

УДК 633.11:001.8:678.049.92

Вплив низьких температур на процеси мітозу та мейозу за визначення морозо-, зимостійкості пшениці озимої (*T. aestivum* L.) в накільченому насінні

Хоменко Л. О., кандидат сільськогосподарських наук
Лялько І. І., кандидат біологічних наук

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: homenkolida18@gmail.com

Мета. Виявити особливості мікроспоро- та мікрогаметогенезу рослин, отриманих з замороженого накільченого насіння, та мітозу в корінцях пророслого насіння наступного покоління з визначенням енергії проростання та схожості. **Методи.** Цитологічний аналіз мітозу та мейозу проводили у клітинах рослин, одержаних з замороженого накільченого насіння, та контрольних (без заморожування). Енергію проростання та схожість насіння визначали за методикою Держстандарту України. Статистичну значущість відмінностей оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. **Результати.** Проведено цитологічний аналіз мітозу у клітинах корінців проростків з насіння рослин пшениці м'якої озимої, отриманих після оцінки морозо-, зимостійкості методом заморожування накільченого насіння за температури -20°C . Усі проаналізовані зразки мали гексаплоїдний набір хромосом ($2n = 6x = 42$). Частка клітин з аномаліями мітозу в корінцях пророслого насіння, одержаного з рослин як після дії стресу, так і в контрольному варіанті, не перевищувала 1,5 %. Виявлено, що проходження мейозу у дослідних рослин на стадіях мікроспоро- та мікрогаметогенезу майже не відрізняється від контрольних за кількістю порушень (до 2 %) та їх спектром. Частка фертильного пилку у контрольному і дослідного матеріалу була понад 70 %, що є достатнім для нормального запліднення пшениці. Низька температура не виявляла негативного впливу на вегетативні та генеративні органи рослин, що вижили після заморожування, оскільки основний показник насіння – схожість – відповідав рівню кондиційного насіння. **Висновки.** При визначенні морозо-, зимостійкості пшениці озимої методом заморожування накільченого насіння низька температура (-20°C) не мала негативного впливу на перебіг мітозу та мейозу у отриманих рослин, оскільки частота порушень не перевищувала 2 %, частка фертильного пилку становила 77–86 %, а основний показник придатності посівного матеріалу – схожість насіння – був на рівні кондиційного насіння (92–96 %). Отримані дані можуть бути використані для підвищення ефективності цілеспрямованого добору при створенні високопродуктивного та високоадаптивного селекційного матеріалу.

Ключові слова: пшениця м'яка озима (*T. aestivum* L.), низька температура, накільчене насіння, мітоз, мейоз, гаметогенез, пилко, схожість насіння

Вступ. У селекції пшениці озимої на продуктивність важливу роль відіграє пошук шляхів підвищення стійкості до абіотичних і біотичних чинників зовнішнього середовища та збільшення врожайності. Як зазначає В. В. Моргун [1], у ХХ ст. сформувався такий важливий науковий

напряг, як інтеграція селекції з генетикою і біотехнологією в дослідженні ключових фізіологічних ознак з подальшим включенням їх у селекційний процес.

Аналіз літературних джерел, постановка проблеми. Відомо, що одним з основних показників високої чутливості пророслого насіння пшениці до дії екстремальних температур є пригнічення росту рослин. У роки з низькими стресовими зимовими температурами значний недобір урожаю на посівах озимих культур спричиняє “післядія” зимових ушкоджень [2]. Дія надоптимальних температур призводить до морфоструктурних модифікацій, зумовлених зміною кількості і розміру клітин проростків [3]. З метою отримання стійких форм морозо-, зимостійкості пшениці озимої визначається методом проморожування рослин у поліетиленових стаканчиках (без дна) за критичних температур вимерзання з наступним дорощуванням рослин, що вижили. Але деякі з них відстають за розвитком і ростом. Відмічається видовження нижнього і гальмування росту верхнього міжвузля стебла, внаслідок чого зменшується кількість продуктивних стебел, зменшується розмір колоса і маси зерна з рослини, може спостерігатися також ураження генеративних органів, що проявляється у підвищенні стерильності пилку до 81–91 % [4].

Описані факти цитологічної нестабільності проявляються у рослин при холодovому стресі, який обумовлює розширення спектру аномалій пилкових зерен, зміну їх розміру, плідності, морфологічних особливостей, хімічного складу тощо [5–7]. Відомо, що процеси мейозу та формування чоловічого гаметофіту дуже чутливі до стресових абіотичних факторів, які нерідко є причиною різноманітних порушень, що знижують продуктивність рослин у два рази та більше [8].

