

МЕТОДИ ОЦІНКИ МОРОЗОСТІЙКОСТІ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ

Пикало С.В., Демидов О.А., Юрченко Т.В.,
Рибка К.М., Харченко М.В., Прокопик Н.І.

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла
Національної академії аграрних наук України
с. Центральне, 08853, Миронівський р-н, Київська обл.
pykserg@ukr.net

Пшениця – найбільш розповсюджена продовольча культура не лише на території України, а і в усьому світі, тому збільшення валових зборів зерна є найважливішим завданням у сільськогосподарському виробництві. Активний розвиток рослинництва в Україні висвітлює ряд проблем, які з плином часу в країні тільки ускладнюються. До цих надскладних питань належить і необхідність створення сортів пшениці, стійких до абіотичних факторів середовища, зокрема дії низьких температур. Це дозволить розширити посіви цієї культури у районах з несприятливими кліматичними умовами. Успіх селекції під час створення морозостійких форм багато у чому залежить від правильної оцінки ступеня їх стійкості. Тому проведення досліджень стосовно оцінки генотипів на стійкість до низьких температур є однією з умов підвищення ефективності селекційного процесу пшениці. Отримані в ході аналізу літературних даних результати свідчать, що для оцінювання морозостійкості сортів пшениці існує багато методик з різними принципами дії, і кожен з них має свої переваги і недоліки. Для отримання достовірних результатів необхідно застосовувати різні методики дослідження зразків за конкретними ознаками стійкості до низькотемпературного стресу. Вибір методу суттєво залежить від його трудомісткості, тривалості та пропускну здатності. Інколи вибраний метод чітко розділяє за стійкістю контрастні види рослин, проте не здатний диференціювати за групами стійкості різні сорти однієї культури, що знижує його практичну цінність для селекційного процесу. Більшість підходів діагностики сортів пшениці на морозостійкість передбачає нанесення певної шкоди рослині, що ускладнює оцінювання іншої не менш важливої ознаки, а також вирощування рослин для одержання потомства. Тому створення нових і удосконалення існуючих методів оцінки генотипів пшениці на морозостійкість в умовах нестійкого клімату надасть змогу об'єктивно характеризувати рівень адаптивності перспективних генотипів і прогнозувати їхню поведінку у відповідних екологічних умовах. *Ключові слова:* пшениця, стійкість, низькі температури, методи, оцінка.

Methods for evaluation of wheat breeding material for frost tolerance. Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T., Rybka K., Kharchenko M., Prokopik N.

Wheat is the most widespread food crop not only on the territory of Ukraine, but throughout the world, therefore, increasing the gross grain yield is the most important task in agricultural production. The active development of crop production in Ukraine has highlighted a number of problems that are only getting more complicated in the country over time. These extremely complex issues include the need to create wheat varieties that are resistant to abiotic environmental factors, in particular, the action of low temperatures. This will allow expanding the sowing of this crop in areas with unfavorable climatic conditions. The success of breeding in the creation of frost-tolerant forms largely depends on the correct assessment of the degree of their resistance. Therefore, research on the assessment of genotypes for tolerance to low temperatures is one of the conditions for increasing the efficiency of the wheat breeding process. The results obtained during the analysis of the literature indicate that there are many methods for assessing the frost tolerance of wheat varieties with different principles of action and each of them has its own advantages and disadvantages. To obtain reliable results, it is necessary to apply various methods of examining samples for specific signs of tolerance to low-temperature stress. The choice of the method essentially depends on its complexity, duration and throughput. Sometimes the chosen method clearly distinguishes contrasting plant species by tolerance, however, it is not able to differentiate different varieties of the same crop by tolerance groups, reducing its practical value for the breeding process. Most approaches to the diagnosis of varieties for frost tolerance involve the infliction of certain harm to the plant, which makes it difficult to evaluate another equally important trait, as well as to grow plants to obtain offspring. Therefore, the creation of new and improvement of existing methods for assessing wheat genotypes for frost tolerance in an unstable climate will make it possible to objectively characterize the level of adaptability of promising genotypes and predict their behavior in appropriate environmental conditions. *Key words:* wheat, frost tolerance, low temperatures, methods, evaluation.

Постановка проблеми. Пшениця озима є головною зерновою культурою України, а нарощування її продуктивності спирається на впровадження високпродуктивних сортів [1]. Поширеність її зумовлена насамперед високою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів. Пшениця вирощується майже у кожному господарстві, а її експорт приносить нашій країні чималі кошти. У виробництві перевага надається пшениці озимій, оскільки

вона швидше звільняє поле, а тому дає більше часу для підготовки поля під посів наступної культури [2; 3]. Окрім того, озима пшениця, порівняно з ярою, володіє вищим продуктивним потенціалом.

