

В. І. ВОЙТОВСЬКА

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ РІЗНИХ ВИДІВ СОРГО, АДАПТОВАНОГО ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ *IN VITRO*

НАУКОВО-МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ



КИЇВ 2026

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

В. І. Войтовська

**СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ
РІЗНИХ ВИДІВ СОРГО, АДАПТОВАНОГО
ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ *IN VITRO***

Науково-методичні рекомендації

Київ 2026

УДК 633.174:581.1.083:631.524.85
<https://doi.org/10.47414/978-617-8706-37-1>

Рекомендовано до опублікування вченою радою
Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН
(протокол № 8 від 08 квітня 2026 р.)

Рецензенти:

Л. А. Правдива, доктор с.-г. наук, старший науковий співробітник;
І. І. Бойко, кандидат с.-г. наук, старший науковий співробітник
(Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН)

Войтовська В. І. Створення вихідного матеріалу різних видів сорго, адаптованого до стресових чинників *in vitro* : науково-методичні рекомендації / НААН України, Ін-т біоенергет. культ. і цукр. буряків. Електрон. вид. Київ : ІБКІЦБ НААН, 2026. 20 с.

ISBN 978-617-8706-37-1 (PDF)

Розглянуто науково-практичні аспекти створення нового вихідного матеріалу різних видів сорго (зернового, цукрового, віничного, соризу та сорго-суданкових гібридів) з використанням методів клітинної селекції *in vitro* до стресових чинників. Досліджено особливості морфогенезу та регенерації рослин за умов селективного тиску, змодельованого фузарієвою кислотою. Отримані клони характеризуються підвищеною адаптивністю до біотичних стресорів та стабільністю біометричних показників на фоні дії патогенів. Наведено алгоритми приготування модифікованих живильних середовищ, розрахунки концентрацій селективних агентів та схеми добору толерантних ліній. Удосконалені біотехнологічні компоненти поповняють ознакові колекції вихідного матеріалу для створення нових сортів та гібридів сорго з високим адаптивним потенціалом.

Рекомендації призначені для біотехнологів, селекціонерів, генетиків і спеціалістів наукових установ – оригінаторів нових сортів, які займаються питаннями імунітету рослин та впровадженням методів клітинної інженерії у селекційний процес.

УДК 633.174:581.1.083:631.524.85
<https://doi.org/10.47414/978-617-8706-37-1>



Цей твір поширюється на умовах ліцензії CC BY-NC-SA 4.0
(Creative Commons «Attribution-NonCommercial-ShareAlike» 4.0 International)

ISBN 978-617-8706-37-1 (PDF)

© Інститут біоенергетичних культур
і цукрових буряків НААН, 2026
© В. І. Войтовська, 2026

ЗМІСТ

Вступ	4
1. Характеристика вихідного матеріалу та селективних агентів	5
2. Регламент техніки безпеки при роботі з фузарієвою кислотою та правила поводження із селективними середовищами	7
3. Приготування живильних середовищ: модифікації, склад	10
4. Культивування пагонів видів сорго на селективному фоні адаптивного до стресових чинників	12
5. Особливості клітинної селекції та культивування морфогенного калусу за умов селективного тиску	13
6. Індукція регенераційних процесів та комплексна оцінка толерантності регенерантів за біометричними показниками	15
7. Технологія адаптації та вирощування толерантного вихідного матеріалу в умовах <i>ex vitro</i>	16
Список використаної літератури	18

Вступ

Глобальні кліматичні зміни, що супроводжуються посиленням аридності та порушенням екологічного балансу агроєкосистем, висувають нові вимоги до адаптивного потенціалу сільськогосподарських культур.

Сорго (*Sorghum bicolor* L.) за своєю біологічною природою є однією з найбільш посухостійких та жаростійких культур світового землеробства, що робить його стратегічно важливим для гарантування продовольчої та енергетичної безпеки в умовах Правобережного Лісостепу та Степу України. Проте, незважаючи на природну пластичність, посіви сорго піддаються значному тиску стресових чинників, серед яких особливе місце посідають біотичні патогени, зокрема гриби роду *Fusarium* [1–6].

Проблема контамінації врожаю мікотоксинами є однією з найбільш гострих у сучасному рослинництві. Фузарієва кислота (5-бутилпіколінова кислота) – ключовий метаболіт фузаріїв – виступає не лише як небезпечна отрута для людей і тварин, а й як потужний фітотоксин, що блокує роботу мембранних систем рослинної клітини, порушує водний обмін та енергетику дихання. Створення генотипів сорго, адаптованих до дії цих токсичних сполук, є пріоритетним завданням, оскільки це дозволяє не лише зберегти рівень урожайності, а й забезпечити екологічну чистоту кінцевої продукції [7–10].

Традиційні методи селекції на стійкість до стресів часто обмежуються складністю контролю умов навколишнього середовища та тривалістю селекційного циклу (8–12 років) [11, 12]. Використання методів біотехнології, зокрема культури ізольованих тканин і клітин (*in vitro*), дозволяє перенести селекційний процес у контрольовані лабораторні умови, де стресовий чинник діє безпосередньо на клітинному або тканинному рівні [13–17].