Високі врожаї сільськогосподарських культур залежать від посівних якостей насіння, найважливішими показниками яких є енергія проростання, що характеризує ступінь життєздатності насіння (спроможність давати швидкі і дружні сходи), та схожість, від якої залежить продуктивність рослин і майбутній урожай. Дослідники стверджують, що низькі температури глибоко впливають на енергію проростання і схожість насіння та інтенсивність росту рослин [9].

Достатній рівень морозо-, зимостійкості визначає стабільність урожаю озимих культур, тому створення сортів пшениці озимої з високим генетично обумовленим рівнем стійкості до несприятливих чинників навколишнього середовища є одним з важливих завдань селекції пшениці в Україні.

Мета досліджень – виявити особливості мікроспоро- та мікрогаметогенезу рослин, отриманих з промороженого накільченого насіння, та

мітозу в корінцях пророслого насіння наступного покоління з визначенням енергії проростання та схожості.

Матеріал і методика. Досліджували рослини пшениці м'якої озимої сортів Подолянка і Крижинка та лінії УК 065, що були отримані з замороженого накільченого насіння (за методом визначення морозо-, зимостійкості озимих культур) [7]. Насіння, що вижило після стресової дії низької температури, дорощували (з наступною перезимівлею рослин) на полях дослідного господарства Інституту фізіології рослин і генетики НАНУ (ІФРГ) в смт Глеваха (Васильківський район Київської області). Контролем було насіння без проморожування та рослини тих самих сортозразків, вирощені за звичайних умов.

Цитологічний аналіз мітозу проводили у клітинах кореневої меристеми пророслого насіння досліджуваних сортозразків після проморожування та на контролі (без проморожування). По 25–30 насінин кожного сортозразка (в досліді та на контролі) пророщували на фільтрувальному папері в термостаті за температури +24 °С упродовж 72 год. Повторність досліді трикратна. Для скорочення хромосом корінці обробляли 0,05 % розчином колхіцину. Первинні корінці фіксували в оцтовому алкоголі (1:3) протягом доби в холодильнику за температури +4 °С. Після фіксатора зразки декілька разів промивали в дистильованій воді та переносили для мацерації в 5N HCl кімнатної температури на 30–35 хв. Забарвлювали зразки у 2 % лактопропіоновому орсеїні впродовж доби за кімнатної температури. Тимчасові давлені препарати готували за загальноприйнятою методикою З. П. Паушевої [10] в 45 % оцтовій кислоті. Частоту та типи хромосомних аберацій визначали паралельно з підрахунком числа хромосом у клітинах. Кількість хромосом підраховували у 5–8 метафазних пластинках одного корінця. На стадіях анафаз – ранніх телофаз вивчали не менше 1000 клітин на варіант.

Цитологічний аналіз мейозу проводили на материнських клітинах пилку. Для кожного варіанта брали по 8–10 колосів, які ще не вийшли з трубки, щоб виявити всі стадії мікроспорогенезу. Фіксацію проводили в оцтовому алкоголі (1:3). Після фіксатора пиляки відмивали декілька разів у дистильованій воді, фарбували 2 % ацетокарміном та готували тимчасові давлені препарати [10].

З одного колоса відбирали пиляки, мейоцити яких перебували на різних стадіях мейозу. У метафазі мейозу 1 вивчали по 10–12 чітких метафазних пластинок, а на стадіях анафаз – ранніх телофаз – не менш 50 клітин на колос. На останній стадії мейозу досліджували по 150–200 тетрад на рослину та визначали мейотичний індекс, що є показником як нормального перебігу мейозу, так і стабільності генотипів [11].

Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом за стандартною методикою [10], для чого брали не менше 2000 пилкових зерен на варіант. Препарати аналізували за допомогою мікроскопа Amplival (Zeiss) зі збільшенням 15×40 та 15×100. Енергію проростання та схожість насіння визначали за загальноприйнятою методикою Держстандарту України [12], достовірність отриманих даних – за критерієм Ст'юдента [13].

Обговорення результатів. У 2015–2016 рр. визначали рівень морозостійкості (удосконаленим методом проморожування накільченого насіння при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) та зимостійкості (дорощування його за природних умов перезимівлі) сортів Подолянка, Крижинка та лінії УК 065.