Збільшення урожайності є найбільш важливим критерієм у вирощуванні будь-яких сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці [4]. Зміни клімату все частіше стають основним стримуючим фактором у реалізації генетичного потенціалу висо-

коврожайних сортів пшениці. Вплив екологічних факторів на рослини різноманітний – одні діють сильніше, інші ледь помітно. В окремі роки зміни екологічних факторів бувають настільки значними, що викликають у рослини необхідність мобілізувати всі адаптаційні ресурси, що призводить до підвищення її стійкості [5]. Рослини, що зимують в північних і помірних зонах (високі широти), неминуче потрапляють в умови низьких негативних температур, які часто діють на них несприятливо. Зимовий період є одним із впливових на ріст і розвиток пшениці озимої [6]. Під час зимівлі вона не впадає у глибокий спокій, але за низької температури повітря різко знижує темпи росту та інтенсивність фізіологічних процесів. Тому рослини з повільною вегетацією дуже вразливі до негативних факторів зими – низьких критичних температур, особливо за відсутності снігового покриву, її різких підвищень, льодових кірок і застою талої води під ними, а також вимокання та випирання рослин [7]. Через несприятливі фактори перезимівлі у різних регіонах України майже щороку гине чимало посівів пшениці озимої. Сукупність явищ (відсутність загартування, відлиги, сублетальні зимові температури, льодяні кірки, вимокання) зумовлюють загибель та пошкодження озимини. На вцілілих посівах рослини пшениці озимої відновлюють вегетацію знесилені, переважно з рідким і низьким продуктивним стеблостоєм [8].

Дія низьких температур, особливо в ранньовесняний період, є однією з найбільш поширених причин загибелі озимих рослин. В.В. Ляшенко та М.М. Маренич вказують [9], що сублетальна дія зимових температур на рослини озимих культур проявляється не завжди як загибель або у вигляді явних пошкоджень, проте завжди є значне зниження врожаю загальної надземної біомаси і зерна. Однак, як зазначають автори, у зимостійких генотипів зниження загальної надземної біомаси може й не бути.

Актуальність дослідження. Морозостійкість – це здатність рослин переносити без незворотних шкідливих наслідків негативні температури. Незадовільний стан посівів озимих культур переконує в нагальній потребі проведення агротехнічних і селекційних досліджень у напрямі підвищення морозостійкості рослин [10]. Тому ця ознака є одним з необхідних складників адаптивності сортів пшениці озимої [11]. Відмінності між сортами та гібридами щодо рівня морозостійкості можуть змінюватися у різних країнах відповідно до змін кліматичних умов. Під час створення сортів цієї культури однією з найважливіших властивостей рослин, що потребує уваги на всіх етапах селекційної роботи, є здатність протистояти несприятливим умовам зимівлі, зокрема стійкість до низької температури та до її коливань протягом зимового періоду [12; 13].

Несприятливі фактори вирощування пшениці висувають надзвичайно важливе завдання – створення нових сортів з потужним генетичним потен-

ціалом високої продуктивності та адаптивності для одержання стабільних валових зборів зерна [14; 15]. Успіх селекції пшениці на морозостійкість значною мірою залежить від правильної оцінки цієї ознаки у створюваних сортах [16; 17]. Численними дослідженнями встановлено [11; 13; 18], що стійкість рослин до дії низьких температур деякою мірою корелює зі стійкістю їх до інших несприятливих умов, що спостерігаються при випріванні, дії льодяної кірки тощо. У зв'язку з цим оцінка сортів за морозостійкістю є однією з основних, оскільки вона значною мірою може відображати ступінь загальної зимостійкості рослин. З часом змінюються кліматичні умови, сорти, родючість ґрунту, тому дослідження щодо створення та удосконалення способів скринінгу зразків на морозостійкість ніколи не втрачати своєї актуальності.

Виклад основного матеріалу. Варто підкреслити, що методів оцінювання рослин за морозостійкістю існує багато і залежно від цілей дослідження цієї ознаки і зони вирощування вони можуть бути різними. Найбільш достовірну оцінку стійкості рослини до низьких температур надають польові дослідження, а саме візуальна оцінка після перезимівлі в полі [19]. Проте за умов змін клімату та теплих м'яких зим проведення оцінки в польових умовах є досить складним завданням. Найбільш адекватною оцінкою морозостійкості є визначення ступеня виживання рослин після дії критичних температур [20]. Варто зазначити, що стійкість рослин до будь-якого стресу є відносною характеристикою, тому для її визначення у селекційній практиці досить часто використовують сорти-класифікатори [21]. Класичні методи, що застосовуються для оцінки морозостійкості рослин, умовно розділяють на прямі та побічні [20]. До побічних, серед решти способів, відносять також біохімічні, морфологічні та біотехнологічні.

Прямі методи. За прямим методом оцінки підраховують кількість рослин озимих культур після дії низьких температур. Кількість рослин, що вижили, виражена у відсотках, характеризуватиме певний сорт за морозостійкістю [20]. В селекції озимих культур під час виведення нових сортів найбільш перевіреним і надійним є метод прямого проморожування рослин в морозильних камерах або в інших спорудах на відкритому повітрі під дією природних низьких температур [21; 22].

