

УДК 633.11:631.524.85

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.186813

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ПОСУХОСТІЙКОСТІ СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

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

*Метою роботи було визначити посухостійкість сортів пшениці м'якої озимої лабораторним методом і в культурі in vitro та порівняти отримані результати*

*Матеріали та методи.* Об'єктом досліджень були сорти пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження. У роботі застосовувалися методи культури тканин і органів in vitro, селекції in vitro, лабораторний та статистичного аналізу даних. Стійкість до водного дефіциту 15 сортів пшениці вивчали за схожістю насіння на осмотичному розчині та часткою живих калюсів на селективному середовищі з манітом.

*Результати.* Проведено скринінг сортів пшениці м'якої озимої, створених у різних екологічних зонах, на посухостійкість та виділено джерела стійкості до водного дефіциту. Генотипова реакція на осмотичний стрес сортів виявлялась за різною часткою життєздатних калюсів та неоднаковим відсотком пророслого насіння за дії стресового чинника. Встановлено, що найбільшою стійкістю до водного дефіциту характеризувалися сорти Балада миронівська та Горлиця миронівська, у яких відсоток проростання насіння та рівень виживання калюсів на середовищах з осмотиком були найвищими. Сорти Овідій і Wenzell виявилися найчутливішими до дії водного дефіциту, оскільки за селективних умов вони мали найнижчі показники стійкості до осмотичного стресу. Виявлено достовірний кореляційний зв'язок ( $r = 0,86$ ) між показниками посухостійкості, отриманими лабораторним методом та in vitro. Розроблено та запатентовано спосіб оцінки посухостійкості генотипів пшениці, який сприятиме створенню нових сортів з цінними практичними властивостями.

*Висновки.* Показники стійкості, отримані на різних рівнях організації (клітини, проростки), в основному збігалися для більшості вивчених сортів, тому для оцінки селекційного матеріалу можна використовувати як in vitro, так і лабораторний методи оцінки. Показано можливість використання селективних систем з манітом для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного дефіциту. Сорти Балада миронівська та Горлиця миронівська можуть бути цінним вихідним матеріалом для подальшої селекції пшениці

*Ключові слова:* пшениця м'яка озима, водний дефіцит, калюсні культури, насіння, маніт, стійкість

Copyright © 2019, S. Pykalo, O. Demydov, T. Yurchenko, N. Prokopik, M. Kharchenko.  
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

### 1. Вступ

Пшениця є важливою продовольчою культурою і основним продуктом харчування у 43 країнах світу з населенням понад 1 млрд осіб. Поширеність пшениці зумовлена її високою біологічною пластичністю та поживністю зерна, з якого виготовляють багато харчових продуктів [1].

Серед усіх природних чинників, які найбільш негативно впливають на фізіологічні процеси росту і розвитку рослин пшениці, та призводять до зниження урожаю, є водний дефіцит, спричинений посухою. Відомо, що нестача води в ґрунті завдає значно більшої шкоди рослинництву, ніж всі інші стресові фактори, разом узяті. Шкідлива дія посухи полягає у зневодненні та порушенні метаболічних процесів у рослинах, що призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і, як наслідок, до зниження кількості накопиченої рослинами органічної речовини [2].

### 2. Літературний огляд

У вирішенні даної проблеми адаптивний сорт є найдешевшим і доступним засобом зростання вро-

жайності за умов стресу. Робота зі створення сортів і гібридів сільськогосподарських культур супроводжується, як правило, оцінкою ряду властивостей і показників у створюваних форм [1]. Розглядаючи цю проблему, генетики та селекціонери зосереджують свої зусилля головним чином на використанні класичної адаптивної селекції для створення нових стійких сортів. Однак селекція на стійкість до стресів шляхом відбору виключно по врожайності зерна утруднена, оскільки успадкування врожаю в умовах стресу зазвичай низька через генотипові відхилення або в силу значних відмінностей у взаємодії генотип-середовище [3].

