

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Чумакова Вікторія Володимирівна**

УДК 581.165:582.546.11]:631.53.027.32(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«ФІТОГОРМОНАЛЬНА ТА ТРОФІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ**  
**ЯРОВИЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**  
***IN VIVO TA IN VITRO*»**

Спеціальність 03.00.12 – «Фізіологія рослин»

(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ В. В. Чумакова

Науковий керівник: Авксентьева Ольга Олександрівна, кандидат біологічних наук,  
доцент

Харків – 2021

## АНОТАЦІЯ

Чумакова В. В. Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню алельного стану генів *Vrn*, закономірностей перебігу яровизаційних процесів у проростках пшениці м'якої озимої на фоні різного рівня їх трофічного забезпечення, а також за праймування гібереліном (ГК) у цих умовах. Досліджені алельний стан генів *Vrn* у культурі *in vitro*, їх ефекти на морфогенез за яровизації, а також вплив ГК на морфогенетичні процеси у калусах сортів озимої пшениці.

Пшениця є однією з найпоширеніших та найцінніших продовольчих культур у світі, продуктивність якої залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища. Одним із найважливіших етапів розвитку рослин озимої пшениці є процес яровизації (верналізації), для нормального проходження якого необхідний комплекс взаємодіючих екзо- та ендогенних факторів. Яровизація має метаболічну природу, яка пов'язана з фізіологічними та біохімічними процесами. Успішне проходження яровизації зумовлене трофічною та фітогормональною регуляцією, яка може визначити генетичний та епігенетичний контроль експресії генів яровизації. Генетичний та епігенетичний контроль є вагомим фактором регуляції перебігу яровизаційного процесу, який у пшениці м'якої здійснюється системою генів *Vrn*, що контролює потребу в яровизації та визначає тип розвитку рослин (ярий або озимий) та опосередковано її продуктивність. Для вивчення функціонування системи генів *Vrn*, фітогормонального та низькотемпературного впливу на процеси

регуляції морфогенезу м'якої пшениці можна використати культури *in vitro*. Отже, викладене обумовило актуальність проведених нами досліджень.

Метою роботи було з'ясувати закономірності фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. за умов *in vivo* та *in vitro*. Для досягнення даної мети були поставлені такі задачі: проаналізувати молекулярно-біологічний контроль яровизаційного процесу за алельним станом генів системи *Vrn* в умовах *in vivo* та *in vitro*; дослідити дію контрастних трофічних умов яровизації на мітотичну активність коревих меристем, динаміку ростової реакції та вмісту розчинних вуглеводів в проростках озимої пшениці; визначити вплив праймування гібереліном на накопичення біомаси, вміст та фракційний склад водорозчинних цукрів в яровизованих проростках озимої пшениці; встановити закономірності пролонгованого впливу контрастних умов трофічного забезпечення та дії гіберелінів за яровизації на темпи розвитку рослин озимої пшениці; вивчити вплив тривалості періоду яровизації та зміни фітогормонального складу живильного середовища на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці.

У всіх дослідях використані сорти озимої м'якої пшениці: Статна, Дорідна, Альянс, Астет, Миронівська 808 і Ольвія та моногеннодомінантні ізогенні за генами *Vrn* лінії (NILs) ярого типу розвитку, створені у генофоні озимих сортів Миронівська 808 і Ольвія. Залежно від задач дослідження використовували насіння, проростки та калусні культури.

Рівень трофічного забезпечення моделювали: яровизація проростків з ендоспермом (оптимальне трофічне забезпечення), яровизація проростків з ендоспермом на 3 %-ній сахарозі (надлишкове трофічне забезпечення), яровизація зародків на 3 %-ному розчині сахарозі (штучне трофічне забезпечення), яровизація ізольованих зародків на воді (відсутність трофічного забезпечення). На фоні різного трофічного забезпечення застосовували праймування проростків ГК за яровизації.

Яровизацію здійснювали при  $+4 \pm 1$  °C протягом 45-ти діб, проби для молекулярно-біологічних, цитологічних, морфофізіологічних та біохімічних

аналізів відбирали у динаміці - через 15, 30 і 45 діб після початку яровизації. Проводили ПЦР-аналіз у калусах, проростках і зернівках. Визначали: динаміку лінійного росту надземної і підземної частини проростків та накопичення біомаси, мітотичний індекс у корневих меристемах 45-добових яровизованих проростків; вміст розчинних вуглеводів у проростках за допомогою мікрометоду Швецова і Лук'яненко. Темпи розвитку рослин залежно від трофічного забезпечення та фітогормонального контролю яровизації вивчали у вегетаційних дослідах. Ефекти яровизації на калусо- і морфогенез вивчали у дослідах з пересадковою калусною культурою. Проби для аналізів відбирали у динаміці - через 15, 30 і 45 діб після початку дії пониженої ( $+4 \pm 1$  °C) температури. Вивчали ефекти ГК у складі живильного середовища на морфогенетичні реакції.

Молекулярно-біологічні дослідження алельного стану ізогенних ліній, що розвиваються швидкими темпами, показали наявність у генотипі домінантних алелей генів *Vrn-A1* та рецесивних *vrn-B1* і *vrn-D1*, а ліній, що розвиваються повільними темпами - рецесивних *vrn-A1* і *vrn-D1* та домінантного *Vrn-B1*. Незалежно від генотипу, лінії сорту Миронівська 808 розвивалися значно повільніше, ніж лінії сорту Ольвія, що можна пояснити впливом генофону сорту.

У роботі показана залежність алельного стану генів *Vrn* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу. Після 45 днів яровизації в локусі гена *Vrn-B1*, головного репресора цвітіння, відбулися зміни в алельному стані: були виявлені рецесивні і домінантні алелі в проростках, яровизованих в умовах природного та штучного трофічного забезпечення.

Дослідження, проведені в культурі *in vitro*, показали, що ізолінії за інтенсивністю калусогенезу ранжуються наступним чином: *Vrn-2* > сорт > *Vrn-1* > *Vrn-3*. Це може свідчити про участь генів *Vrn* у регуляції морфогенетичних реакцій у культурі *in vitro*. Показана стабільність алельного стану генів *Vrn* у калусній культурі пшениці озимої за умов культивування *in vitro*. Відмінності алельного стану виявлені тільки у ізолінії *Vrn-3* сорту Миронівська 808 в локусі *Vrn-B1*, що може бути пов'язано з геномними перебудовами при індукції калусогенезу.

Встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність корневих меристем яровизованих проростків пшениці озимої. На 45-ту добу яровизації найвищий мітотичний індекс був в умовах природного і штучного трофічного забезпечення процесу яровизації. А надлишок трофічного забезпечення, як і його дефіцит, інгібували процес проліферації клітин. За показниками тривалості фаз мітотичного циклу у корневих меристемах більша частина клітин знаходилася в анафазі (до 70 %), незалежно від варіанту досліджу.

Встановлено, що різний рівень трофічного забезпечення яровизації впливає на динаміку вмісту вуглеводів. Виявлено, що динаміка вмісту моноцукрів за штучного трофічного забезпечення протягом яровизації була подібною до динаміки за оптимального забезпечення у обох сортів. За надмірного трофічного забезпечення вміст моноцукрів поступово знижувався протягом яровизації у обох сортів. За відсутності трофічного забезпечення динаміка вмісту моноцукрів протягом яровизації у двох сортів Статна і Дорідна практично не змінювалася. Від 15-ї до 30-ї доби яровизації, в основному, у всіх варіантів двох сортів пшениці знижувався вміст як моноцукрів, так і суми цукрів.

Трофічне забезпечення процесу яровизації вплинуло на темпи розвитку яровизованих рослин та обумовило динаміку змін лінійного росту та накопичення біомаси. Виявлено, що максимальними показниками характеризувалися проростки, які проходили яровизацію за оптимальних трофічних умов та штучного трофічного забезпечення. Дефіцит або надлишок трофічного забезпечення інгібували ростову реакцію.

У вегетаційному досліді вивчали темпи розвитку рослин озимих сортів пшениці і було показано, що за оптимального і недостатнього трофічного забезпечення рослини значно прискорювали проходження фаз розвитку, раніше переходили до колосіння і дозрівання, ніж за його відсутності.

Показано, що ГК значно стимулював лінійний ріст надземної частини та накопичення біомаси як яровизованих проростків, одержаних з цілих зернівок, так і проростків, одержаних з ізольованих зародків. Ріст підземної частини за дії ГК практично не змінювався.

Стосовно впливу ГК на вміст вуглеводів, виявлена стимулююча дія ГК на накопичення як моно-, так і олігоцукрів на фоні нестачі трофічного забезпечення у всіх сортів. На фоні оптимального трофічного забезпечення ГК практично не змінював накопичення моноцукрів в усіх сортів.

Виявлено, що за впливу ГК тривалість періоду до фази виходу у трубку та до колосіння у сортів Статна та Альянс була значно коротшою, а у сорту Дорідна довшою. Щодо останнього сорту, то виявлену закономірність можна пояснити особливістю генотипу відносно чутливості до дії ГК.

Встановлено, що за яровизації у калусній культурі трьох сортів озимої пшениці - Дорідна, Статна та Астет відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює процес отримання рослин-регенерантів. Після 15-ти діб яровизації підвищувався рівень хлорофіло- і гемогенезу та зростала кількість меристематичних осередків у калусів.

Показана можливість оптимізувати фітогормональний склад живильного регенераційного середовища для культивування пшениці м'якої в культурі *in vitro* шляхом додаванням фітогормону ГК. Максимальна ефективність гемогенезу була за дії ГК в концентрації 0,5 мг/л, порівняно до показників у контролі та інших варіантів. При цьому, на деяких калусах спостерігалось утворення листя і колеоптилів. Щодо ризогенезу, то в усіх варіантах дослідів він відбувався достатньо інтенсивно і різниці між варіантами за цим показником не виявлено.

Наукова новизна результатів полягає в тому, що вперше показана залежність алельного стану генів *Vrn* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу. Встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність корневих меристем за яровизаційного впливу. Виявлено вплив контрастних трофічних умов яровизації та праймування гіберелінами на пролонговані ефекти регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої. Вперше проведений аналіз алельного стану генів *Vrn* у калусній культурі пшениці озимої. Сформульоване положення щодо стабільності системи генів *Vrn* за умов культивування *in vitro*. Встановлено, що за яровизації у калусній культурі озимої пшениці відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює

процес отримання рослин-регенерантів. Вперше показана можливість оптимізувати фітогормональний склад живильного регенераційного середовища для культивування пшениці м'якої в культурі *in vitro* шляхом додаванням оптимальної концентрації гіберелінів.

Уперше проведено комплексне дослідження взаємозв'язку генетичних, трофічних та фітогормональних факторів регуляції яровизаційного процесу за умов *in vivo* та *in vitro*. Показано, що трофічні умови яровизації та праймування гібереліном визначають інтенсивність мітотичної активності, хід ростової реакції проростків, динаміку накопичення розчинних цукрів та темпи розвитку рослин озимої пшениці. Результати дослідження можуть бути використані для обґрунтування нових методів регуляції темпів розвитку рослин озимої пшениці.

*Ключові слова:* пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.), ізогенні лінії, гени *Vrn*, гіберелін, яровизація, трофічне забезпечення, культура *in vitro*, темпи розвитку.

## ABSTRACT

Viktoriia V. Chumakova. Phytohormonal and trophic regulation of the vernalization process of winter wheat *in vivo* and *in vitro*. – Qualification scientific work is as a manuscript.

Thesis for a candidate degree in Biology: speciality 03.00.12 – Plant physiology (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to find out the allelic state of *Vrn* genes, the patterns of vernalization processes in soft winter wheat sprouts under contrasting conditions of trophic support, as well as the priming of gibberellin (GA) under these conditions. The allelic state of *Vrn* genes *in vitro*, their effects on morphogenesis during vernalization and the influence of GA on morphogenetic processes in callus of winter wheat varieties were studied.

Wheat is one of the most common and valuable food crops in the world, the productivity of which depends on the realization of genotype properties, as well as the impact of environmental conditions. One of the most important stages of development of

winter wheat plants is the vernalization process. A complex of interacting exogenous and endogenous factors is required for the normal passing of vernalization. It has a metabolic nature, which is associated with physiological and biochemical processes. The successful passing of vernalization is due to trophic and phytohormonal regulation, which can determine the genetic and epigenetic control of the expression of vernalization genes. Genetic and epigenetic control is an important factor of regulating of the vernalization process, which in soft wheat is carried out by the *Vrn* gene system, which controls the need for vernalization and determines the type of plant development (spring or winter) and indirectly its productivity. *In vitro* culture can be used to study the functioning of the *Vrn* gene system, phytohormonal and low-temperature effects on the processes of regulation of soft wheat morphogenesis. Thus, the above determined the relevance of our research.

The aim of the study was to find out the patterns of phytohormonal and trophic regulation of the vernalization process of winter soft wheat *Triticum aestivum* L. *in vivo* and *in vitro*. The following tasks were: to analyse the molecular biological control of the vernalization process on the allelic state of *Vrn* genes *in vivo* and *in vitro*; to study the effect of contrasting trophic conditions of vernalization on the mitotic activity of the root meristems, the dynamics of the growth reaction and the content of soluble carbohydrates in the sprouts of winter wheat; to determine the effect of gibberellin priming on biomass accumulation, content and fractional composition of water-soluble sugars in vernalized winter wheat sprouts; to establish patterns of prolonged influence of contrasting conditions of trophic support and influence of gibberellins during vernalization on rates of development of winter wheat plants; to study the influence of the duration of the period of vernalization and changes of the phytohormonal content of the nutrient medium on the morphogenetic reactions of callus culture of winter wheat varieties.

The winter soft wheat varieties were used. There were Statna, Doridna, Alians, Astet, Myronivska 808 and Olvia, and the near-isogenic lines by *Vrn* genes (NILs), created in the genotype of winter varieties Myronivska 808 and Olvia. Depending on the tasks of the study, seeds, sprouts and callus culture were used.

The level of trophic support was modelled: vernalization of sprouts with endosperm (optimal trophic support), sprouts with endosperm on 3 % sucrose (excess of trophic support), embryos with 3 % sucrose solution (artificial trophic support), embryos with water (deficit of trophic support). Under different trophic support, GA priming of sprouts during vernalization was used.

The vernalization has been carrying out at  $+ 4 \pm 1$  °C for 45 days. The samples for molecular biological, cytological, morphophysiological and biochemical analyses have been taken in the dynamics - 15, 30 and 45 days after the onset of vernalization. PCR analysis has been conducted in calluses, sprouts and seeds. The dynamics of linear growth of aboveground and underground part of sprouts and biomass accumulation, mitotic index of root meristems of 45-day-old vernalized sprouts and the content of soluble carbohydrates using the Shvetsov and Lukyanenko's micro method have been determined. The rates of plant development depending on the trophic support and phytohormonal control of vernalization have been studied in vegetation experiments. The effects of vernalization on callusogenesis and morphogenesis have been studied in experiments with transplant callus culture. The samples for analysis have been taken in the dynamics - 15, 30 and 45 days after the onset of low ( $+ 4 \pm 1$  °C) temperature. The effects of GA in the nutrient medium on morphogenetic reactions have been studied.

Molecular biological studies of the allelic state of fast-growing isogenic lines have shown the presence of dominant alleles of *Vrn-A1* and recessive *vrn-B1* and *vrn-D1* genes in the genotype and slow-growing lines - recessive *vrn-A1* and *vrn-D1* and the dominant *Vrn-B1*. Regardless of the genotype, the lines of the Myronivska 808 variety have developed much more slowly than the lines of the Olvia variety, which can be explained by the influence of the variety's genotype.

The dependence of the allelic state of *Vrn* genes on trophic conditions and the duration of the vernalization process was shown. After 45 days of vernalization, there were changes in the allelic state of the main repressor of flowering, the locus *Vrn-B1*. The recessive and dominant alleles were detected in sprouts, vernalized under conditions of natural and artificial trophic support.

*In vitro* research has shown that NILs are ranked according to the intensity of callusogenesis as follows: Vrn-2 > variety > Vrn-1 > Vrn-3. This may indicate the involvement of *Vrn* genes in the regulation of morphogenetic responses *in vitro* culture. The stability of the allelic state of *Vrn* genes in callus culture of winter wheat under *in vitro* cultivation has been shown. Differences in the allelic state were found only in the Vrn-3 line of Myronivska 808 at the *Vrn-B1* locus, which may be associated with genomic rearrangements by the induction of callusogenesis.

The stimulating effect of exogenous sucrose on the mitotic activity of root meristems of vernalized sprouts of winter wheat has been established. On the 45th day of vernalization, under conditions of natural and artificial trophic support the highest mitotic index have been detected. The excess of trophic support, as well as its deficit, has inhibited the process of cell proliferation. According to the duration of the phases of the mitotic cycle in the root meristems, most of the cells were in anaphase (up to 70 %), regardless of the variant of the experiment.

It has been found that contrasting conditions of trophic support of vernalization have affected the dynamics of carbohydrate content. The dynamics of the monosaccharides content with artificial trophic support during vernalization was similar to the dynamics under optimal support in both varieties. Under excess of trophic support, the content of monosaccharides has gradually decreased during vernalization in both varieties. Under deficit of trophic support, the dynamics of the content of monosaccharides in the two varieties Statna and Doridna has not changed. From the 15th to the 30th day of vernalization, basically, in all variants of two wheat varieties, the content of monosaccharides and the total sugars has decreased.

Trophic support of the vernalization process influenced on the rates of development of vernalized plants and determined the dynamics of changes of linear growth and biomass accumulation. The maximum indicators were characterized by sprouts vernalized under optimal and artificial trophic support. Deficit or excess of trophic support inhibited the growth response.

In the vegetation experiment the rates of development of winter wheat plants have been studied. It has been shown that plants with optimal and deficit of trophic support

significantly accelerate the passing of development phases and earlier passed to earing and maturation than with its deficit.

It has been shown that exogenous GA significantly stimulate the linear growth of the aboveground part and the accumulation of biomass of both vernalized sprouts grown with and without endosperm. Under the GA influence the growth of the underground part has not changed.

Regarding the GA influence on the carbohydrate content, the stimulating effect of GA on the accumulation of both monosaccharides and oligosaccharides has been revealed under the deficit of trophic support in all varieties. Under optimal trophic support, GA practically has not changed the accumulation of monosaccharides in all varieties.

It has been found that under the GA effect the duration of the earing period in the varieties Statna and Alians is significantly shorter and in the variety Doridna longer. The identified pattern in Doridna can be explained by the feature of the genotype regarding the sensitivity to the GA influence.

Under vernalization in the callus culture of three varieties of winter wheat - Doridna, Statna and Astet, intense morphogenetic reactions have been revealed. These reactions have significantly stimulated the process of obtaining regenerating plants. After 15 days of vernalization, the level of chlorophyll and hemogenesis and number of meristematic loci in calluses have been increased.

To optimize the phytohormonal content of the nutrient regenerating medium for the cultivation of soft wheat *in vitro* by adding the phytohormone has been shown. The maximum efficiency of hemogenesis has been under the GA concentration of 0.5 mg/l, compared other variants. At the same time, the formation of leaves and coleoptiles has been observed in some calluses. In all variants of the experiment rhizogenesis has been quite intense and the difference between the variants has not been detected.

The scientific novelty of the results is that the dependence of the allelic state of *Vrn* genes on the trophic conditions and the duration of the vernalization process has been firstly shown. The stimulating effect of exogenous sucrose on the mitotic activity of root meristems under vernalization has been established. The influence of contrasting trophic

conditions of vernalization and priming by gibberellins on prolonged effects of regulation of rates of development of winter wheat plants has been revealed. The allelic state of *Vrn* genes in callus culture of winter wheat has been analysed firstly. It has been stated the stability of the *Vrn* gene system under *in vitro* culture. In the callus culture of winter wheat during vernalization intense morphogenetic reactions have been occurred. It has been significantly stimulated the process of obtaining regenerating plants. It has been shown to optimize the phytohormonal content of the nutrient regenerating medium for the cultivation of soft wheat *in vitro* by adding the optimal concentration of gibberellins.

The complex research of the relationship between genetic, trophic and phytohormonal factors regulating the vernalization process *in vivo* and *in vitro* has been conducted. It has been shown that the trophic conditions of vernalization and priming by gibberellin determine the intensity of mitotic activity, growth reactions of sprouts, dynamics of accumulation of soluble sugars and rates of development of winter wheat plants. The results of the study can be used to substantiate new methods of regulating the rates of development of winter wheat plants.

*Key words:* soft wheat (*Triticum aestivum* L.), isogenic lines, *Vrn* genes, gibberellin, vernalization, trophic support, *in vitro* culture, rates of development.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Публікації у фахових виданнях України:

1. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.**, Жмурко В. В. Аллельные варианты генов VRN и темпы развития изогенных линий мягкой пшеницы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 17–21. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).
2. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем, ріст та розвиток озимої пшениці. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 2 (5). С. 4–9. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
3. Авксентьева О. А., Зубрич А. И., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Эффекты генов контроля темпов развития растений в формировании индивидуальной продуктивности пшеницы и сои. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. № 23. С. 261–267. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
4. **Чумакова В. В.**, Авксентьева О. О. Вплив праймування гібереліном за яровизації на ріст та вміст розчинних вуглеводів в проростках пшениці м'якої. *Біологічні системи: теорія та інновації*. 2018. № 287. С. 173–183. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
5. **Chumakova V. V.**, Avksentieva O. A. Effect of trophic support on the dynamics of growth processes and carbohydrate content of winter wheat sprouts under vernalization. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 2018. Vol. 31. P. 138–147. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Публікація у фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази:**

6. Авксентьєва О. О., **Шулік В. В.** Алельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*. *Biosystems Diversity*. 2016. Vol. 24, No 1. С. 222–229. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень) (Web of Science).

**Наукова праця, в якій опубліковані основні наукові результати дисертації у зарубіжному спеціалізованому виданні:**

7. Avksentiieva O. O., **Shulik V. V.**, Taran N. Yu. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of *Vrn* genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018. Vol. 64. No. 1. P. 73–81. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Наукова праця, яка додатково відображає наукові результати дисертації:**

8. Жмурко В. В., Авксентьєва О. О., Юхно Ю. Ю., Попова Ю. В., Самойлов А. М., Тимошенко В. Ф., Васильченко М. С., **Шулік В. В.**, Зубрич О. І. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості і потреби в яровизації на фізіолого-біохімічні процеси у рослин пшениці м'якої та сої культурної. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. 2017. С. 187–196. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та статистичній обробці результатів досліджень).

**Наукові праці апробаційного характеру за темою дисертації:**

9. **Шулік В. В.**, Авксентьєва О. О. Молекулярно-біологічне дослідження алельного стану генів контролю темпів розвитку *Triticum aestivum* L. // Молодь і поступ біології : матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, 20–23 квітня 2015 р., Львів, 2015. С. 532. (Здобувач брала участь

*в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

10. **Шулик В. В.** Аллельное состояние локусов генов системы Vrn пшеницы мягкой в условиях *in vivo* и *in vitro* // Матеріали ІІ Міжнародного форуму студентів, аспірантів і молодих учених, 23–24 квітня 2015 р., Дніпропетровськ, 2015. С. 468.

11. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.** Изучение аллельных вариантов локусов генов VRN пшеницы мягкой в течение яровизации и в связи с темпами развития // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий : материалы VIII съезда общества физиологов растений России, 21–26 сентября 2015 г., Петрозаводск, Россия, 2015. С. 24. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*

12. **Shulik V. V.**, Koskova V. A. Trophic factors effect on the proliferative activity of apical meristem of winter wheat two varieties under vernalization // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали IV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 12–14 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. С. 316–317. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

13. **Шулік В. В.**, Кириленко А. С., Коскова В. А. Вплив трофічного фактору на алельний стан гену VRN-A1 та морфометричні показники проростків озимої пшениці за яровизації // Біологічні дослідження – 2016 : матеріали VII Всеукраїнської науково-практичної конференції для молодих учених і студентів, 10–11 березня 2016 р., Житомир, 2016. С. 142–143. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

14. **Шулік В. В.** Біоінформаційне дослідження системи генів яровизаційного контролю у представників родини Poaceae // Біологія: від молекули до біосфери : матеріали X Міжнародної конференції молодих учених, 2–4 грудня 2015 р., Харків, 2015. С. 31.

15. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Молекулярно-генетичні дослідження системи генів *VRN in vivo та in vitro* // Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці : матеріали міжнародної конференції, присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення, 1–3 червня 2016 р., Одеса, 2016. С. 67–68. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
16. Авксентьева О. А., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Роль генетических систем контроля темпов развития растений в детерминации каллусогенеза изолиний NILs пшеницы и сои // Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма : материалы годовичного собрания Общества физиологов растений России, 21–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург, 2016. С. 87–88. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
17. **Шулік В. В.** Вплив трофічного фактору за умов яровизації на вміст редукуючих цукрів у проростках озимої пшениці // Біологія: від молекули до біосфери : матеріали XI Міжнародної конференції молодих учених, 29 листопада–2 грудня, 2016 р., Харків, 2016. С. 107–108.
18. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Популяризація знань з біології рослин в роботі викладачів кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2017. С. 54–56. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
19. **Шулік В. В.**, Самойлов А. М. Молекулярно-біологічні методи дослідження фізіологічних процесів рослин та мікроорганізмів як складова підготовки магістрів на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2016. С. 63–65.

*(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

20. **Шулік В. В.** Дослідження впливу різних умов трофічного забезпечення на фізіолого-біохімічні процеси та алельний стан гену *Vrn-A1* в проростках озимої пшениці упродовж яровизації // Біологія рослин і біотехнологія : III конференція молодих учених, 16–18 травня 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 31.