1. Оцінка морозостійкості рослин методом монолітів. Спосіб [20] включає нижче перераховані процеси. Моноліти беруть у полі за допомогою механічних пилок. Вони повинні включати два суміжні рядки, у кожному з яких не менше 15 рослин. Товщина монолітів має бути 12–15 см. Їх поміщають у ящики розміром 30x40 см. Для обліку максимальної морозостійкості моноліти проморожують один раз всередині зими. У ряді випадків проводять дворазове проморожування: всередині зими й у передвесняний період. Температуру для проморожування

підбирають, виходячи з умов району загартовування й особливостей досліджуваних сортів. Метод досить надійно дозволяє характеризувати морозостійкість, визначати стан рослин у польових умовах, робити прогноз їх перезимівлі, встановлювати динаміку критичних температур і виявляти стійкість рослин до відлиги [20]. До його недоліків належить значна трудомісткість та довга тривалість.

2. Оцінка морозостійкості рослин методом прямого проморожування у висівних ящиках. Попри те, що на цей час створена апаратура для проморожування рослин в польових умовах, практично у всіх селекційних центрах країни і за кордоном в якості офіційного методу оцінки морозостійкості в тій чи іншій модифікації використовується метод прямого проморожування рослин при певних температурах в морозильних камерах [23].

Метод включає нижче перераховані процеси. Ящики розміром 30x40 см і глибиною 12–15 см заповнюють звичайним просіяним ґрунтом на 3–4 см нижче верхнього краю. Поверхню ґрунту вирівнюють та маркують на рядки. Дослідний матеріал висівають в ящики, в рядки через 3–4 см по 20–25 насінин у кожному і засипають зверху ґрунтом на 3 см. У кожному ящику висівають по 2 рядки сорту-еталону.

Весь період осені і початку зими рослини перебувають у природних умовах, де проходять першу та другу фази загартовування. Догляд за рослинами полягає у систематичному поливі, підживленні та боротьбі зі шкідниками. В подальшому ящики поміщають в низькотемпературні камери. Для більшої об'єктивності прямої оцінки морозостійкості кожен сорт проморожують при 2–3-х температурах. У зв'язку з тим, що температурні умови загартовування, як протягом кожного сезону, так і від року до року сильно різняться, то і критичну температуру проморожування необхідно вибирати заново для кожного циклу проморожування. Основою для вибору температури проморожування є дані по спостереженню за динамікою зміни температури протягом загартовування рослин. Оптимальною температурою проморожування є температура, за якої середньоморозостійкий сорт зберігається на 40–50%, більш жорсткі режими проморожування дозволяють виявити різницю між сортами з підвищеною морозостійкістю.

Далі проморожування проводять при двох температурах, починаючи зниження температури у камерах з температури навколишнього середовища на 2 °С щогодини до заданої температури. Експозиція проморожування 24 год. Після поступового їх розмерзання (2 доби) ящики з рослинами розміщують в приміщення з температурою від плюс 18° до плюс 24 °С і готують їх до відрощування (підстригають, щоб залишилась листова пластинка довжиною 0,5 см). Попередній підрахунок живих і відмерлих рослин проводять через 10–12 діб, остаточний – через 15–16 діб.

Використовуючи такий метод, науковцями Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МПП) були виділені найстабільніші за стійкістю до впливу низької температури сорти – Трудівниця миронівська, Розкішна, Гордовита, Кохана, Зіра, Царівна та Чародійка білоцерківська [24].

Недоліками цього способу є мала пропускна здатність, значна трудомісткість, необхідність використання значної площі штучного клімату, а також те, що рослини, які вижили під час проморожування, не зберігаються для подальшого вирощування, тобто метод слугує лише для оцінювання рослин за морозостійкістю, а не для добору кращих з них за вказаною ознакою [20].

3. Оцінка рослин озимих культур на морозостійкість методом проморожування рослин в пучках.

Метод [20] включає нижче перераховані процеси. При настанні стійкого похолодання, коли середньодобова температура повітря буде нижчою 0 °С і ґрунт почне злегка промерзати, в полі відбирають з кожного досліджуваного номера озимих посівів по два пучки рослин (50–70 шт. в кожному пучку). Потім рослини встановлюють на щиті з комірками, на дні якого є зволожена тирса або пісок. Рослини в комірках розташовують у вигляді вертикального пухкого, розгорнутого пучка. Щити залишаються у вегетаційному будиночку під сіткою за природних негативних температур в межах від –4 до –8 °С протягом восьми днів для проходження другої фази загартовування. Після її завершення рослини проморожують в холодильній камері з двома температурними режимами (інтервал 2°). До заданої температури переходять поступово, починаючи з 5°С і знижуючи температуру на 1–2 °С протягом години (експозиція проморожування – 2 год). Після проморожування рослини залишають в камерах з відкритими дверима на 3–4 години, а потім переносять в теплицю з поступовим підвищенням температури від +2 °С до +20 °С протягом доби. При цьому слід періодично зволожувати рослини. В подальшому рослини висаджують на стежах в теплицях, підстригають та проводять облік.

У дослідженнях М.М. Іванісова та Є.В. Іонової [25] при проморожуванні рослин даним методом ($t^{\circ} -19^{\circ}C$) відсоток живих рослин змінювався від 7,5 до 55%. Високий рівень виживання рослин відзначено у сортів: Дон 107 (55%), Аскет (48,8%), Донська безоста (45%), низький рівень – у лінії 260/09 (7,5%) та сортів Капризуля (12,5%) і Ліліт (16,3%).