На даний час найефективнішими вважаються методи ранньої діагностики на насінні і проростках, оскільки вони дають змогу проводити оцінку впродовж року і аналізувати велику кількість селекційного матеріалу [4]. В якості осмотика, як правило, використовують дисахарид сахарозу, однак подібними властивостями характеризується і такий шестиатомний спирт, як маніт. Показано [5], що поряд з сахарозою маніт має аналогічну спроможність до моделювання водного стресу, що робить його перспективним

для ранньої діагностики посухостійкості зразків. Тому ми розробили та запатентували спосіб оцінки стійкості генотипів пшениці до водного дефіциту, що обумовлений здатністю насіння неоднаково проростати на високоосмотичних розчинах з манітом [6]. Представлений винахід доповнить методологію та сприятиме створенню нових сортів з цінними практичними властивостями.

Протягом останніх десятиліть поряд з морфолого-анатомічними і фізіолого-біохімічними методами оцінки стрес-стійкості рослин широкого поширення набули біотехнологічні підходи. Сучасні біотехнології, зокрема культура тканин *in vitro*, дають змогу значно скоротити терміни добору та оцінки генотипів і успішно застосовуються селекціонерами по всьому світу [7]. У багатьох роботах показана можливість використання методу *in vitro* для тестування селекційного матеріалу на стійкість до несприятливих факторів середовища [3, 8]. Зокрема, на прикладі пшениці м'якої ярої виявлено істотний кореляційний зв'язок між реакціями клітинних систем *in vitro* на водний дефіцит і посухостійкістю рослини в польових умовах [9].

Загалом, для тестування перспективних зразків пшениці існує ціла низка методів, кожен з яких має свої переваги і недоліки. Більшість з них не є на сьогоднішній день оптимальними, внаслідок чого актуальним залишається задача створення нових і вдосконалення вже наявних методів оцінки селекційного матеріалу, що дасть можливість більш об'єктивно характеризувати рівень адаптивності ліній та сортів і прогнозувати їхню поведінку у відповідних екологічних умовах.

Результати аналізу літературних джерел свідчать, що питання стосовно вивчення посухостійкості рослин пшениці на організмовому та клітинному рівнях організації з використанням різних методик висвітлене недостатньо. Дослідження, спрямовані на вирішення цієї проблеми, є актуальними і значимими, оскільки орієнтовані на розвиток розуміння реакцій рослин на водний стрес та широке впровадження нових методів для вирішення прикладних завдань селекції пшениці. Тому представлена у даній роботі порівняльна оцінка способів визначення посухостійкості сортів за енергією проростання насіння та в культурі *in vitro* на даний час є досить актуальною.

### 3. Мета та задачі дослідження

Мета досліджень – визначити посухостійкість сортів пшениці м'якої озимої лабораторним методом і в культурі *in vitro* та порівняти отримані результати.

Для реалізації даної мети були поставлені наступні задачі:

1. Визначити посухостійкість пшениці за рівнем виживання калюсів на селективному середовищі з манітом;

2. Оцінити посухостійкість пшениці за часткою пророслого насіння на осмотичному розчині з манітом;

3. Визначити кореляцію між показниками толерантності до водного дефіциту, отриманими лабораторним методом та *in vitro*;

4. На основі одержаних результатів виділити генотипи з підвищеною стійкістю до водного стресу.

### 4. Матеріали та методи

Матеріалом досліджень були 15 сортів пшениці м'якої озимої вітчизняної та зарубіжної селекції, які наведено в табл. 1. У досліджах використовували насіння однієї репродукції та однакової фракції.

Під час оцінки стійкості сортів пшениці до водного дефіциту були використані модифіковані методики скринінгу пшениці розробленим лабораторним методом [6] та *in vitro*.

**Методика оцінки посухостійкості лабораторним методом.**

З кожного селекційного зразка відбирали насіння по 100 шт. та поміщали у підготовлені чашки Петрі з двома шарами фільтрувального паперу, які попередньо стерилізували у сушильній шафі протягом 2 год при температурі 160 °С.