Теоретичною основою використання *in vitro* систем для добору видів Сорго є концепція клітинної селекції. Вона базується на припущенні, що реакція клітин у культурі на дію стресового агента (мікотоксину, солі чи осмотику) корелює з реакцією цілої рослини в полі. Це дає можливість проводити «жорсткий» скринінг великої кількості генотипів на обмежених площах, виділяючи найбільш толерантні клітинні лінії.

Культивування тканин сорго *in vitro* супроводжується явищем соматоклональної мінливості – виникненням генетичних та епігенетичних змін у процесі дедиференціації та проліферації клітин. В умовах селективного тиску (додавання мікотоксину в живильне середовище) ця мінливість стає потужним інструментом: виживають лише ті клітини, в яких активовано захисні системи. Рослини-регенеранти, отримані з таких клітин, часто успадковують ознаку толерантності, що дозволяє отримувати принципово новий вихідний матеріал з підвищеною резистентністю.

Адаптація сорго до цього стресора супроводжується посиленням синтезу специфічних білків, накопиченням осмопротекторів (зокрема аміно-

кислоти проліну) та стабілізацією ферментативних комплексів. Методика *in vitro* дозволяє зафіксувати ці зміни на ранніх етапах морфогенезу, забезпечуючи високу вірогідність відбору форм, здатних протидіяти патогенезу грибових хвороб у польових умовах. Доведено, що клітинна селекція дозволяє диференціювати матеріал за ступенем чутливості до токсину, виділяючи як високотолерантні, так і чутливі лінії для порівняльних досліджень.

Об'єктом розробки вихідного матеріалу виступають різні види та еко-типи сорго, що різняться за походженням та напрямом використання (зернові, цукрові, технічні). Предметом добору є закономірності реакції пагонів та калусних тканин на дію фузарієвої кислоти в широкому діапазоні концентрацій (від 10 до 600 мкг/л), що дозволяє встановити сублетальні дози для кожного конкретного генотипу. Використання широкого спектру вихідного матеріалу, включаючи дикі форми та селекційні сорти, забезпечує репрезентативність отриманих результатів.

Метою є систематизація та виклад методичних підходів до створення толерантного матеріалу сорго. Основна увага приділяється уніфікації прописів селективних середовищ, розробці шкал оцінки пошкоджень тканин токсинами та алгоритмам адаптації отриманих регенерантів. Запропоновані підходи інтегрують класичні принципи фізіології рослин із сучасними клітинними технологіями, забезпечуючи ефективне вирішення проблеми створення адаптованого вихідного матеріалу сорго до біотичних стресорів. Завдання рекомендацій полягає у наданні покрокового алгоритму: від введення експлантів у культуру до отримання стабільних толерантних форм, придатних для використання в практичній селекції.

Застосування викладених методів дозволяє значно інтенсифікувати селекційний процес, забезпечуючи високу точність відбору на ранніх етапах онтогенезу. Теоретичні засади біотехнологічного добору сорго на толерантність до мікотоксинів є фундаментом для підвищення генетичного потенціалу стійкості вітчизняних сортів та гібридів, що є вкрай актуальним для сучасного агровиробництва України. Таким чином, розробка теоретичних та практичних аспектів адаптації видів сорго до стресових чинників методами *in vitro* відкриває нові можливості для створення біологічно безпечної та стабільно високої продуктивності культури.

1. Характеристика вихідного матеріалу та селективних агентів

Для створення толерантного до мікотоксинів матеріалу було залучено широкий спектр генетичного різноманіття культури сорго. Це дозволило комплексно оцінити міжвидову та міжсортову реакцію на дію фузарієвої кислоти та виділити найбільш адаптивні генотипи. До складу вихідного матеріалу увійшли представники таких господарських груп:

- Сорго двокольорове (зернове) (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): представлене сортами 'Дніпровський 39', 'Одеський 205', 'Лан 59' та ін. Використання цих сортів як модельних об'єктів дозволило простежити механізми блокування токсинів на етапі раннього онтогенезу.
- Сориз (*Sorghum oryzoidum*): до досліджень залучались сорти 'Титан', 'Кварц' та ін. Отримання толерантних форм соризу дозволило обґрунтувати можливість створення безпечної сировини для дієтичного харчування.
- Сорго цукрове (з підвищеним вмістом цукрів): представлене сортами 'Силосне 42', 'Довіста' та ін. Високий вміст розчинних вуглеводів у цих генотипах створює сприятливі умови для патогенезу, тому відбір толерантних соматоклонів дозволив підвищити їхній загальний імунний статус.
- Сорго віничне (технічне) (*Sorghum technicum*): залучались сорти 'Таврійське 1', 'Вавилон', 'Венічне 623'. Добір *in vitro* дозволив зберегти якісні показники технічної сировини за умов штучного інфекційного фону.
- Сорго-суданкові гібриди: використано гібриди 'Новатор', 'Румба', 'Ювілейне'. Це дозволило отримати вихідний матеріал, що поєднує високу регенераційну здатність із стійкістю до мікотоксинів.
- Суданська трава (*Sorghum sudanense*): представлена сортами 'Одеська 25', 'Миронівська 10', 'Білявка'. Проведення клітинної селекції дозволило виділити форми з посиленням розвитком кореневої системи на фоні дії фузарієвої кислоти.