21. Avksentiieva O. A., **Shulik V. V.**, Taran N. Yu. Research of Influence of Contrasting Trophic Conditions of Vernalization on the Allelic State of *VRN* Genes and the Development Rates of *Triticum aestivum* L. // SmartBio : International Conference, 18–20 May 2017 : abstr., Kaunas, 2017. P. 23. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

22. **Шулік В. В.** Дослідження впливу сахарози та гіберелінів на вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках озимої пшениці // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 320–321. має бути наведено так, як на обкладинку

23. Терентьєва Н. В., Степченкова С. В., **Шулік В. В.**, Авксентьєва О. О. Вплив ліофілізованого препарату молозива корів на ростову реакцію та морфо-фізіологічні особливості калусної культури // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 86–88. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

24. Avksentiieva O. O., **Shulik V. V.**, Terentiieva N. V. Culture *in vitro* - model system for the study of morphogenetic and adaptative potential of soft wheat *Triticum aestivum* L. // Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences : International research and practice conference, 27–28 December 2017, Lublin, 2017. С. 263–267. *(Здобувач брала участь*

*в експериментальній частині роботи, статистичній обробці та обговоренні результатів досліджень).*

25. **Shulik V. V.** Effect of low-temperature exposure on the morphogenesis reactions of the callus culture of winter wheat // Клеточная биология и биотехнология растений : Междунар. науч.-практ. конф., 28–31 мая 2018 г. : тез. докл. Минск, 2018. С. 56–57.

26. **Chumakova V. V.** The role of *Vrn* genes system, phytohormonal and trophic regulation of vernalization process of winter wheat *in vivo* and *in vitro* // Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : IV Міжнародна наукова конференція, 9–10 жовтня 2018 р. : тези доп. Харків, 2018. С. 27–28.

27. **Чумакова В. В.** Вплив фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури озимої м'якої пшениці // Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : V Міжнародна наукова конференція, 12–13 лютого 2020 р. : тези доп. Харків, 2020. С. 89–90.

28. **Chumakova V., Avksentyeva O.** Morphogenetic Responses of Winter Wheat Callus Culture Under Prolonged Period of Low-Temperature Exposure // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020. № 30 (3). P. 287. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

## ЗМІСТ

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>ВСТУП</b> .....                                                                   | 21 |
| <b>РОЗДІЛ 1</b> .....                                                                | 27 |
| <b>ЯРОВИЗАЦІЙНИЙ ПРОЦЕС ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ ПРОГРАМИ</b>                             |    |
| <b>РОЗВИТКУ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ</b> .....                                          | 27 |
| 1.1 Яровизація – фізіологічний процес .....                                          | 27 |
| 1.2 Генетичний та епігенетичний контроль яровизації <i>Triticum aestivum</i> L. .... | 35 |
| 1.3 Вплив трофічних факторів на процес яровизації.....                               | 42 |
| 1.4 Фітогормональний контроль яровизаційних змін .....                               | 45 |
| 1.5 Культура <i>in vitro</i> – модельна система досліджень в біології рослин.....    | 48 |
| <b>Висновки до розділу 1</b> .....                                                   | 57 |
| <b>РОЗДІЛ 2</b> .....                                                                | 58 |
| <b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....                                          | 58 |
| <b>2.1 Рослинний матеріал</b> .....                                                  | 58 |
| <b>2.2 Умови досліджень</b> .....                                                    | 59 |
| 2.2.1 Схеми експериментів <i>in vivo</i> .....                                       | 59 |
| 2.2.2 Схеми експериментів <i>in vitro</i> .....                                      | 63 |
| <b>2.3 Методи дослідження</b> .....                                                  | 65 |
| 2.3.1 Молекулярно-біологічні .....                                                   | 65 |
| 2.3.2 Методи визначення вмісту вуглеводів, мітотичного індексу, темпів               |    |
| розвитку рослин .....                                                                | 69 |
| 2.3.3 Методи культури <i>in vitro</i> .....                                          | 71 |
| 2.3.4 Статистичні методи .....                                                       | 73 |
| <b>Висновки до розділу 2</b> .....                                                   | 73 |
| <b>РОЗДІЛ 3</b> .....                                                                | 74 |
| <b>МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЯРОВИЗАЦІЙНОГО</b>                               |    |
| <b>ПРОЦЕСУ</b> .....                                                                 | 74 |
| 3.1 Алельний стан локусів генів яровизації та темпи розвитку пшениці .....           | 74 |
| 3.2 Молекулярно-генетичні дослідження генів <i>Vrn</i> за різних трофічних           |    |
| умов яровизації .....                                                                | 80 |

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3 Алельний стан локусів генів <i>Vrn</i> за умов культури <i>in vitro</i> .....                                                                    | 85  |
| <b>Висновки до розділу 3</b> .....                                                                                                                   | 91  |
| <b>РОЗДІЛ 4</b> .....                                                                                                                                | 92  |
| <b>ВПЛИВ КОНТРАСТНИХ ТРОФІЧНИХ УМОВ ЯРОВИЗАЦІЇ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ</b> .....                                            | 92  |
| 4.1 Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем .....                                 | 92  |
| 4.2 Вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках озимої пшениці.....                                                                         | 97  |
| 4.3 Вплив контрастних трофічних умов яровизації на ріст проростків та темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці .....                              | 104 |
| <b>Висновки до розділу 4</b> .....                                                                                                                   | 118 |
| <b>РОЗДІЛ 5</b> .....                                                                                                                                | 119 |
| <b>ФІТОГОРМОНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ ЯРОВИЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ</b> .....                                                                                        | 119 |
| 5.1 Дослідження впливу гіберелінів в період яровизації на ріст і вміст розчинних вуглеводів проростків озимої пшениці.....                           | 119 |
| 5.2 Темпи розвитку яровизованих рослин сортів пшениці за дії гіберелінів в період яровизації .....                                                   | 127 |
| <b>Висновки до розділу 5</b> .....                                                                                                                   | 131 |
| <b>РОЗДІЛ 6</b> .....                                                                                                                                | 132 |
| <b>ДОСЛІДЖЕННЯ ЯРОВИЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ В СИСТЕМІ КУЛЬТУРИ <i>IN VITRO</i></b> .....                                                                   | 132 |
| 6.1 Вплив тривалості яровизації на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці.....                                               | 132 |
| 6.2 Дослідження впливу фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури сортів озимої пшениці ..... | 143 |
| <b>Висновки до розділу 6</b> .....                                                                                                                   | 148 |
| <b>УЗАГАЛЬНЕННЯ</b> .....                                                                                                                            | 149 |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....                                                                                                              | 153 |
| <b>ДОДАТКИ</b> .....                                                                                                                                 | 174 |

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Дослідження систем регуляції росту, розвитку та онтогенезу рослин є актуальним завданням сучасної фітофізіології (Авксентьева, Жмурко, 2011). Пшениця м'яка - одна з найцінніших продовольчих культур у світі, продуктивність якої залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища, що діють на кожному етапі онтогенезу (Моргун, 2010; Gol, 2017). Одним із найважливіших етапів розвитку рослин озимої пшениці є процес яровизації, для нормального проходження якого необхідний комплекс взаємодіючих екзо- та ендогенних факторів. Вагомим фактором регуляції перебігу яровизаційного процесу є генетичний контроль, який у пшениці м'якої здійснюється за системи генів *Vrn*, що контролює потребу в яровизації та визначає тип розвитку рослин (ярий або озимий) та опосередковано її продуктивність (Стельмах, 2000; Henderson, 2003; Dennis, Peacock, 2009). За сучасності достатньо інтенсивно досліджуються молекулярно-генетичні механізми експресії генів *Vrn* за яровизації (Cockram, 2007; Щербань, Салина, 2013; Zhang et al, 2015; Muterko et al, 2015).

Вуглеводи як основні фактори трофічної регуляції виконують роль сигнальних молекул – універсальних регуляторів експресії генів детермінації процесів росту, і розвитку (Rolland et al, 2002; Koch, 2004; Eveland, Jackson, 2011).

Фітогормональний статус займає вагоме місце в регуляції процесів індукції флорального морфогенезу рослин, а також регуляції яровизації (верналізації). Серед відомих класів фітогормонів саме ГК можуть частково заміняти дію низьких температур, сприяючи цвітінню деяких рослин (Pearce, 2013). ГК взаємопов'язані з вуглеводами на рівні регуляції трансдукції гормональних та цукрових сигналів за дії стресових факторів (Rosa, 2009; Firuzeh et al, 2015) та їх метаболічної активності (Silva Vieira et al., 2013).

Дослідження взаємозв'язку фізіолого-біохімічних і генетичних процесів у пшениці м'якої важливе для поглиблення існуючих уявлень про механізми її екологічної пластичності.

Однак в даний час не досліджено питання взаємозв'язку трофічних, генетичних та фітогормональних процесів регуляції яровизаційного процесу. Не досліджені також пролонговані ефекти трофічних умов яровизації та дії фітогормонів на темпи розвитку рослин озимої пшениці.

За сучасності використання методів культури *in vitro* стає одним з найпоширеніших інструментів досліджень у фізіології рослин. Основою методів культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин є унікальна властивість рослинних клітин – тотипотентність. Дуже широко застосовуються методи культури *in vitro* в дослідженні основної сільськогосподарською культури – пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. Новітні біотехнологічні розробки у галузі клітинних технологій дозволяють успішно їх використовувати для одержання нових форм рослин, а також для вдосконалення існуючих сортів. На даний час дослідження ведуться для поліпшення пшениці з метою підвищення врожайності та зведення до мінімуму її втрат у зв'язку з несприятливими умовами навколишнього середовища та ін.

Дослідження генетичних систем контролю яровизації в культурі *in vitro* майже не проводяться. Малочисельні дослідження впливу ГК на морфогенетичні реакції калусних культур.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася у рамках держбюджетної теми НДР кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна «Дослідження молекулярно-генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин *in vivo* та *in vitro*» № держреєстрації 0118U 002104 та тем НДР за грантом Фонду розвитку і модернізації наукового та навчально-наукового обладнання Харківського Національного Університету імені В. Н. Каразіна «Модернізувати і розробити комплекс наукового-навчального обладнання для програмованого культивування

та ідентифікації молекулярних маркерів особливостей росту і розвитку рослин та мікроорганізмів» шифр 811Н/9-15, розробити комплекс науково-навчального обладнання для дослідження фоторецепторних систем регуляції росту і розвитку рослин» шифр 811Н/10-16, «Розробити комплекс навчально-наукового обладнання для дослідження ефектів екзогенних індукторів спрямованості шляхів морфогенезу *in vitro* *Triticum aestivum* L. та *Glycine max* (L.) Merr.» шифр 811Н/12-18.

### **Мета і завдання досліджень.**

Мета досліджень – з'ясувати закономірності фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. за умов *in vivo* та *in vitro*.

Для досягнення даної мети були поставлені такі задачі:

- 1) проаналізувати молекулярно-біологічний контроль яровизаційного процесу за алельним станом генів системи *Vrn* в умовах *in vivo* та *in vitro*;
- 2) дослідити дію контрастних трофічних умов яровизації на мітотичну активність коревих меристем, динаміку ростової реакції та вмісту розчинних вуглеводів в проростках озимої пшениці;
- 3) визначити вплив праймування гібереліном на накопичення біомаси, вміст та фракційний склад водорозчинних цукрів в яровизованих проростках озимої пшениці;
- 4) встановити закономірності пролонгованого впливу контрастних умов трофічного забезпечення та дії гіберелінів за яровизації на темпи розвитку рослин озимої пшениці;
- 5) вивчити вплив тривалості періоду яровизації та зміни фітогормонального складу живильного середовища на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці.

**Об'єкт дослідження:** закономірності фітогормональної, трофічної та генетичної регуляції яровизаційного процесу *Triticum aestivum* L.

**Предмет дослідження** – перебіг фізіолого-біохімічних, цитогенетичних, морфологічних та морфогенетичних процесів і темпи розвитку озимої пшениці, що знаходяться під контролем генів *Vrn* за умов *in vivo* та *in vitro*.

**Методи досліджень:** молекулярно-біологічні – для визначення алельного стану генів *Vrn*, фізіолого-біохімічні – для визначення вмісту розчинних вуглеводів, цитогенетичні і мікроскопічні – для визначення проліферативної активності меристем, вегетаційні досліді, фенологічні спостереження і морфофізіологічні – для визначення характеру ростових процесів та темпів розвитку, біотехнологічні – для досліджень в культурі *in vitro*, статистичні – для визначення достовірності одержаних результатів. Обробку результатів експериментальних досліджень здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показана залежність алельного стану генів системи *Vrn* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу. Встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність корневих меристем за яровизаційного впливу. Виявлено вплив контрастних трофічних умов яровизації та праймування гіберелінами на пролонговані ефекти регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої.

Вперше проведений аналіз алельного стану генів *Vrn* – системи генетичного контролю яровизації у калусній культурі пшениці озимої. Сформульоване положення щодо стабільності системи генів *Vrn* – регуляторних генів контролю розвитку озимої пшениці за умов культивування *in vitro*. Встановлено, що за тривалого впливу позитивними температурами у калусній культурі озимої пшениці відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює процес отримання рослин-регенерантів. Вперше показана можливість оптимізувати фітогормональний склад поживного регенераційного середовища для культивування пшениці м'якої в культурі *in vitro* шляхом додаванням фітогормону ГК<sub>3</sub>.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати дослідження трофічної, генетичної та фітогормональної регуляції яровизаційного процесу можуть стати підґрунтям для розробки нових методів та агроприйомів регуляції темпів розвитку рослин озимої пшениці. Отримані експериментальні дані та узагальнення мають важливе значення для розуміння механізмів регуляції

пластичності онтогенезу рослин пшениці м'якої. Встановлені закономірності стимуляції позитивними температурами та оптимізацією фітогормонального складу поживного середовища морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* можуть бути враховані при біотехнологічних дослідженнях пшениці м'якої *Triticum aestivum* L.

Результати роботи використовуються при викладанні нормативного курсу «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів «Системність регуляції онтогенезу рослин», «Прикладна біохімія та біотехнологія рослин» та «Методи культури *in vitro* вищих рослин» на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, також вони слугували основою курсових, кваліфікаційних робіт бакалаврів та магістрів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертант самостійно опрацював наукову літературу за темою дисертації, обґрунтував мету і задачі досліджень, спланував і провів експерименти, оволодів необхідними методами, провів статистичну обробку результатів дослідів. За участю наукового керівника проаналізував отримані результати та підготував наукові публікації.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Авсентьєвою О. О., Жмурко В. В., Таран Н. Ю., Тимошенко В. Ф., Юхно Ю. Ю., Поповою Ю. В., Самойловим А. М., Васильченко М. С., Зубрич О. І.

**Апробація результатів дисертації.** Апробація матеріалів дисертації була проведена на дванадцяти наукових конференціях:

- XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів (Львів, 20-23 квітня 2015 р.);
- VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні дослідження - 2016» для молодих учених і студентів (10-11 березня 2016 р., Житомир);
- X і XI Міжнародних конференціях молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2-4 грудня 2015 р., 29 листопада - 2 грудня, 2016 р.);

- III Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 11-12 листопада, 2014 р.);
- II науково-методичному інтернет-семінарі «Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук» (Харків, 14 грудня 2016 р.);
- VI Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 14-16 листопада 2017 р.);
- Міжнародній науково-практичній конференції «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Люблін, Польща, 27–28 грудня, 2017 р.);
- Міжнародній науково-практичній конференції «Клеточная биология и биотехнология растений» (Мінськ, Республіка Білорусь, 28-31 травня 2018 р.);
- IV і V Міжнародній науковій конференції «Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти» (Харків, 9-10 жовтня 2018 р., 12-13 лютого 2020 р.);
- 44-й Щорічній конференції молодих вчених Холод в біології та медицині: «Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 19 травня 2020 р.).

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення, висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Робота ілюстрована 19 таблицями та 42 рисунками. Список використаних джерел містить 217 найменувань, з них 78 кирилицею та 139 латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### ЯРОВИЗАЦІЙНИЙ ПРОЦЕС ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ ПРОГРАМИ РОЗВИТКУ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

#### 1.1 Яровизація – фізіологічний процес

Яровизація (верналізація) – фізіологічний процес, який відбувається в організмі рослин, зокрема озимих або дворічних, і обумовлений тривалою дією низьких позитивних температур. Такий вплив необхідний для формування флорального стимулу у озимих форм рослин і сприяє прискоренню їх розвитку та зацвітання [1, 39]. В помірних широтах, де є кліматичні зміни – зміни пори року – протягом зимового періоду, під впливом короткого дня і низьких температур, відбувається яровизація пшениці озимої. Навесні відбувається підвищення температури і подовження тривалості світлового дня, що є закінченням періоду низькотемпературного впливу і переходом рослин до наступних етапів онтогенезу [74].

Перші експериментальні дослідження з яровизації були проведені на початку ХХ століття німецьким фізіологом рослин Г. Гаснером. У його дослідках насіння ярих і озимих сортів пшениці, жита та ячменю, пророщене у холодильнику при знижених температурах, висівалося навесні в період з березня по червень. Автор проводив фенологічні спостереження за строками переходу рослин до колосіння. Результати показали, що ярі сорти переходили до колосіння у всіх варіантах досліду. Рослини озимих сортів переходили до колосіння залежно від температури пророщування і строків сівби. Посіяні у березні колосилися при всіх варіантах температур пророщування насіння. З насіння, висіяного у квітні, рослини колосилися у варіантах, у яких температура пророщування до посіву була від 1-2 до 12 °С, апри сівбі у травні – тільки рослини, вирощені з насіння, яке пророщували при 5-6 °С. За результатами Г. Гаснер дійшов висновку, що озимі сорти потребують дії холоду. Без неї вони не здатні переходити до цвітіння і плодоношення [8, 39].

Вчений Мельхерс у 1939 році висунув гіпотезу про фізіологічну природу явища яровизації, а саме, що у період яровизації відбувається утворення гіпотетичної речовини гормональної природи – верналіна, що може транспортуватися по рослині і ініціювати закладання квіток [1].

Однак, у більшості рослин закладання квіток не відбувається безпосередньо під час дії низьких температур, а лише після дії сприятливих температур. Низькі температури грають роль індуктора. Тому деякі автори вважають, що термін «яровизація» є рівноцінним терміну «термоіндукція» [10].

Про фізіологічну природу яровизаційного процесу у 1958 році писали М. Х. Чайлахян та його учень Ланг [77, 141, 142]. Вони надавали велике значення комплексу гормонів цвітіння. Була висунута наступна гіпотеза: низька температура викликає відповідний термоіндукований стан, для якого характерний певний рівень цукрів, утворюється особливий метаболіт верналін, який у рослин на довгому дні перетворюється в гібереліни, а в умовах короткого дня такого перетворення не відбувається [77]. Тому автори вважали, що саме перетворення верналіну у гіберелін, який, власне, індукуює здатність озимих до цвітіння. Однак, верналін не був ідентифікований і гіпотеза про його роль у регуляції розвитку озимих рослин не підтверджена експериментально. Інші автори вважали, що термоіндукція викликає синтез гіберелінів або депресію генів, що впливає на дію багатьох ферментів [39].

Дослідженнями про вплив температури на розвиток ярих і озимих злаків та інших видів рослин займався радянський агроном, азгодом академік, Т. Д. Лисенко. Результати своїх дослідів, проведених у 1925-1930 роках, 1935 року він узагальнив у статті «Теоретичні основи яровизації», що входить в основну працю «Агробіологія». В даній роботі описані закономірності стадійності розвитку рослин, а також деякі приклади практичного використання цих знань [44].

Стосовно стадійності розвитку рослин, зміни, які відбуваються в зародках за умов передпосівної яровизації, є одна зі стадій розвитку озимих форм рослин. Без цих змін рослини озимих сортів не можуть переходити до генеративної фази розвитку. Для проходження рослиною стадії яровизації, так само як і для

проходження інших стадій розвитку, необхідний комплекс внутрішніх та зовнішніх факторів. Для розвитку рослин властива послідовність (черговість) проходження окремих стадій розвитку. Проходження кожної наступної стадії розвитку може початися тільки після закінчення попередньої стадії розвитку і тільки при наявності відповідних для даної стадії умов зовнішнього середовища [44]. Розподіл процесу розвитку на стадії, запропонований автором, відображав закономірності перебігу онтогенезу, однак які саме фізіолого-біохімічні процеси відбуваються протягом стадії яровизації, він не розкрив.

Розробкою методики штучної яровизації рослин як агротехнічного прийому, поряд з дослідженнями процесу яровизації, займався Т. Д. Лисенко. Однак дана методика не дала очікуваного позитивного ефекту на продуктивність озимих злаків. Тим не менше, яровизацію можна використовувати для селекції рослин: для отримання насіння в зимовий період в теплицях, кліматичних камерах або фітотронах [44]. В умовах вегетаційного дослідження, можна отримати 2-3 покоління насіння в рік, що має важливе значення для прискорення селекційного процесу [23, 39, 53].

Щодо існуючих гіпотез чи концепцій відносно фізіолого-біохімічних механізмів яровизації, то нині, крім вище названих, сформульоване положення про те, що прискорення темпів розвитку озимих злаків у результаті яровизації пов'язане з інтенсифікацією трофічних процесів [74].

За результатами вивчення типів розвитку рослин їх розділили на групи відповідно до їх реакції на тривалу дію низьких температур:

- озимі форми, дворічники і деякі багаторічники – рослини, які не переходять до генеративного розвитку без впливу протягом певного періоду дії низьких температур;

- дворучки – рослини, у яких розвиток прискорюється за впливу яровизації, проте цей вплив не є обов'язковим. Вони розвиваються при осінній сівбі як озимі, а при весняній – як ярі;

- ярі форми – рослини, які не потребують дії низьких температур для переходу до цвітіння [1, 72].

Тривалість періоду впливу низьких температур, необхідна для переходу до колосіння рослин озимих форм, різниться не лише в залежності від виду, але і сорту. У більшості рослин цей період становить 1-3 місяці. Якщо період яровизації занадто короткий або його перервати підвищенням температури вище 15 °С, то спостерігається «роз'яровизація», тобто перехід до генеративного стану у рослин значно сповільнюється, або вони зовсім до нього не переходять. Установлено, що тривалість яровизації залежить від географічного походження виду або сорту рослин. Стосовно озимої пшениці, то найбільш ефективною для неї є тривалість яровизації – від 35 до 60 діб [8, 23, 39, 53].

Для різних видів або сортів може варіювати температурний діапазон яровизуючих температур, що обумовлено адаптацією до умов певної кліматичної зони. Найбільш ефективні температури 1-7 °С. Для деяких злаків цей діапазон становить від 0 °С і до -6 °С. Найбільш ефективними для яровизації озимої пшениці є температури від 0 до +4 °С. Будь-яка з ефективних температур може викликати перехід до генеративного стану, але якщо вплив буде достатньо тривалим для даної культури чи сорту [8, 39].

Різні види рослин проходять яровизацію на відповідних стадіях онтогенезу: для пшениці – це стадія зародків у зернівках, або у фазі кущення вегетуючих рослин, як це відбувається у природі. Для пшениці було виявлено, що рослини здатні до цвітіння, якщо витримати ізольовані зародки в умовах знижених температур. Новоутворені з точок росту клітини, які зазнали впливу знижених температур, є яровизованими [126, 192, 193].

Тривалу дію низьких температур здатна сприймати точка росту або апікальна меристема. При настанні сприятливих умов у меристемі відбуваються метаболічні зміни: збільшується кількість РНК, активуються гідролітичні ферменти, ізоелектрична точка білків зсувається в кислу сторону, посилюються окислювальні процеси. Дані зміни зберігаються, бо при поділі меристематичних клітин передаються поколінням нових клітин. Незважаючи на так звану «клітинну пам'ять», насіння озимих однорічних і дворічних культур, отримане з яровизованих рослин, потребує нової яровизації [150]. Можливо, це обумовлено

процесами мейозу при утворенні мега- і мікроспор [39]. Дані процеси лежать в основі епігенетичних змін і до цих пір досліджуються. Саме тому, процес яровизації часто наводять як приклад і пояснення про механізми епігенетичної регуляції розвитку [188].

Зміни, що відбуваються протягом верналізації, є зворотними. Іншими словами, можлива «роз'яровизація», яка обумовлена дією підвищених температур + 25-40 °C безпосередньо одразу після впливу яровизації (ранник крилатий, *Scrophularia nodosa* L.). «Роз'яровизовані» рослини та насіння можна знову яровизувати [39].

У деяких рослин роз'яровизацію може викликати вплив короткого фотоперіоду. У низки сортів озимої пшениці короткий день та безперервне освітлення за температури вище 18-20 °C, коли яровизація не може відбуватися, зумовлюють перехід до колосіння [39, 74]. Отже, у процесі яровизації температура і фотоперіод виступають як взаємозамінні фактори [99, 74, 139].

Дію знижених температур (яровизацію) можна замінити обробкою рослин гіберелінами, яка сприяє переходу до цвітіння довгоденних рослин жита, озимого ріпаку, моркви та ін. [94, 147].

Підвищена весняна і літня температура у поєднанні здовгим фотоперіодом затримують проходження яровизації у пшениці озимої [45, 53, 192, 193].

Для нормального проходження яровизаційного процесу необхідний комплекс зовнішніх і внутрішніх факторів: температура, вода, кисень, фітогормональний статус і поживні речовини [23]. Вода є одним із необхідних факторів. Оскільки за її участі, зокрема, відбувається проростання насіння. Відомо, що рослини озимих злаків, у тому числі і пшениці м'якої, проходять яровизацію на етапі проростання (накльовування) насіння, упродовж якого вода надходить до насіння і спричинює його набухання. У процесі набухання за дії ферментів відбувається гідроліз запасних речовин. Останні залучаються до обміну і використовуються для живлення зародку. Зокрема, утворюються цукри, які необхідні для забезпечення пластичним та енергетичним матеріалом процесу яровизації [8, 49, 52, 54].

Наявність кисню грає також важливу роль, оскільки він пов'язаний з процесами аеробного дихання. А енергія, яка є необхідною для синтетичних процесів, є результатом дихання [8, 39, 50, 54].

Відповідно до робіт багатьох авторів озимість рослин пов'язана з накопиченням вітамінів. Було встановлено, що в листках ярих та озимих яровизованих рослин пшениці за весняної сівби, вміст вітаміну С і вітамінів групи В був більшим у порівнянні зі вмістом у неяровизованих озимих рослин, які за даних умов не колосилися [73, 74, 75]. На думку авторів це зв'язок пов'язано з тим, що вітаміни беруть участь в регуляції процесів метаболізму, так як є коферментами багатьох ферментів.