На дно кожної чашки поміщали насіння і знезаражували шляхом обприскування розчином гіпохлориту натрію у співвідношенні 1:3. Через 30 хв. заливали 10 мл розчину низькомолекулярного маніту молярної концентрації 0,65 М, що відповідала 1,61 МПа осмотичного тиску, і пророщували у термостаті протягом 7 діб при температурі 20–21 °С. Розчин готували з використанням дистильованої води і маніту заданої концентрації з подальшим автоклавуванням тривалістю 15 хв. Контроль – дистильована вода. На 7-у добу визначали частку (відсоток) пророслого насіння. Дослід проводили в 3-х аналітичних повторностях.

**Методика оцінки посухостійкості методом культури тканин *in vitro*.**

У роботі використовували калюси вищезазначених генотипів (по 160 шт. на кожен варіант досліджу). Культуру калюсної тканини отримували з апікальних меристем пагонів на середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [10], яке додатково містило 2 мг/л 2,4-Д. Калюси культивували у чашках Петрі при 26 °С в темряві на селективному середовищі протягом 4 тижнів. Як селективний агент застосовували маніт, який додавали до модифікованого середовища МС у концентрації 0,65 М (1,61 МПа осмотичного тиску). Контролем слугувало середовище без маніту. Через 4 тижні визначали частку живих калюсів як відсоткове відношення кількості життєздатних калюсів до їх початкової кількості. До мертвих відносили калюси, які побуріли на 2/3 своєї поверхні й більше, а решту вважали живими. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням прикладних програм MS Excel 2013 і Statistica 10. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

### 5. Результати досліджень та їх обговорення

Для апробації розроблених методик проведено порівняльне вивчення посухостійкості сортів *in vitro* і в лабораторних умовах. Результати засвідчили, що показники стійкості сортів, визначені шляхом тестування *in vitro*, відображають їх посухостійкість у лабораторних умовах (табл. 1).

Таблиця 1

Показники посухостійкості сортів пшениці м'якої озимої, отримані лабораторним методом та *in vitro*

Сорт	Установа-оригінатор, країна	Частка пророслого насіння, %	Частка живих калюсів, %
Балада миронівська	МІП, Україна	97,9±1,4	42,5±3,9
МІП Вишиванка	МІП, Україна	64,0±4,8	30,4±3,6
Грація миронівська	МІП, Україна	85,7±3,5	36,8±3,8
Трудівниця миронівська	МІП, Україна	64,3±4,9	33,5±3,7
Естафета миронівська	МІП, Україна	88,7±3,2	35,1±3,8
Вежа миронівська	МІП, Україна	68,0±4,8	26,5±3,5
МІП Дніпрянка	МІП, Україна	61,5±5,0	29,6±3,6
МІП Ассоль	МІП, Україна	63,5±4,9	26,3±3,5
Горлиця миронівська	МІП, Україна	89,0±3,1	40,3±3,9
Берегиня миронівська	МІП, Україна	69,1±4,8	28,6±3,6
Світанок Миронівський	МІП, Україна	78,7±4,2	36,8±3,8
Подільянка	ІФРГ, МІП, Україна	85,9±3,5	38,1±3,8
Чародійка білоцерківська	БДСС ІБКЦБ, Україна	59,8±5,0	18,6±3,1
Овідій	ІЗЗ, Україна	54,1±5,1	17,3±3,0
Wenzell	Австралія	61,0±4,9	15,2±2,8

Примітка: МІП – Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла, БДСС ІБКЦБ – Білоцерківська селекційно-дослідна станція Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків, ІЗЗ – Інститут захисту рослин, ІФРГ – Інститут фізіології рослин і генетики

Так, у сортів Балада миронівська, Горлиця миронівська, які характеризуються підвищеною посухостійкістю, відсоток пророслого насіння та частка живих калюсів були значно вищими, ніж у менш посухостійких – Wenzell та Овідій. Кореляційний аналіз

отриманих даних засвідчив наявність істотного зв'язку між показниками стійкості досліджуваних сортів, отриманими різними методами (рис. 1).

Коефіцієнт кореляції склав 0,86 (зв'язок достовірний при  $p \leq 0,05$ ).