Використання такої значної кількості сортів та видів дозволило забезпечити високу репрезентативність результатів та довести універсальність розробленої методики для всього різноманіття культури сорго.

Основним чинником добору в даній методиці виступає фузарієва кислота (5-бутилпіколінова кислота). Це вторинний метаболіт, що синтезується грибами роду *Fusarium*, зокрема *F. oxysporum*, *F. solani* та *F. moniliforme*, які є основними збудниками корневих гнилей та фузаріозу волотті сорго.

Хімічні та біологічні властивості:

- *Формула:* C₁₀H₁₃NO₂.
- *Механізм дії:* фузарієва кислота діє як неспецифічний токсин. Вона порушує проникність клітинних мембран, інгібує активність АТФ-аз, що призводить до неконтрольованої втрати іонів калію та води клітиною. Це спричиняє швидке в'янення тканин експланта (пагонів або калусу).
- *Синергізм:* токсин діє комплексно, викликаючи окиснювальний стрес та накопичення вільних радикалів, що робить його ідеальним агентом для відбору генотипів із потужною антиоксидантною системою.

Моделювання стресових умов (селективний фон)

Для диференціації вихідного матеріалу за ступенем толерантності використовується градієнт концентрацій токсину. Згідно з розробленою методикою, робочий діапазон становить 10–600 мкг/л.

- *Низькі концентрації (10–50 мкг/л):* дозволяють виявити початкові захисні реакції та оцінити стимулюючий ефект (гормезис), якщо він притаманний генотипу.
- *Середні (сублетальні) концентрації (100–250 мкг/л):* є основними для добору. При таких концентраціях спостерігається чіткий поділ на толерантні та чутливі форми.
- *Високі (летальні) концентрації (400–600 мкг/л):* використовуються для визначення «межі витривалості» виду та виділення унікальних варіантів.

Таким чином, поєднання генетично різноманітного матеріалу сорго та точного дозування фузарієвої кислоти створює надійну модельну систему для отримання форм з прогнозованою стійкістю до грибкових захворювань у польових умовах.

2. Регламент техніки безпеки при роботі з фузарієвою кислотою та правила поведінки із селективними середовищами

Робота з вторинними метаболітами мікроскопічних грибів, зокрема з фузарієвою кислотою (5-бутилпіколінова кислота), класифікується як робота з біологічно активними речовинами високого ступеня токсичності. Забезпечення безпеки персоналу та недопущення контамінації довкілля є обов'язковою умовою проведення біотехнологічних досліджень.

Загальні вимоги до персоналу та робочого місця

До роботи із селективними агентами допускаються особи, які пройшли відповідний інструктаж з техніки безпеки та володіють методами роботи в асептичних умовах. Усі маніпуляції з кристалічною формою токсину та приготування маточних розчинів повинні проводитися виключно у витяжній шафі з використанням засобів індивідуального захисту:

- лабораторний халат із щільної тканини;
- гумові або нітрилові рукавички (одноразові);
- захисні окуляри;
- респіратор (при роботі з порошкоподібним токсином для запобігання вдиханню аерозолів).

Порядок приготування та зберігання маточних розчинів. Фузарієва кислота потребує особливої обережності при розчиненні. Зважування наважки токсину проводиться на аналітичних терезах у закритих бюксах. Слід уникати розпилення речовини. Маточні розчини готують у герме-

тичному посуді, маркують із зазначенням назви речовини, концентрації та дати виготовлення. Зберігати розчини необхідно у холодильній шафі при температурі +4...6 °С у секції для токсичних речовин, недоступній для загального користування.

Правила введення токсину в живильні середовища

Оскільки фузарієва кислота може втрачати свої властивості при тривалому термічному впливі високих температур (автоклавуванні), рекомендується застосовувати метод «холодної стерилізації».

1. Маточний розчин токсину пропускають через стерилізуючі мікрофільтри (діаметр пор 0,22 мкм).
2. Введення розчину в базове середовище проводять у ламінар-боксі, коли агаризована суміш охолола до температури +45...+50 °С, але ще не почала застигати.
3. Після додавання токсину колбу ретельно струшують для рівномірного розподілу селективного агента по всьому об'єму.

Поводження з використаним посудом та селективними середовищами

Залишки селективних середовищ, на яких проводився добір толерантних ліній сорго, а також використаний одноразовий пластиковий посуд, вважаються біологічно та хімічно небезпечними відходами.