Фітогормони можуть впливати на протікання процесів верналізації. Зокрема гібереліни (ГК) на етапі проростання насіння, коли вже можлива яровизація, активують синтез ферментів гідролаз: під дією нуклеаз нуклеїнові кислоти ДНК і РНК розпадаються до пуринів, які потім використовуються для синтезу цитокінінів, а утворені протеази каталізують розпад білків до амінокислот, серед яких є триптофан, який є попередником ауксинів. Разом ауксини і цитокініни регулюють ріст і розвиток зародку: перші активують розтягнення, а другі поділ клітин [8, 39, 50].

Ауксини задіяні в фізіолого-біохімічних процесах упродовж яровизації. Вони грають вагомую роль у процесі надходження води в клітини зародку (зокрема індоліл-3-оцтова кислота, ІОК). За дії ІОК відбувається збільшення об'єму вакуолі, що зумовлює розтягнення клітинних стінок. Ауксини запускають каскад реакцій та активують синтез білків [37, 51].

Цитокініни контролюють метаболізм – активують найважливіші ферменти, а гібереліни впливають на експресію генів, що кодують ферменти. У дводольних, зокрема бобових рослин, цитокініни беруть участь в мобілізації запасних поживних речовин. А у однодольних цю функцію виконують гібереліни [45, 51].

Стосовно ролі абсцизової кислоти (АБК), то вона є гормоном спокою [45]. Регуляція виходу насіння зі стану спокою полягає в посиленні впливу ГК

і послабленні дії АБК. Останнє відбувається в результаті інактивації АБК, що призводить до зниження вмісту фітогормону за дії ферменту гідролази [55].

Процеси, що відбуваються упродовж яровизації, визначаються взаємодією фітогормонів. У процесі проростання насіння розвивається апекс пагону, де синтезується ауксин, який активує коренеутворення. Як наслідок цього, посилюється синтез цитокініну, який необхідний для росту, морфогенезу і функціонування верхівки пагону [45, 51, 55].

Отже, яровизація є необхідним процесом, який зумовлює перехід рослин озимого типу розвитку та дворічників до генеративного стану. Вона відбувається у тісній взаємодії зовнішніх (температура, кисень, вода, фотоперіод) та внутрішніх факторів (метаболических та фітогормональних процесів). Кульмінацією розвитку рослин є перехід від вегетативного до репродуктивного етапу розвитку.

Згідно з роботами М. Х. Чайлахяна, існують два типи регуляторних механізмів, які впливають на перехід рослини від етапу молодості до зрілості – автономний та індукований [77]. Автономна регуляція – це віковий контроль, який полягає в тому, що рослина лише в певному віці переходить до етапу цвітіння, незалежно від умов середовища. Індукована регуляція викликається певними факторами середовища – температура, світло, вологість, тривалість дня і ночі, мінеральне живлення і т.д. [135].

За сучасними уявленнями функціонують яровизаційний і гібереліновий шляхи регуляції цвітіння, які тісно переплітаються між собою. Згідно з роботами М.Х. Чайлахяна існують чотири механізми або шляхи індукції цвітіння: фотоперіодичний, яровизаційний, автономний або віковий та гібереліновий. На кінцевому етапі індукції цвітіння результат їх інтегральної дії є цвітіння. Кожний шлях пов'язаний з утворенням і дією речовини білкової природи, а також стимулу цвітіння – флоригену [63, 77].

Реакції у відповідь на яровизацію були описані у численних видів квіткових рослин і вивчені на фізіологічному рівні. Порівняльний аналіз яровизаційного процесу у різних сільськогосподарських культур, а також у відомого модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana*, виявив ряд загальних властивостей і характеристик, за

допомогою яких схематично можна відобразити природу механізму цих реакцій (рис. 1.1) [133].

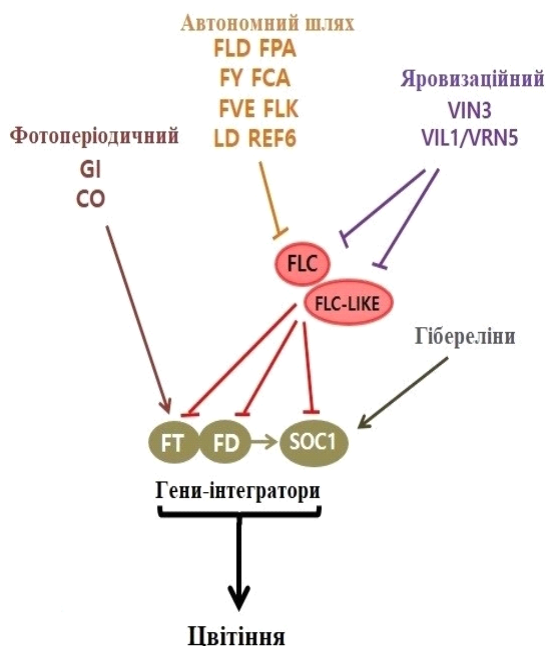


Рис. 1.1 Генетична регуляторна мережа, яка контролює цвітіння у рослин *Arabidopsis thaliana* L. (узагальнено-спрощена схема): «←» активація, «⊥» інгібування [133]

За допомогою молекулярно біологічних досліджень з'ясована наявність у рослин білка, який задіяний у індукції переходу верхівкової меристеми до флорального морфогенезу і названого флоригеном за аналогією гіпотетичного фітогормона М. Х. Чайлахяна.

Хімічну природу флоригену було відкрито німецькими і британськими дослідниками: це білок, що є продуктом експресії гена FLOWERING LOCUS T (FT) [104, 105]. Генетичний локус FT було ідентифіковано у багатьох представників вищих рослин. Насамперед, у модельного об'єкта молекулярно-генетичних досліджень *Arabidopsis thaliana* L. ген FT виявився гомологом (ортологом) гена *Vrn 3*, який контролює потребу у яровизації у *Triticum aestivum* L., оскільки кодує інгібітор RAF-кінази, подібно FT [207]. Крім того, ще одним ключовим геном у регуляції процесу генеративного розвитку є CONSTANS (CO), який кодує цинк-білок, що у відповідь на довгий день індукує транскрипцію FT.

Отже, зв'язок генних локусів CO-FT є універсальною складовою процесів індукції цвітіння у багатьох рослин різних фотоперіодичних груп [63]. Експресія генів FT і *Vrn 3* посилюється внаслідок яровизації, яка пригнічує активність основного репресора цвітіння FLOWERING LOCUS C (FLC) і його аналога у м'якої пшениці *Vrn 2* – ключового гена, що репресує квіткову стеблову апікальну меристему [151].

Таким чином, яровизація має метаболічну природу, яка пов'язана з фізіолого-біохімічними і генетичними процесами, що протікають в рослині як цілісній системі. Для нормального протікання даного процесу важливим є реалізація програми розвитку через генетичну, епігенетичну, фітогормональну та трофічну регуляцію у комплексі з екзогенними факторами, насамперед температурними умовами і, окрім цього фотоперіодом, достатнім рівнем вологості та трофічного забезпечення і присутністю кисню.

## **1.2 Генетичний та епігенетичний контроль яровизації *Triticum aestivum* L.**

У пшениці реакція на яровизацію контролюється, щонайменше, п'ятьма генами *Vrn*: *Vrn-A1* (*VRN1*), *Vrn-B1* (*VRN2*), *Vrn-D1* (*VRN3*), *Vrn-D4* (*VRN4*) і *Vrn-B3* (*VRN5*) [128, 134, 166, 207, 208, 209]. Дані гени були клоновані. Три основних гени *Vrn-A1*, *Vrn-B1* і *Vrn-D1*, локалізовані відповідно в хромосомах 5AL, 5BL і 5DL, а *Vrn-B3* – у хромосомі 7BS [25, 137, 189, 207, 215]. Також у результаті ідентифікації послідовності гена *VRN4*, було виявлено, що він є транслокованою копією гена *VRN1* і розташований в проксимальному районі хромосоми 5DS [134, 195].

Різні поєднання алелів генів системи *Vrn* лежать в основі різноманітності сортів м'якої пшениці за ознакою яровості / озимості: озимий тип розвитку рослин проявляється тільки у тому випадку, якщо три основних гени є рецесивними [58, 137]. При цьому присутність лише одного домінантного гену *Vrn-A1* забезпечує повну нечутливість рослин до яровизації, домінантні гени *Vrn-B1* і *Vrn-D1* тільки частково знижують потребу в ній. Таке припущення є основою класифікації сортів пшениці за типом розвитку. До ярих віднесли рослини з домінантним геном

*Vrn-A1*, які не реагують на яровизацію, до напівозимих – з домінантними алелями *Vrn-B1*, *Vrn-D1* [25, 26, 42, 58].

***Vrn-A1 (VRN1)*.** Домінантний алель гену *Vrn-A1* не визначає потреби пшениці у яровизації. Вважається, що озима форма з рецесивним алелем є диким типом, а яра форма виникла внаслідок делеції 7222 п.н. в області першого інтрона у тетраплоїдної пшениці та делеції 1375 п.н. у гексаплоїдної [119, 207]. *Vrn-A1* має п'ять різних алельних форм: *Vrn-A1a*, *Vrn-A1b*, *Vrn-A1c*, *Vrn-A1d* та *Vrn-A1e* [207].

*Vrn-A1a* найпоширеніший з алелів в генотипах *T. aestivum* і є результатом дублювання промоторних областей. Два *foldback* фрагменти промоторної області відрізняються на 222 п.н. і 131 п.н., одним ОНП (однонуклеотидним поліморфізмом, або SNP, *Single nucleotide polymorphism*) та делецією 91 п.н. Ці фрагменти однакові несуть вставки і дублікацію *host direct duplication* (HDD) 9 п.н. [96, 208].

Стосовно алеля *Vrn-A1b*, то для нього характерна делеція 20 п.н. в 5'-нетрансльованій області (UTR) і дві мутації у HDD. Алель *Vrn-A1c* має велику делецію в інтроні 1. *Vrn-A1d* був виявлений лише у тетраплоїдної пшениці *T. dicoccoides*, а *Vrn-A1e* охарактеризовано тільки в тетраплоїдної пшениці *T. dicoccum*. Останні два алелі є результатом двох різних делецій 32 і 54 п.н. у HDD і CArG-бокс, які розташовані в промоторі [208].

***Vrn-B1 (VRN2)*.** Два рецесивних алелі *Vrn-B1*, мають п'ять SNP і дві інерції 1 п.н. в інтронах 1 і 2. Домінантний алель *Vrn-B1* виник в результаті делеції 6850 п.н. в інтроні 1 [119]. Відомо три алельні варіанти домінантного алеля *Vrn-B1*: *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b* та *Vrn-B1c*. *Vrn-B1a* має делецію 440 п.н. в інтроні 1 рецесивного алелю, що характерно для озимого типу розвитку. *Vrn-B1b* виник після делеції 36 п.н. та SNP (G-C) в алелі *Vrn-B1a* [176]. *Vrn-B1c* виник через делецію 817 п.н. або ж дуплікацію або транслокацію фрагмента 450 п.н. в інтроні 1 *Vrn-B1* [153].

***Vrn-D1 (VRN 3)*.** Наявність домінантного алеля *Vrn-D1* в генотипі пшениці не визначає необхідність яровизації [216]. Домінантний алель *Vrn-D1*, який характерний для ярого типу, має делецію 4235 п.н. в інтроні 1 у порівнянні з рецесивним алелем *Vrn-D1*, який був позначений *Vrn-D1a* [216, 217].

Для пшениці м'якої за силою фенотипічного прояву гени системи *Vrn* можна представити в наступному порядку:  $VRN1 > VRN3 > VRN4 \geq VRN2 > VRN5$  [19]. Взаємодії між *VRN1*, *VRN2* і *VRN3* генами утворюють регуляторну петлю зворотного зв'язку і, отже, зміна рівнів транскриптів будь-якого з цих генів впливає на рівень транскриптів інших (рис. 1.2) [60, 192, 193].

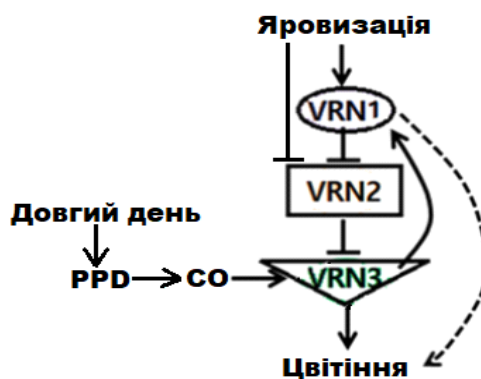


Рис. 1.2 Схема процесу термоіндукції цвітіння у м'якої пшениці: трикутник - активатор, квадрат - репресор, овал - upstream-репресор репресора; «←» активація, «+» репресія [133]

Озимі сорти пшениці висівають восени, вони яровизуються за низької температури і короткого дня протягом осені та зими і зацвітають навесні при довгому дні. Восени цвітінню пшениці перешкоджає репресор цвітіння *VRN2*, який пригнічує транскрипцію гена *VRN3* (рис. 1.2). Яровизація індукує експресію гена *VRN1*. Останній є репресором гена *VRN2*, який репресує *VRN3* [128]. Протягом осінньо-зимового періоду, за умов короткого дня та тривалого періоду низьких температур, відбувається зростання експресії гена *VRN1*, що сприяє збільшенню рівня експресії *VRN3*. Навесні, за умов довгоденного фотоперіоду, гени *PPD1* і *CONSTANS (CO)* підсилюють експресію *VRN3*. Останній підсилює транскрипцію *VRN1*, що ініціює цвітіння [60, 128, 192, 193].

Гени верналізації мають плейотропні ефекти. Локус *Vrn-A1*, як основна мішень епігенетичної регуляції, впливає на перехід до колосіння, елонгацію пагону, фізіологічну зрілість, а також може модулювати архітектуру кореневої системи [97, 108, 200]. *Vrn-A1* функціонує не лише за дії тривалого періоду низьких

температур – процесу верналізації, але і протягом періоду від елонгації пагону до зрілості [128]. Окрім цього, система генів *Vrn* впливає на багато біологічних характеристик, які є цінними для адаптації до змін навколишнього середовища та врожайного потенціалу пшениці, що робить її важливою для досліджень і селекції [42, 96, 101, 195].

До виявлення генів *Vrn* у пшениці, найбільш повно був вивчений генетичний контроль яровизації на прикладі модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana* L., де перехід рослин від ярого до озимому типу розвитку детермінований одним домінантним геном FRIGIDA (FRI) [69]. Проте основним репресором цвітіння у рослин *A. thaliana* є ген *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Останній кодує MADS-box фактор транскрипції, який експресується в клітинах з високою активністю мітотичних поділів, що призводить до інгібування цвітіння [205].

Гени *VRN1* і *VRN2* пшениці не пов'язані з *VRN1* і *VRN2* *A.thaliana*. *VRN1* є гомологом гена *AP1 (APETALA 1)* у *A. thaliana*, який сприяє цвітінню пшениці, а також кодує MADS-бокс транскрипційні фактор [156, 96]. Ген *VRN3* – гомолог гена *FT (FLOWERING LOCUS T)* *A. thaliana* [207, 208, 209], що кодує інгібітор Raf-кінази, подібно *FT*. Ген *VRN2*, що кодує білок CCT-домен, блокує експресію *VRN3*. Ген *VRN2* не має гомологів у *A. thaliana*, але пригнічує цвітіння аналогічно гену *FLC (FLOWERING LOCUS C)* [105]. Незважаючи на те, що у злаків і *A. thaliana* різні гени контролюють відповідь на яровизацію, однак механізми регуляції часу цвітіння у них дуже схожі. Виходячи з цього було виявлено, що *FT (VRN3)* є основним регулятором і індуктором цвітіння, який активує ген *AP1 (VRN1)* [182, 187]. Останній кодує транскрипційні фактор, що забезпечує трансформацію клітин апікальної меристеми стебла в клітини генеративних тканин. Ген-індуктор знаходиться під контролем репресора *FLC (VRN 2)*, який є провідником зовнішніх сигналів (температури і фотоперіоду) [110, 111, 119, 156].

За сучасними уявленнями ключовими у процесі переходу рослин пшениці від вегетативного до генеративного етапу розвитку є декілька генетичних систем: гени *Vrn* (vernalization), що визначають реакцію пшениці на яровизацію; гени *Ppd* (photoperiod), що визначають реакцію пшениці на тривалість дня; комплекс генів

*Eps-earliness perse* (скоростиглість як така) і гени *Vrd*, які визначають тривалість яровизаційного періоду [69, 71, 101, 113, 133]. Ці гени, впливаючи на темпи розвитку рослин [58], визначають ряд інших господарсько цінних ознак: структуру врожаю, морозо- і зимостійкість, стійкість до захворювань. Проте роль цих генетичних систем неоднакова. При цьому більшість дослідників сходяться на думці, що головну роль відіграють дві перші системи, а саме 70 % генетично зумовленого варіювання тривалості періоду «сходи-колосіння» детерміновано генами *Vrn*, 25 % – генами *Ppd* і тільки 5 % – іншими генами [63, 188].

Генетична система *Vrn* яровизаційного контролю пов'язана з системою генів *Ppd* фотоперіодичного контролю. У пшениці реакція на фотоперіод контролюється локусами *PHOTOPERIOD 1 (PPD1)* – *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, розташованими на коротких плечах хромосом 2A, 2B і 2D. Гени *PPD1*, ідентифіковані у пшениці, є членами *PSEUDO-RESPONSE-REGULATOR (PRR)* сімейства [89, 198].

У кожному з геномів пшениці в генах *PPD1* є значні делеції, що призводить до зниженої чутливості рослин до фотоперіоду. У пшениці делеція 2089 п.н. в промоторі *PPD-D1* відповідає за семі домінантний фотоперіод-нечутливий алель для раннього цвітіння, пов'язаний із місекспресією *PPD-D1* та підвищеною експресією *VRN3* в умовах короткого дня [110, 111, 123].

За сучасності розроблені генетичні мережі регуляції цвітіння пшениці в залежності від яровизації і фотоперіоду, а також стресу (рис. 1.3) [65]. У пшениці м'якої репресором ключового гена *VRN1* є MADS-box транскрипційний фактор *VRT2 (VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2)* [130]. Довгий фотоперіод у неяровизованих рослин посилює експресію *VRT2*, а яровизація інгібує *VRT2* (рис. 1.3). Необхідно зазначити, що інтегратором сигнальних шляхів у відповідь на тривалий вплив низьких температур і зміну тривалості дня є ген *VRN3*. За умов довгого дня ген *PPD1* індукує експресію *VRN3*. Білковий продукт гена *VRN3*, що є флоригеном, в апікальній меристемі взаємодіє з bZIP-білком *FDL2*, який взаємодіє з промотором гена *VRN1*, активуючи його транскрипцію [143, 144]. Експресія *VRN3* стимулює транскрипцію *VRN1* до рівня, необхідного для ініціації цвітіння [65, 110, 111].

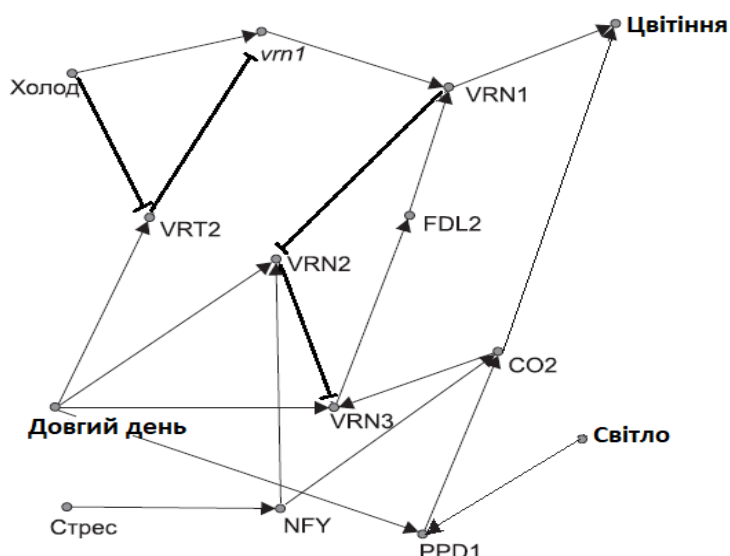


Рис. 1.3 Генетична мережа регуляції цвітіння пшениці в залежності від яровизації, фотоперіоду і стресу: «←» активація, «⊖» інгібування гена; *vrn1* - рецесивний алель гена *VRN1*, *VRT2* - *VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2*, *FDL2* - *FD-like 2*, *PPD1* - *PHOTOPERIOD 1*, *NF-Y* - *NUCLEAR FACTOR-Y*, *CO2* - *CONSTANS 2* [65].

Взаємодія між білками, що мають CCT домени *CONSTANS 2* (*CO2*), і транскрипційними факторами *NF-Y* (*NUCLEAR FACTOR Y*) грає важливу роль в інтеграції шляхів передачі сигналів. CCT-білки *ZCCT 1* і *ZCCT 2*, гени яких розташовані в локусі *VRN2*, а також білок *CO2* взаємодіють з одним сімейством *NF-Y*-білків [143]. Гени *PPD1* і *CO2*, які беруть участь у відповідь на фотоперіод, підсилюють експресію *VRN3* на довгому дні, тоді як *VRN2* є репресором цвітіння. Регуляція цвітіння відбувається в результаті конкуренції репресора цвітіння *VRN2* (*ZCCT1*) і активатора *CO2* за взаємодію з *NF-Y*-комплексом [65, 96].

Процес яровизації є одним з яскравих прикладів епігенетичної регуляції. Відомо, що епігенетичні зміни – це ті генетичні зміни, які можуть стабільно підтримуватися протягом багатьох поділів соматичних клітин, при цьому не пов'язані зі змінами структури ДНК [9, 192, 193]. Виділяють два типи механізмів епігенезу – транскрипційні, в основі яких лежать механізми модифікації ДНК, та пост транскрипційні – модифікації гістонових білків [9, 76].

Функціонування вище описаних механізмів забезпечують не лише специфічні білки-ферменти (ДНК-метилтрансферази, гістонметилтрансферази, ацетилтрансферази тощо), але і різні низькомолекулярні некодуючі РНК, що відносяться або до малих інтерферентних РНК (siRNA), або до мікро-РНК (miRNA). Ці РНК відповідають за збірку специфічних білкових комплексів та їх заякорюванню на ділянках ДНК, що піддаються іншим модифікаціям [9, 45, 197].

Мішенню епігенетичної регуляції є *FLC*-репресор – у випадку *A.thaliana*, тоді як у злаків – ген *VRN1*. Шляхи регуляції у даних рослин відрізняються, але механізми подібні. Клітини апікальної меристеми швидко діляться у процесі мітозу, реагують на верналізацію і передають наступним поколінням клітин відповідну генетичну інформацію. Дане явище називають "клітинною пам'яттю" [109]. Пам'ять у злаків виникає внаслідок деметилювання лізину 27 (H3K27) і збільшення рівня метилювання лізину 4 гістона H3 (H3K4), що свідчить про те, що яровизація сприяє активації *VRN1*. Стосовно генів *VRN2* і *VRN3* зміни рівня метилювання H3K27 не були виявлені, що дозволило припустити, що *VRN1* є основною мішенню епігенетичної регуляції генів яровизації у злаків [76, 80, 165, 196].

В основі механізму детермінації чутливості до яровизації і терміну колосіння лежать мутації в регуляторних районах *VRN1* [79, 156]. Делеції в цій ділянці (в межах 2000 п.н. першого інтрона) у більшості випадків призводять до втрати реакції на яровизацію, а також до ярого типу розвитку [76, 119, 185]. Було висунуто припущення, що цей район містить сайт, як і у гена *FLC*, що обумовлює ініціацію специфічного білкового комплексу, який здійснює процес метилювання (деметилювання) гістонових білків. Отже, даний сайт може бути відповідальним за підтримку репресивного стану хроматину, що призводить до озимого типу розвитку рослин пшениці [76, 197].

Отже, за сучасності з'ясовані вагомі аспекти генетичних та епігенетичних процесів, які відбуваються за верналізації та забезпечують протікання процесу переходу озимих злаків до генеративного розвитку.

### 1.3 Вплив трофічних факторів на процес яровизації

У 20-80-х роках ХХ століття активно проводилися дослідження фізіолого-біохімічних процесів у пшениці за умов яровизації проростків і рослин. Ідентифікація *Vrn* генів яровизаційного контролю розвитку гексаплоїдної м'якої пшениці зумовила переважання більшості робіт з вивчення механізмів експресії генів на молекулярному рівні [65, 110, 111, 207, 208, 209]. Це стало однією з причин того, що дослідження фізіолого-біохімічних процесів за яровизації та їх можливої ролі у регуляції розвитку озимих злаків практично припинилися.

Оскільки молекулярно-генетичні процеси пов'язані безпосередньо з протіканням в рослинному організмі метаболічних процесів, які здійснюються за участю трофічних факторів, ферментів і фітогормонів, то доцільно провести дослідження можливого зв'язку та взаємовпливу системи генів *Vrn* та умов протікання яровизації на фізіолого-біохімічні процеси [173, 180, 214].

Трофічне забезпечення грає вагомую роль для успішного проходження процесу яровизації рослин злакових, у тому числі пшениці. Необхідний запас пластичних речовин міститься в ендоспермі насіння, що включає білки, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, пігменти, вітаміни, ферменти і неорганічні речовини. У процесі проростання під впливом ферментів (амілази, протеїнази, ліпази та ін.) відбувається гідроліз складних органічних макромолекул (крохмаль, білки, жири та ін.) до низькомолекулярних сполук. Ці ферменти знаходяться в ендоспермі або зародку в зв'язаному, неактивному стані, та під впливом набухання активуються [51, 55].

Протягом процесу яровизації важливу роль в регуляції його регуляції можуть грати вуглеводи, оскільки вони не тільки виконують пластичну та енергетичну, а ще й функціонують як сигнальні молекули у експресії низки генів [82, 115, 149].