4. Оцінка морозостійкості рослин пшениці м'якої озимої в поліетиленових стаканчиках.

Цей метод розроблений науковцями МПП та охороняється патентом на корисну модель [26]. Він полягає в тому, що в заповнені ґрунтом поліетиленові стаканчики розміром 9x13 см, в яких вирізане дно, висівають насіння (15 насінин на стаканчик) різних селекційних зразків в чотириразовій повторності. Після розміщення стаканчиків у викопаній траншеї і засипання їх землею, вологість ґрунту в стаканчи-

ках повинна відповідати вологості ґрунту ділянки. У терміни відбору проб стаканчики з рослинами з ділянки доставляють до низькотемпературних камер ЛВН-200Г. Проморожують пшеницю озиму у камерах за двома температурами: -18°C та -20°C з інтервалом зниження $2^{\circ}\text{C} / \text{год}$ і експозицією 24 год. Після проморожування стаканчики встановлюють у приміщення з температурою $+15...+18^{\circ}\text{C}$ і підстригають листки до розетки довжиною 0,5 см для відростання. Через 12–16 діб проводять підрахунки живих і загиблених рослин. Для порівняння відповідності значення розрахункових критичних температур вимерзання з фактичними використовують сорт-еталон пшениці м'якої озимої для підвищеного рівня морозостійкості Миронівська 808. Рослини, що залишилися живі після проморожування (наприкінці зимівлі), разом з ґрунтом виймають із стаканчиків і дорошують у відкритому ґрунті. Отримані морозостійкі форми використовують в схрещуваннях або в подальшому доборі морозостійких форм і ліній для подальшого розмноження.

Цей спосіб дозволяє наблизити сам процес загартування рослин до природних умов забезпечує зменшення трудомісткості процесу висіву та відсутність травмування кореневої системи рослини під час відбору проб.

5. Оцінка відносної морозостійкості рослин пшениці в проростках. Цей спосіб, який розроблений Г.А. Самігіним [27], включає нижче перераховані процеси. Зволене насіння пророщують в термостаті при температурі $+15...+20^{\circ}\text{C}$ до появи проростків довжиною 5–7 мм, потім викладають у марлеві мішечки по 100 штук і поміщають в екскатор спочатку для загартування на 7 діб за температури $0...-2^{\circ}\text{C}$, а потім на 3 доби при -4°C . Проростки проморожують за температури $-11...-13^{\circ}\text{C}$ у міні-камерах ЛВН-200Г з експозицією 24 год. Зразки розкладають в ростильні на фільтрувальний папір, накривають склом (захист від пересихання) і через 7–10 діб проводять підрахунок життєздатних рослин.

Слід відмітити, що таке відносно швидке зниження температури дозволяє значно скоротити час досліду і за умови правильно підібраної температури проморожування не впливає на точність оцінки морозостійкості зразків. Цей спосіб дозволяє зручно, швидко і без великих енерговитрат провести скринінг селекційного матеріалу на морозостійкість. Результати досліджень засвідчили, що проморожування рослин у фазі проростків забезпечує зменшення трудомісткості процесу та дозволяє провести одночасно проморожування значної кількості селекційного матеріалу [28].

Побічні методи. Оскільки безпосередня оцінка морозостійкості рослин є тривалим і трудомістким завданням, у селекційній практиці широко використовують побічні (непрямі) лабораторні методи оцінки за фізіологічними, анатомічними, морфологічними та біохімічними показниками [29]. Ці під-

ходи полягають у використанні не самої стійкості до дії низьких температур, а будь-якої іншої біологічної властивості, пов'язаної з даною ознакою. Ключова перевага побічних методів полягає в тому, що їх можна використовувати в оцінці стійкості на різних етапах розвитку рослин, що значно поглиблює уявлення про морозостійкість. Однак навіть якщо між досліджуваним ознакою і морозостійкістю рослин є певний функціональний зв'язок, побічні методи не завжди забезпечують досить надійну характеристику сорту. Це пов'язано з тим, що морозостійкість є складною і динамічною властивістю, а не єдиною ознакою. Водночас з огляду на відносну простоту та оперативність проведення аналізів побічні методи останніми роками отримали досить широке використання. Сьогодні існує ціла низка побічних методів оцінки морозостійкості рослин пшениці.

1. Оцінка морозостійкості рослин пшениці м'якої озимої за витоком електролітів. Спосіб [30; 31] включає нижче перераховані процеси. З поля в зимовий період відбирають рослини, які зазнали дії низьких температур в природних умовах. У лабораторії рослини очищають від ґрунту, відрізають найближчу з вузла кушнінної частини стебла довжиною 3–4 см, споліскують дистильованою водою і поміщають в бюкси з дистильованою водою по 4–6 відрізків. Кожен варіант аналізують не менше, ніж в чотирьох повторностях. Через 3–4 години вимірюють електропровідність водних витяжок. За ступенем електропровідності витяжки визначають кількість електроліту, що вийшов – чим вища електропровідність, тим сильніше пошкоджені клітинні мембрани, а тому, як наслідок, нижча морозостійкість цього зразка.

