus annuus L. In Тurkey. *Trakya University Journal of Natural Sciences*: Trakya, Тurkey, 2016. №17. Р. 129-133.

46. Голінько В.І. Основи охорони праці: підручник. Дніпропетровськ: НГУ, 2014. 271 с.

47. Правила охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях. ДНАОП. URL:<https://dnaop.com/html/32348_2.html>

48. Одарченко М. С., Одарченко А. М.,. Степанов В. І.,. Черненко Я. М. Основи охорони праці : підручник. Харків: Стиль-Издат, 2017. 334 с.

49. Ткачук К.Н., Зацарний В.В. Охорона праці та промислова безпека: підр. Київ: Лібра, 2010. 559 с.

50. Голубнича В. М., Погорєлов В. М.,. Корнієнко В. В. Біобезпека та біозахист у біологічних лабораторіях 1-го та 2-го рівнів біобезпеки : монографія. Суми: СДУ, 2016. 123 c.

51. Перегуда О.В., Капустян О.А., Курилко О.Б. Статистична обробка даних: навч. посіб. Київ, 2022. 103 с.

52. Руденко В. М. Математична статистика: навч. посіб. Київ: Центр учбової літератури, 2012. 304 с.