Розчинні вуглеводи, або цукри, відіграють ключову роль у фізіолого-біохімічних процесах на ранніх етапах онтогенезу. Розчинні вуглеводи є сигнальними молекулами і задіяні у реакціях-відповідях на ряд стресів, що активізують специфічні шляхи трансдукції стресового або гормонального сигналу, в результаті чого відбуваються важливі модифікації експресії генів [87, 88, 136,

149, 174, 212]. Цукри можуть виступати у якості низькомолекулярних антиоксидантів та впливати на осмотичні потенціали в клітинах, а також функціонувати як сигнальні молекули для передачі низькотемпературного сигналу. Під впливом холоду за дії гідролітичних ферментів в клітинах збільшується рівень вмісту гексоз – глюкози, та декількох олігосахаридів - рафінози, стахіози і, особливо, сахарози [212].

У роботах багатьох дослідників є дані щодо активності ферментів у проростках озимих злаків за умов яровизації [35, 56, 74, 75]. За впливу низьких температур може зростати активність деяких ферментів, зокрема  $\alpha$ -амілази [13] і інвертази [36]. Для неярвизованих рослин озимої форми пшениці активність амілази є нижчою у порівнянні з активністю у ярих і ярвизованих озимих форм [32]. Показано також, що у листках ярвизованих рослин зростала гідролітична, проте знижувалася синтетична активність інвертази [74].

У зернівках злаків, у тому числі пшениці, крохмаль є домінуючим джерелом простих вуглеводів у процесі проростання. У процесах гідролізу крохмалю беруть участь ферменти  $\alpha$ -амілаза і  $\beta$ -амілаза. На етапі проростання насіння, надходження води зумовлює активацію ферментів, які знаходяться в ендоспермі або зародку в зв'язаному, неактивному стані, у результаті чого утворюються прості вуглеводи [8, 39, 50, 55]. Після повного гідролізу крохмалю утворюється мальтоза, яка в клітинах щитка зародку гідролізується  $\alpha$ -глюкозидазою, і, разом з глюкозою, перетворюються в сахарозу за дії ферменту сахарозофосфатсинтази через гексозофосфатний пул [82, 158].

Сахароза є розчинним дисахаридом, а також головною транспортною формою вуглеводів рослинного організму, який виконує енергетичну, пластичну, сигнальну та інші функції [135, 212]. Саме сахароза є переважаючою транспортною формою цукрів у флоемі, проте вона не може безпосередньо бути використана для процесів обміну [22]. Ендогенна сахароза та глюкоза або діють як субстрати для клітинного дихання, або як осмоліти для підтримки клітинного гомеостазу, тоді як фруктоза не пов'язана з осмолітичним захистом і з синтезом вторинних метаболітів [174].

За участі одного з ключових ферментів вуглеводного обміну в рослині – інвертази (або сахарози,  $\beta$ -фруктофуранозидази), сахароза гідролізується до відновлюючих цукрів глюкози і фруктози. Активність інвертази може свідчити про розподіл транспортних і метаболічних форм цукрів в рослинному організмі упродовж процесу яровизації. У роботах дослідників Сисакяна (1937,1954), Коновалова і Попова (1941), Опаріна і Зенченко (1949) показано, що у проростках озимої пшениці, вирощених з яровизованого насіння, відбувалося зростання гідролітичної та зниження синтетичної активності даного ферменту [цит. за 74].

Розчинні вуглеводи впливають на експресію багатьох генів, що беруть участь у фотосинтезі, гліколізі [97], азотному метаболізмі і метаболізмі сахарози, регулюють клітинний цикл за рахунок експресії CysD [172] та ін. Цукровий сигналінг може також перетинатися з іншими сигнальними шляхами [160], зокрема, зниження експресії трегалозо-6-фосфат синтази обумовлює down-регуляцію гену FT (Flowering Locus T - MADS-box), який у *Arabidopsis thaliana* відповідає за яровизацію і надзвичайно пізнє цвітіння рослин [120]. Цукри можуть пригнічувати мобілізацію поживних речовин, розвиток та ріст у довжину надземної частини рослини [173]. Екзогенна сахароза може компенсувати дію регуляторів меристеми пагону та кореня [114].

Вуглеводи, які включені в трофічні процеси, поряд з пластичною функцією в рослині, можуть бути задіяні в експресії генів Vrn [192, 193, 204]. Установлено, що тільки за пророщування в умовах дії низької температури, повній темряві або на світлі, з додаванням розчину сахарози, а також за наявності в атмосфері CO<sub>2</sub>, рослини озимої пшениці здійснюють перехід до колосіння [27]. Метаболічні фактори в процесі яровизації озимих злаків – необхідна і достатня умова для переходу рослин до колосіння, а отже і експресії генів Vrn. Таким чином, у яровизованих рослин озимих злаків за весняного посіву відбувається активація і встановлюється збалансованість протікання трофічних, фітогормональних і ензиматичних процесів, що обумовлює перехід рослин до колосіння. У рослин, які не проходили стадію яровизації, гени Vrn неекспресовані, тому дані процеси інгібуються і рослини не переходять до колосіння [192, 193].

Отже, роль трофічних факторів у процесі яровизації може бути однією з необхідних умов її протікання, а відтак і переходу озимих злаків рослин до генеративної фази. В період яровизації розчинні цукри можуть виступати як трофічні субстрати, транспортні форми вуглеводів, осмоліти – захисники від низькотемпературного стресу та сигнальні молекули, що можуть опосередковано регулювати розвиток рослин через експресію генів-регуляторів розвитку або їх епігенетичний контроль.

#### **1.4 Фітогормональний контроль яровизаційних змін**

Серед усіх фітогормонів, які беруть участь у процесі цвітіння, гібереліни вважаються найбільш вивченим класом. Рослинні гормони відіграють певну роль у регуляції генеративної стадії розвитку [106, 132]. Гібереліни (гіберелінова кислота, ГК) – це велика група тетрациклічних дитерпеноїдних карбонових кислот, з яких основними біологічно активними формами є переважно ГК1, ГК3 та ГК4, що функціонують як гормони росту у вищих рослинах [93, 206]. Серед відомих фізіологічних ефектів гіберелінів в рослинному організмі можна навести такі: подовження стебла, збільшення кількості міжвузлів, стимуляція процесів проростання насіння, закладки і розвитку плодів тощо [45].

Окрім участі в регуляції переходу до цвітіння рослин, ГК грають ключову роль в механізмах відповіді на абіотичний стрес. За дії декількох стресів, у тому числі холоду, сольового та осмотичного стресу, було показано зниження рівня ГК та їх сигналіngu, що сприяло інгібування ростових процесів рослин [102]. В умовах сольового та осмотичного стресів було встановлено, що обробка ГК сприяла зменшенню вмісту білкового, небілкового та загального азоту та одночасному зростанню вмісту розчинних цукрів [118]. Таке зростання вмісту розчинних вуглеводів може бути зумовлене їх функцією осмотичних регуляторів в клітинах, а також, вірогідно, інгібування процесів перетворення розчинних цукрів у нерозчинні полісахариди (наприклад, целюлози) [118].

Як наслідок, розчинні цукри можуть зменшувати інгібуючі ефекти сольового стресу на транскрипцію певних генів. Зниження транскрипції малих і великих

субодиниць рибулозобісфосфаткарбоксилази (РБФК) під час сольового стресу, вірогідно, є однією з причин накопичення розчинних вуглеводів у листках [136]. Стосовно, загального вмісту білків та ферментів білкового синтезу, то гібереліни, вірогідно, стимулюють синтез білків теплового шоку (БТШ або *heatshockprotein*, HSP), які є білками стійкості, що є одним з симптомів толерантності рослин до умов стресу [194]. Також причиною збільшення білка є роль ГК у захисті макромолекул, таких як ДНК і білки, від дії реактивної форми кисню (Reactive oxygen species, ROS) [202].

Гібереліни відіграють надзвичайно важливу роль у процесах проростання насіння. При надходженні води в насіння відбувається синтез і перетворення ГК, які активують специфічні гени, експресія яких не відбувається у стані спокою, в результаті чого неактивні гідролітичні ферменти активуються і розщепляють резервні речовини ендосперму: наприклад, ГК1 і ГК2 індукують експресію гена  $\alpha$ -амілази в алеїроновому шарі насіння, внаслідок чого під дією ферменту відбувається гідроліз крохмалю, утворюються в низьких концентраціях розчинні цукри (глюкоза, фруктоза, сахароза) [51, 175].

Отже, виходячи з вище сказаного, вуглеводи і ГК взаємопов'язані на рівні регуляції трансдукції гормональних та цукрових сигналів та їх метаболічної активності. Вуглеводи і фітогормони можуть контролювати ферменти, що беруть участь у синтезі / деградації крохмалю і накопиченні сахарози [136]. Показано, що гібереліни можуть підвищувати активність ферменту сахарозофосфатсинтази, внаслідок чого відбувається стимулювання експорту сахарози з листя, що впливає на репродуктивний розвиток рослин [184].

Дослідниками було висунуті твердження, що ГК беруть участь у регулюванні процесів у продовж яровизації [77, 40, 141]. Окрім цього, механізми фотоперіодичної, автономної, яровизаційної та гіберелінової регуляції цвітіння у рослин м'якої пшениці досить консервативні [161]. Загальна спрощена схема регуляції цвітіння у злаків, зокрема аспекти яровизаційної і гіберелінової регуляції, наведена на рис. 1.4.



Рис. 1.4 Схема регуляції цвітіння у м'якої пшениці: гормональний та генетичний контроль [161].

ГК можуть частково замінити довгоденний фотоперіод [144] або період дії низьких температур, сприяючи при цьому цвітінню довгоденних рослин [95], а саме шляхом активації експресії безпосередньо відповідального за цвітіння гена *SUPPRESSOR OF CO OVEREXPRESSION (SOC1)* в умовах короткого дня [127, 161]. Експресію останнього, а також гена *FT*, інгібує ген *FLC*. Флориген, або *FT*-білок, в апікальній меристемі поєднується з транскрипційним фактором *FD*-білком, утворюючи *FT/FD*-комплекс, який активує гени *APETALA 1 (AP1)* і *SOC1*, що викликають експресію гена *LFY*. Необхідно зазначити, що ген *AP1* у *A.thaliana* є гомологом *VRN1* у *T.aestivum*, який сприяє цвітінню злаків, а також кодує *MADS*-бокс транскрипційні фактор [208, 209]. ГК через експресію *SOC1* можуть підсилювати експресію гена ідентичності квіткової меристеми *LFY*, який індукує квітковий морфогенез в стебловій апікальній меристемі [103, 161]. Довгий день і період яровизації стимулюють експресію генів, які кодують біосинтез ГК, а також сприяють підвищенню активності ГК [147, 180].

Окрім того, відомо, що верналізація стимулює збільшення вмісту ГК у озимого ріпаку або *Brassica napus* [214], *Brassica rapa* [190], цикорію [129],

редису [152] і озимої пшениці [170], а також попередників активних ГК у еustomи *Eustoma grandiflorum* [154].

Отже, аналіз літератури дає підставу припустити, що гормональна регуляція відіграє вагомий роль у протіканні яровизаційних процесів. Вірогідно, що гібереліни задіяні у їх регуляції опосередковано, через активацію трофічних (метаболических) та генетичних процесів. Однак дія гіберелінів на процес яровизації за різного рівня трофічного її забезпечення, зокрема вуглеводами, за різного рівня потреби у яровизації, контрольованої певним станом генів VRN, практично не досліджена. На нашу думку, з'ясування цього питання вагомим для розширення уявлень про механізми регуляції яровизаційного процесу, а отже і темпів розвитку пшениці озимої.

### **1.5 Культура *in vitro* – модельна система досліджень в біології рослин**

Культура *in vitro* є зручною моделлю для дослідження регуляторних процесів росту і розвитку, у тому числі програми морфогенезу рослин [11, 54, 59]. Методи культури *in vitro* рослин ґрунтуються на унікальній властивості соматичних клітин рослини – тотипотентності, тобто здатності відновлювати цілісний організм з окремої соматичної клітини. При цьому, в клітинах відбувається процес дедиференціювання, що призводить до втрати спеціальних функцій і появи нових властивостей, в тому числі здатності клітин до необмеженого розмноження [15].

Морфогенез рослин – це сукупність процесів росту та розвитку організму, що включає організацію клітин в тканини, тканин в органи, органів в організм. У рослин морфогенез є постійним процесом. В культурі *in vitro* морфогенетичний потенціал рослинної клітини проявляється більш широко, порівняно з умовами *in vivo* [30]. Два шляхи морфогенезу, що ведуть до регенерації всієї рослини, включають або соматичний ембріогенез, або органогенез пагону з подальшим органогенезом коренів. Обидва шляхи розвитку можуть відбуватися або безпосередньо без проміжної стадії калюсогенезу, або після даної стадії. До регенерації через органогенез, як і через соматичний ембріогенез, здатні не всі види рослин. Більшість з них можуть регенерувати одним або іншим із цих шляхів

Спрямованість відповідного шляху морфогенезу обумовлено комплексом внутрішніх та зовнішніх факторів [81].

Стосовно першого шляху, то на здатність рослин до калусогенезу та регенерації впливають ендегенні фактори: генотип, епігенетична характеристика експланту, фізіологічний статус інтактних рослин; екзогенні фактори – географічне походження, культуральне середовище, умови культивування (температура, світло, вологість, тривалість світлового періоду або фотоперіод), а також взаємодія між цими факторами [24, 90].

Не менш важливим фактором, що визначає успішність отримання первинного калусу та прояв морфогенетичних реакцій є вибір експланта з врахуванням його фізіологічного стану та епігенетичної характеристики. Правильно підібраний експлант на відповідній стадії розвитку рослини обумовлює ефективність культивування і отримання регенерантів [15, 146, 201]. Ювенільні (незрілі) тканини і органи завжди більш пластичні з точки зору здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж зрілі. Окрім того, при виборі експланту слід віддавати перевагу тканинам і органам з меристематичною активністю, оскільки вони мають кращу приживаність в культурі та більшу швидкість росту. Спрямованість морфогенезу на клітинному рівні пов'язана з активністю проліферації, росту і диференціації клітин в певному меристематичному оточенні [15, 41].

У більшості випадків в якості основного фактору, що визначає успішність культури *in vitro*, розглядаються особливості генотипу [2, 24, 43]. Дедиференційовані калусні клітини зберігають властивості, характерні для рослин в умовах *in vivo* [40, 41]. Однак гени, які детермінують інтенсивність калусоутворення, не пов'язані з генами контролю прояву морфогенезу. Процеси ембріогенезу та регенерації, калусогенезу з соматичних і генеративних органів і тканин знаходяться під контролем різних генів [29, 70].

Протягом тривалого субкультивування експлант може зберігати частину властивостей від інтактної рослини, що є прикладом епігенетичних змін – змін експресії генів у ході мітотичного поділу клітин, але не передаються за мейозу. Ключову роль грає ступінь компетентності індукованих клітин, що мають

відповідний стан хроматину та його транскрипційну активність. Іншими словами, ці параметри об'єднують і називають «пам'ятю клітини» [15, 30]. Виходячи з цього, необхідно враховувати характеристики генотипу рослини-донору для успішного здійснення процесів культивування.

Для популяцій рослинних клітин та тканин *in vitro*, які культивуються протягом тривалого періоду, однією з основних особливостей є нестабільність геному та її клітинна гетерогенність. Важливим є і збереження генетичних особливостей і епігенетичних характеристик геному організму-донора. Від'єднання рослинної клітини від усієї ієрархії регуляторних систем цілісного організму часто призводить до цитогенетичної варіабельності культивованих клітин [15, 67]. Можна назвати декілька причин нестабільності геному клітин *in vitro*: гетерогенність вихідного матеріалу і селекція клітин певного типу; порушення корелятивних зв'язків при виділенні експлантів з рослини; дія компонентів середовища; мутагенна дія екзогенних гормонів і стимуляторів; вплив продуктів метаболізму, що накопичуються в середовищі; аномалії мітотичного циклу клітин *in vitro*. На мінливість значною мірою впливає присутність, концентрація і співвідношення регуляторів росту в живильному середовищі, в тому числі фітогормонів, а також сахарози. Може також проявлятися роль сахарози та інших цукрів як чинників соматоклональної мінливості, мутагенів і регуляторів генної експресії [76, 148, 163].

Геномні зміни, що накопичуються упродовж онтогенезу, а також нові реорганізації і перебудови можуть виникати за умов індукції калусоутворення. Генетична мінливість обумовлена мутаціями і успадковується не тільки в клітинних поколіннях, але і в потомстві регенерантів. Цей тип мінливості має найбільше значення, оскільки сприяє утворенню нових генотипів і є необхідною умовою її існування, основою адаптаційних властивостей популяції, а також фактором гомеостазу популяції. На відміну від генетичної мінливості, епігенетична визначається функціональною активністю генів і проявляється на різних рівнях диференціювання клітин і тканин [40, 67].

За сучасності існує безліч питань, що стосуються механізмів калусогенезу і морфогенезу рослин *in vitro*, які залишаються вирішеними не повністю. Актуальним завданням біотехнології рослин є виявлення ролі конкретних генетичних систем і генів в здатності рослинних експлантів до культивування і його ефективності для отримання рослин-регенерантів або дослідження програми морфогенезу. Для таких досліджень доцільне створення генетичних моделей, що включають в себе ізогенні лінії, де відомий функціональний зв'язок між експресією генів і їх фенотипічним проявом [83, 189]. Іншими словами, необхідно дослідити вплив індивідуальних генів на прояв тотипотентності клітин *in vitro* у об'єктів з ускладненою регенерацією, до яких відносяться злаки, в тому числі пшениця [20].

Аналіз сучасної літератури показує значний інтерес до дослідження генетичних систем рослин [109, 125] проте відомості про їх вивченні в культурі *in vitro* нечисленні [11, 15, 41]. На генетичній моделі, що включає сорт м'якої озимої пшениці Миронівська 808, а також майже ізогенні лінії за генами *VRN* (vernalization), раніше була показана детермінація ряду фізіолого-біохімічних характеристик життєдіяльності рослин пшениці [27]. Дані генетичні системи активно досліджуються на молекулярно-генетичному рівні регуляції цвітіння злаків [145, 164, 176].

Виходячи з вище сказаного, можна припустити, що рослини, контрастні за типом розвитку можуть відрізнятися за характером морфогенетичних процесів в культурі *in vitro*, які детерміновані генетичними системами, а отже і перебігом фізіолого-біохімічних процесів.

Оскільки пшениця є другою за величиною врожаю сільськогосподарською культурою в світі, то актуальним завданням є підвищення врожаю пшениці та його якості. Не менш важливим є те, що для поліпшення існуючих форм пшениці і створення нових використовують методи клітинної селекції [37, 49].

Злаки, з точки зору експериментальної фітобіотехнології, представляють складний об'єкт в порівнянні з представниками дводольних. На даний момент часу у однодольних не описано калусоутворення в природних умовах, незважаючи на успішні досягнення в культивуванні *in vitro* калусів пшениці, ячменю, кукурудзи,

рису та інших представників злаків [52, 61, 91]. Нездатність до утворення раневого калус в природних умовах є однією з причин, які обумовлюють складність отримання калусних тканини у злаків [20].

В останні роки значно розширився спектр експлантів, які успішно культивуються: зрілі зародки, вузли кушення, пиляки (для андрогенезу) і листкові експланти [20, 37, 86, 124]. Для злаків найбільш поширеним експлантом є незрілі зародки (immature embryos, IE). Наприкінці XX століття незрілі зародки вважалися найбільш ефективним експлантом з найвищою частотою калусогенезу і регенерації рослин *in vitro* [91, 171, 213]. Однак їх використання обмежене певним періодом онтогенезу рослини – формуванням та дозріванням зернівки. І навпаки, зрілі зародки (mature embryos, ME) можуть бути доступні в будь-який час. Використання ME забезпечує економію часу та коштів, що є гарною альтернативою IE [86, 107, 157, 167, 169].

Фізичні фактори – температура, вологість, якість освітлення, осмотичний потенціал – також впливають на індукцію калусо- та органо-генезу в культурі *in vitro*. Підбравши оптимальний режим для культивування відповідного рослинного об'єкта можна підвищити ефективність калусо-, органо- та морфогенезу [162].

Температура є важливим фактором навколишнього середовища, що визначає поширення рослин по зонах вирощування, виживання та урожайність. Експозиція рослин за умов низьких позитивних температур може обумовлювати різноманітні зміни в рослинах, що може призвести до переходу до наступного етапу онтогенезу [45], а також до розвитку холодостійкості [131]. Озима пшениця для реалізації повної морфо генетичної програми розвитку потребує такої тривалої експозиції – яровизації або верналізації [44]. За літературними даними, в культурі *in vitro*, зазвичай, проводяться дослідження впливу низьких температур як стрес-фактор на прояв реакції-відповіді калусної культури, а саме підвищення холодо- і морозостійкості, накопичення кріопротекторних сполук (білків, цукрів і т.д.) [131, 138]. Було встановлено, що за температури 4 °C підвищувався загальний вміст внутрішньоклітинних білків як в клітинах кореневої меристеми, так і в калусних клітинах озимої пшениці, порівняно з ярою пшеницею. Однак індуковане низькими

температурами накопичення білка не обов'язково пов'язане з розвитком [131]. Вірогідно тому, що відповіді рослин на низькі температури, що призводять до холодової акліматизації (холодо- і морозостійкості) та яровизації, контролюються різними шляхами передачі сигналів через експресію генів [94].

За сучасності питання тривалого впливу низьких температур на спрямованість та протікання морфогенетичних реакцій культури озимої пшениці *in vitro* не досліджено. Не виявлений можливий зв'язок такого впливу з ростом і розвитком культури тканин і клітин. Вірогідно, що як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*, тривалий період низьких температур може грати ключову роль в прояві морфогенетичних реакцій.

Процес індукції утворення калусу значною мірою визначається складом живильного середовища. Для культивування калусних культур злаків використовуються різні середовища. Середовище Мурасіге і Скуга (МС) є універсальним і його використовують для культивування багатьох видів рослин із додаванням різної концентрації регуляторів росту [155]. З метою стимулювання процесів морфогенезу додають у середовище культивування різні біологічно активні речовини – синтетичні аналоги фітогормонів, амінокислоти, осморегулятори та інші сполуки [17, 125, 139, 177, 178].

Подвійні концентрації макроелементів у середовищі МС можуть посилювати індукцію калусоутворення пшениці [178]. Додавання різних видів вуглеводів до складу живильного середовища також може впливати на калусо- та морфогенез. Оскільки вуглеводи є необхідним компонентом живильних середовищ для культивування ізолюваних клітин і тканин рослин, бо останні, зазвичай, не здатні до автотрофного типу живлення. Тривалість часу культивування та отримання рослин-регенерантів пшениці може зменшуватися за рахунок внесення до живильного середовища сорбітолу [16, 125].

Злаки вимогливі до органічних джерел азоту, до яких відносяться деякі амінокислоти і аміді (гліцин, аспарагін та інші). Про ефективність культивування злаків на середовищах з додаванням амінокислот можуть свідчити результати багатьох дослідників [12, 20, 86]. Такі амінокислоти, як L-глутамін та гліцин також

можуть входити до складу живильних середовищ для підвищення ефективності отримання калусу або рослин-регенерантів [86]. Установлено, що висока частота калусоутворення в культурі озимої м'якої пшениці спостерігалася на живильному середовищі з амінокислотою L-аспарагіном з концентрацією 150 мг/л, а також 10 мг/л AgNO<sub>3</sub> та 2 мг/л 2,4-Д [20].

Живильні середовища для культивування злаків, зокрема пшениці, можуть також включати і антиоксиданти – аскорбінову кислоту, глутатіон тощо. Також рослинні екстракти або соки, що мають рістактивуючі властивості, можуть використовуватися у якості стимуляторів у культурі *in vitro* [16, 86]. Використовують також ендосперми незрілих зародків пшениці, гідролізат казеїну. Максимальна ріст стимулююча дія характерна для кокосового молока – рідкого ендосперму кокосового горіха [16].

Пшениця належить до групи гормонозалежних об'єктів культивування *in vitro*. Добір оптимальної концентрації певних фітогормонів, які входять до складу живильного середовища – один із ключових етапів роботи з культурою пшениці [114, 121, 181]. В основному, для культивування злаків використовують фітогормони фуксинового ряду – ІОК (індолілоцтова кислота), НОК ( $\alpha$ -нафтилоцтова кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксоцтова кислота); та цитокінінового ряду – 6-БАП (6-бензиламінопурин), кінетин, зеатин, бензиладенін [122, 211].

Для індукції та отримання пухкої калусної культури та її подальшої підтримки найчастіше використовується синтетичний аналог ІОК - 2,4-Д, концентрація якого в середовищі може залежати від біологічних особливостей, зокрема генотипу, виду і сорту пшениці [125, 139, 168, 169, 177, 178, 183, 210]. Щодо ІОК, то вона майже в 30 разів менш активна, ніж 2,4-Д і НОК [16]. Згідно з літературними даними, найефективніша концентрація 2,4-Д в середовищі МС для стимулювання калусогенезу у різних видів пшениці (твердої або м'якої, озимого або ярого типу розвитку) знаходиться у діапазоні від 2 до 3,5 мг/л [124, 140, 168, 169, 177, 178, 183, 210].

Окрім того, в літературі є дані про використання інших фітогормонів ауксинового ряду: піклораму (4-аміно-3,5,6-трихлор-2-піридинкарбонової кислота) і дикамбу (3,6-дихлор-2-метоксibenзойная кислота). За даними Satyavathi та ін. (2004), серед досліджених стимуляторів росту синтетичний ауксин дикамба з концентрацією 2 мг/л виявився кращим для індукції компактного калусу, а також показав найвищий коефіцієнт регенерації рослин чотирьох сортів твердої пшениці [177]. Filippov та ін. (2006) виявили найвищий показник регенерації рослин пшениці за використання 10 мг/л 2,4-Д і 12 мг/л дикамби. Ці результати показали, що більш висока концентрація дикамби є більш ефективною порівняно з 2,4-Д [117].