У клітинах кореневої меристеми насінин, отриманих з живих (після проморожування) рослин досліджуваних сортозразків, підраховували кількість хромосом. За результатами цитологічного аналізу рослини мали нормальний гексаплоїдний каріотип ($2n = 6x = 42$) (рис. 1).

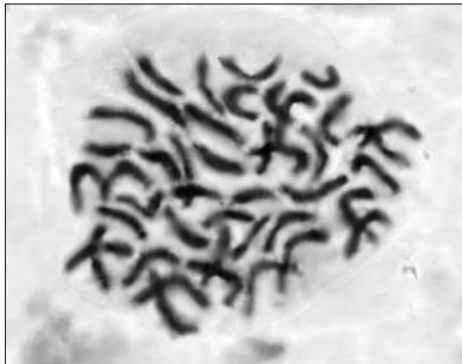


Рис. 1. Гексаплоїдний набір хромосом рослин сорту Подолянка

Аналіз клітин кореневої меристеми проростків показав, що в контрольних зразках сорту Подолянка та лінії УК 065 частота хромосомних аберацій була менше 1 % (відповідно 0,93 та 0,85 %), у сорту Крижинка цей показник дорівнював 1,16 %. У проростків, отриманих з промороженого насіння, ці показники були дещо вищими. Так, у сорту Подолянка та лінії УК 065 частота хромосомних аберацій складала відповідно 1,07 та 0,99 %, у сорту Крижинка – 1,47 %, але такі показники не перевищують допустимі норми і свідчать про цитологічну стабільність даних сортів.

Виявлено, що хромосомні перебудови досліджуваних сортів практично не різнились. При аналізі ана-, телофаз спостерігали в основному фрагменти, дещо менше – хромосомні мости та подекуди (близько 0,2 %) – відсталі хромосоми (табл. 1).

Таблиця 1. Частота хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми проростків пшениці

Сорт, лінія	Проаналізовано клітин, шт.	З них з аномаліями мітозу, % $\pm s_p$	Аномалії мітозу, % $\pm s_p$		
			фрагменти	мости	відсталі хромосоми
Контроль					
Подольнка	1176	0,93 \pm 0,08	0,34 \pm 0,17	0,42 \pm 0,19	0,17 \pm 0,12
Крижинка	1053	0,85 \pm 0,08	0,57 \pm 0,23	0,28 \pm 0,16	–
УК 065	1032	1,16 \pm 0,33	0,58 \pm 0,24	0,39 \pm 0,18	0,19 \pm 0,13
Після проморожування					
Подольнка	1123	1,07 \pm 0,30	0,62 \pm 0,23	0,45 \pm 0,20	–
Крижинка	1012	0,99 \pm 0,31	0,39 \pm 0,19	0,49 \pm 0,22	0,11 \pm 0,10
УК 065	1156	1,47 \pm 0,35	0,69 \pm 0,24	0,61 \pm 0,23	0,17 \pm 0,12

Таким чином, аналіз клітин кореневої меристеми проростків контрольних і дослідних зразків показав, що стресовий фактор низьких температур (-20 °С) не мав негативного впливу на проходження мітозу, оскільки частота порушень у сортозразків не перевищувала 1,5 %, що свідчить про цитологічну стабільність досліджуваного матеріалу.

Цитологічний аналіз мікроспорогенезу показав, що мейоз у рослин досліджуваних сортозразків в основному проходив майже без порушень. У контрольних зразків пшениці в метафазі 1 виявлено бівалентну кон'югацію хромосом з вищою асоціацією 21^{II}_3 (21 закритий бівалент). У зразків, що пройшли проморожування, відмічали по 1–3 відкриті біваленти ($20^{II}_3 + 1^{II}_B$), наявність яких указує на послаблення кон'югації хромосом. Проте показано, що десинапсис не має негативного впливу на проходження мейозу [14]. Клітин з унівалентними хромосомами нами не виявлено. На стадіях анафази 1 та анафази 2 спостерігали за характером розходження хромосом до полюсів веретена поділу. У рослин як на контролі, так і в досліді на різних стадіях мейозу спостерігались окремі клітини з порушеннями, частота яких не перевищувала 0,75 %. Формування нормальних діад та тетрад у всіх досліджуваних сортів відбувалось у гніздах пиляків синхронно і майже без порушень.