2. Оцінка морозостійкості за електропровідністю тканин рослин, що зазнали дії низьких температур за природних умов. Спосіб [31] включає нижче перераховані процеси. Зразки для вимірювання відбирають в полі в другій половині зими, після того, як рослини зазнали дії мінімальних зимових температур і почалося підвищення температури повітря. Рослини доставляють в лабораторію, де їх розморожують при температурі $+10...+15^{\circ}\text{C}$. Очищені від залишків ґрунту рослини закладають в електроди, причому в кожен пару електродів розміщують однакове число рослин. Частина рослин, що знаходяться в електродах, розчавлюють спеціальним пресом. При цьому сік, що впливає з розчавлених клітин, забезпечує електрохімічний контакт між рослинами і металом електроду. Після закладки зразків в усі електроди проводять вимір струму, що проходить через зразки, за кімнатної температури. Величина струму прямо пропорційна електропровідності, а значить і ступеню пошкодження рослинної тканини. У тканин більш морозостійких сортів ступінь викликаних низькою температурою пошкоджень буде менше і струм через тканини буде слабкіший. Недоліком цього методу є те, що результати будуть залежати від того, наскільки сильно пошкоджені

тканини рослин в польових умовах. Цього недоліку можна уникнути, якщо використовувати промороження рослин в контрольованих умовах.

3. Оцінка морозостійкості за електропровідністю тканин рослин, що зазнали дії низьких температур за контрольованих умов. Спосіб [31] включає нижче перераховані процеси. Зразки для вимірювання відбирають в полі після проходження другої фази загартовування. Моноліти з вирубанними рослинами доставляють в лабораторію, де їх розморожують при температурі +10...+15 °С. Очищені від залишків ґрунту рослини закладають в електроди так само, як і за попереднього методу. Блоки електродів з пробами поміщають в кліматичну камеру, де їх охолоджують зі швидкістю 0,2–0,4 °С/хв до критичної температури проморожування. Значення критичної температури вибирають в попередніх дослідах на трьох сортах-індикаторах таким чином, щоб різниця між контрастними сортами була максимальною. Зазвичай ця температура знаходиться в межах –18 ... –20 °С. За критичної температури рослини проморожують впродовж 3–4 год, після чого електроди виносять з камери в приміщення з кімнатною температурою, де проходить відтавання зразків. Через 50–70 хв після початку відтавання реєструють струм, що проходить через зразки. Чим менше змінився струм порівняно з його величиною до проморожування, тим вищу морозостійкість має зразок.

4. Оцінка морозостійкості озимих культур методом удару струмом. Спосіб [31] включає нижче перераховані процеси. Рослини доставляють з поля в лабораторію, очищають від ґрунту і закладають в електроди. В подальшому вимірюють електропровідність рослинних тканин, після чого на електроди з рослинними тканинами послідовно подається імпульс постійного струму напругою 40–60 Вт тривалістю 2–3 с і відразу вимірюється опір тканини. Ступінь морозостійкості визначають за величиною опору рослинної тканини після проходження струму. Цей метод може бути використаний для швидкої і достовірної оцінки морозостійкості. Перевага його в тому, що немає необхідності використовувати дорогі морозильні камери як під час оцінки методом прямого проморожування, так і під час оцінки іншими методами електропровідності. Окрім того, рослини з поля можна брати досить тривалий час, навіть під час їх виходу з вимушеного зимового спокою. Варто відзначити, що методи, пов'язані з вимірюванням електропровідності, легко автоматизуються. Це дає змогу створити на їх базі продуктивні технології оцінки морозостійкості селекційного матеріалу. Складність широкого поширення цього методу полягає в необхідності мати спеціально обладнані кліматичні камери, в яких слід одночасно підтримувати низьку температуру і досить високу освітленість.

5. Біохімічні методи. Полягають у реєстрації зміни вмісту зв'язаної води, вмісту різних фракцій білка і високоенергетичних сполук, активності

ферментів [32]. Відомо, що між зимостійкістю та інтенсивністю накопичення цукрів існує пряма залежність, тобто за однакових умов найбільш морозостійкими будуть ті сорти, в рослинах яких більше накопичилося цукрів у вузлах кушіння перед входженням у зиму. Проте при різкому похолоданні та короткому періоді осінньої вегетації між морозостійкістю і вмістом цукрів у вузлах кушіння прямого зв'язку може й не бути. Вміст цукрів у вузлах кушіння визначають за методом Х.М. Починка [33]. При вдалих умовах загартовування накопичується більше цукрів, особливо сахарози і моноцукрів.

Ступінь морозостійкості оцінюють також за забарвленням живих та мертвих тканин [31]. Після відтавання рослини ставлять на добу у воду. З кожного вузла кушіння роблять 2–3 поздовжніх зрізи, потім рослини забарвлюють у слабкому 0,025% – у розчині нейтральроти впродовж 15 хв і переносять на 30 хв у 2 N розчин сахарози. При цьому живі клітини мають чітко виражений плазмоліз, а мертві його не мають.