Діаграма розсіювання: Частка пророслого насіння (x) vs. Частка живих калюсів (y)

$$y = -8,7 + 0,53712 \cdot x$$

Кореляція:  $r = 0,86428$

X: Частка пророслого насіння  
 N = 15  
 Сер. = 72,746667  
 Стд.від. = 13,566180  
 Макс. = 97,9; Мін. = 54,1  
 Y: Частка живих калюсів  
 N = 15  
 Сер. = 30,373333  
 Стд.від. = 8,430850  
 Макс. = 42,5; Мін. = 15,2

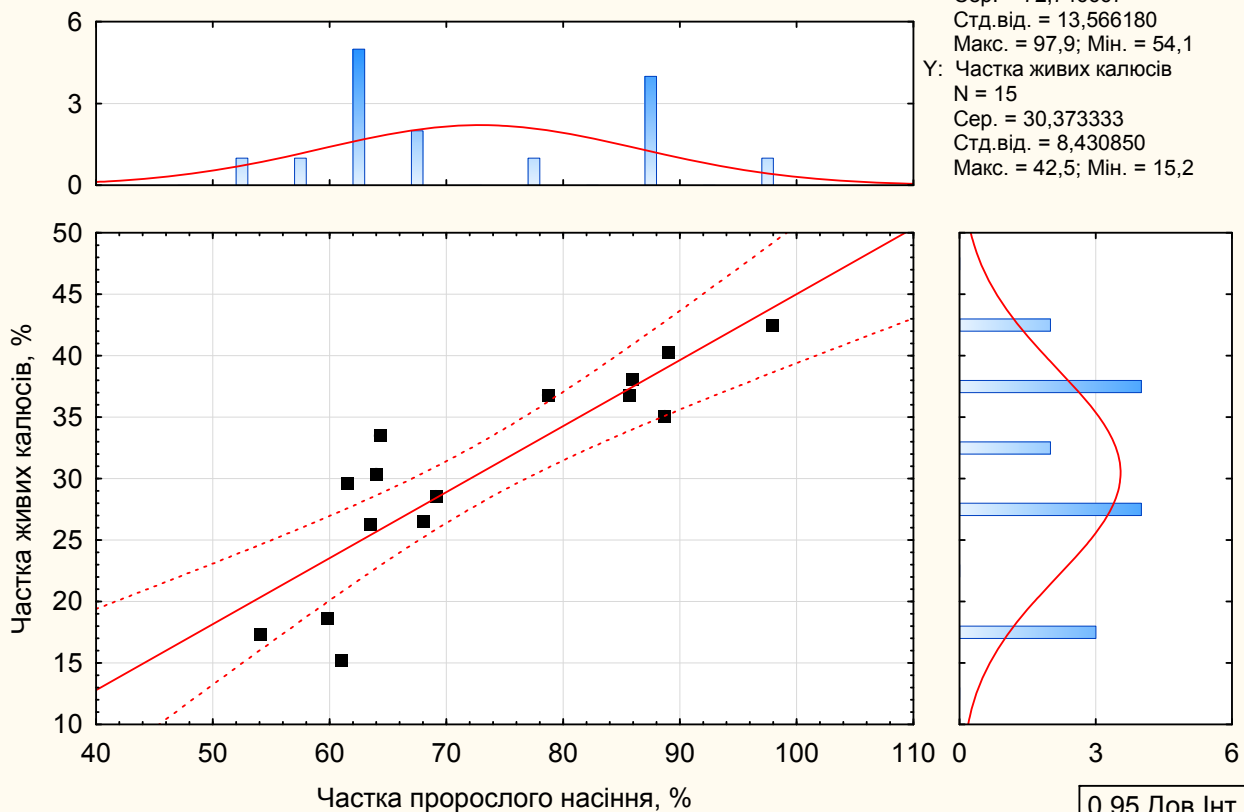


Рис. 1. Карта кореляційних зв'язків між часткою пророслого насіння та часткою живих калюсів сортів пшениці

Згідно отриманих даних можна зробити висновки, що сорт Балада миронівська та Горлиця миронівська є найменш осмочутливими, оскільки за селективних умов ці генотипи мали найвищий відсоток пророслого насіння (рис. 2) та найвищу частку живих калюсів (рис. 3).