- *Дезактивація:* увесь скляний посуд, чашки Петрі та пробірки із залишками токсичного середовища підлягають обов'язковому автоклавуванню при тиску 1,5 атм (121 °С) протягом 60 хв. Це забезпечує деструкцію молекул токсину та повну стерилізацію від можливої вторинної мікрофлори.
- *Очищення:* тільки після термічної обробки посуд дозволяється мити з використанням стандартних дезінфікуючих розчинів.
- *Утилізація відходів:* використані фільтри, рукавички та інші витратні матеріали збираються в окремі контейнери для подальшої утилізації згідно з протоколами роботи з токсичними відходами.

Особливості гігієни праці при роботі в ламінарному боксі

Робота з мікотоксинами в обмеженому просторі ламінар-боксу вимагає особливої уваги до напрямку повітряних потоків, щоб запобігти випадковому винесенню мікрочастинок токсину за межі робочої зони.

Перед початком роботи поверхню слід обробити дезінфектантом і ввімкнути бактерицидну лампу на 20–30 хв. Повітряний потік (ламінарний режим) має працювати постійно під час маніпуляцій із селективними середовищами.

Усі розчини з фузарієвою кислотою мають бути розташовані в центрі робочої зони, подалі від переднього захисного скла, щоб мінімізувати турбулентність повітря біля рук дослідника.

У боксі завжди повинні бути стерильні серветки та спиртовий розчин для негайної локалізації випадкових крапель середовища з токсином.

Регламент термічної дезактивації та стерилізації обладнання

Для повного руйнування хімічної структури фузарієвої кислоти звичайного миття посуду недостатньо. Рекомендується дотримуватися такого протоколу дезактивації:

1. *Попереднє знезараження*: використані чашки Петрі та пробірки з калусом, що не пройшов відбір, збирають у спеціальні термостійкі бікси.

2. *Режим автоклавування*:

- для рідких відходів та середовищ: температура 121 °С, тиск 1,5 атм, час – 60 хв.
- для порожнього скляного посуду: температура 132 °С, тиск 2,0 атм, час – 20 хв.

3. *Контроль якості*: раз на місяць рекомендується проводити перевірку ефективності автоклавування за допомогою хімічних або біологічних індикаторів стійкості.

4. *Санітарна обробка стічних вод*: при роботі у великих обсягах промивні води після дезактивації посуду рекомендується нейтралізувати хлорвмісними препаратами (наприклад, гіпохлоритом натрію) перед зливом у загальну каналізацію.

Особиста гігієна та медичний контроль

Після закінчення роботи в лабораторії персонал зобов'язаний:

- зняти засоби індивідуального захисту (рукавички знімаються останніми так, щоб не торкатися зовнішньою стороною відкритої шкіри).
- ретельно вимити руки з милом та обробити їх антисептиком.
- змінити лабораторний одяг на повсякденний.
- рекомендується вести журнал обліку роботи з токсичними агентами, де фіксується назва речовини, використана кількість, дата та підпис відповідальної особи.

Дії при аварійних ситуаціях

У разі розлиття розчину токсину на робочу поверхню ламінар-боксу, її необхідно негайно обробити 70 % розчином етилового спирту або спеціальним дезактивуючим розчином, після чого промити дистильованою водою. При попаданні токсину на шкіру або слизові оболонки – промити великою кількістю проточної води та звернутися за медичною допомогою.

Дотримання цих правил гарантує безпеку дослідника та точність результатів біотехнологічного експерименту, запобігаючи неконтрольованому впливу токсичних речовин на персонал лабораторії.

3. Приготування живильних середовищ: модифікації, склад

Успіх культивування експлантів сорго *in vitro* та ефективність клітинної селекції значною мірою визначаються збалансованістю компонентів живильного середовища. Основним базовим складом, що забезпечив стабільний ріст та розвиток тканин сорго, було середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС).

Для забезпечення фізіологічних потреб клітин сорго використовували повний набір макро- та мікроелементів, а також вітамінний комплекс, що сприяє метаболічній активності тканин (табл. 1).

Таблиця 1

Склад базового живильного середовища (МС) для сорго

Компоненти	Назва солі / речовини	Концентрація, мг/л
Макроелементи	NH ₄ NO ₃	1650,0
	KNO ₃	1900,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
Мікроелементи	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Вітаміни та цукри	Мезо-інозит	100,0
	Кислота нікотинава	0,5
	Піридоксин HCl	0,5
	Тіамін HCl	0,1
	Цукроза	30 000,0
	Агар-агар	7000,0–8000,0

Для спрямування процесів морфогенезу базовий склад МС доповнювали різними комбінаціями фітогормонів. Це дозволило отримати специфічні модифікації для кожного етапу роботи:

1. *Модифікація МС-І (індукція калусогенезу)*: до базового складу додавали 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д) у концентрації 2,0–4,0 мг/л. Це забезпечило дедиференціацію клітин експланта та формування пухкого морфогенного калусу.