На стадії телофази 2 у контрольних рослин Лінії УК 065 та сорту Подольнка виявлено відповідно 0,92 та 0,94 % клітин з порушеннями, а у сорту Крижинка цей показник дорівнював 1,86 %. У рослин, вирощених з промороженого накільченого насіння, ці показники були дещо вищими (1,1 % у лінії УК 065 та 1,1 і 2,1 % у сортів Подольнка і Крижинка відповідно). Основним типом порушень на цій стадії були тетради з мікродрамами та безядерні мікроспори, але частота таких клітин не перевищувала 2,1 % (табл. 2).

Таблиця 2. Аналіз стадії тетрад та визначення мейотичного індексу у рослин пшениці

Сорт, лінія	Клітин		З них, % $\pm s_p$		Мейотичний індекс, % $\pm s_p$
	проаналізованих, шт.	з аномаліями мейозу, % $\pm s_p$	з мікроядрами	без'ядерні мікроспори	
Контроль					
Подольнка	1059	0,94 \pm 0,30	0,66 \pm 0,25	0,28 \pm 0,17	99,06 \pm 0,30
Крижинка	1287	1,86 \pm 0,38	1,40 \pm 0,33	0,47 \pm 0,19	98,13 \pm 0,38
УК 065	1196	0,92 \pm 0,27	0,75 \pm 0,25	0,17 \pm 0,19	99,08 \pm 0,27
Після проморожування					
Подольнка	1234	1,05 \pm 0,29	0,65 \pm 0,23	0,40 \pm 0,18	98,94 \pm 0,28
Крижинка	1392	2,08 \pm 0,38	1,36 \pm 0,31	0,72 \pm 0,23	97,91 \pm 0,38
УК 065	1273	1,10 \pm 0,30	0,63 \pm 0,22	0,47 \pm 0,22	98,90 \pm 0,30

Отримані дані свідчать про нормальний перебіг мейозу у рослин, вирощених з замороженого накілченого насіння, оскільки кількість порушень у них (3 %) не перевищує норми, допустимої для нормального перебігу мейозу [15]. Наявність мікроядер у тетрадах та діадах вважають наслідком порушень, що сталися на попередніх стадіях мейозу [16], а появу без'ядерних мікроспор пояснюють наявністю на стадіях метафаз 1 або 2 автономного веретена, відсутністю кінетохорних фібрил або аномальним передчасним цитокінезом у профазі 2 [17]. Визначення мейотичного індексу показало, що в усіх проаналізованих зразків він був на рівні 97,9–99,1 %. Це свідчить про нормальний перебіг мейозу та цитологічну стабільність досліджуваного матеріалу, а також обумовлює утворення в подальшому життєздатного пилку.

Слід зазначити, що в постмейотичному періоді під час гаметогенезу у пшениці, незважаючи на нормальний перебіг мейозу, може відбуватися дегенерація пилку. Дослідниками встановлено [4, 5, 8], що під дією стресів можуть знижуватись кількість і фертильність пилку, розширюватись спектр аномалій, змінюватись розмір пилкових зерен, плоідність та ін. У зв'язку з цим ми визначали фертильність пилку в усіх досліджуваних зразків, що необхідне для оцінки пилкової продуктивності, якості пилку та врожайності насіння.

При аналізі пилку визначали відсоток фертильних, стерильних та деформованих пилкових зерен. На цитологічних препаратах клітини стерильного і фертильного пилку різняться за інтенсивністю забарвлення. Фертильний пилковий набувач яскраво-червоного кольору, мав зернисту цитоплазму з чітко сформованими двома сперміями та вегетативним ядром. Саме такі пилкові зерна беруть участь у процесі запліднення. Стерильні пилкові зерна майже не фарбувались карміном або забарвлювались нерівномірно і мали слабкий, практично прозорий світло-коричневий колір.

Проведені дослідження показали, що в пиляках усіх сортозразків присутні пилкові зерна різних типів. Найбільшу кількість склали фертильні зерна (80,1–86,1 % у контролі та 76,9–84,1 % у зразків з проморожуванням). Частка стерильного пилку в контролі була на рівні 10,7–15,1 %, у зразків з проморожуванням – 14,7–19,9 %. До аномальних пилкових зерен відносили деформовані або такі, які відрізнялися за розміром (рис. 2).