Основна перевага біохімічних методів полягає в тому, що їх можна використовувати в оцінці стійкості на різних етапах розвитку рослин, що значно поглиблює уявлення про морозостійкість.

6. Морфологічні методи. Дозволяють за станом конуса наростання озимих культур виділити найбільш морозостійкі сорти [34; 35]. Слід відмітити, що морозостійкість відповідає певним етапам органогенезу рослин [36]. На перших етапах відбувається адаптування до зовнішніх умов, і в рослин формується висока морозостійкість. Тому за диференціацією конуса наростання на початку зимового періоду можна орієнтовно дійти висновку про морозостійкість сорту. Морозостійкі форми озимої пшениці перебуватимуть на першому етапі, менш морозостійкі – на другому, низькоморозостійкі – в кінці другого – на початку третього етапу органогенезу.

Окрім того, на початку зимового періоду у морозостійких сортів пшениці вища концентрація клітинного соку у вузлах кушіння [32]. Визначають її за допомогою рефрактометра після настання від'ємних температур. Морозостійкі сорти характеризуються меншими розмірами клітин і більшою щільністю тканин у вузлах кушіння. Слід зазначити, що чим менше відношення поверхні клітин до об'єму, тим вищий і стабільніший її енергетичний рівень. Відповідно, морозостійкість таких сортів також вища.

7. Біотехнологічні методи. Дослідження стосовно морозостійкості рослин досить тривалий час проводилися в основному в польових умовах на цілих рослинах. Проте останніми роками в силу розвитку складних аналітичних методів вчені отримали можливість проводити дослідження на клітинному і субклітинному рівнях. Принципово новим підходом на сьогоднішній день є застосування методів біотехнології, що значно полегшує та прискорює традиційний селекційний процес створення нових ліній

і сортів пшениці. Варто зазначити, що за останні десятиліття, поряд з морфолого-анатомічними і фізіолого-біохімічними методами оцінки стрес-стійкості рослин, біотехнологічні підходи набули досить широкого поширення [37; 38]. Сучасні біотехнології дають змогу значно скоротити терміни добору та оцінки сортів і успішно застосовуються селекціонерами по всьому світу.

Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, де відсутні механізми регуляції, що діють на рівні цілого організму [39]. Метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовується для вирішення прикладних завдань селекції різних сільськогосподарських рослин і, зокрема, пшениці [40]. Особливістю культури соматичних тканин рослин є можливість регенерації повноцінних організмів завдяки властивості тотипотентності рослинної клітини [41]. Культура ізольованих тканин є екологічно безпечною, малозатратною за часом і ресурсами технологією для вивчення стрес-стійкості форм зернових, що базується на використанні калюсних культур та культивуванні *in vitro* клітин у специфічних умовах [42; 43]. Ці підходи застосовуються для скринінгу стійких форм, створення та ідентифікації соматональних ліній з підвищеною стійкістю, а також для вивчення реакції клітин на токсичність селективних агентів.

Дослідження щодо оцінки морозостійкості *in vitro* проводилися в МПП [44]. В.С. Гірко із використанням модельного набору сортів пшениці озимої Миронівська 808, Кінельська 4, Кошутка, Рання 12 отримав та здійснював проморожування калюсних культур у температурному діапазоні $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Автором встановлено, що температура $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ спричиняла зменшення приросту біомаси калюсів, не пригнічуючи регенераційної здатності. Оптимальною для більшості калюсних культур виявилась температура $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, а $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ – летальною. Проте, попри отримані результати, диференціювати генотипи за ознакою морозостійкості в силу певних причин автору так і не вдалося.

Дослідники в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України отримали клітинні культури пшениці озимої з генотипів, які піддавали процедурі проморожування [45]. Також під час оцінки показників життєздатності тканин автори встановили ефективність поєднання методів дослідження *in vivo* та *in vitro*. Генотипи пшениці озимої піддавали процедурі загартування/проморожування на стадії накілчених зернівок *in vivo*, а потім вирощували в польових умовах. Зміни умов впливу здійснювали в декілька етапів: 1) зниження температури від $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20/48 год); 2) зниження температури від $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$); 3) проморожування при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 24 год. Із регенованих рослин виділяли незрілі зародки, отримували клітинні культури та оцінювали ступінь життєздатності тканин інтактною рослини за характером реакцій культур *in vitro* на різних

культуральних середовищах. Відзначено різні типи реакції, залежних від генотипу й середовища: пряме проростання, калюсогенез та комбінування обох типів. Найбільш показовою виявилася реакція прямого проростання. Авторами встановлено, що генотипи пшениці озимої суттєво відрізнялися за рівнем морозостійкості. Показано, що поєднання методів *in vivo* та *in vitro* створює можливість ранжування генотипів пшениці озимої за рівнем морозостійкості.