а



б

Рис. 2. Насіння пшениці після культивування на осмотичних субстратах з манітом:

а – сорт Балада миронівська; б – сорт Wenzell

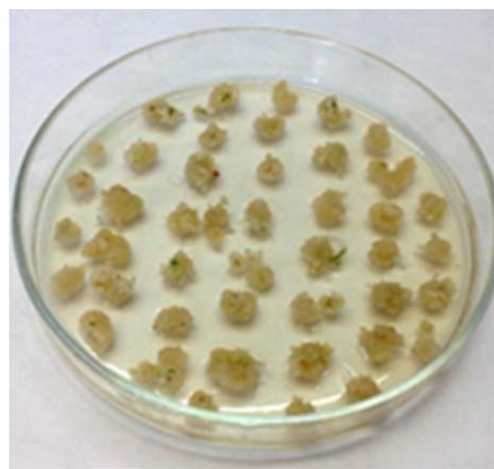
Решта сортів показали нижчий рівень посухостійкості, оскільки характеризувались нижчим відсотком пророслих насінин та виживаністю калюсів (велика їх частка темніла та підлягала некрозу).

Отримані результати дають підставу стверджувати, що тестування *in vitro* за розробленою методикою дозволяє проводити оцінку селекційного матеріалу пшениці на стійкість до несприятливих стресових чинників, зокрема до посухи.

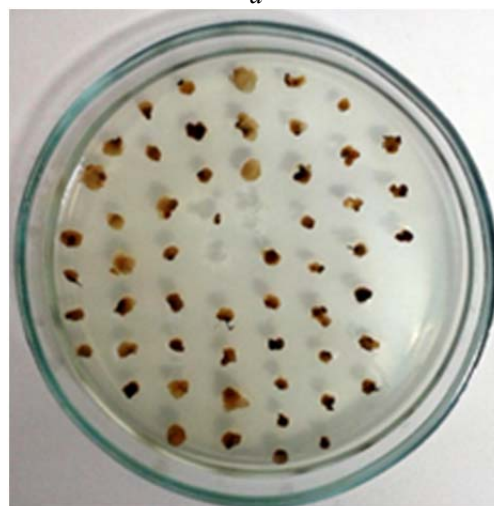
Таким чином, результати роботи підтвердили застосування культури тканин *in vitro* як тест-системи для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного стресу.

Д. С. Тагіманова та співавтори стверджують, що при проведенні оцінки на посухостійкість необхідно використовувати комплекс методів, за допомогою яких можна було б оцінювати не тільки різні ас-

пекти стійкості сортів пшениці на ранніх етапах розвитку рослин, а й прогнозувати їх потенційну врожайність [8]. Порівняльне вивчення сортів м'якої пшениці показало, що індекси стійкості форм, визначені шляхом тестування *in vitro*, відображають їх посухостійкість в польових умовах [9].



а



б

Рис. 3. Калюси пшениці після культивування на селективних середовищах з манітом:

а – сорт Балада миронівська; б – сорт Wenzell

Незважаючи на те, що метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовується для оцінки посухостійкості, далеко не завжди ступінь толерантності цілої рослини і отриманої з неї культури тканин збігається. Так, у роботі E. Farshadfar et al. під час скринінгу генотипів м'якої пшениці на посухостійкість не виявлено достовірного кореляційного зв'язку між результатами оцінки *in vivo* та *in vitro* [3]. Автори підсумували, що результати скринінгу *in vitro* на толерантність до посухи не можна узагальнити на рівні *in vivo* та навпаки, тому показники, отримані вищезгаданими методами, не завжди корелюють між собою і повинні розглядатися окремо або доповнювати один одного. Разом з тим, використання тканинних і клітинних культур в більшості випадків дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці.

**Обмеження дослідження.** Представлені дослідження не дають змоги провести пряму оцінку посухостійкості сортів пшениці за величиною урожайності рослин, що більше би відповідало польовим умовам.

**Перспективи використання результатів досліджень.** Результати роботи сприятимуть ефективнішому використанню досліджуваних сортів як у рослинництві, так і в селекційній практиці. Представлені дослідження є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів посухостійкості пшениці та можуть застосовуватися як елементи селекційних програм.