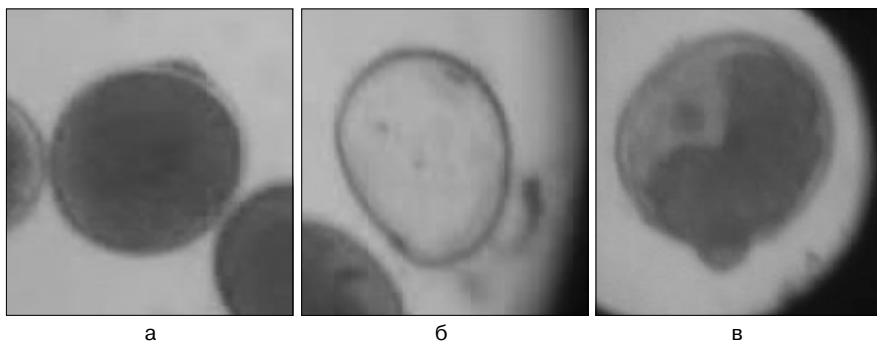


Рис. 2. Пилкові зерна у рослин пшениці: а) фертильні, б) стерильні, в) аномальні

Проте аномальний пилко зустрічався досить рідко. Максимальна частка стерильного пилку складала 3,25 % (табл. 3).

Таблиця 3. Аналіз фертильності пилку у рослин пшениці озимої

Сорт, лінія	Проаналізовано пилкових зерен, шт.	З них					
		фертильні		стерильні		аномальні	
		шт.	% ± s _p	шт.	% ± s _p	шт.	% ± s _p
<i>Контроль</i>							
Подольанка	2000	1714	85,7±0,78	214	10,7±0,69	72	3,6±0,42
Крижинка	2000	1602	80,1±0,89	301	15,1±0,80	97	4,8±0,41
УК 065	2000	1722	86,1±0,86	247	12,3±0,73	31	1,5±0,27
<i>Після проморожування</i>							
Подольанка	2000	1681	84,1±0,81	293	14,6±0,79	26	1,3±0,25
Крижинка	2000	1537	76,8±0,94	398	19,9±0,89	65	3,2±0,39
УК 065	2000	1642	82,1±0,87	316	15,8±0,81	42	2,1±0,32

Частка фертильних пилкових зерен в усіх вивчених зразків пшениці озимої становила 76,8–86,1 %. Цього достатньо для нормального запилення та запліднення квіток у колосі, оскільки практикою встановлено, що фертильність пилку пшениці має бути не менше 70 %.

Показником негативного впливу температури на вегетативні та генеративні органи рослин може бути також зниження посівних якостей сформованого насіння.

Для дослідження енергії проростання та лабораторної схожості на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі за кімнатної температури пророщували по 100 насінин з рослин, вирощених із замороженого накілченого насіння, та контрольних (без заморожування). По кожному зразку підраховували кількість нормально пророслих зернівок (що мали не менше двох корінців, за розміром більших за довжину зернівки або не менше половини її довжини) та зернівок з різними дефектами проростання. На 3-ю добу після пророщування енергія проростання насіння сортів Подолянка та Крижинка складала відповідно 69 та 59 %, лінії УК 065 – 64 %. На 7-му добу схожість насіння сортів Подолянка та Крижинка була на рівні 96 та 92 %, лінії УК 065 – 95 %, крім того 2 % проростків сорту Крижинка мали лише корінці без колеоптилів (табл. 4).

Таблиця 4. Показники схожості насіння з рослин, вирощених із замороженого накілченого насіння

Сорт, лінія	Енергія проростання (3-я доба), %		Лабораторна схожість (7-а доба), %	
	контроль	проморожування	контроль	проморожування
Подолянка	72	69	100	96
Крижинка	65	59	95	92
УК 065	70	64	96	95

HIP_{05} для енергії проростання – 1,5; HIP_{05} для схожості – 1,9.

Дані свідчать, що низька температура (-20 °C) впливає на енергію проростання насіння з рослин, вирощених із замороженого накілченого насіння, але схожість у обох варіантів залишається на рівні кондиційного насіння (92–96 %).

Висновки. При визначенні морозо-, зимостійкості пшениці озимої методом заморожування накілченого насіння низька температура (-20 °C) не мала негативного впливу на перебіг мітозу та мейозу у отриманих з нього рослин, оскільки частота порушень не перевищувала 2 %, частка фертильного пилку склала 77–86 %, а основний показник придатності посівного матеріалу – схожість насіння – був на рівні кондиційного насіння (92–96 %). Отримані дані можуть бути використані для підвищення ефективності цілеспрямованого добору при створенні високопродуктивного та високоадаптивного селекційного матеріалу.