Попри вищезазначені переваги, методи *in vitro* мають також і цілу низку недоліків: складний генетичний контроль селективної ознаки [38]; ускладнена регенераційна здатність калюсних культур [46]; не завжди існує кореляція між проявом селективної ознаки *in vitro* та *in vivo* [47]; дія селективного чинника може залежати від фази розвитку клітинної популяції [48]; під час оцінювання додається вплив фізіологічно активних речовин [49]; є ризик, що бажані ознаки в польових умовах проявлятимуться інакше, оскільки оцінка ведеться в лабораторних умовах [50]. Слід також зауважити, що скринінг і добір селекційного матеріалу пшениці на клітинному рівні не завжди виправданий та ефективний з економічної точки зору. Водночас, попри вищезгадані недоліки, використання тканинних і клітинних культур у більшості випадків дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці.

Головні висновки. Таким чином, на основі зробленого аналізу літературних джерел можна підсумувати, що для скринінгу перспективних зразків пшениці існує ціла низка методів, заснованих на різних принципах дії, і кожен з них має свої переваги і недоліки. Значна їх частина сьогодні не є оптимальними, тому створення нових і вдосконалення наявних методів оцінки генотипів пшениці є пріоритетним завданням. Вибір способу суттєво залежить від ступеню його достовірності, трудомісткості, тривалості та пропускну здатності. Від достовірності методу залежить ступінь збігу результатів оцінки одного й того ж набору сортів у повторних циклах діагностики. Комплексне оцінювання зразків на різних етапах розвитку рослин уможливить більш об'єктивно та достовірно оцінити генотипи за морозостійкістю. Подальший прогрес у вивченні стійкості пшениці до дії низьких температур буде також залежати від більш глибокого пізнання молекулярних механізмів регуляції та експресії генів, що детермінують цю ознаку. Впровадження інноваційних генетичних та біотехнологічних розробок надасть селекціонерам потужні інструменти для виявлення форм з цінними господарськими ознаками. Дослідження, спрямовані на розв'язання цих проблем, є актуальними і значущими, оскільки орієнтовані на розвиток розуміння реакцій рослин на дію низьких температур та широке впровадження нових підходів для вирішення прикладних завдань селекції пшениці.