2. *Модифікація МС-М (мультиплікація пагонів)*: для стимуляції розвитку вже існуючих пагонів та утворення додаткових бруньок використовували цитокініни: 6-бензиламінопурін (6-БАП) – 0,5–1,0 мг/л та кінетин – 0,5 мг/л.

3. *Модифікація МС-Р (ризогенез)*: для вкорінення регенерантів концентрацію мінеральних солей зменшували вдвічі (1/2 МС), виключали цитокініни та додавали ауксини (наприклад, ІОК або ІМК – 0,5–1,0 мг/л).

Особливістю даної методики є введення селективного агента (фузарієвої кислоти) на фоні стабільного гормонального складу.

Ступінь модифікації: до середовищ МС-І або МС-М додавали фузарієву кислоту в діапазоні концентрацій 10, 50, 100, 200, 400 та 600 мкг/л.

Для запобігання гідролізу цукрів та деградації токсину, рН середовища доводили до 5,7–5,8 строго перед автоклавуванням. Селективний агент вводили в стерильних умовах ламінар-боксу після охолодження середовища до температури, що не перевищує 50 °С.

При використанні комерційного розчину фузарієвої кислоти (Fusaric acid, FA) необхідно враховувати його вихідну концентрацію. Найчастіше вона становить 1 мг/мл (що дорівнює 1000 мкг/мл) (табл. 2).

Таблиця 2

Приготування 1 л середовища

(за умови, що вихідний розчин має концентрацію 1 мг/мл)

Цільова концентрація в середовищі (C2)	Об'єм готового розчину на 1 л середовища (V1)	Тип піпетки для дозування
10 мкг/л	0,01 мл (10 мкл)	Мікропіпетка 2–20 мкл
50 мкг/л	0,05 мл (50 мкл)	Мікропіпетка 20–200 мкл
100 мкг/л	0,1 мл (100 мкл)	Мікропіпетка 20–200 мкл
200 мкг/л	0,2 мл (200 мкл)	Мікропіпетка 100–1000 мкл
400 мкг/л	0,4 мл (400 мкл)	Мікропіпетка 100–1000 мкл
600 мкг/л	0,6 мл (600 мкл)	Мікропіпетка 100–1000 мкл

Розрахунок об'єму для додавання в середовище

Для отримання необхідної концентрації токсину в живильному середовищі використовуємо формулу розведення:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

де: V1 – об'єм готового розчину токсину, який треба взяти; C1 – вихідна концентрація розчину (наприклад, 1000 мкг/мл); V2 – кінцевий об'єм живильного середовища (наприклад, 1000 мл); C2 – необхідна селективна концентрація (наприклад, 100 мкг/л).

Важливо: зверніть увагу на одиниці виміру. 100 мкг/л = 0,1 мг/мл.

Процедура введення

1. *Підготовка середовища*: автоклауйте базове середовище МС. Після стерилізації перенесіть колби в ламінар-бокс.

2. *Охолодження*: зачекайте, поки температура середовища опуститься до 45–50 °С (колба має бути теплою, але не обпікати руку). Це критично, щоб уникнути термічного розпаду компонентів готового розчину.

3. *Стерильне дозування*: використовуйте стерильні наконечники для мікропіпеток. Відберіть потрібний об'єм розчину фузарієвої кислоти згідно з таблицею.

4. *Перемішування*: введіть розчин у середовище і ретельно збовтайте колбу круговими рухами протягом 15–20 секунд для рівномірного розподілу токсину.

5. *Розлив*: негайно розлийте готове селективне середовище у чашки Петрі або пробірки, поки агар не почав застигати.

Зберігання готового розчину

Комерційний розчин слід зберігати у щільно закритій тарі, обгорнутій фольгою (якщо він світлочутливий), при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (морозильна камера) або $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (згідно з інструкцією виробника).

Уникайте частого заморожування/розморожування; доцільно розділити основний об'єм на декілька стерильних аліквот по 0,5–1 мл.

Використання вказаних модифікацій дозволило створити гнучку систему культивування, що забезпечує як активний ріст контрольних зразків, так і ефективний відбір толерантних форм сорго на селективному фоні.

4. Культивування пагонів видів сорго на селективному фоні адаптивного до стресових чинників

Використання ізольованих пагонів як об'єктів селекції *in vitro* дозволяє оцінити реакцію цілісної організованої структури на дію стресора. У цій методиці селективний фон, створений фузарієвою кислотою, моделює біотичний стрес, що дозволяє виявити генотипи з високим адаптивним потенціалом.

Технологія експлантації та умови культивування

Для постановки досліду використовували пагони сорго, отримані шляхом пророщування стерильного насіння.

1. *Експлантація*: підготовлені пагони заввишки 1,5–2,0 см висаджували на селективні живильні середовища МС-М (з додаванням БАП 0,8 мг/л) згідно з варіантами концентрацій токсину (10–600 мкг/л).

2. *Режим інкубації*: культивування проводили у світловій кімнаті за температури $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, фотоперіоду 16 год світла / 8 год темряви та інтенсивності освітлення 2500–3000 лк.