Список використаних джерел

1. Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку / гол. ред. В. В. Моргун. Київ : Логос, 2017. С. 6–8.
2. Пузік В. К., Криштоп Є. А. Мітотична активність клітин первинних корінців ярої пшениці залежно від дії низьких температур. *Селекція і насінництво* : міжвід. темат. наук. зб. Харків, 2008. Вип. 96. С. 260–266.

3. Варавкін В. О. Ростова реакція проростків пшениці озимої на дію температурного стресу та їх регулювання в розчині триману. *Агробіологія* : зб. наук. праць. Біла Церква, 2013. Вип. 10. С. 161–165.
4. Хоменко Л. О., Шередеко Л. М. Післядія критичних температур вимерзання в залежності від сорту пшениці озимої. *Селекція і насінництво* : міжвід. темат. наук. зб. Харків, 2012. Вип. 101. С. 214–222.
5. Цаценко Л. В., Нековаль С. Н. Пыльцевой анализ. Краснодар : КубГАУ, 2012. 126 с.
6. Зеленцов С. В., Мошненко Е. В., Цаценко Л. В., Зеленцов В. С. Стрессовые условия внешней среды как причина генетических рекомбинаций у цветковых растений на примере видов сои культурной *Glycine max* (L.) Merr., сои уссурийской *G. soja* Sieb. et Zucc. и льна обыкновенного *Linum usitatissimum* L. *Научный диалог*. 2014. Вып. 1 (25). С. 14–29.
7. Хоменко Л. О., Кочмарський В. С. Досвід Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН з визначення морозо-, зимостійкості пшениці м'якої озимої. *Вісник Степу* : наук. зб. / Кіровоградська ДСГДС НААН. Кіровоград : КОД, 2014. Вип. 11. С.104–107.
8. Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* / Eds. В. В. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones. Rockville, Md. : American Society of Plant Physiologists, 2000. P. 1158–1249.
9. Кирпа М. Я., Скотар С. О., Базілева Ю. С., Лупітько О. І. Посівні якості насіння зернових культур та методи їх визначення. *Селекція і насінництво* : міжвід. темат. наук. зб. Харків, 2016. Вип. 110. С. 171–179.
10. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. Москва : Колос, 1980. С. 213–216.
11. Орловская О. А., Леонова И. Н., Адонина И. Г., Салина Е. А., Хотылева Л. В., Шумный В. К. Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы *Triticeae*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 19, № 5. С. 552–560. doi: 10.18699/VJ15.072
12. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови : ДСТУ 2240-93. [чинний від 1994-07-01] Київ : Держстандарт України, 1994. 73 с.
13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва : Колос, 1979. 415 с.
14. Лемеш В. А., Саматадзе Т. Е., Гузенко Е. В., Железнякова Е. В., Амосова А. В., Зеленин А. В., Муравенко О. В. Особенности развития и репродукции трансгенных растений льна-долгунца. *Онтогенез*. 2014. Т. 45, № 6. С. 406–411. doi: 10.7868/S0475145014060081
15. Гордеева Е. И., Леонова И. Н., Калинина Н. П., Салина Е. А., Будашкина Е. Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. *Генетика*. 2009. Т. 45, № 12. С. 1616–1626.
16. Силкова О. Г., Перемыслова Е. Э., Щапова А. И., Шумный В. К. Генетическая регуляция деления центромерных районов унивалентных хромосом ржи и пшеницы в анафазе 1 мейоза ди-моносомиков. *Генетика*. 2008. Т. 44, № 1. С. 102–111.
17. Shamina N. V., Dorogova N. V., Sidorchuk I. V., Zagorskaya A. A., Deineko E. V., Shumny V. K. Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA tagget mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Cell Biol. Int.* 2001. Vol. 25, No. 4. P. 367–369. doi: 10.1006/cbir.2000.0641

References

1. Morhun, V. V. (Ed.) (2017). *Fiziolohiia roslyn: dosyahnennia ta novi napriamky rozvytku* [Plant Physiology: Achievements and New Directions of Development] (pp. 6–8). Kyiv: Lohos. [in Ukrainian]
2. Puzik, V. K., & Kryshtop, Ye. A. (2008). The mitotic activity of cells of the primary roots of spring wheat depending on the action of low temperatures. *Selektsiia i Nasinnytstvo* [Plant Breeding and Seed Production], 96, 260–266. [in Ukrainian]