Додавання до складу живильного середовища цитокінінів, таких як кінетин, 6-БАП і зеатин, призводить до стимулювання процесів гісто- і органогенезу [124, 183]. При цьому, 6-БАП і зеатин виявляють більш високу активність у підтримці росту ізольованих тканин та індукції органогенезу, порівняно з кінетином [16, 33].

Також є відомості про використання синтетичного фітогормону цитокінового ряду тидіазурону (Thidiazuron, TDZ) для ефективного отримання рослин-регенерантів *T. aestivum* [92, 179]. TDZ виявився ефективним регулятором морфогенезу *in vitro* багатьох видів дводольних рослин. Дослідниками Benlioglu та Birsin була встановлена ефективна та оптимальна концентрація TDZ - не вище 0,75 мг/л<sup>-1</sup> та експлант - незрілі зародки - для регенерації рослин озимої пшениці [92].

Використання цитокінінів у комбінаціях з ауксинами може сприяти регенерації рослин *in vitro* з тканин калусу пшениці. Високе співвідношення цитокінінів до ауксинів (або присутність у живильному середовищі цитокініну без ауксину) необхідне для індукції пагоноутворення або гомогенезу. Для стимулювання утворення коренів або ризогенезу концентрацію ауксинів зазвичай збільшують. Необхідно зазначити, що високий рівень вмісту ауксинів у середовищі, зокрема 2,4-Д, зумовлює соматичний ембріогенез [140, 168, 169].

У роботі Kumar та ін. висока частота індукції калусогенезу і регенерації рослин спостерігалися у всіх трьох досліджених генотипах пшениці, що

культивувалися на середовищі МС з додаванням 2,4-Д, бензиладеніну (БА) і ІОК з різними концентраціями [140].

Необхідно відмітити, що фітогормони можуть не лише індукувати проліферацію клітин, контролюючи їх поділ, вони можуть стати причиною нестабільності геному, як зазначалося вище. Вони здатні стимулювати ендополіплоїдію, політенію та амітози (2,4-Д та НОК). В деяких випадках синтетичний фітогормон 2,4-Д викликав мейозоподібні процеси та мутації, а кінетин і 6-БАП – додаткову реплікацію ДНК та мутації [47].

Інші рослинні гормони: гібереліни, етилен або абсцизова кислота (АБК) рідко використовуються в культурі рослин *in vitro*. Дані про використання гіберелінів, зокрема гіберелової кислоти (ГК) для культивування пшениці малочисельні. У роботах дослідників ХХ століття було встановлено, що у культурі пильовиків ГК стимулювала процеси андрогенезу – проростання пилкових зерен і ріст пилкових трубок [185, 186]. Також ГК використовують для стимулювання процесів гомогенезу у цитрусових і підтримки росту суспензійних культур клітин. Найчастіше використовують гіберелову кислоту (GA3 або ГК3) як найбільш біологічно активну речовину [16].

У культурі тканини фітогормони, додані в різних пропорціях, регулюють синтез ендогенних гормонів рослин, що проявляється в різноманітних морфогенетичних реакціях клітин і тканин [18, 62].

Отже, культура *in vitro* – важливий метод дослідження біологічних закономірностей регуляції морфогенезу рослин, зокрема пшениці. Нині з'ясовано різноманітні аспекти протікання морфогенетичних реакції у цій культурі, встановлена роль експланту, генотипу рослини-донору, складу живильного середовища, біологічно активних речовин у процесах калюсогенезу та різних шляхів морфогенезу. Однак, щодо генетичного контролю морфогенетичних процесів генами *Vrn* у культурі *in vitro* пшениці дані обмежені. Крім того, не з'ясована залежність протікання морфогенетичних процесів за дії гібереліну на фоні різного трофічного забезпечення при їх можливому контролі генами *Vrn* за дії пониженої яровизуючої температури. Дослідження у цьому напрямі, на нашу

думку, дозволить розширити існуючі уявлення про механізми регуляції морфогенетичних процесів у культурі *in vitro* і, вірогідно, про роль у ній генів *Vrn* при взаємодії з трофічними та фітогормональними факторами за яровизації.

Наведений аналіз літератури показує, що яровизація є неодмінною умовою регуляції переходу озимої пшениці до генеративного стану. Її механізми досліджувалися у напрямках ролі фізіолого-біохімічних процесів у 20-80 роки минулого століття. Після ідентифікації генів потреби у яровизації (*Vrn*) стали досліджуватися молекулярно-біологічні механізми функціонування цих генів за яровизації. Встановлені основні закономірності контролю цими генами процесу яровизації та переходу озимих злаків до генеративного етапу онтогенезу. Досліджені також окремі аспекти фітогормональної регуляції яровизації за участю системи генів *Vrn*. Встановлені окремі вагомі сторони ролі трофічних та ензиматичних факторів у регуляції яровизації. Однак до нинішнього часу все ще обмежені дані про можливу взаємодію генетичних, трофічних та гормональних факторів у регуляції яровизаційних процесів, а відтак, у регуляції темпів переходу озимої пшениці до генеративного стану. Недостатньо вивченими залишаються і роль генів *Vrn* у контролі морфогенетичних процесів за культури *in vitro* при яровизації за дії фітогормонів та різного рівня трофічного забезпечення цього процесу. Викладене обумовлювало доцільність проведення наших досліджень.

### **Висновки до розділу 1**

У огляді літератури проаналізовані дані стосовно фізіологічної природи, фітогормонального, генетичного та епігенетичного контролю яровизації у рослин озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L., а також дані про роль трофічних факторів у яровизації. Проаналізовані дані щодо культури *in vitro* як можливої модельної системи дослідження морфогенезу у калусній культурі за яровизації. З'ясовані недостатньо досліджені вагомі аспекти фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного процесу, які доцільно вивчати для поглиблення існуючих уявлень про біологічну природу озимості рослин.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [2, 4, 5, 6, 7, 28, 78, 84, 85, 100].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Рослинний матеріал

**Сорти озимої м'якої пшениці.** У дослідах використані шість сортів озимої м'якої пшениці: Дорідна, Статна, Астет, Досконала та Альянс. Їх насіння було надане Інститутом рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААНУ. Насіння двох сортів Миронівська 808 і Ольвія та створених в їх генофоні ізогенні моногенодомінантні за локусами *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1* лінії (ізолінії, NILs) було надане відділом генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААНУ.

Досліджувані сорти Досконала, Дорідна, Статна, Астет та Альянс – універсального типу використання, невибагливі до умов вирощування, середньостиглі, середньорослі, стійкі до вилягання і до несприятливих біо- та абіотичних чинників на всіх етапах росту і розвитку. Сорти вирізняються високою урожайністю та за показниками якості зерна відносяться до сильних пшениць. Внесені до Державного реєстру сортів рослин України та рекомендовані для вирощування в Поліській, Лісостеповій і Степовій зонах України [31].

Сорт Миронівська 808 (*M 808*) – різновидності *lutescens*, високорослий, схильний до вилягання. Сорт Ольвія – різновидності *erythrospermum*, низькорослий. Обидва сорти недостатньо стійкі до бурої іржі. Зимостійкість сортів середня і вище середньої, посухостійкість середня. За показниками якості зерна відносяться до сильних пшениць [34].

**Ізогенні за генами *Vrn* лінії.** Для проведення дослідження ролі системи генів *Vrn* в детермінації темпів розвитку рослин та молекулярно-біологічного аналізу алельного стану даних генів в калусній культурі використовували по три ізогенні лінії м'якої пшениці, які створені в генофоні двох сортів Миронівська 808 та Ольвія.

Всі ізоляції мають загальний генотип сорту, у генофоні якого вони створені, але різняться за станом локусів генів *Vrn*. Тому вони цілком відповідають основному принципу проведення експериментів – принципу єдиної відмінності.

Досліджувані ізоляції несуть один з генів *Vrn* у домінантному стані, тому мають ярий тип розвитку та не потребують яровизації для переходу до колосіння. У озимих сортів всі гени *Vrn* рецесивні, тому без яровизації вони не здатні переходити до колосіння в рік весінньої сівби (табл. 2.1) [64, 71].

Таблиця 2.1

**Генотип ізогенних за генами *Vrn* ліній і двох сортів м'якої пшениці  
Миронівська 808 та Ольвія**

| Назва ізоляції | Генотип за генами <i>Vrn</i>   | Тип розвитку |
|----------------|--------------------------------|--------------|
| Vrn-1          | <i>Vrn-A1a vrn-b1b vrn-d1b</i> | Ярий         |
| Vrn-2          | <i>vrn-a1b Vrn-B1a vrn-d1b</i> | Ярий         |
| Vrn-3          | <i>vrn-a1b vrn-e1b Vrn-D1a</i> | Ярий         |
| Вихідні сорти* | <i>vrn-a1b vrn-e1b vrn-d1b</i> | Озимий       |

Примітка \*) – всі гени рецесивні

## 2.2 Умови досліджень

### 2.2.1 Схеми експериментів *in vivo*

Дослідження *in vivo* включали лабораторні та вегетаційні досліді (див. рис. 2.1).

**Лабораторні досліді.** Молекулярно-біологічний аналіз стану локусів *Vrn*. Для ідентифікації алельного стану генів системи *Vrn* використані ізогенні лінії озимої пшениці двох сортів М 808 та Ольвія – з'ясовували алельний стан генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*. Аналіз включав виділення ДНК з зернівок ізоляцій та вихідних озимих сортів М 808 та Ольвія, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з використанням алель специфічних праймерів та горизонтальний електрофорез в агарозному гелі.

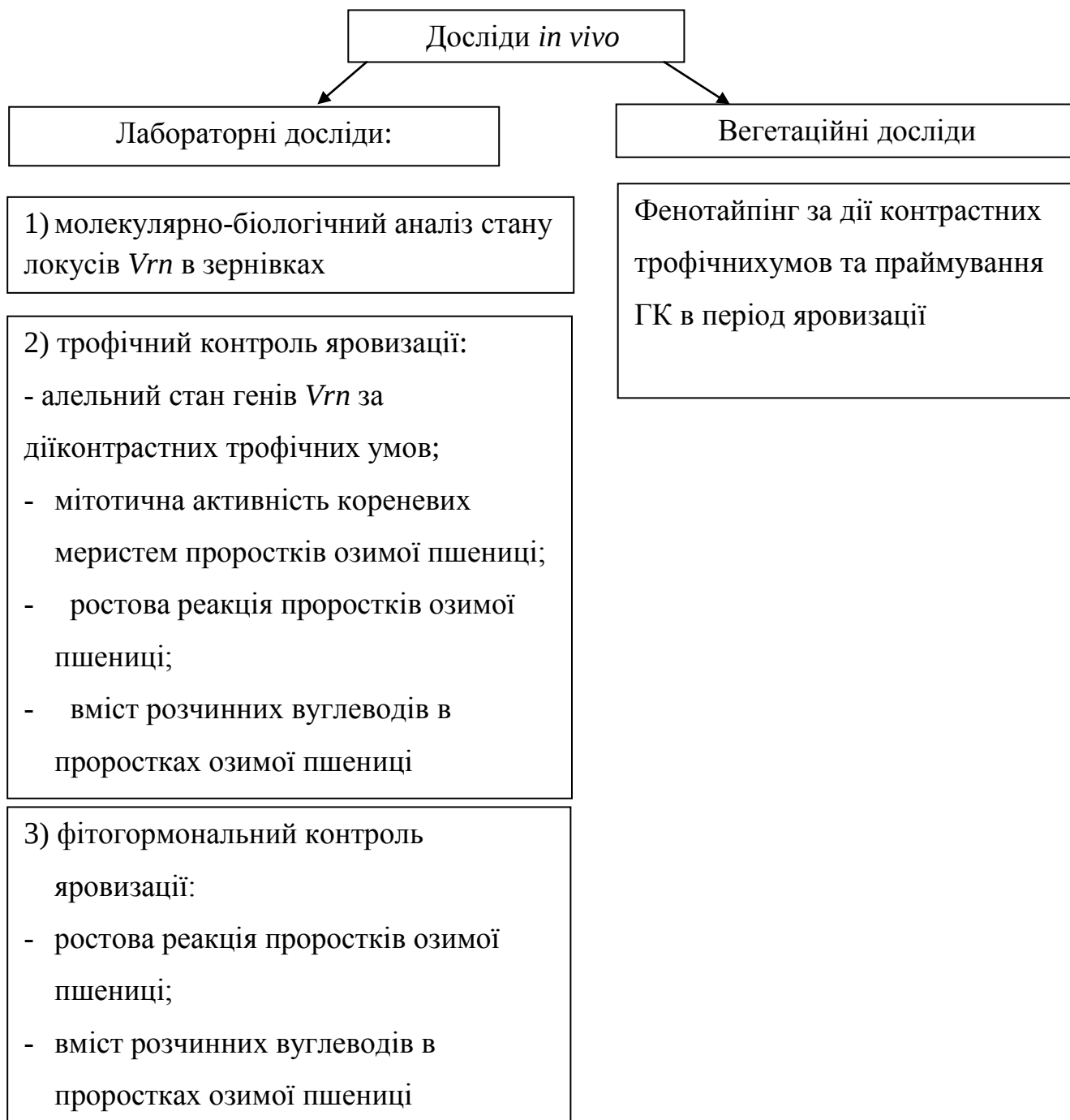


Рис. 2.1 Загальна схема дослідів *in vivo*

*Трофічний контроль яровизації.* Для з'ясування ролі трофічного забезпечення у перебігу яровизації темпів розвитку рослин озимої пшениці була застосована наступна схема дослідів, за якою проводили яровизацію по варіантах: 1) цілі зернівки (оптимальне трофічне забезпечення); 2) зародки без ендосперму (відсутнє трофічне забезпечення); 3) зародки з додаванням 3 %-го розчину сахарози (штучне

трофічне забезпечення); 4) цілі зернівки з додаванням 3 %-го розчину сахарози (надлишкове трофічне забезпечення).

Для цих дослідів зернівки стерилізували розчином 5 %-го гіпохлориту натрію протягом 15 хвилин та пророщування протягом 2 діб в чашках Петрі з вологим фільтрувальним папером у темряві за  $22 \pm 2$  °C.

З пророслих зернівок відокремлювали зародки від ендосперму і поміщали у чашки Петрі з фільтрувальним папером і зволожені водою або 3 %-м розчином сахарози. Зернівки з ендоспермом зволожували за такою ж схемою. Яровизацію здійснювали протягом 45 діб у холодильній камері при 4 °C у темряві. Протягом холодової експозиції підтримували вологий стан матеріалу, додаючи відповідний розчин сахарози або води. Для проведення аналізів відбір проб та фіксацію рослинного матеріалу здійснювали на 15-, 30- і 45-ту добу яровизації.

*Молекулярно-біологічний аналіз алейного стану генів *Vrn* за дії контрастних умов трофічного забезпечення.* У цьому досліді проводили молекулярний аналіз у 15-, 30- і 45-ти добових яровизованих проростках двох сортів озимої пшениці – Миронівська 808 і Ольвія за схемою: 1) зернівки + вода; 2) зародки + вода; 3) зародки + 3 % розчин сахарози.

*Вивчення впливу контрастних трофічних умов яровизації на мітотичну активність коревих меристем.* Для визначення мітотичної активності кореневої меристеми відбирали проростки двох сортів озимої м'якої пшениці – Дорідна і Статна на 45 добу яровизації. Дослід проведений за схемою: 1) зернівки + вода; 2) зернівки + 3 % розчин сахарози; 3) зародки + вода; 4) зародки + 3 % розчин сахарози.

*Аналіз ростової реакції за дії контрастних трофічних умов яровизації.* Дослід проведений за тими ж варіантами, що і визначення мітотичної активності меристем. Для проведення морфометричного аналізу використані проростки трьох сортів пшениці озимої – Досконала, Дорідна і Статна на 15-, 30- і 45-ту добу яровизації. Аналізували по 10 проростків кожного варіанту досліду. Вимірювали довжину надземної та підземної частин, а також визначали біомасу цілого проростка.

*Визначення вмісту розчинних вуглеводів за дії контрастних трофічних умов яровизації.* Вміст водорозчинних вуглеводів в яровизованих проростках визначали на 15, 30 і 45 добу. Для цього використовували проростки двох сортів озимої м'якої пшениці Дорідна і Статна. Дослід проведений за схемою: 1) зернівки + вода; 2) зернівки + 3 % розчин сахарози; 3) зародки + вода; 4) зародки + 3 % розчин сахарози.

*Фітогормональний контроль яровизації.* Дослід проведений за схемою: 1) зернівки + вода; 2) зернівки + розчин гібереліну (концентрація 10 мг/л); 3) зародки + вода; 4) зародки + розчин гібереліну (концентрація 10 мг/л). Використані три сорти озимої пшениці – Дорідна, Статна і Альянс. Відбір проб для аналізів здійснювали на 45 добу яровизації. У проростках визначали ростову реакцію та вміст водорозчинних вуглеводів.

Для морфометричного аналізу відбирали по 10 проростків з кожного із варіантів. Вимірювали довжину надземної та підземної частин, а також визначали біомасу цілого проростка.

За такою ж схемою дослідів проводили визначення вмісту водорозчинних вуглеводів у проростках на 45-ту добу яровизації. Фіксували проростки при 120 °С протягом 30 хвилин у сухо жаровій шафі, висушували до постійної маси при 60 °С і використовували для аналізів.

**Вегетаційні дослід.** Для дослідження пролонгованого впливу контрастних умов трофічного забезпечення та дії гіберелінів за яровизації на темпи розвитку рослин озимої пшениці проводили вегетаційні дослідів у факторостатній камері кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів. У досліді використані яровизовані проростки трьох сортів пшениці – Досконала, Дорідна і Статна. Вплив контрастних трофічних умов яровизації на темпи розвитку рослин визначали у варіантах: 1) зернівки + вода; 2) зародки + вода; 3) зародки + 3 % розчин сахарози.

Вплив праймування гібереліном в період яровизації на темпи розвитку рослин трьох сортів пшениці Дорідна, Статна і Альянс визначали по варіантах:

1) зернівки + вода; 2) зернівки + розчин гібереліну (10 мг/л); 3) зародки + вода; 4) зародки + розчин гібереліну (10 мг/л).

Після 45 діб яровизації проростки висаджували в ґрунтову культуру (суміш чорнозем звичайний / пісок 3:1) в пластикові 3-літрові посудини. У кожному варіанті вирощували по 10 рослин в посудині у триразовій повторності. Умови культивування: температурний режим 22 / 18 °С (день / ніч), освітленість 15 кЛк, 16-годинний фотоперіод, 70 % вологість повітря.

У обох дослідях визначали швидкість проходження фенологічних фаз та тривалість періоду сходи-колосіння (ПСК), за якими судили про темпи розвитку рослин.

### 2.2.2 Схеми експериментів *in vitro*

Дослідження яровизаційного процесу в системі культури *invitro* проводили за наступною схемою (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Загальна схема дослідів *in vitro*

Для ідентифікації алельного стану локусів *Vrn* в калусній культурі, вивчення впливу тривалості періоду яровизації та зміни фітогормонального складу живильного середовища на морфогенетичні реакції було поставлено завдання отримання пересадкової калусної культури. Тому були підібрані ефективний режим стерилізації насіння пшениці, умови культивування та індукції калусної культури. Надалі досліді проводили за схемою (рис. 2.2).

*Отримання первинної калусної культури.* З цією метою в якості експланти використані зрілі зародки озимих сортів та ізогенних ліній пшениці, які культивували в термостаті за 26 °C протягом  $28 \pm 2$  діб на живильному середовищі Мурасіге і Скуга (МС) з повним набором макро- та мікросолей та додаванням стимулятора росту 2,4-Д (додаток Д). Аналізували морфологічну характеристику утворених первинних калусів і частоту калусогенезу.

*Отримання пересадкової культури.* З первинної калусної культури одержували пересадкову. Її культивували у термостаті у темряві за 26 °C. Отриману калусну культуру використовували для визначення алельного стану локусів *Vrn*, вивчення впливу тривалості періоду яровизації та зміни фітогормонального складу живильного середовища на морфогенетичні реакції калусної культури досліджуваних сортів озимої пшениці.

*Визначення алельного стану генів *Vrn* в умовах *in vitro* за яровизації.* З метою підтвердження або спростування припущення щодо стабільності системи генів *Vrn* в культурі *in vitro* отриману калусну культуру шести ізогенних ліній пшениці двох сортів Миронівська 808 і Ольвія використовували для ПЛР-аналізу. Аналіз включав виділення ДНК з калусів, ПЛР з використанням алель специфічних праймерів та горизонтальний електрофорез в агарозному гелі.

*Морфогенетичні реакції калусної культури озимої пшениці за яровизації.* Наступним етапом було дослідження впливу тривалості періоду яровизації на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці – Дорідна, Статна, Альянс і Астет. Отриману пересадкову калусну культуру другого/третього пасажу аналізували за варіантами тривалості яровизації при  $+4 \pm 1$  °C: 1) яровизація 15 діб; 2) яровизація 30 діб; 3) яровизація 45 діб; 4) контроль – аналізи калусів на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу культивування за  $+26$  °C у термостаті в темряві.

Після закінчення відповідного періоду температурного впливу калусну культуру пасивували на регенераційне середовище з додаванням фітогормонів БАП (6-бензиламінопурин) в концентрації 3 мг/л і НОК (1-нафтилоцтова кислота) в концентрації 0,5 мг/л і культивували на світлі з інтенсивністю 2-3 кЛк та

16-годинним фотоперіодом протягом  $28 \pm 2$  діб. Надалі проводили аналіз морфогенетичних реакцій.

*Вплив ГК у складі регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури озимої пшениці.* Отриману калусну пересадкову культуру другого пасажу сорту Альянс пасивували на регенераційне середовище МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК з додаванням до нього ГК в концентраціях: 0,1, 0,5, 1 і 10 мг/л. В якості контрольного варіанту використовували МС з додаванням 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК.

Культивування здійснювали за наступних умов: освітленість 2 кЛк, фотоперіод 16 годин, температура 22 / 18 °С (день / ніч) протягом  $28 \pm 2$  діб. Прояв морфогенетичних реакцій оцінювали за інтенсивністю процесів ризогенезу, хлорофілогенезу та гемогенезу. Визначали кількість корінців, зелених ділянок і новоутворених листків на одному калусі, а також частоту прояву морфогенетичної реакції у відсотках від загальної кількості калусів в чашках Петрі кожного варіанту.

*Аналіз ефективності калусогенезу за нетривалого впливу низької позитивної температури.* Введення в культуру *in vitro* здійснювали, використовуючи в якості експлантів зрілі зародки за раніше розробленим нами протоколом [7]. В якості контрольного варіанту використовували зернівки, які пророщували протягом 2 діб в термостаті за температури 26 °С, а дослідний варіант – протягом 4 діб в холодильній камері за  $4 \pm 1$  °С. Виокремлювали зрілі зародки та поміщали у чашку Петрі з живильним середовищем МС + 2,4-Д, культивували протягом  $28 \pm 2$  діб. В ході культивування фіксували частоту калусогенезу, а також прояви морфогенезу.

## 2.3 Методи дослідження

### 2.3.1 Молекулярно-біологічні

Для вивчення впливу трофічних факторів на алельний стан генів системи *Vrn* та його ідентифікацію використовували насіння шести ізогених ліній озимої пшениці двох сортів М 808 та Ольвія, а також яровизовані проростків озимої

пшениці двох сортів Миронівська 808 і Ольвія на різних етапах обробки холодом – 15, 30, 45 діб. Брали вибірку з 5 зразків проростків і зернівок кожного варіанта, а також 100 мг калусної культури. Аналізи проводили безпосередньо в той день, в який брали проростки.

*Виділення геномної ДНК* – її виділяли за допомогою 2 методик:

- з набором «DiatomPrep 100» (Ізоген, Росія) (метод сорбції) – для зернівок (за методикою виробника; додаток Б);

- з використанням СТАВ-буфера за стандартною методикою (лізуючий розчин складався з наступних компонентів: 5М NaCl; 0,5М Na<sub>3</sub>ЕДТА (трилон Б), рН = 8,0; цетилтриметиламоній бромід (СТАВ, цетавлон), 2М Тріс-НCl, рН = 8,0) – для яровизованих проростків і пересадкової (вторинної) калусної культури [112].

Виділення ДНК за допомогою СТАВ - буфера складалося з таких етапів:

1. Кінчики (по 0,5 см) проростків і наважка калусної культури (100-200 мг) переносили в пробірки типу «епендорф» на 1,5 мл, додавали лізуючий розчин і гомогенізували, додаючи 300 мкл буферу.

2. Інкубацію проводили в термостаті «TS-100» (BioSAN) протягом 1 години при 60 °С для лізису клітинних оболонок і екстракції нуклеїнових кислот в розчин.

3. Очищення розчину від білків проводили за допомогою суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1). Додавали однаковий об'єм цього розчину в пробірки «епендорф». Змішували на вортексі до утворення білої емульсії. Фази розчину розділяли за допомогою центрифуги «AB-BOTT» (Block Scientific) протягом 5 хвилин за 13000 об/хв.

4. Відбирали верхню фазу (супернатант) (200 мкл), не зачіпаючи середню, і переносили піпеткою в нову пробірку типу «епендорф». Після додавання (0,6-1 об'єму) 200 мкл 96 % етилового спирту утворювався осад ДНК. Центрифугували протягом 5 хв. за 8000 об/хв. Осад ДНК промивали 70 %-м етиловим спиртом для видалення солей і низькомолекулярних сполук. Повторне центрифугування протягом 5 хвилин при 8000 об/хв. і очищення розчину ДНК 70 % етанолом проводили 2 рази.

5. Осад ДНК підсушували в пробірках на повітрі або за 40 °С на водні лазні протягом 2–3 хвилин і розчиняли з додаванням 100 мкл бідистильованої води.

6. Після повного розчинення осаду розчин ДНК зберігали за 4 °С в холодильнику.

7. Якість виділеної ДНК перевіряли методом електрофорезу в 1 % агарозному гелі протягом 1 години за 120 В. ДНК після виділення була недеградованою і придатною для проведення ПЛР.