3. *Тривалість циклу*: первинну оцінку проводили на 3-тю та 7-му добу, остаточний добір толерантних форм – на 14-ту добу культивування.

Морфологічні ознаки реакції пагонів на дію стресора

Дія фузарієвої кислоти на пагони сорго проявляється через комплекс візуальних та біометричних змін. До основних ознак чутливості, що вказують на низьку адаптивну здатність, відносяться:

- *Хлороз та некроз*: поступове пожовтіння листкових пластинок, що починається з верхівки пагона, з подальшим побурінням (некротизацією) тканин.
- *Втрата тургору*: свідчить про порушення осмотичного потенціалу клітин під дією мікотоксину.
- *Пригнічення росту*: зупинка подовження пагонів та відсутність закладання нових пазушних бруньок.

Толерантні форми (адаптовані) зберігають інтенсивне зелене забарвлення, демонструють приріст біомаси навіть на фоні сублетальних концентрацій (100–200 мкг/л) та здатні до формування додаткових пагонів (мультиплікації).

Диференціація видів сорго за рівнем адаптивності

У результаті досліджень встановлено, що різні види сорго демонструють неоднаковий рівень життєздатності на селективному фоні:

- *Висока адаптивність*: спостерігалась зернового та суданської трави (сорта 'Одеська 25', 'Білявка'), де життєздатність на 14-ту добу при концентрації 100 мкг/л становила понад 45–50 %.
- *Середня адаптивність*: характерна для соризу ('Титан') та цукрового сорго ('Силосне 42'), що дало змогу виділити до 25–30 % стійких пагонів.
- *Специфічна реакція*: сорго віничне виявилось більш чутливими, що вимагало використання нижчих концентрацій (50–100 мкг/л) для ефективного відбору життєздатних форм.

5. Особливості клітинної селекції та культивування морфогенного калусу за умов селективного тиску

Клітинна селекція на рівні калусних тканин сорго базується на використанні неорганізованої маси клітин, що активно діляться, як мішені для дії стресового чинника. Це дозволяє провести відбір безпосередньо на рівні клітинних мембран та внутрішньоклітинного метаболізму, нівелюючи організмові бар'єри.

Отримання та характеристика морфогенного калусу.

Для проведення селекції використовували морфогенний калус, ініційований з меристем пагонів на середовищі МС-I (2,4-Д 2,5 мг/л).

- *Ознаки морфогенності*: відбір калусу проводили за візуальними критеріями. Пріоритет надавався структурам щільної консистенції, білого або світло-жовтого кольору з глобулярною поверхнею.

- *Підготовка:* калусну масу розділяли на агрегати вагою 50–100 мг, які рівномірно розподіляли по поверхні селективного середовища.

Моделювання селективного тиску

На відміну від пагонів, калусна тканина є більш вразливою до дії токсинів через відсутність захисних покривних тканин.

- *Схема:* застосовували метод прямої ступінчастої селекції. Калуси пасажували на середовища з концентрацією фузарієвої кислоти 50, 100 та 200 мкг/л.
- *Тривалість впливу:* оцінку життєздатності проводили через 21–28 днів (тривалість одного пасажу).

Візуальні та фізіологічні показники реакції калусу

Під впливом мікотоксину в тканинах калусу сорго спостерігалися такі зміни:

1. *Некротизація (потемніння):* чутливі клітини швидко накопичують фенольні сполуки, що призводить до повного почорніння калусного агрегату та припинення його росту.

2. *Формування «зон виживання»:* у толерантних генотипів на фоні загального потемніння калусу з'являються окремі зони інтенсивного росту (білі або кремові папіли). Саме ці зони є джерелом стійких соматоклональних варіантів.

3. *Зміна індексу росту (IP):* показник, який розраховували як різницю між кінцевою та початковою масою калусу. У толерантних ліній сорго IP на селективному фоні становив не менше 30–40 % від контролю.

Ефективність відбору за видами сорго

За результатами клітинної селекції було встановлено:

- *Сорго цукрове та зернове:* демонстрували високу варіабельність. Вихід життєздатних калусів на фоні 100 мкг/л токсину варіював у межах 12–18 %.
- *Сориз та сорго-суданкові гібриди:* виявили здатність до тривалого культивування на селективному фоні без повної втрати морфогенного потенціалу.
- *Суданська трава:* показала найвищу швидкість детоксикації фузарієвої кислоти, що виражалося у збереженні світлого кольору тканин навіть при підвищених дозах селективного агента.

Відібрані життєздатні калуси підлягали повторному пасажуванню на середовище з тією ж концентрацією токсину для підтвердження стабільності ознаки стійкості. Тільки ті лінії, що демонстрували стабільний приріст протягом двох пасажів, переводилися на етап регенерації рослин.