Література

1. Черенков А.В., Гасанова І.І., Солодушко М.М. Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті. *Бюлетень Інституту сільськогосподарства степової зони*. 2014. № 6. С. 3–6.
2. Жемела Г.П., Кузнецова О.А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2012. № 3. С. 23–25.
3. Mohammad F., Ahmad I., Khan N. U., Maqbool K., Naz A., Shaheen S., Ali K. Comparative study of morphological traits in wheat and triticale. *Pakistan Journal of Botany*. 2011. Vol. 43. P. 165–170.
4. Васильківський С.П., Гудзенко В.М., Кочмарський В.С., Кириленко В.В. Реалізація потенціалу сортів зернових культур – шлях вирішення продовольчої проблеми. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 21. С. 47–51.
5. Двораковский М.С. Экология растений. Москва : Высшая школа, 1983. 190 с.
6. Жученко А.А. Возможности создания сортов и гибридов растений с учетом изменения климата. Стратегия адаптивной селекции полевых культур в связи с глобальным изменением климата: Сб. научн. трудов по материалам междунар. научно-практ. конф. (г. Саратов, 16–18 июня 2004 г.). Саратов, 2004. С. 10–16.
7. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов на Дону : Издательство Ростовского университета, 1993. 240 с.
8. Литвиненко М.А., Лифенко С.П. Вплив строків сівби і сублетальних зимових температур на виживаність та врожайність озимої пшениці. *Вісник аграрної науки*. 2004. № 5. С. 27–31.
9. Ляшенко В.В. Маренич М.М. Вплив строків сівби на продуктивність посівів пшениці озимої. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2010. № 2. С. 46–50.
10. Кучеренко О.М., Хоменко С.О., Ковалишина Г.М., Кочмарський В.С. Вплив змін клімату на особливості морфологічного аналізу при оцінці стану перезимівлі пшениці м'якої озимої. *Селекція і насінництво*. 2013. Вип. 103. С. 107–114.
11. Пірич А.В. Морозостійкість нових сортів пшениці м'якої озимої миронівської селекції. *Миронівський вісник*. 2018. Вип. 7. С. 85–92.
12. Моргун В.В., Логвиненко В.Ф. Селекція сортів озимої пшениці на високу зимо- та морозостійкість. *Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть*. Київ, 2001. Т. 2. С. 204–211.
13. Ионова Е.В., Иванисов М.М. Морозостойкость озимой пшеницы. *Зерновое хозяйство России*. 2014. № 4. С. 36–40.
14. Базалій В.В., Ларченко О.В., Лавриненко Ю.О., Базалій Г.Г. Адаптивний потенціал сортів пшениці м'якої озимої залежно від умов вирощування. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2009. Т. 6. С. 272–276.
15. Дубовик Н.С., Кириленко В.В., Дергачов О.Л. Вихідний матеріал для селекції пшениці м'якої озимої за пластичністю та стабільністю. *Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області*. 2015. Вип. 18. С. 132–138.
16. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы получения высоких урожаев пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40. № 6. С. 463–479.
17. Польовий А.М., Блищик Д.В., Феоктістов П.О. Динамічна модель формування зимостійкості рослинами озимої пшениці на території Південного Степу України. *Український гідрометеорологічний журнал*. 2014. № 14. С. 105–111.
18. Вінниченко О.М., Більчук В.С., Філонік І.О., Хромих Н.О., Шупранова Л.В., Богуславська Л.В., Заморуєва Л.Ф. Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації сільськогосподарських рослин до комплексної дії абіотичних факторів середовища. Дніпропетровськ : Нова ідеологія, 2011. 224 с.
19. Методика державного сортопробування сільськогосподарських культур / за ред. В.В. Волкодава. 2000. Київ : АЛЕФА, С. 10–50.
20. Методы определения морозо- и зимостойкости озимых культур. Москва, 1969. С. 17–29.
21. Кириленко В.В., Гуменюк О.В., Дергачов О.Л., Дубовик Н.С., Близнюк Б.В., Хоменко С.О. Методи підвищення морозо-, зимостійкості пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.) в умовах Лісостепу України. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 16. С. 120–124.
22. Дубовий В.І. Способи оцінки морозо- та зимостійкості озимих зернових культур. *Миронівський вісник*. 2016. Вип. 2. С. 69–86.
23. Пшениця озима. Метод визначення морозостійкості сортів: ДСТУ 4749:2007. Київ : Держспоживстандарт України, 2008. 8 с.
24. Булавка Н.В., Юрченко Т.В., Кучеренко О.М., Пірич А.В. Сорти пшениці м'якої озимої, стійкі до впливу негативних чинників довкілля. *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*. 2018. Т. 14. № 3. С. 255–261.
25. Иванисов М.М., Ионова Е.В. Морозостойкость сортов и линий озимой мягкой пшеницы. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016. № 9 (51). С. 110–113.
26. Спосіб оцінювання і добору морозостійких форм озимих зернових культур: пат. 38732 Україна: МПК А01Н 1/04, А01G 7/00, А01С 1/00. № 200806677; заявл. 15.05.2008; опубл. 12.01.2009, Бюл. № 1. 5 с.
27. Самыгин Г.А. Промораживание проросших семян озимой пшеницы как метод оценки относительной морозостойкости. *Сельскохозяйственная биология*. 1980. Т. 15. № 6. С. 935–938.
28. Поморцев А.В., Дорофеев Н.В., Пешкова А.А., Бояркин Е.В. Морозостойкость и динамика содержания углеводов у озимых злаков в осенне-зимне-весенний период. *Вестник ИРГСХА*. 2012. Вип. 49. С. 32–40.
29. Поминов А.В., Кибкало И.А. Лабораторные методы оценки морозоустойчивости перспективных линий озимого тритикале. Вавиловские чтения – 2013: Сб. ст. Межд. научн.-практ. конф., посвящ. 126-й годовщине со дня рожд. Акад. Н.И. Вавилова и 100-летию Саратовского ГАУ. (г. Саратов, 25–27 ноября 2013 г.). Саратов, 2013. С. 74–77.
30. Никитин В.А. Быстрый способ определения электропроводности растительной ткани. *Физиология растений*. 1964. Т. 13. № 2. С. 373–376.
31. Федулов Ю.П. Методы определения устойчивости растений. Краснодар : КубГАУ, 2015. 39 с.
32. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Ленинград : Агропромиздат, 1987. 430 с.

33. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев : Наукова думка, 1976. 333 с.
34. Куперман Ф.М. Морфофизиологические приемы исследования растений. *Бюллетень МОИП*. 1952. Т. LVII. Вып. 6. С. 14–21.
35. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство) / Под ред. Г.В. Удовенко. Л.: ВИР, 1988. 228 с.
36. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. Москва : Наука, 1979. 352 с.
37. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46. № 1. С. 3–18.
38. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.
39. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
40. Maluszynski M., Ahloowalia B., Sigurbjörnsson B. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*. 1995. Vol. 85. No 1–3. P. 303–315.
41. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ : Логос, 2012. 428 с.
42. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2011. Т. 11. С. 237–241.
43. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5. №1/2. С. 3–10.
44. Колочий В.Т., Власенко В.А., Борсук Г.Ю. Селекція, насінництво і технології вирощування зернових колосових культур у Лісостепу України. *Аграрна наука* : Київ, 2007. С. 226–258.
45. Сергеева Л., Хоменко Л., Броннікова Л. Біотехнологія пшениці. Нові підходи до оцінювання морозистійкості генотипів пшениці озимої. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки*. 2018. Т. 8. № 381. С. 23–27.
46. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 6. С. 463–476.
47. Дубровная О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
48. Зинченко М.А., Дубровная О.В., Бавол А.В. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к комплексу стрессовых факторов и анализ полученных форм. *Известия Самарского отделения РАН*. 2013. Т. 15. № 3 (5). С. 1610–1614.
49. Lestari E. G. In vitro selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*. 2006. Vol. 7. № 3. P. 297–301.
50. Rai M. K., Kalia R. K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A. K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress. *Environ. Exper. Bot*. 2011. Vol. 71. № 1. P. 89–98.