*Ампліфікація фрагментів геномної ДНК.* Для вивчення алельного стану генів використовували алель специфічні праймери (бази даних MassWheat, EVEX та NCBI) [116, 150, 159] (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Праймери для ідентифікації різних алелів генів у гексаплоїдній пшениці**

| Ген    | Алель          | Праймер                  | Послідовність                                          | Розмір продукта (п.н.) |
|--------|----------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|
| VRN-A1 | <i>Vrn-A1a</i> | VRN AF<br>VRN-INT1R      | GAAAGGAAAAATTCTGCTCG<br>GCAGGAAATCGAAATCGAAG           | 965 + 876              |
|        | <i>Vrn-A1b</i> |                          |                                                        | 714                    |
|        | <i>Vrn-A1c</i> |                          |                                                        | 734                    |
|        | <i>vrn-A1</i>  |                          |                                                        | 734                    |
|        | <i>Vrn-A1a</i> | VRN AF<br>VRN1R          | GAA AGGAAAAATTCTGCTCG<br>TGCACCTTCCCCCGCCCCAT          | 750 + 650              |
|        | <i>Vrn-A1b</i> |                          |                                                        | 480                    |
|        | <i>vrn-A1</i>  |                          |                                                        | 500                    |
|        | <i>Vrn-A1c</i> |                          |                                                        | 500                    |
| VRN-A1 | <i>Vrn-A1c</i> | Intr1/A/F2<br>Intr1/A/R3 | AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA<br>AAGTAAGACAACACGAATGTGAG<br>A | 1170                   |
| VRN-A1 | <i>vrn-A1</i>  | Intr1/ C/F<br>Intr1/AB/R | GCACTCCTAACCCACTAACC<br>TCATCCATCATCAAGGCAAA           | 1068                   |
| VRN-B1 | <i>Vrn-B1</i>  | Intr1/B/F<br>Intr /B/R3  | CAAGTGGAACGGTTAGGACA<br>CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA        | 709                    |
| VRN-B1 | <i>vrn-B1</i>  | Intr1/B/F<br>Intr /B/R4  | CAAGTGGAACGGTTAGGACA<br>CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA         | 1149                   |
| VRN-D1 | <i>Vrn-D1</i>  | Intr1/D/F<br>Intr1/D /R3 | GTTGTCTGCCTCATCAAATCC<br>GGTCACTGGTGGTCTGTGC           | 1671                   |
| VRN-D1 | <i>vrn-D1</i>  | Intr1/D/F<br>Intr1/D/ R4 | GTTGTCTGCCTCATCAAATCC<br>AAATGAAAAGGAACGAGAGCG         | 997                    |

Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в багатоканальному ампліфікаторі «Терцик» (ДНК-технологія, Росія) за стандартними умовами для ампліфікації даних праймерів (додаток В).

Для аналізу великого числа зразків готували загальну реакційну суміш, що включає всі компоненти, крім ДНК. Для кожної ПЛР складався протокол, в якому вказувалася загальна кількість усіх компонентів реакційної суміші, виходячи з розрахунку на одну реакцію (зразок). Кількість праймера на одну реакцію розраховували, виходячи з його концентрації. Далі поміщали пробірку в ампліфікатор і проводили ПЛР за заданою програмою в залежності від умов проведення реакції (температури відпалу праймерів і часу елонгації). Зокрема, була підібрана інша температура відпалу для праймерів VRN AF VRN-INTIR, яка становила 55 °C.

Розділення продуктів ампліфікації здійснювали шляхом електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі в присутності бромистого етидію (10 мг/мл). Довжину ампліфікованих фрагментів ДНК визначали за допомогою молекулярного маркера 100 bp +1,5 kb. Агарозний гель нагрівали до повного і рівномірного розплавлення. Розчин охолоджували до 55-60 °C, додавали бромистий етидій (15 мкл на 200 мл) і заливали в кювету. Для створення стартових лунок в кювету ставили гребінку з зубцями товщиною 1,5 мм, довжиною 14 см. Полімеризація агарози відбувалася за температури нижче 42 °C. Агарозний гель поміщали в камеру для електрофорезу, камеру заливали 1×TBE-буфером (Тріс-боратний) так, щоб гель був повністю покритий буфером. Проби вносили дозатором в лунки гелю. В окрему лунку вносили маркер молекулярної маси з барвником (1,5 мкл маркер + 1,5 мкл бромфеноловий синій), за допомогою якого визначали розміри ампліфікованого фрагмента. Електрофорез здійснювався при напрузі 150 В протягом 90-120 хвилин.

Спектри фрагментів ДНК реєстрували в ультрафіолеті (довжина хвилі 312 нм) за допомогою трансільюмінатору цифрової фотокамери Nikon, потім обробляли з використанням програми TotalLab (TL120.v2009). Склад всіх робочих розчинів наведено в додатку Г.

### 2.3.2 Методи визначення вмісту вуглеводів, мітотичного індексу, темпів розвитку рослин

*Фіксація рослинного матеріалу.* Для визначення вмісту водорозчинних вуглеводів матеріал фіксували про 120 °С, висушували при 60 °С у термостаті і використовували для аналізів.

*Метод визначення водорозчинних вуглеводів.* Визначення проводили фото колориметричним мікрометодом за Швецовим і Лук'яненко [48]. Принцип методу полягає у відновленні редукуючими цукрами фериціаніду калію  $K_3[Fe(CN)_6]$  в лужному середовищі при нагріванні до фериціаніду  $K_4[Fe(CN)_6]$  [48].

Фериціанід при взаємодії з сірчаноокислим окисним залізом утворює забарвлений синій розчин, оптична щільність якого пропорційна вмісту цукрів. Її визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2МП з довжиною хвилі – 670 нм.

Екстракцію цукрів з матеріалу проводили 80 %-м етиловим спиртом. У екстракті визначали моноцукри (редуючі), а також суму цукрів. За різницею вмісту моноцукрів та суми цукрів розраховували вміст олігоцукрів.

Для визначення суми цукрів екстракт попередньо гідролізували (5 % HCl при 70 °С 5 хвилин) для перетворення всіх цукрів у редуючі.

Вміст моноцукрів та суми цукрів розраховували за каліброваною кривою, побудованою по глюкозі. У дослідях використовувалися реактиви, з класифікацією ЧДА.

Вміст моноцукрів розраховано за формулою (2.3.1):

$$A = \frac{C \cdot V}{V_1 \cdot n}, \quad (2.3.1)$$

де: C – концентрація цукрів мг/мл;

V – об'єм спиртової витяжки;

$V_1$  – об'єм витяжки, взятої для аналізу;

n – наважка дослідної рослини, г.

Вміст суми цукрів визначали за формулою (2.3.2):

$$A = \frac{C \cdot V}{V_1 \cdot n} * K_{\text{розв.}}, \quad (2.3.2)$$

де  $C$  – концентрація цукрів мг/мл;

$V$  – об'єм спиртової витяжки;

$V_1$  – об'єм витяжки, взятої для аналізу;

$n$  – наважка матеріалу, г;

$K_{\text{розв.}}$  – коефіцієнт розведення для нейтралізації рН.

Вміст олігоцукрів визначався як різниця між вмістом суми цукрів та моноцукрів.

Для визначення впливу праймування гіберелінами на вміст розчинних вуглеводів в проростах озимої пшениці у період яровизації аналіз проводили, як описано вище.

*Визначення мітотичного індексу.* Для аналізу використовували апікальну частину корінців проростків довжиною 1,5-2,0 см після 45-добової яровизації. Аналізи проведені за Паушевою [58] на тимчасових давлених препаратах. Матеріал фіксували у фіксаторі Кларка, або оцтовому алкоголі протягом доби при 4 °С Після фіксації промивали тричі 70%-м етиловим спиртом і у четвертій зміні спирту зберігали при 4 °С до проведення аналізів [14, 57, 186]. Забарвлювали препарати реактивом Шифа. Визначення кількості клітин на різних фазах поділу виконували за допомогою світлового мікроскопа ЛОМО МІКМЕД-1 (БІОЛАМ) за збільшенням  $\times 400$ . Аналізувалося 8-10 полів зору таким чином, щоб кількість клітин з одного препарату враховувалася не менше 250-300 клітин. В ході аналізу визначалася кількість клітин, які діляться, фази мітозу, в яких вони знаходяться. Мітотичний індекс розраховували у відсотках клітин на різних фазах мітозу від загальної кількості клітин у препараті [14, 57, 186].

*Фенологічні методи.* Фенологічні спостереження за темпами розвитку рослин озимої пшениці після яровизаційного впливу проводили за умов вегетаційного досліду у факторостатній камері кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Яровизовані 45-добові проростки всіх варіантів: зернівки, яровизовані на воді; зернівки – з додаванням 3 % розчину сахарози; зернівки – з додаванням гібереліну (концентрація 10 мг/л); ізольовані зародки, яровизовані на воді;

ізолювані зародки – з додаванням 3% розчину сахарози; ізолювані зародки – з додаванням гібереліну (10 мг/л) – пересаджували по 15 штук вегетаційні посудини у ґрунтову культуру. У кожному варіанті рослини вирощували за триразової повторності (3 посудини на варіант). Вирощували рослини за наступних умов: температурний режим 22 / 18 °С (день / ніч), освітленість 15 клк, 16-годинний фотоперіод. Тривалість періоду сходи-колосіння (ПСК) для кожного варіанту визначали за умов переходу більше 50 % дослідних рослин до певної фенологічної фази розвитку. Фіксували такі фенологічні фази: кущіння, вихід в трубку, колосіння та дозрівання. Також зазначали ступінь приживаності (в %) дослідних рослин, що вирости по кожному варіанту.

### 2.3.3 Методи культури *in vitro*

Для отримання і культивування калусних культур готували живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС). Приготування маточних розчинів, вітамінів, гормонів та склад середовища МС вказано у додатку Д.

Для проведення досліджень використовували методи стерилізації приміщень, інструментів і живильних середовищ, а також рослинного матеріалу [7]. Режим стерилізації для дослідних об'єктів встановлювали експериментально.

Для отримання первинної калусної культури озимих сортів та ізогенних ліній пшениці в якості експланту використовували зрілі зародки, які максимально легко вводяться в культуру. Для цього використовували наступний протокол роботи:

1. Марлеві мішечки з 20-30 зернівками поміщали в розчин 0,1н  $\text{KMnO}_4$  на 10 хвилин, потім в мильний розчин з 100 мг СТАВ, 100 мг лаурилсульфату натрію і краплею Tween-80 на 10 хвилин, після чого ретельно промивали в проточній воді.
2. Поміщали на 2 хвилини в розчин  $\text{AgNO}_3$ , концетрація 5 мг/мл.
3. Мішечки з насінням стерилізували 70 %-м етанолом протягом 2 хвилин в умовах ламінарного боксу.
4. Стерилізували розчином гіпохлориту натрію в концентрації не менше 15 % (білизна) протягом 20 хвилин.

5. Насіння промивали стерильною дистильованою водою - 3 рази по 10 хвилин.

6. Мішечки з насінням стерильним пінцетом переносили в стерильні чашки Петрі, розгортали і насіння рівномірно розподіляли по поверхні чашки. Додавали невелику кількість стерильної води і поміщали в термостат за 26 °С.

7. Через 36-48 годин із пророслого насіння за допомогою хірургічного скальпелю вирізали зрілі зародки, які, по 7-10 штук, пасивували в чашку Петрі з живильним середовищем МС з 10 мг/л 2,4-Д для калусогенезу.

8. Чашки поміщали в термостат з температурою 26 °С.

Ефективність калусогенезу сортів та ізогенних ліній озимої пшениці в культуру *in vitro* визначали, підраховуючи відсоток зародків, які утворили калусну тканину, до загальної кількості в чашці за формулою:

Ефективність, % = Загальна кількість калусів / Загальне число зародків.

Аналіз морфогенетичних реакцій за тривалого низькотемпературного впливу та дії ГК у складі регенераційного середовища проводили на пересадковій калусній культурі озимої пшениці. Для того, щоб отримати пересадкову калусну культуру, робили 2-3 пасажі на нове середовище МС та культивували в термостаті за 26 °С.

Для вивчення тривалого низькотемпературного впливу пересадкову калусну культуру витримували за умов відповідного температурного режиму 4 °С (дослідний) або 26 °С (контрольний варіант) протягом 15, 30 та 45 діб. Після цього культивували на регенераційному середовищі з додаванням фітогормонів 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК за наступних умов: освітленість 2 кЛк, фотоперіод 16 годин, температура 22 / 18 °С (день / ніч) протягом 28 ± 2 діб.

Щодо аналізу морфогенетичних реакцій за дії ГК у складі регенераційного середовища, то отриману калусну пересадкову культуру пасивували на регенераційне середовище МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК з різною концентрацією ГК: 0,1, 0,5, 1 і 10 мг/л. В якості контрольного варіанту використовували МС з додаванням 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК. Культивування здійснювали за наступних умов: освітленість 2 кЛк, фотоперіод 16 годин, температура 22 / 18 °С (день / ніч) протягом 28 ± 2 діб.

Прояв морфогенетичних реакцій оцінювали за інтенсивністю процесів ризогенезу, хлорофілогенезу та гемогенезу: враховували кількість корінців, зелених ділянок і новоутворених листків на одному калусі, також частоту прояву морфогенезу у відсотках від загальної кількості калусів в чашках Петрі кожного варіанту за формулою:

Частота морфогенезу, % = Загальна кількість калусів / Загальне число морфогенних калусів.

Також проводили морфологічну характеристику калусної культури кожного варіанту і сорту. Визначали колір, структуру, щільність та обводненість.

Всього проведено три біологічні незалежні серії експериментів для кожного сорту/лінії.

#### **2.3.4 Статистичні методи**

Усі аналізи виконані у 2-3 аналітичній повторності. Проведено по 3-5 дослідів. Статистична обробка отриманих даних проводилась за допомогою критерію Стюдента (t) або методу однофакторного дисперсійного аналізу з використанням критерію  $HP_{0,05}$  [68].

Обробку і аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2013 та TotalLab (TL120.v2009). В таблицях і на рисунках наведені середні значення та помилка середнього.

### **Висновки до розділу 2**

У дослідженні використана наступна модель: яровизація проростків за різних умов трофічного забезпечення та праймуванні ГК. На рослинному матеріалі упродовж яровизації проводили молекулярно-біологічні, цитологічні, морфофізіологічні та біохімічні аналізи, а також визначали тривалість фаз онтогенезу і періоду від висаджування до колосіння і дозрівання. Визначали ефекти яровизації та ГК у складі живильного середовища на калусо- і морфогенез калусної культури озимої м'якої пшениці.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [2, 4, 5, 6, 7, 28, 78, 84, 85, 100].

## РОЗДІЛ 3

### МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЯРОВІЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ

#### 3.1 Алельний стан локусів генів яровизації та темпи розвитку пшениці

Більшість дослідників вважає, що головною серед генетичних систем пшениці є система генів *Vrn*, яка впливає на терміни переходу до генеративної фази розвитку, який проявляється як тривалість періоду сходи-колосіння (ПСК), і відповідно, на загальну тривалість вегетаційного періоду [58, 110, 111, 113, 196]. На даний момент у *Triticum aestivum* L. відомо 5 головних генів - *Vrn-A1* (*Vrn 1*), *Vrn-B1* (*Vrn 2*), *Vrn-D1* (*Vrn 3*), *Vrn-D4* (*Vrn 4*), *Vrn-B3* (*Vrn 5*) [134, 166, 207, 208, 209]. Майже всі локуси генетичної системи *VRN* (за винятком локусу *Vrn 4*) ідентифікуються як гени-кандидати, а вивчення їх молекулярної структури надає можливість для дослідження змін у фізіологічних процесах рослин з відпоповіднималельним станом. За літературними даними найкраще вивчені і описані взаємодії між трьома генами *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1*, які, в основному, і детермінують темпи и типи розвитку рослин м'якої пшениці [189, 207, 215]. Озимий тип розвитку рослин проявляється тільки в тому випадку, якщо ці три основних гени рецесивні, а ярий - домінантний алель хоча б одного гена [76].

Згідно з вище сказаним, для вивчення впливу генів системи *Vrn* на тривалість ПСК був проведений молекулярний-біологічний аналіз озимих сортів пшениці м'якої - Миронівська 808 і Ольвія та створених в генофонах цих сортів майже ізогенних моногеннодомінантних ліній (NILs) ярого типу розвитку *Vrn-1*, *Vrn-2* і *Vrn-3* для ідентифікації алельного стану генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1* (рис. 3.1) [3]. Алелі локусу *Vrn-A1* вивчали з використанням праймерів *VRN AF* і *VRN-INT1R*. Розмір ампліфікаційного фрагменту з використанням цих праймерів для домінантного алеля *Vrn-A1a* становить 965 і 876 п.н., а для рецесивного алеля *vrn-A1* - 734 п.н.

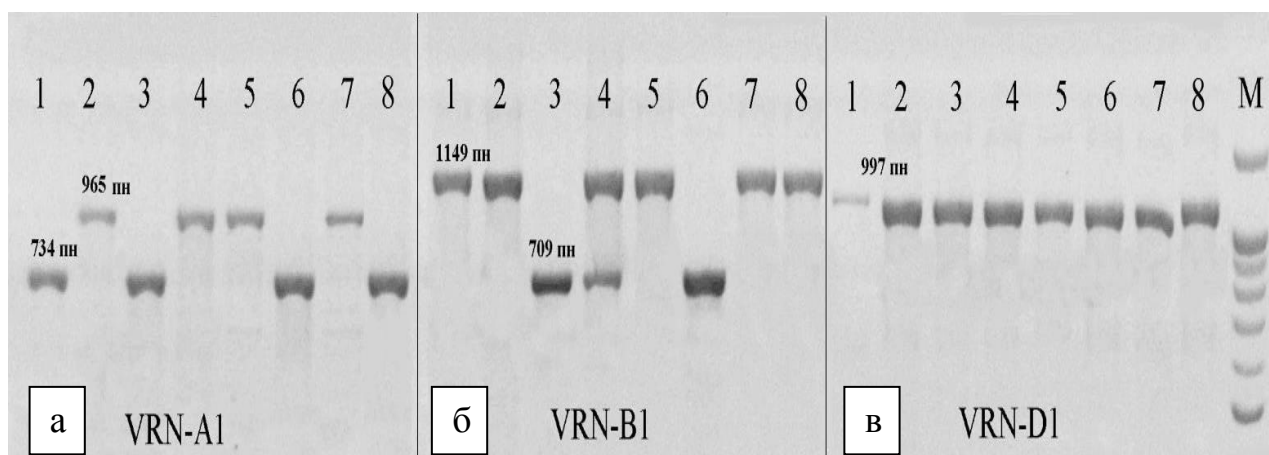


Рис. 3.1 Виявлення алелів генів *Vrn* у ізогенних ліній пшениці сортів Миронівська 808 і Ольвія з використанням комбінації праймерів: а - для гена *Vrn-A1* - VRN AF//VRN-INT1R, б - для гена *Vrn-B1* - Intr1/B/F//Intr1/B/R3//Intr/B/R4, в - для гена *Vrn-D1* - Intr1/D/F//Intr/D/R3//Intr1/D/R4; сорт Миронівська 808 (1-4): 1 - вихідний сорт, 2 - *Vrn-1*, 3 - *Vrn-2*, 4 - *Vrn-3*; сорт Ольвія (5-8): 5 - *Vrn-1*, 6 - *Vrn-2*, 7 - *Vrn-3*, 8 - вихідний сорт

Серед проаналізованих генотипів ізогенних ліній рецесивний алель *vrn-A1b* виявлений у вихідних сортів Миронівська 808 і Ольвія, а також у ізоліній *Vrn-2* двох даних сортів (рис. 1а). Стосовно ізоліній *Vrn-1* і *Vrn-3* обох сортів, то вони несуть домінантний алель *Vrn-A1a*. Оскільки присутність лише одного домінантного гена *Vrn-A1* забезпечує повну нечутливість рослин до яровизації, що не залежить від домінантного стану інших двох генів, то дані ізолінії є ярими. В іншому випадку, якщо будуть виявлені лише домінантні гени *Vrn-B1* і / або *Vrn-D1*, то вони тільки частково можуть знижуватимуть потребу в яровизації, і такі сорти або ізолінії – будуть напівозимими [25, 26, 42]. Було показано, що саме за рахунок множинних алелей домінантних локусів *Vrn-A1* можливе збільшення варіацій сортів м'якої пшениці за тривалістю вегетаційного періоду [38].

Ген *Vrn-A1* є основним в детермінації потреби або нечутливості до яровизації [196]. *Vrn-A1a* є найпоширенішим алелем, виявленим у *T. aestivum*, а також являється результатом дублювання послідовностей промоторних областей, тому для дослідження його алельного стану використовують значну кількість праймерів (див. табл. 2.3 розділу «Матеріали і методи»). У гена *Vrn-A1* були виявлені такі три

різні мутації, які визначають ярий тип розвитку, як вставки в межах промоторної області, делеції всередині промотора і великі делеції в інтроні-1. Домінантні алелі в цьому локусі, які асоціюються з промоторними вставками, делеціями та делецією в інтроні-1, позначаються як *Vrn-A1a*, *Vrn-A1b* та *Vrn-A1c*, відповідно [119, 208]. Отже, у результаті проведення ПЛР аналізу доміантний алель *Vrn-A1a* може бути представлений двома фрагментами 965 і 876 п.н. Однак в наших дослідженнях було виявлено тільки один продукт - 965 п.н. (Рис. 3.1, а).

Очікуваний розмір ампліфікованих фрагментів у всіх ізоляцій з використанням праймерів VRN AF//VRN-INT1R для рецесивного алеля *vrn-A1* склав 734 п.н. Домінантний алель *Vrn-A1a* відрізняється від рецесивного алеля *vrn-A1* делецією розміром 20 п.н. в промоторній ділянці гена, відповідно, очікуваний розмір ПЛР-фрагмента - 714 п.н.

Так як використання праймерів VRN AF та VRN-INT1R дозволяє виявляти відмінності алеля *vrn-A1* від алелів *Vrn-A1a* і *Vrn-A1b*. Аналіз алельного стану гена *Vrn-A1* з використанням даних праймерів показав присутність доміантного алеля *Vrn-A1a* (750 п.н.) у всіх досліджуваних генотипів (рис. 3.2). Отже, серед проаналізованих генотипів аллель *Vrn-A1b* не виявлено.

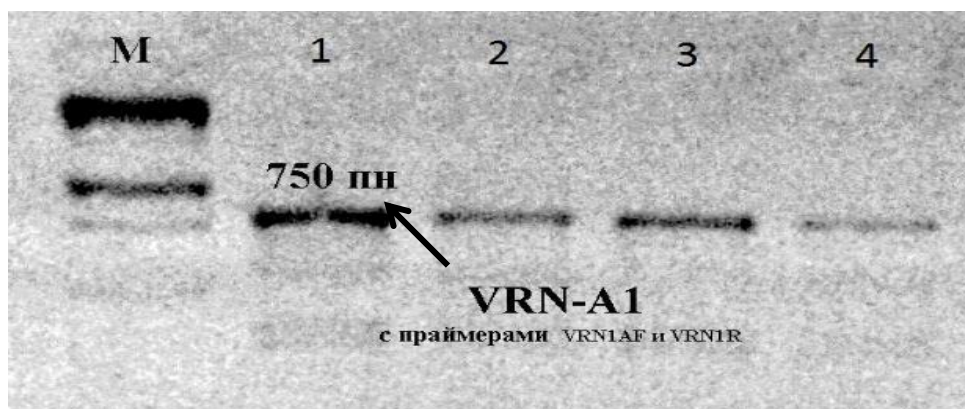


Рис. 3.2 Виявлення доміантних *Vrn-A1a* алелів у ізогенних ліній пшениці сорту Миронівська 808 (1 – ізоляція *Vrn-1*, 2 – ізоляція *Vrn-3*) і сорту Ольвія (3 – ізоляція *Vrn-1*, 4 – ізоляція *Vrn-3*)

Використання агарозного гелю не дозволяє розпізнавати різниці між *vrn-A1* і *Vrn-A1*, так як утворюється ампліфікований фрагмент довжиною 734 п.н., який

може відповідати алелям *Vrn-A1* і *Vrn-A1c*. Тому у подальших дослідженнях ми використовували праймери Intr1/A/F2 та Intr1/A/R3 (рис. 3.3, а), а також Intr1/C/F та Intr1/AB/R (рис. 3.3, б). В ході проведених аналізів виявлено продукт ампліфікації 1068 п.н., характерний для рецесивного алелю *vrn-A1* у сортів Миронівська 808 і Ольвія та ізоляцій Vrn-2 обох сортів (рис. 3.3б). У разі якщо б спостерігалася відсутність продукту, то використовувалася інша пара праймерів Intr1/A/F2 і Intr1/A/R3 з продуктом 1170 п.н., характерного для алелю *Vrn-A1c*, який серед проаналізованих генотипів був відсутній (рис. 3.3а).