6. Індукція регенераційних процесів та комплексна оцінка толерантності регенерантів за біометричними показниками

Переведення толерантних клітинних ліній до морфогенезу та отримання повноцінних рослин-регенерантів є завершальним етапом *in vitro*. На цьому етапі важливо не лише індукувати розвиток пагонів, а й підтвердити, що ознака стійкості до стресора закріпилася на рівні цілого організму.

Індукція морфогенезу та регенерації рослин

Для відновлення рослин із толерантних калусних ліній сорго використовували середовища з низьким вмістом ауксинів та підвищеною концентрацією цитокінінів (модифікація МС-Р).

- *Склад середовища*: базова основа МС, доповнена БАП (0,5–1,0 мг/л) та кінетином (0,5 мг/л). У окремих випадках для стимуляції додавали аденін-сульфат (20 мг/л).
- *Умови культивування*: експланти переносили на інтенсивне освітлення (3000–4000 лк) із фотоперіодом 16/8 год.
- *Етапність*: поява перших зелених зон (центрів регенерації) спостерігалася на 10–14 добу, а формування повноцінних пагонів – на 21–28 добу культивування.

Комплексна оцінка толерантності за біометричними показниками

Для кількісного оцінювання адаптивного потенціалу отриманих регенерантів використовували порівняльний аналіз із контрольними рослинами (що не піддавались селективному тиску). Основними показниками були:

1. *Висота пагона (см)*: фузарієва кислота зазвичай пригнічує ріст. Толерантні регенеранти сорго демонстрували висоту на рівні 75–85 % від контролю, тоді як нестійкі форми демонстрували затримку росту більш ніж на 60 %.

2. *Кількість сформованих листків*: показник інтенсивності вегетативного розвитку. Адаптовані форми зберігали здатність до стабільного нарощування листового апарату.

3. *Інтенсивність коренеутворення (ризогенез)*: кількість та довжина коренів першого порядку. Розвинена коренева система у присутності токсину є прямим підтвердженням високої стресостійкості генотипу.

4. *Коефіцієнт адаптивності*: розраховувався як інтегральний показник, що враховує суху та сиру масу рослини порівняно з контролем.

Результати оцінки за групами сорго

Аналіз біометричних даних дозволив виявити наступні закономірності:

- *Сорго цукрове та сориз*: регенеранти, отримані з селективних середовищ (100 мкг/л), за біометричними показниками майже не поступалися контролю, що свідчить про успішну детоксикацію фузарієвої кислоти тканинами рослин.
- *Зернове сорго (сорт 'Дніпровський 39')*: виявлено окремі клони, які за потужністю кореневої системи перевершували вихідні форми, що вказує на позитивну соматоклональну мінливість.
- *Суданська трава*: регенеранти продемонстрували найвищу швидкість відновлення біомаси після перенесення на безтоксичні середовища.

Верифікація стійкості

Для підтвердження стабільності отриманих результатів частину регенерантів повторно висаджували на середовища з критичною концентрацією токсину (200 мкг/л). Відсутність ознак хлорозу та збереження темпів росту підтвердили генетичну обумовленість набутої толерантності.

7. Технологія адаптації та вирощування толерантного вихідного матеріалу в умовах *ex vitro*

Успіх створення нових форм сорго завершується етапом адаптації рослин-регенерантів до нестерильних умов ґрунту. Оскільки рослини, вирощені *in vitro*, мають слабкий восковий наліт на листках та неповністю функціонуючі продири, процес перенесення в умови *ex vitro* вимагає суворого дотримання технологічного регламенту.

*Підготовка регенерантів до умов *in vivo**

До адаптації допускаються рослини сорго, що мають сформовану кореневу систему (не менше 3–4 коренів довжиною 2–3 см) та 3–5 справжніх листків.

- *Загартування*: за 2–3 доби до висадки пробірки або посудини з рослинами переносять у приміщення з умовами, наближеними до природних, та поступово відкривають кришки для зниження вологості повітря.
- *Відмивання коренів*: рослини обережно вилучають із колб, коріння ретельно промивають теплою проточною водою для повного видалення залишків агаризованого середовища. Залишки цукрів на корінні можуть стати субстратом для розвитку патогенної мікрофлори в ґрунті.

Склад субстратів для вирощування

Для першого етапу адаптації використовували легкі, повітропроникні та стерильні субстрати. Найкращі результати продемонстрували такі суміші:

1. Торф : Перліт (1:1) – забезпечує високу аерацію та оптимальний вологообмін.

2. Торф : Пісок : Дернова земля (2:1:1) – стабільний субстрат для подальшого росту. Перед використанням ґрунтову суміш піддавали термічній стерилізації (прожарюванню) або проливали 0,1 % розчином перманганату калію ($KMnO_4$).

Етапи адаптації в умовах клімакамери

1. *Початкова фаза (1–7 доба)*: висаджені у касети або стаканчики рослини накривають прозорими ковпаками (або поліетиленовою плівкою) для створення «парникового ефекту». Вологість повітря підтримують на рівні 90–95%.

2. *Фаза стабілізації (8–14 доба)*: починають короточасне провітрювання (від 15 хвилин до кількох годин на день), поступово привчаючи рослини до сухого повітря лабораторії.