## 6. Висновки

1. Проведено скринінг сортів пшениці м'якої озимої на посухостійкість та виявлено достовірний

кореляційний зв'язок ( $r=0,86$ ) між результатами, одержаними лабораторним методом та *in vitro*.

2. Показники стійкості, отримані на різних рівнях організації (клітини, проростки), в основному збігалися для більшості вивчених сортів, тому для оцінки селекційного матеріалу можна використовувати обидва методи.

3. Показано можливість використання селективних систем з манітом для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного дефіциту.

4. Встановлено, що найбільшою стійкістю до водного дефіциту характеризувалися сорти Балада миронівська та Горлиця миронівська, які можуть бути цінним вихідним матеріалом для подальшої селекції пшениці.

## Література

1. Черенков, А. В., Гасанова, І. І., Солодушко, М. М. (2014). Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті. Бюлетень Інституту сільськогосподарства степової зони НААН України, 6, 3–8.
2. Bartels, D., Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (1), 23–58. doi: <http://doi.org/10.1080/07352680590910410>
3. Farshadfar, E., Jamshidi, B., Cheghamirza, K., da Silva, J. A. T. (2012). Evaluation of drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in vivo* and *in vitro* techniques. *Annals of Biological Research*, 3 (1), 465–476.
4. Варавкин, В. А., Таран, Н. Ю. (2014). Диагностика засухоустойчивости сортов пшеницы разной селекции по осморегуляторным свойствам семян. *ScienceRise*, 3 (1 (3)), 18–22. doi: <http://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.27463>
5. Прокопик, Н. І., Чугункова, Т. В., Хоменко, С.О. (2019). Оцінка посухостійкості сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження за умов осмотичного стресу. Наукові доповіді НУБіП України, 3 (79). doi: <http://doi.org/10.31548/dopovidi2019.03.004>
6. Юрченко, Т. В., Демидов, О. А., Пикало, С. В., Прокопик, Н. І., Фоманюк, В. А. (2019). Пат. № 132899 UA. Спосіб оцінки генотипів пшениці м'якої озимої до дії водного дефіциту. МПК: A01N 1/04; № u201811089; заявл. 09.11.2018; опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5.
7. Дубровная, О. В. (2017). Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*, 49 (4), 279–292.
8. Тагиманова, Д. С., Ергалиева, А. Ж., Райзер, О. Б., Хапилина, О. Н. (2013). Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro*. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2, 42–46. doi: <http://doi.org/10.11134/btp.2.2013.7>
9. Россеев, В. М., Белан, И. А., Россеева, Л. П. (2011). Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*, 76 (2), 32–34.
10. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Received date 08.05.2019

Accepted date 27.05.2019

Published date 30.06.2019

**Пикало Сергій Володимирович**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Відділ біотехнології, генетики і фізіології, Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України, вул. Центральна, 68, с. Центральне, Київська обл., Україна, 08853  
E-mail: [pykserg@ukr.net](mailto:pykserg@ukr.net)

**Демидов Олександр Анатолійович**, доктор сільськогосподарських наук, Член-кореспондент НААН України, директор інституту, Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України, вул. Центральна, 68, с. Центральне, Київська обл., Україна, 08853  
E-mail: [mwheats@ukr.net](mailto:mwheats@ukr.net)

**Юрченко Тетяна Василівна**, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач відділу, Відділ біотехнології, генетики і фізіології, Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України, вул. Центральна, 68, с. Центральне, Київська обл., Україна, 08853  
E-mail: [T.Yurchenko978@gmail.com](mailto:T.Yurchenko978@gmail.com)

**Прокопик Наталія Іванівна**, молодший науковий співробітник, Відділ біотехнології, генетики і фізіології, Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України, вул. Центральна, 68, с. Центральне, Київська обл., Україна, 08853  
E-mail: [snatanata@ukr.net](mailto:snatanata@ukr.net)

**Харченко Михайло Володимирович**, кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник, Відділ біотехнології, генетики і фізіології, Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України, вул. Центральна, 68, с. Центральне, Київська обл., Україна, 08853  
E-mail: [mikhail.kharch@gmail.com](mailto:mikhail.kharch@gmail.com)