3. Varavkin, V. O. (2013). The growth reaction of winter wheat seedlings on temperature stress and their reaction in solution tri-man. *Ahrobiolohiia* [Agrobiology], 10, 161–165. [in Ukrainian]
4. Khomenko, L. O., & Sheredeko, L. M. (2012). Aftereffects of the critical temperatures of freezing depending on the winter wheat variety. *Selektsiia i Nasinnystvo* [Plant Breeding and Seed Production], 101, 214–222. [in Ukrainian]
5. Tsatsenko, L. V., & Nekoval', S. N. (2012). *Pyl'tsevyy analiz* [Pollen Analysis]. Krasnodar: KubSAU. [in Russian]
6. Zelentsov, S. V., Moshnenko, Ye. V., Tsatsenko, L. V., & Zelentsov, V. S. (2014). Stress conditions of the environment as the cause of genetic recombination in flowering plants by the example of cultivated soybean *Glycine max* (L.) Merr., wild soybean *G. soja* Sieb. et Zucc., and flax *Linum usitatissimum* L. *Nauchnyy Dialog* [Scientific Dialogue], 1, 14–29. [in Russian]
7. Khomenko, L. O., & Kochmarskyi, V. S. (2014). Experience of the V. M. Remeslo Mironivka Institute of Wheat of NAAS on the determination of frost and winter resistance of bread winter wheat. *Visnyk Stepu* [Herald of Steppe], 11, 104–107. [in Ukrainian]
8. Bray, E. A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses In B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1158–1249). Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists.
9. Kyrpa, M. Ya., Skotar, S. O., Bazilieva, Yu. S., & Lupitko, O. I. (2016). Seed quality of seeds of grain crops and methods of their determination. *Selektsiia i Nasinnystvo* [Plant Breeding and Seed Production], 110, 171–179. [in Ukrainian]
10. Pausheva, Z. P. (1980). *Praktikum po tsitologii rasteniy* [Practical Manual on Plant Cytology]. Moscow: Kolos. [in Russian]
11. Orlovskaya, O. A., Leonova, I. N., Adonina, I. G., Salina, Ye. A., Khotyleva, L. V., & Shumny, V. K. (2015). Molecular-cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the tribe *Triticeae* species genetic material. *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 19(5), 552–560. [in Russian]. doi: 10.18699/VJ15.072
12. *Nasinnia silskohospodarskykh kultur. Sortovi ta posivni yakosti. Tekhnichni umovy: DSTU 2240:93* [Seeds of agricultural plants. Varietal and sowing characteristics. Specification: State Standard 2240-93]. (1994). Kyiv: Derzhstandart Ukrainy. [in Ukrainian]
13. Dospkhev, B. A. (1979). *Metodika polevogo opyta* [Methods of Field Experiment]. Moscow: Kolos. [in Russian]
14. Lemesh, V. A., Samatadze, T. Ye., Guzenko, Ye. V., Zheleznyakova, Ye. V., Amosova, A. V., Zelenin, A. V., & Muravenko, O. V. (2014). Features of development and reproduction of transgenic flax. *Ontogenez* [Ontogenesis], 45(6), 406–411. [in Russian]. doi: 10.7868/S0475145014060081
15. Gordeyeva, Ye. I., Leonova, I. N., Kalinina, N. P., Salina Ye. A., & Budashkina, Ye. B. (2009). Comparative cytological and molecular analysis of introgressive lines of bread wheat containing genetic material of *Triticum timopheevii* Zhuk. *Genetika* (Genetics), 45(12), 1616–1626. [in Russian]
16. Silkova, O. G., Peremyslova, E. E., Shchapova, A. I., & Shumny, V. K. (2008). Genetic regulation of the centromere division in rye and wheat univalent chromosomes in dimonosomics during meiotic anaphase I. *Genetika* (Genetics), 44(1), 102–111. [in Russian]
17. Shamina, N. V., Dorogova, N. V., Sidorchuk, I. V., Zagorskaya, A. A., Deineko, E. V., & Shumny, V. K. (2001). Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA tagget mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Cell Biol. Int.*, 25(4), 367–369. doi: 10.1006/cbir.2000.0641

Влияние низких температур на процессы митоза и мейоза при определении морозо-, зимостойкости пшеницы озимой (*T. aestivum* L.) в наклюнувшихся семенах