3. *Повна адаптація (після 21 доби)*: ковпаки повністю знімають. У цей період у толерантних форм сорго активізується фотосинтетичний апарат, з'являються нові листки з вираженим восковим нальотом.

Особливості вирощування адаптованого матеріалу

Адаптовані рослини сорго пересаджують у більші ємності (вегетаційні судини) для вирощування до фази цвітіння та отримання насіння.

- *Підживлення*: раз на 10 днів проводять полив розчином мінеральних солей (1/4 концентрації за Кнопом або комплексними добривами для злакових).
- *Контроль стресостійкості*: рослини, що пройшли селекцію на фузарієву кислоту, в умовах *ex vitro* зазвичай демонструють вищу енергію росту та кращу опірність до корневих гнилей порівняно з неадаптованими контрольними зразками.

Формування вихідного матеріалу для селекції

Отримані рослини-регенеранти (покоління R_0) є цінним вихідним матеріалом. Насіння, зібране з цих рослин, використовується для подальшої перевірки стабільності ознаки толерантності у наступних поколіннях (R_1 , R_2) в умовах польових інфекційних розсадників.

Список використаної літератури

1. Diaz D. E., Smith T. K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. *The Mycotoxin Blue Book* / ed. by D. E. Diaz. Nottingham : Nottingham University Press, 2005. Vol. 1. P. 323–339.
2. Брезвин О., Отчич В., Коцюмбас І. Контроль мікотоксинів у кормах і їх знешкодження. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2013. № 62. С. 242–249.
3. Січняк О. Л., Міресь С. Л., Довганюк К. О. Цитогенетичні ефекти *Fusarium graminearum* Schwabe на злакові культури. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 2019. Т. 24, № 1. С. 65–74.
4. Дубініна А. А., Ленерт С. О., Летуга Т. М., Непочатих Т. А., Щербакова І. С. Мікотоксини в рослинній сировині. Київ, 2019.
5. Wang X. et al. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Toxicology*. 2016. Vol. 90. P. 81–101.
6. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Антіпов І. А. Біотехнологія : практикум. Київ : Аграр Медіа Груп, 2013. 150 с.
7. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них. 2008. Т. 6, № 2. С. 191–200.
8. Wang M. et al. Effect of fusaric acid on the leaf physiology of cucumber seedlings. *European Journal of Plant Pathology*. 2014. Vol. 138. P. 103–112.
9. Chawla H. S., Wenzel G. *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants. *Plant Breeding*. 1987. Vol. 99, No. 2. P. 159–163.
10. Корня Т. М., Ігнатова С. О. Вивчення селективних властивостей фільтрату культуральної рідини *Fusarium graminearum* Schwabe в культурі піяків м'якої пшениці. 2008. № 3. С. 99–106.
11. Івченко Т. В., Мозговська Г. В. Приготування фільтратів культуральної рідини гриба *Fusarium solani* Sacc. для використання в клітинній селекції баклажана на стійкість проти фузаріозного в'янення. *Селекція і насінництво*. 2013. № 103. С. 135.
12. Niehaus E. M. et al. Fusarins and fusaric acid in fusaria. *Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites*. New York : Springer, 2014. P. 239–262.
13. Захарчук Н. А. Ефективність селекції картоплі *in vitro* на стійкість до *Fusarium oxysporum* та *Fusarium sambucinum*. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агрономія і біологія*. 2013. № 11. С. 188–191.
14. Міщенко С. В., Ткаченко С. М., Кривошеева Л. М. Використання культури ізольованих клітин і тканин льону *in vitro*: напрями, досягнення, перспективи. *Наукові читання до 85-річчя від дня народження В. Г. Вировця*. 2022. С. 118.

15. Kuźniak E. Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Journal of Phytopathology*. 2001. Vol. 149, No. 10. P. 575–582. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00682.x>
16. Toyoda H., Matsuda Y., Shimizu K. et al. *In vitro* selection of fusaric acid-resistant regenerants from tomato leaf explant-derived callus tissues. *Plant Tissue Culture Letters*. 1988. Vol. 5, No. 2. P. 66–71. <https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY1984.5.66>
17. Arumugam T., Ghazi T., Abdul N. S., Chuturgoon A. A. A review on the oxidative effects of the fusariotoxins: Fumonisin B₁ and fusaric acid. *Toxicology*. Elsevier, 2021. P. 181–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819092-0.00019-4>

Наукове видання

В. І. Войтовська

**СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ
РІЗНИХ ВИДІВ СОРГО, АДАПТОВАНОГО
ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ *IN VITRO***

Науково-методичні рекомендації

Електронне видання

Погоджено до опублікування 20.04.2026.
Формат: PDF. Гарнітура Cambria.

Видавець

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН
03110, м. Київ, вул. Клінічна, 25
Тел.: (044) 275-50-00; e-mail: sugarbeet@ukr.net
<https://bio.gov.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 5713 від 19.10.2017