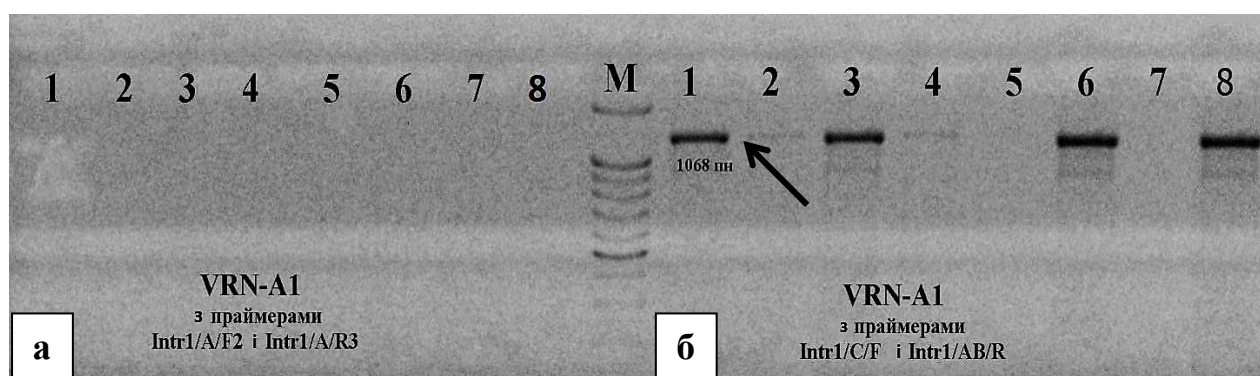


Рис. 3.3 Виявлення алелів гена *Vrn-A1c* (а) і *vrn-A1* (б) за допомогою специфічних праймерів Intr1/C/F і Intr1/AB/R та Intr1/A/F2 і Intr1/A/R3 відповідно: Миронівська 808: 1 – вихідний озимий сорт, 2 – Vrn-1, 3 – Vrn-2, 4 – Vrn-3; Ольвія: 5 – Vrn-1, 6 – Vrn-2, 7 – Vrn-3, 8 – вихідний сорт

Аналіз локусу *Vrn-B1* показав наявність домінантних алелів *Vrn-B1* (709 п.н.) у ізоляцій Vrn-2 сортів Миронівська 808 і Ольвія, виявлених за допомогою праймерів Intr1/BF і Intr/B/R3. У решти досліджених генотипів виявлений рецесивний алель *vrn-B1* з використанням праймерів Intr1/B/F і Intr/B/R4 і довжиною ампліфікованого фрагмента 1149 п.н. відповідно (рис. 3.1 б). За даними літератури у гена *Vrn-B1* виявлено наявність множинних алелів, які впливають на відмінності в часі колосіння, а також продуктивності [38]. Рослини з одним домінантним алелем *Vrn-B1* характеризуються як пізньостиглі і достовірно більшою тривалістю періодів «кушіння - перший вузол» і «вихід в трубку - колосіння» і, отже, виколошуються пізніше [38].

Алельний аналіз локусу *Vrn-D1* показав присутність лише рецесивного алеля *vrn-D1* (997 п.н.) при використанні праймерів Intr1/D/F і Intr1/D/R4 у всіх досліджуваних генотипів обох сортів (рис. 3.1в). У роботах багатьох дослідників показано, що у ярих сортів пшениці, які вирощуються в Європі, практично відсутній домінантний алель *Vrn-D1* [42, 58]. Досліджені ізогенні лінії створені в генотипі озимих сортів, але являють собою форми з ярим типом розвитку. Наші дослідження також підтверджують виявлену закономірність – відсутність домінантного алеля *Vrn-D1* у ізоліній м'якої пшениці з ярим типом розвитку [3].

Отже, за результатами молекулярного аналізу у дослідних ізоліній *Vrn-1*, *Vrn-2* і *Vrn-3* та вихідних сортів Миронівська і Ольвія були ідентифіковані алельні варіанти генів *Vrn*, що наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Алельні варіанти майже ізогенних за генами *Vrn* ліній (NILs) та вихідних сортів Миронівська 808 та Ольвія**

| Сорт / ізолінія        | Генотип                               |
|------------------------|---------------------------------------|
| Миронівська 808 (М808) | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>           |
| М 808 <i>Vrn-1</i>     | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          |
| М 808 <i>Vrn-2</i>     | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>           |
| М 808 <i>Vrn-3</i>     | <i>VRN-A1a VRN-B1 / vrn-B1 vrn-D1</i> |
| Ольвія                 | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>           |
| Ольвія <i>Vrn-1</i>    | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          |
| Ольвія <i>Vrn-2</i>    | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>           |
| Ольвія <i>Vrn-3</i>    | <i>vrn-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          |

На перехід до генеративної фази розвитку пшениці, а також на пов'язані з ним компоненти врожайності, гени *Vrn* впливають не тільки окремо, але і за взаємодії між ними [189]. Результати визначення періоду сходи-колосіння (ПСК) в польовому і вегетаційному експериментах показали істотні відмінності за цією ознакою між лініями сортів Миронівська 808 (М 808) і Ольвія, які відрізняються за комбінацією домінантних і рецесивних локусів генів *Vrn* (табл. 3.2). Між собою

ізоляції за темпами розвитку можна розділити на контрастні групи – рослини, які швидко розвиваються і переходять до колосіння через 47-57 діб - це лінії *Vrn-1* і *Vrn-3*, і ті, що розвиваються повільно, які колосяться через 61-75 діб від появи сходів - *Vrn-2*. Що стосується вихідних озимих сортів, то рослини М 808 переходять до колосіння пізніше, тобто мають довший вегетаційний період, порівняно з Ольвією. Відповідно ізоляції обох сортів мають ті ж закономірності [3,6].

Таблиця 3.2

**Тривалість ПСК у ізогенних по генам *Vrn* ліній пшениці при вирощуванні в умовах вегетаційного та польового експериментів (2013-2014 р.р.)**

| Сорт            | Ізоляція     | ПСК, діб     |          |
|-----------------|--------------|--------------|----------|
|                 |              | Веgetаційний | Польовий |
| Миронівська 808 | <i>Vrn-1</i> | 89 ± 2       | 57 ± 1   |
|                 | <i>Vrn-2</i> | 99 ± 3       | 75 ± 2   |
|                 | <i>Vrn-3</i> | 72 ± 2       | 51 ± 1   |
| Ольвія          | <i>Vrn-1</i> | 68 ± 1       | 47 ± 1   |
|                 | <i>Vrn-2</i> | 89 ± 3       | 61 ± 2   |
|                 | <i>Vrn-3</i> | 76 ± 2       | 50 ± 1   |

Отримані дані дозволяють припустити, що темпи розвитку пшениці м'якої детерміновані не тільки домінантним станом окремого гена, а взаємодією рецесивних і домінантних алелів генів *Vrn*. Таким чином, для дослідних ізоляцій з домінантним алелем *Vrn-A1* і рецесивними алелями *vrn-B1* і *vrn-D1* характерні швидкі темпи розвитку, а для ліній з домінантним алелем *Vrn-B1* і рецесивними *vrn-A1* і *vrn-D1* повільні. Також нами було підтверджено виявлену закономірність - відсутність домінантного алеля *Vrn-D1* у ізоляцій м'якої пшениці з ярим типом розвитку, що характерно для ярих сортів, які вирощуються у Європі [3,6].

### 3.2 Молекулярно-генетичні дослідження генів *Vrn* за різних трофічних умов яровизації

У процесі яровизації у озимої пшениці і ячменю відбувається експресія генів *Vrn*, яка визначає здатність рослин переходити до генеративної фази – колосіння [99, 110, 111, 119, 196]. Для успішного протікання яровизаційного процесу, результатом якого є перехід до фази колосіння, рослини потребують трофічних факторів, в якості яких виступають вуглеводи. Однією із важливих функцій вуглеводів є сигнальна, оскільки вони виконують роль універсальних регуляторів експресії генів детермінації процесів росту, розвитку і флорального морфогенезу рослин [115, 125]. Нами було висунуто припущення, що умови трофічного забезпечення протягом яровизаційного процесу можуть впливати на алельний стан і експресію генів *Vrn*.

Виходячи з вище сказаного, були змодельовані умови з різним рівнем забезпечення трофічними факторами за яровизації, а саме: цілі зернівки з ендоспермом (оптимальне), ізольовані зародки на воді (відсутність трофічних факторів) та 3 %-му розчині сахарози (дефіцит). Для проведення молекулярно-генетичного аналізу використовували проростки на різних етапах яровизації - 15, 30, 45 діб, оскільки необхідно було знайти той період, на якому відбуваються певні зміни [84]. Адже відомо, що в основі механізму детермінації чутливості до яровизації і переходу до колосіння лежать мутації в регуляторних районах *Vrn-A1*. Ці мутації знімають залежність переходу до стадії колосіння від фактору яровизації бо, вірогідно, відбуваються зміни алельного стану генів [99, 119]. У локусі гена *Vrn-A1* виникають делеції або інсерції в промоторі, або в першому інтроні, а також в локусі гена *Vrn-B1* – інсерції-ретротранспозону в області 5' - UTR [99]. З літературних даних відомо, що у тетраплоїдної пшениці в локусі *Vrn-B1* була виявлена алельна варіація, асоційована з частково домінуючим ефектом [110, 111]. У диплоїдної пшениці і ячменю показано, що озимий або ярий тип розвитку визначається алельною варіабельністю в локусах *Vrn-A1* і *Vrn-B1*, а у поліплоїдних видів пшениці переважно алельною варіацією *Vrn-A1* [119]. У наших дослідженнях також була показана варіабельність алельних станів локусу гена *Vrn-B1* при

культивуванні первинної і пересадкової калусної культури м'якої гексаплоїдної пшениці [4].

На рисунках 3.4 – 3.7 наведені дані, одержані при аналізі алельного стану генів *Vrn* у процесі яровизації за різного рівня трофічного забезпечення проростків сортів пшениці озимої Миронівська 808 і Ольвія [84].

Результати дослідження алельного стану генів *Vrn* показали, що у 15-добових проростків, які яровизували в контрастних умовах трофічного забезпечення за температури  $4 \pm 1$  °C всі три гени *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* знаходилися в рецесивному стані (рис. 3.4), що характерно для озимого типу розвитку.

Алелі локусу *Vrn-A1* вивчали з використанням VRN AF і VRN-INT1R праймерів. Очікуваний розмір ампліфікованого фрагмента з використанням цих праймерів для найпоширенішого домінантного алеля *Vrn-A1a* становить 965 і 876 п.н., для рецесивного алеля *vrn-A1* становить 734 п.н. (див. додаток Б).

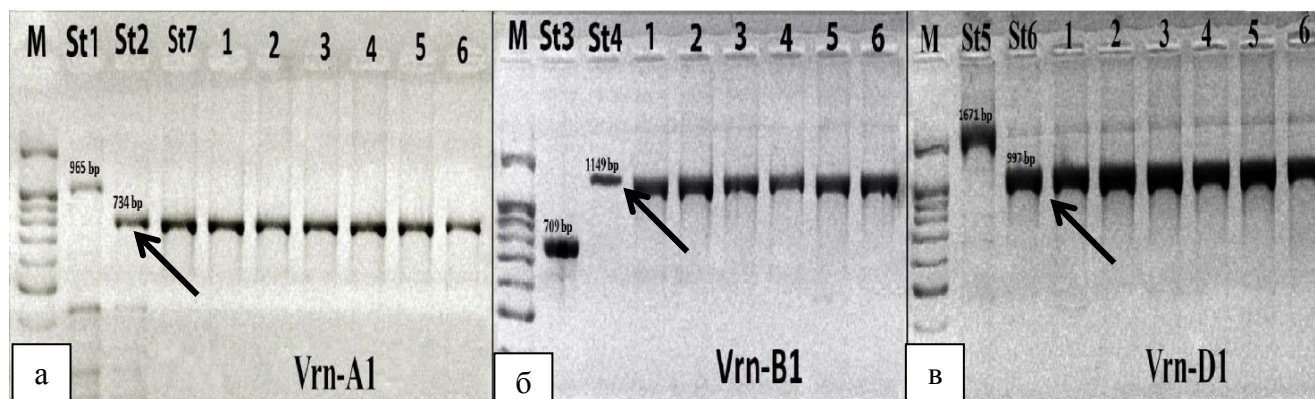


Рис. 3.4 Алельний стан локусів *Vrn-A1* (а), *Vrn-B1* (б) і *Vrn-D1* (в) 15-добових яровизованих проростків двох сортів пшениці при яровизації за різного трофічного забезпечення (Миронівська 808: 1 – зернівки з ендоспермом, 2 – ізолювані зародки + вода, 3 – ізолювані зародки + 3 % сахароза); Ольвія(4 – зернівки з ендоспермом, 5 – ізолювані зародки + вода, 6 – ізолювані зародки + 3 % сахароза)

Серед проаналізованих варіантів рецесивний алель *vrn-A1* був виявлений у всіх проростків обох сортів Миронівська 808 і Ольвія (рис. 3.3а). Аналіз локусу *Vrn-B1* з використанням двох пар праймерів (Touchdown PCR, дуплекс) Intr/B/F і Intr/B/R3 та Intr1/B/F і Intr1/B/R4 з другою парою показав наявність тільки рецесивного алелю *vrn-B1* з розміром ампліфікованого фрагмента 1149 п.н.

відповідно (рис. 3.3б), а також при використанні праймерів Intr1/D/F і Intr1/D/R3 та Intr1/D/F і Intr1/D/R4 з другою парою – рецесивного алеля *vrn-D1* (997 п.н.) у всіх варіантах дослідів обох сортів (рис. 3.4, в).

В ході молекулярно-генетичного аналізу в проростках, яровизованих протягом 30 діб в різних умовах забезпечення трофічними факторами також не виявлено змін в алельному стані трьох генів системи *Vrn* - *Vrn-A1*, *Vrn-B1* і *Vrn-D1* (рис. 3.5).

У всіх дослідних варіантах двох сортів озимої пшениці - Миронівська 808 і Ольвія був ідентифікований рецесивний алель *vrn-A1* з продуктом ампліфікації 734 п.н. з використанням праймерів VRN AF і VRN-INT1R (Рис. 3.5, а). При використанні двох пар праймерів (Touchdown PCR, дуплекс) Intr1/B/F і Intr/B/R3 та Intr1/B/F і Intr/ B/R4 з другою парою виявлений рецесивний алель *vrn-B1* - 1149 п.н. (рис. 3.5, б), а також рецесивний алель *vrn-D1* - 997 п.н. при використанні праймерів Intr1/D/F і Intr1/D/R3 та Intr1/D/F і Intr1/D/R4 (рис. 3.5, в) з другою парою у всіх варіантах відповідно.

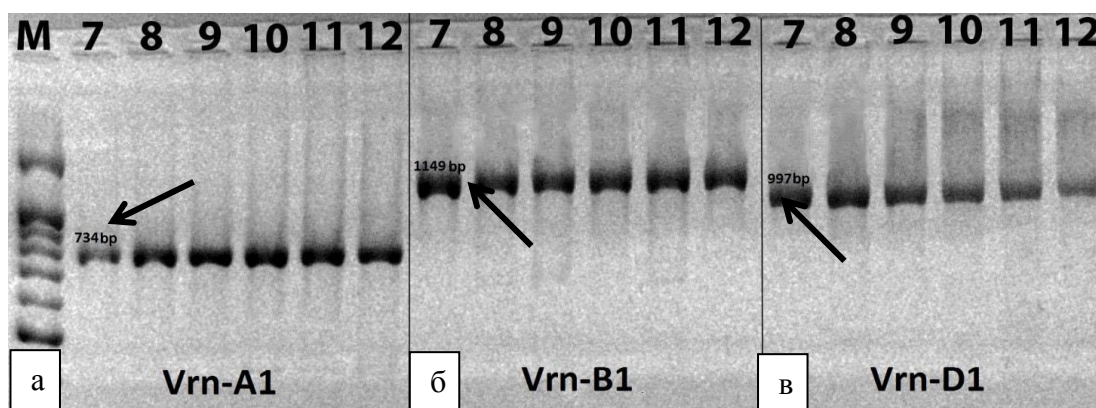


Рис. 3.5 Алельний стан локусів *Vrn-A1* (а), *Vrn-B1* (б) і *Vrn-D1* (в) 30-добових яровизованих проростків двох сортів пшениці при яровизації за різного трофічного забезпечення (Миронівська 808: 7 – зернівки з ендоспермом, 8 – ізолювані зародки + вода, 9 – ізолювані зародки + 3% сахароза); (Ольвія: 10 – зернівки з ендоспермом, 11 – ізолювані зародки + вода, 12 – ізолювані зародки + 3% сахароза)

За дослідження алельного стану генів *Vrn* у проростках на 45-ту добу яровизації були отримані наступні результати (рис. 3.6). Гени *Vrn-A1* і *Vrn-D1* у всіх варіантах обох сортів пшениці Миронівська 808 і Ольвія були представлені тільки рецесивними алелями *vrn-A1* (734 п.н.) і *vrn-D1* (997 п.н.) (рис. 3.6, а, 3.6, в). Однак в алельному стані локусу *Vrn-B1* були виявлені зміни. Після 45-ти діб впливу низькими позитивними температурами в проростках, які були яровизовані в умовах природного забезпечення трофічними факторами – варіант зернівки з ендоспермом, а також штучного – варіант ізольовані зародки + 3% р-н сахарози, було виявлено як рецесивні алелі *vrn-B1* (1149 п.н.), так і домінантні *Vrn-B1* (709 п.н.) (рис. 3.6, б). Тобто, рівень трофічного забезпечення вплинув на алельний стан гена *Vrn-B1*, вірогідно, перевівши його із гомозиготного в гетерозиготний. В умовах дефіциту трофічних факторів таких перебудов не було виявлено. Це дає підставу припустити про залежність прояву змін в алельному стані гена *Vrn-B1* від тривалості яровизації і від її забезпеченості трофічними факторами – в наших дослідках наявністю поживних речовин ендосперму і 3 %-го розчину сахарози за яровизації.

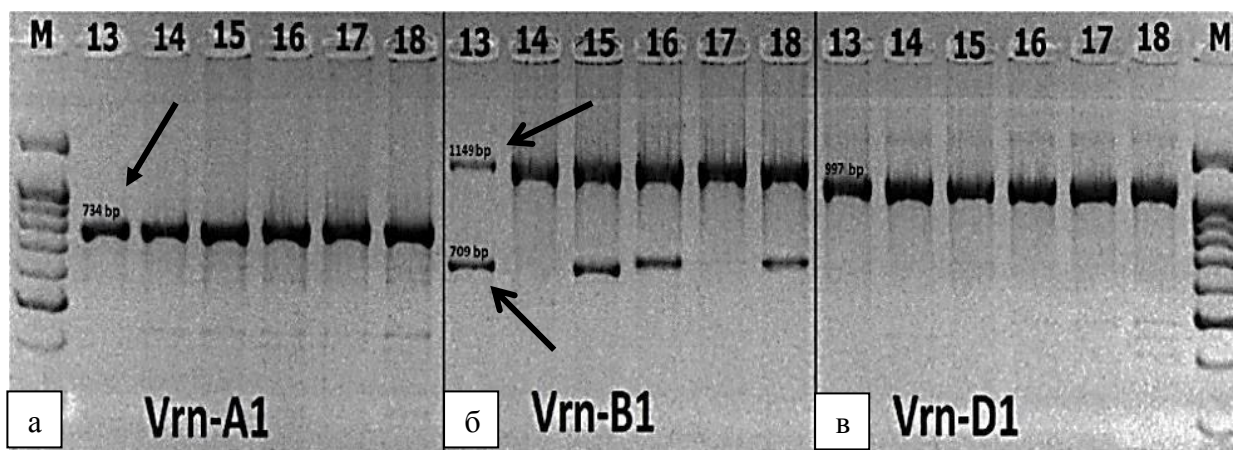


Рис. 3.6 Алельний стан локусів *Vrn-A1* (а), *Vrn-B1* (б) і *Vrn-D1* (в) 45-добових яровизованих проростків двох сортів пшениці при яровизації за різного трофічного забезпечення (Миронівська 808: 13 – зернівки з ендоспермом, 14 – ізольовані зародки + вода, 15 – ізольовані зародки + 3 % сахароза); (Ольвія: 16 – зернівки з ендоспермом, 17 – ізольовані зародки + вода, 18 – ізольовані зародки + 3 % сахароза)

Оскільки ген *Vrn-A1* є основним в детермінації потреби або нечутливості до яровизації [65, 196], то для дослідження його алельного стану використовують значну кількість праймерів (див. додаток Б). Використання праймерів VRN AF і VRN-INT1R дозволяє виявити відмінності алелі *vrn-A1* від алелей *Vrn-A1a* і *Vrn-A1e*, але не вловлює відмінностей між *vrn-A1* і *Vrn-A1c*, оскільки утворюється ампліфікований фрагмент довжиною 734 п.н., який може відповідати і *vrn-A1* і *Vrn-A1c* (див. додаток Б).

У подальших дослідженнях ми використовували праймери Intr1/C/F і Intr1/AB/R (див. додаток Б). В ході проведених ПЛР-аналізів алельного стану локусу *Vrn-A1* у проростках всіх варіантів, незалежно від тривалості періоду яровизації 15, 30 і 45 діб, був виявлений тільки рецесивний алель *vrn-A1* (1068 п.н.) у обох сортів озимої пшениці – Миронівська 808 і Ольвія (рис. 3.7).

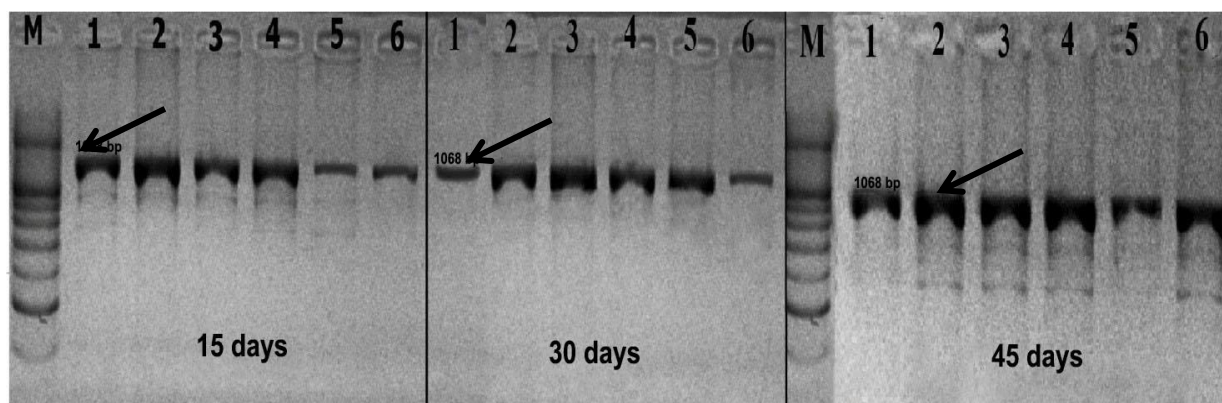


Рис. 3.7 Виявлення алелей *Vrn-A1c* і *vrn-A1* у проростків, яровизованих в контрастних умовах трофічного забезпечення, двох сортів пшениці (Миронівська 808: 1– зернівки з ендоспермом, 2 – ізолювані зародки + вода, 3 – ізолювані зародки + 3 % сахароза); (Ольвія: 4 – зернівки з ендоспермом, 5 – ізолювані зародки + вода, 6 – ізолювані зародки + 3 % сахароза)

Таким чином, зміни алельного стану, які знімають залежність переходу до стадії колосіння від фактору яровизації і переводять ген з рецесивного в домінантний стан [110], в наших дослідженнях, були виявлені тільки після 45 діб яровизації і в умовах природного або штучного забезпечення трофічними факторами і тільки в локусі гена *Vrn-B* – головного репресора цвітіння в генетичній

системі яровизаційного контролю [84]. Це дає підставу для припущення, що генетичний контроль процесу яровизації генами *Vrn* здійснюється за участі трофічних факторів.

### 3.3 Алельний стан локусів генів *Vrn* за умов культури *in vitro*

Культура *in vitro* являється зручною моделлю для дослідження процесів росту і розвитку рослин і широко використовується в дослідженнях сучасної фітобіотехнології [20, 21, 24, 29, 41, 43, 47, 111, 140]. Рослинні клітини, на відміну від тваринних, мають унікальну властивість однієї клітини розвиватися в цілий організм, яка називається тотипотентністю і є основою для більшості морфогенетичних моделей рослин *in vitro*. Клітини вищих рослин в умовах культури *in vitro* характеризуються появою нових специфічних властивостей, але водночас здатні зберігати властивості, характерні для рослин в умовах *in vivo*. Основним типом культури вищих рослин *in vitro* є калусна культура, яка і повною мірою проявляє тотипотентність [15, 30]. При утворенні калусних дидеференційованих клітин не зовсім ясно, що викликає поділ і коли поновлюється меристематична активність. У роботах Уорінга і Філліпса (1984 р.) представлені дані, що в основі цього процесу, ймовірно, лежить явище зняття стану вибіркового «маскування» геному, так зване «перепрограмування». Однак калусні клітини можуть зберігати частину властивостей вихідної тканини протягом багатьох етапів субкультивування, тобто «перепрограмування» може бути неповним. Це є прикладом епігенетичних змін, тобто змін в експресії генів [162].

Відомо, що генотип вихідної рослини має вагомий вплив на морфологію, швидкість поділу калусних клітин, ефективність та протікання процесів калусогенезу та інші. [62, 169, 183] Серед генетичних систем детермінації процесів росту і розвитку рослин озимої м'якої пшениці вагоме місце займає система генів *Vrn*, яка визначає тип розвитку і контролює процес яровизації. Вивчення участі даної генетичної системи в контролі процесу формування первинного калусу *Triticum aestivum* L. майже не досліджується. Тому нами було проведено дослідження можливого впливу генотипу (алельного стану генів *Vrn*) на

ефективність калусогенезу та морфологічну характеристику ізогенних за генами контролю типу розвитку ліній озимої м'якої пшениці (6 ізоліній та вихідні сорти Миронівська 808 (М 808) і Ольвія, які є носієм рецесивних генів генетичної системи *Vrn*).

В якості експланту для отримання первинного калусу використовували зрілі зародки пшениці, які є найбільш ефективними експлантами для отримання первинного калусу [2, 140]. За раніше отриманими нами даними зрілі зародки також виявилися ефективними експлантами [4].