Хоменко Л. А., кандидат сельскохозяйственных наук

Лялько И. И., кандидат биологических наук

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17

e-mail: homenkolida18@gmail.com

Цель. Выявить особенности микроспоро- и микрогаметогенеза растений, полученных из замороженных наклюнувшихся семян, и митоза в корешках проросших семян с растений следующего поколения с определением энергии прорастания и всхожести. **Методы.** Цитологический анализ митоза и мейоза проводили в клетках растений, полученных из замороженных наклюнувшихся семян, и контрольных (без промораживания). Энергию прорастания и всхожесть семян определяли по методике Госстандарта Украины. Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. **Результаты.** Проведен цитологический анализ митоза в клетках корешков проростков семян с растений пшеницы мягкой озимой, полученных после оценки морозо-, зимостойкости методом промораживания наклюнувшихся семян при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Все проанализированные образцы имели гексаплоидный набор хромосом $2n = 6x = 42$. Доля клеток с аномалиями митоза в корешках проростков семян, полученных с растений как после действия стресса, так и в контрольном варианте, не превышала 1,5 %. Выявлено, что протекание мейоза у опытных растений на стадиях микроспоро- и микрогаметогенеза почти не отличается от контрольных по количеству нарушений (2 %) и их спектрам. Доля фертильной пыльцы у контрольного и опытного материала была более 70 %, что достаточно для нормального опыления пшеницы. Низкая температура не оказывала негативного влияния на вегетативные и генеративные органы растений, которые выжили после промораживания, поскольку основной показатель семян – всхожесть – соответствовал уровню кондиционных семян. **Выводы.** При определении морозо-, зимостойкости пшеницы озимой методом промораживания наклюнувшихся семян низкая температура ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) не оказывала отрицательного влияния на прохождение процессов митоза и мейоза у полученных растений, поскольку частота нарушений не превышала 2 %, доля фертильной пыльцы составляла 77–86 %, а основной показатель пригодности посевного материала – всхожесть семян – был на уровне кондиционных семян (92–96 %). Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности целенаправленного отбора при создании высокопродуктивного, высокоадаптивного селекционного материала.

Ключевые слова: пшеница мягкая озимая (*T. aestivum* L.), низкая температура, наклюнувшиеся семена, митоз, мейоз, гаметогенез, пыльца, всхожесть семян

The influence of low temperature on mitosis and meiosis when estimating winter wheat (*T. aestivum* L.) frost resistance and winter hardiness in sprouted seeds

Khomenko L. O., Candidate of Agricultural Sciences

Lialko I. I., Candidate of Biological Sciences

*Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine
31/17, Vasylykivska st., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: homenkolida18@gmail.com*

Purpose. To reveal the characteristics of microsporogenesis and microgametogenesis in plants derived from frozen sprouted seeds and mitosis in rootlets of germinating seeds from plants of the next generation and to determine seed vigor and seed laboratory germination.

Methods. Cytological analysis of mitosis and meiosis was carried out in cells of plants obtained after freezing and control (no freezing). Seed vigor and seed laboratory germination were determined according to the methods of the State Standard of Ukraine. The statistical significance of differences was assessed according to the Student's t-test. **Results.** It was conducted cytological analysis of mitosis in rootlets of seedlings from seeds derived from bread winter wheat plants which survived after evaluation of frost resistance by the method of freezing sprouted seeds at temperature of minus 20 °C. All samples analyzed had hexaploid set of chromosomes $2n = 6x = 42$. The proportion of cells with mitotic anomalies in rootlets of seedlings of seeds obtained both after the effect of temperature stress and in the control variant did not exceed 1.5 %. It was found that the meiosis in experimental plants at the stages of microspores and microgametogenesis almost does not differ from the control ones in terms of the number of disorders (2 %) and their spectrum. The proportion of fertile pollen in the control and experimental material was more than 70 % being sufficient for normal pollination of wheat. The low temperature did not adversely affect vegetative and generative organs of plants which have survived after freezing, since the main seed rate – germination – well corresponded to the level of certified seeds. **Conclusions.** It was found that when determining frost resistance and winter hardiness of winter wheat by the method of freezing sprouted seeds, the low temperature (-20 °C) does not adversely affect mitosis and meiosis processes in the plants survived, since the frequency of disorders did not exceed 2 %, the proportion of fertile pollen was 77–86 %, and seed laboratory germination was at the level of certified seeds (92–96 %). The data obtained can be used to improve the efficiency of targeted selection when creating highly productive, highly adaptive breeding material.

Key words: *bread winter wheat (*T. aestivum* L.), low temperature, sprouted seeds, mitosis, meiosis, gametogenesis, pollen, seed germination*