У ізоліній *Vrn*-1 і *Vrn*-3 початок калусогенезу відбувався вже на 7-10 добу, в той час як у *Vrn*-2 і обох вихідних сортів Ольвія і М 808 - на 14-17. Усі представлені генотипи формували калус, з різною частотою – 61-93 % (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Ефективність калусогенезу ізогенних за генами *Vrn* пшениці, %**

| Сорт   | Ізолінія      | Калусогенез * | Морфологічна характеристика                                                                            |
|--------|---------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| М 808  | <i>Vrn</i> -1 | 74,3 ± 3,0    | Компактний, гетерогенний, мало обводнений, аморфний, сизо-жовтого відтінку, з елементами диференціації |
|        | <i>Vrn</i> -2 | 93,2 ± 4,2    |                                                                                                        |
|        | <i>Vrn</i> -3 | 66,6 ± 2,1    |                                                                                                        |
|        | сорт          | 84,4 ± 3,7    |                                                                                                        |
| Ольвія | <i>Vrn</i> -1 | 70,5 ± 3,1    |                                                                                                        |
|        | <i>Vrn</i> -2 | 90,0 ± 4,0    |                                                                                                        |
|        | <i>Vrn</i> -3 | 61,5 ± 1,9    |                                                                                                        |
|        | сорт          | 80,5 ± 2,7    |                                                                                                        |

*Примітка.\** Різниця між варіантами значуща при  $p \leq 0,05$ . Для М 808  $HP_{0,05} = 3,8$  %, для Ольвії  $HP_{0,05} = 4,2$  %

Результати показали, що ізолінії кожного сорту і вихідний сорт значно різнилися між собою за ефективністю калусогенезу. Максимальною частотою калусогенезу характеризувалися ізолінія *Vrn*-2 і сорт, а мінімальної – *Vrn*-1 і *Vrn*-3 обох досліджених сортів. При цьому за морфологічної характеристикою відмінності не спостерігалися.

В умовах *in vivo*, між собою ці лінії розрізняються за темпами розвитку: Vrn-1 і Vrn-3 – це ярі форми пшениці, які розвиваються швидше, ніж яра ізоляція Vrn-2, а також сорт – озима форма, яка без яровизації не переходить до колосіння. Раніше отримані дані [27] показали, що за умов *in vivo*, рослини ізогенних ліній Vrn-2 з домінантним алелем гену *Vrn-B1* відрізняються від рослин ліній Vrn-1 та Vrn-3 рецесивним алелем цього гену, більш тривалою вегетативною фазою та у результаті цього, більш інтенсивними ростовими процесами (накопичення вегетативної маси), але повільнішими темпами розвитку. За умов *in vitro* лінія Vrn-2 з повільними темпами розвитку мала найвищий показник частоти калусогенезу. За даними, отриманими в результаті ПЛР-аналізу, в калусній культурі ізоляції Vrn-2 був ідентифікований домінантний алель гену *Vrn-B1*, що, ймовірно, і вплинуло на час індукції, а також частоту калусогенезу.

Порівнюючи ізоляції за генами *Vrn*, в цілому, можна констатувати, що всі ізоляції мають великий потенціал калусоутворення та ранжуються за його інтенсивністю, незалежно від генотипу сорту, наступним чином: Vrn-2 > сорт > Vrn-1 > Vrn-3.

Таким чином, було показано, що генетична система *Vrn*, яка детермінує тип і темпи розвитку м'якої пшениці *Triticum aestivum* L., ймовірно, контролює процеси індукції калусогенезу. Так, у Vrn-2 ізоляції і озимих сортів пшениці, які повільно розвиваються, показники калусогенезу були вище, ніж у ліній Vrn-1 і Vrn-3, які розвиваються швидше.

Протягом культивування калусної культури м'якої пшениці нами випробувані деякі модифікації живильного середовища Мурасіге і Скуга (МС). Додавання в живильне середовище розчину  $\text{AgNO}_3$  в концентрації 10 мг/л підвищує частоту утворення калусів і збільшує стерильність умов культивування за рахунок пригнічення внутрішньої інфекції експлантів [12, 17]. Використання в наших експериментах даної модифікації середовища культивування значно підвищило стерильність, що сприяло ефективності проведення експериментів.

Окрім цього була дана морфологічна характеристика отриманих калусів (рис. 3.8, табл. 3.3). Калусна тканина, отримана із зрілих зародків, в основному,

була мало обводнена, аморфна, компактна і гетерогенна, мала сизо-жовтий відтінок. Відмінностей між калусами ізогенних ліній двох сортів Ольвії і М 808 не спостерігалось. У калусах всіх досліджуваних ізоляцій і вихідних сортів часто виявлялися зони меристематичної активності.

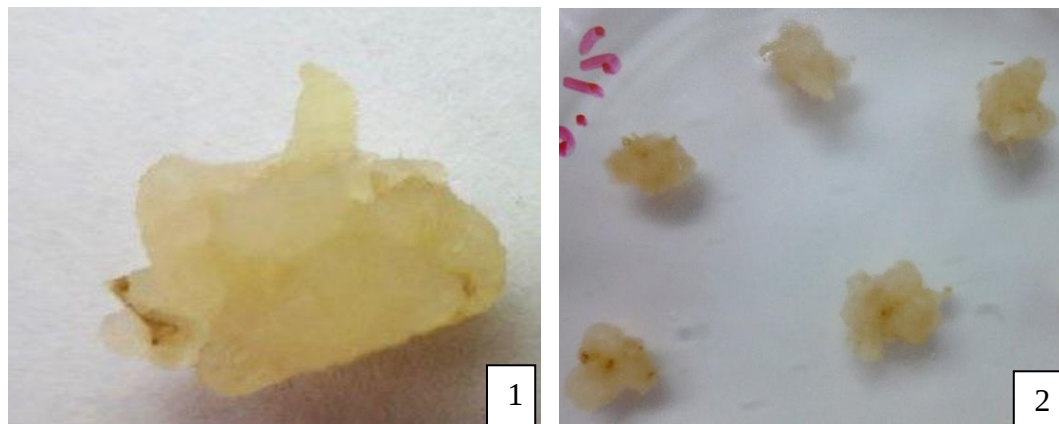


Рис. 3.8 Калусогенез ізогенної *Vrn-1* лінії м'якої пшениці *Triticum aestivum* L.:  
1 щільний гетерогенний калус, 2 – загальний вигляд калусів в чашці Петрі

Для з'ясування участі генетичної системи *Vrn* у процесах індукції та утворення первинного калусу ми провели дослідження алельного стану генів в умовах *in vitro*, а саме на пересадковій калусній тканині (рис. 3.9). За допомогою праймерів VRN1 AF VRN-INTIR було виявлено, що калусна культура ізоляцій *Vrn-1* і *Vrn-3* несе домінуючу алель *Vrn-A1a*, продукт ампліфікації якої становив 965 п.н. (рис. 3.9а), а також рецесивні алелі *vrn-B1* і *vrn-D1*, які були ідентифіковані з використанням праймерів Intr1/B/F // Intr/B/R4 і Intr1/D/F // Intr1/D/R4. Їх продукти ампліфікації становили 1149 п.н. і 997 п.н. відповідно (рис. 3.9 в, г). У ізоляції обох сортів, що розвиваються повільними темпами (*Vrn-2*) та мають найвищі показники частоти калусогенезу (див. табл.3.3) була ідентифікована домінуюча алель *Vrn-B1* з використанням пари праймерів Intr1/B/F і Intr/B/R3 з продуктом 1170 п.н., а також *vrn-D1* з використанням парипраймерів Intr1/D/F // Intr1/D/R4 – 997 п.н. У даному випадку для виявлення рецесивної/домінуючої алелі гена *Vrn-A1* були використані дві пари праймерів, так же як і за умов *in vivo* (в насінні). У результаті ампліфікації з першою парою VRN1 AF і VRN1-INTIR за допомогою електрофорезу у агарозному гелі був ідентифікований продукт 734 п.н.

Для того, щоб пересвідчитися, що даний продукт відповідає рецесивній алелі *vrn-A1*, а не доміантній *Vrn-A1c* з такою ж молекулярною масою – 734 п.н., проводили ПЛР-аналіз з другою парою праймерів Intr1/CF і Intr1/ABR, у результаті чого був виявлений продукт - 1068 п.н. (рис. 3.9, г).

Відомо, що морфологічна, фізіологічна і генетична гетерогенність являється однією з характеристик калусної культури [15]. На даний момент активно ведуться дослідження особливостей та механізмів генетичної мінливості клітинних культур. Так як у ході субкультивування калусної культури часто виникає явище спонтанної соматональної мінливості [24, 40]. Тому для певних робіт по фітобіотехнології необхідно підтвердження збереження вихідного генотипу рослини-донора в ході культивування *in vitro*.

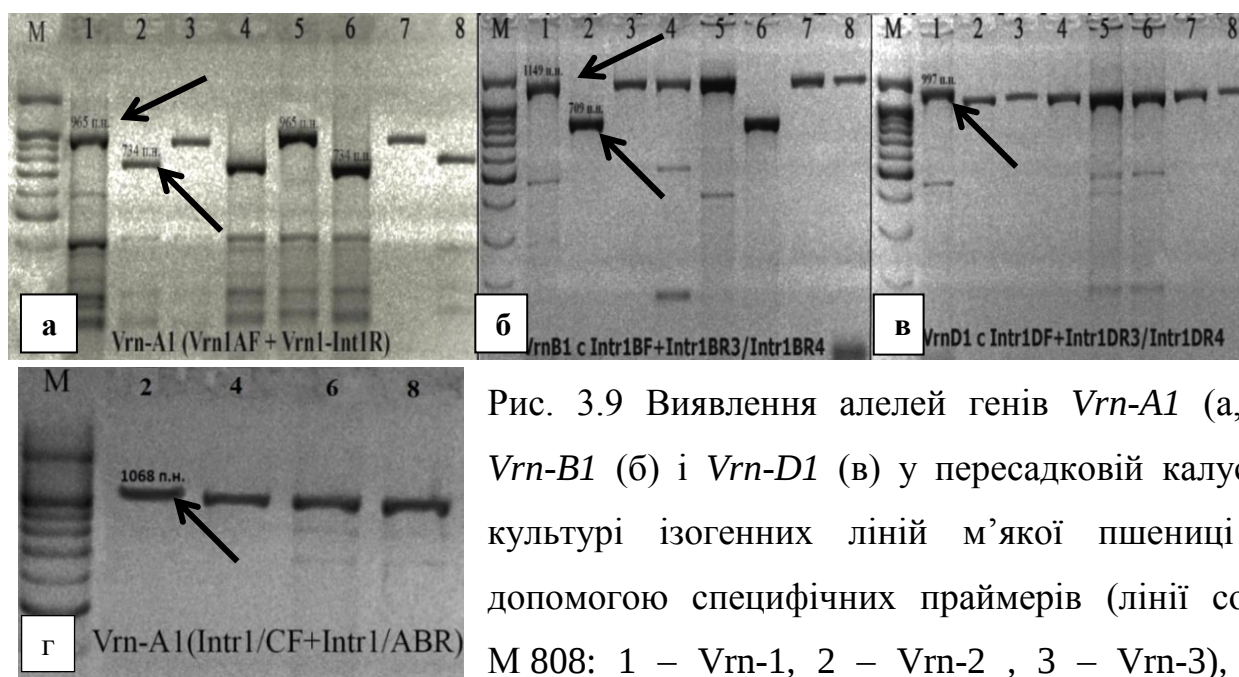


Рис. 3.9 Виявлення алелей генів *Vrn-A1* (а, г), *Vrn-B1* (б) і *Vrn-D1* (в) у пересадковій калусній культурі ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою специфічних праймерів (лінії сорту М 808: 1 – *Vrn-1*, 2 – *Vrn-2*, 3 – *Vrn-3*), 4 –

вихідний сорт; (лінії сорту Ольвія: 5 – *Vrn-1*, 6 – *Vrn-2*, 7 – *Vrn-3*), 8 – вихідний сорт

У результаті порівняння даних молекулярно-біологічних досліджень в культурі *in vitro* і *in vivo*, нами були виявлені незначні відмінності в алельному стані генів *Vrn* в насінні і калусній культурі (табл. 3.4).

Зміни спостерігалися в калусній культурі ізолінії *Vrn-3* сорту М 808, а саме алельного стану *Vrn-B1*. Ймовірно, при отриманні культури клітин, а також

індукції калусоутворення, в даному випадку виявилися накопичені в онтогенезі геномні зміни – перебудови. Механізми таких перебудов різні [40, 199].

В ході проведених досліджень, в основному, було підтверджено збереження генотипу вихідних ізоляцій за умов культивування *in vitro*. Явище спонтанної соматоклональної мінливості не спотерігалось у пересадковій калусній культурі досліджуваних ізоляцій, за винятком ізоляції Vrn-3 сорту М 808. У цієї ізоляції в насінні виявлений наступна комбінація алелів – *VRN-A1a VRN-B1 / vrn-B1 vrn-D1*, в той час як у калусній культурі був відсутній компонент *VRN-B1 / vrn-B1* (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Алельні варіанти генів *Vrn* в умовах *in vivo* та *in vitro***

| Сорт / ізоляція | Генотип                               |                              |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------|
|                 | Насіння                               | Калусна культура             |
| М 808           | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>           | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>  |
| М 808 Vrn-1     | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i> |
| М 808 Vrn-2     | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>           | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>  |
| М 808 Vrn-3     | <i>VRN-A1a VRN-B1 / vrn-B1 vrn-D1</i> | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i> |
| Ольвія          | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>           | <i>vrn-A1 vrn-B1 vrn-D1</i>  |
| Ольвія Vrn-1    | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i> |
| Ольвія Vrn-2    | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>           | <i>vrn-A1 VRN-B1 vrn-D1</i>  |
| Ольвія Vrn-3    | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>          | <i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i> |

Таким чином, одержані нами дані підтверджують збереження генотипу рослини-донора двох сортів *Triticum aestivum* L., оскільки у калусній культурі ізоляцій і вихідних сортів зберігається практично такий же алельний стан генів *Vrn* як і у рослин *in vivo*. Тому, на нашу думку, культура *in vitro* є адекватною системою для подальшого вивчення фізіолого-біохімічних процесів залежно від алельного стану генів *Vrn* у пшениці м'якої. Незначні відмінності у алельному стані гену *VRN-B1* у ізоляції Vrn-3 сорту М 808 між його станом у калусній культурі та *in vivo*

(у насінні) не вплинули на істотну різницю ефективності калюсогенезу, бо у ізоліній *Vrn-3* обох сортів вона була нижчою, ніж у інших ліній.

Одержані результати дозволяють вважати наявність можливої участі системи генів *Vrn* в контролі процесу формування первинного калусу досліджуваних ізоліній.

### **Висновки до розділу 3**

1. Встановлено, що ізогенні за генами *Vrn* лінії пшениці м'якої відрізняються за алельним станом цих генів, що обумовлює різні темпи їх розвитку.
2. Показано, що яровизація проростків за різного трофічного забезпечення зумовлює зміну у алельному стані гена *Vrn-B1*, головного репресора переходу до цвітіння пшениці озимої.
3. З'ясовано, що в пересадковій калусній культурі *in vitro* 2-3 пасажу ізогенних за генами *Vrn* ліній зберігається алельний стан локусів генів потреби у яровизації, подібно тому, який характерний для *in vivo*.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [2, 4, 6, 28, 84].

## **РОЗДІЛ 4**

### **ВПЛИВ КОНТРАСТНИХ ТРОФІЧНИХ УМОВ ЯРОВИЗАЦІЇ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**

#### **4.1 Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем**

Відомо, що меристематичні тканини рослин є найбільш чутливими і активно реагують на зміни умов зовнішнього середовища, при цьому вони постійно утворюють нові клітини. Особливості виду, вік рослин, фактори зовнішнього середовища (температура, освітлення, аерація, зволоженість, наявність метаболітів та ін.) можуть впливати на тривалість мітотичних циклів меристематичних тканин [47, 67, 186]. Температура – один із широко досліджуваних зовнішніх факторів впливу на рослинний організм [109]. Яровизація (тривала дія низьких позитивних температур) пов'язана з протіканням трофічних процесів. За яровизаційного впливу процеси поділу і новоутворення нових клітин потребують забезпечення енергією та пластичними речовинами. А реалізація програми розвитку рослинного організму пов'язана безпосередньо з проліферативною активністю в меристемах рослин [186].

Однак в літературі відсутні дані про вплив різних умов трофічного забезпечення на проліферативну активність меристем пшениці озимої м'якої за яровизації.

Дослідження залежності проліферативної активності в меристемах рослин озимої м'якої пшениці від умов трофічного забезпечення є важливим для пізнання фізіологічної, генетичної та епігенетичної природи процесу яровизації. У наших дослідах трофічне забезпечення за яровизації моделювали наступним чином: 1) контрольний варіант – цілі зернівки з додаванням води; 2) зернівки + 3 % розчин сахарози; 3) ізольовані зародки + вода; 4) ізольовані зародки + 3 % розчин сахарози.

Для того, щоб оцінити проліферативну активність популяції меристематичних клітин, використовували показник мітотичний індекс (МІ), який розраховували як співвідношення кількості клітин, які знаходяться на стадії мітозу, до загальної кількості клітин досліджуваної тканини (в препараті або в культурі) [58]. Для коректного співставлення МІ за варіантами була проведена стандартизація рослинного матеріалу шляхом морфометричного аналізу кореневої системи. Для аналізів відбирали корінці чотирьох варіантів так, щоб їх довжина була однаковою. Така необхідність відбору корінців обумовлена тим, що їх довжина пов'язана з проліферативною активністю. Відомо, що максимум мітозів спостерігається при довжині кореня приблизно 1,5 см, а перші мітози виявляються при довжині 1,2 см [58].

Тому в нашому дослідженні відбір рослинного матеріалу для фіксації проводили за обов'язкових умов: довжина кореня була не менше 1,2 см і однаковою у варіантах досліджу. Матеріал фіксували по завершенні яровизації – на 45-ту добу.

Результати дослідження впливу контрастних умов яровизації на проліферативну активність кореневих меристем озимої м'якої пшениці двох сортів Дорідна та Статна наведені у таблиці 4.1.

Одержані дані показали відмінності у МІ за варіантами досліджу. У варіантах яровизації ізолюваних зародків з додаванням 3-го % розчину сахарози у обох сортів Статна та Дорідна були виявлені максимальні показники МІ 8,45 % і 8,92 % відповідно. У нашому дослідженні сахарозу використовували в якості екзогенного трофічного фактору і додавання її 3 %-го розчину стимулювало проліферацію апікальної кореневої меристеми, порівняно до неї у всіх інших варіантах досліджу. В умовах дефіциту трофічних факторів, у варіанті ізолювані зародки з додаванням води, спостерігалось пригнічення мітотичних поділів: МІ обох сортів Статна та Дорідна становив 6,82 % і 6,86 % відповідно, що нижче, ніж у варіанті зернівки + вода (оптимальне трофічне забезпечення). Однак, ці показники значно нижчі, порівняно до показників варіанту ізолювані зародки + сахароза [5].

Порівняльний аналіз варіантів з оптимальним трофічним забезпеченням (зернівки + вода) та надлишковим (зернівки + сахароза) показав, що додавання розчину сахарози до зернівок за яровизації може пригнічувати проліферацію клітин кореневої меристеми. Це може побічно свідчити про істотну роль трофічного забезпечення у перебігу яровизаційних процесів.

Таблиця 4.1

**Вплив контрастних умов трофічного забезпечення яровизації на мітотичну активність корневих меристем сортів пшениці озимої м'якої**

| Сорт    | Варіант                                | Мітотичний індекс, % |
|---------|----------------------------------------|----------------------|
| Статна  | Зернівки + вода (контроль)             | 7,31                 |
|         | Зернівки + 3 % р-н сахарози (контроль) | 6,52                 |
|         | Ізольовані зародки + вода              | 6,82                 |
|         | Ізольовані зародки + 3 % р-н сахарози  | 8,45**               |
|         |                                        | $HP_{0,05} = 1,09$   |
| Дорідна | Зернівки + вода (контроль)             | 8,01 – 0,44          |
|         | Зернівки + 3 % р-н сахарози (контроль) | 6,51**               |
|         | Ізольовані зародки + вода              | 6,86*                |
|         | Ізольовані зародки + 3 % р-н сахарози  | 8,92**               |
|         |                                        | $HP_{0,05} = 1,45$   |

*Примітка.* Різниця з контролем значуща \*)  $HP_{0,05} = 1,09$  %; \*\*)  $HP_{0,05} = 1,45$  %

Разом з тим, за нашими даними, таке пригнічення може бути сортоспецифічним: для сорту Статна пригнічення проліферації неістотне, а для сорту Дорідна, навпаки, суттєве.

Стимулюючий вплив на поділ клітин за додавання сахарози до ізольованих зародків, вірогідно, може бути пов'язаний з тим, що сахароза виступає у ролі екзогенного трофічного фактору для забезпечення проліферації пластичними і енергетичним матеріалом в умовах дефіциту трофічних факторів.

У цілому, показники мітотичного індексу яровизованих 45-добових проростків у всіх варіантів сорту Дорідна були вищими в порівнянні з ним у сорту Статна. Виявлені закономірності можуть бути пов'язані з генотиповими особливостями досліджуваних сортів. Дані сорти мають високу зимостійкість, але належать до різних різновидностей пшениці м'якої: Дорідна – *lutescens*, а Статна – *erythrospermum*. Також за нашими даними фенологічних спостережень за умов вегетаційного експерименту рослини сорту Дорідна мають більшу висоту стебла, більші показники біомаси, а також більш тривалий період «сходи-колосіння» у порівнянні з сортом Статна [5].

Оскільки тривалість мітотичного циклу є видовою ознакою і у пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. становить період 10-12 годин [14], то показник відносної тривалості фаз, як правило, може свідчити про стан клітинної популяції, яка активно проліферує в конкретний момент часу і в конкретних умовах [203]. Виходячи з цього ми визначали тривалість окремих фаз мітозу.

При цьому в кожному препараті враховували загальну кількість клітин, які діляться, та відповідну кількість клітин, що знаходяться у мітотичних фазах: метафазі, профазі, анафазі і телофазі. Порівняння показника МІ в корневих меристемах усіх варіантів яровизованих проростків двох сортів, виявило, що співвідношення фаз значною мірою варіює (рис. 4.1).

За даними цитологічного дослідження найбільша частка клітин від загальної кількості, яка вступила у мітоз, перебувала у анафазі, незалежно від варіанту досліду і сорту (рис. 4.1). У всіх варіантах досліду обох сортів, значно меншою була кількість клітин у профазі, телофазі та метафазі, порівняно з кількістю в анафазі. На момент цитологічного аналізу, на 45 добу яровизації, меристематичні клітини завершували мітотичний цикл, перебуваючи в стадії анафази, число яких у всіх варіантах досліду обох сортів була максимальною – 47-65 %. Крім того, найбільш тривалою анафаза була у сорту Дорідна у варіанті зародки + вода (близько 70 %).

Зазначимо, що серед усіх варіантів, у варіантах зернівки + 3 % сахароза обох сортів озимої м'якої пшениці тривалість першої стадії мітозу, профазі, була

більшою порівняно з її тривалістю у інших варіантах дослідження обох сортів пшениці. Окрім цього, даний варіант надлишку трофічного забезпечення характеризувався нижчими показниками МІ, порівняно до контролю (зернівки + вода), особливо у сорту Дорідна (див. табл. 4.1). Отримані дані можуть свідчити про інгібуючий вплив екзогенної сахарози (надлишок трофічного фактору) на інтенсивність проліферації в умовах достатнього трофічного забезпечення за рахунок ендосперму. У наших дослідженнях впливу трофічного фактору на ростову реакцію сахароза також пригнічувала ріст кореневої системи та надземної частини рослин у варіантах зернівки з ендоспермом + сахароза [5].

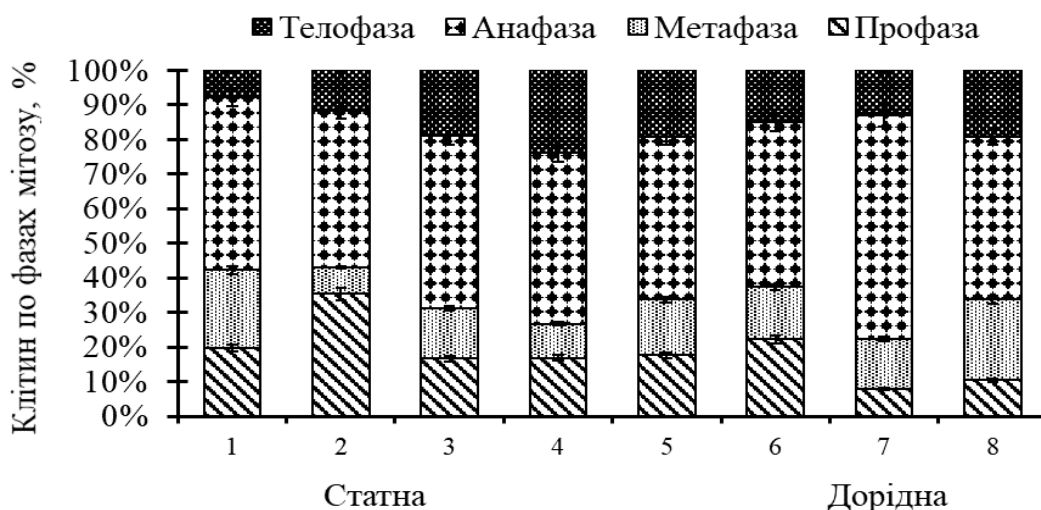


Рис. 4.1 Вплив трофічного забезпечення яровизації на тривалість фаз мітозу корневих меристем двох сортів озимої пшениці. Сорт Статна: 1 – зернівки + вода (контроль), 2 – зернівки + 3 % р-н сахарози, 3 – ізолювані зародки + вода, 4 – ізолювані зародки + 3 % р-н сахарози. Сорт Дорідна: 5 – зернівки + вода (контроль), 6 – зернівки + 3 % р-н сахарози, 7 – ізолювані зародки + вода, 8 – ізолювані зародки + 3 % р-н сахарози

*Примітка.* \* Різниця з контролем значуща  $НІР_{0,05} = 4,22\%$  (для профаз),  $НІР = 4,39\%$  (для метафаз),  $НІР_{0,05} = 15,08\%$  (для анафаз),  $НІР_{0,05} = 10,90\%$  (для телофаз).

Отже, за результатами дослідження, незалежно від трофічних умов та сортової специфічності, клітини апікальної меристеми коренів яровизованих

45-денних рослин, проходять фази мітотичного циклу досить синхронно. Вивчення проліферативної активності меристем за яровизації доводить, що трофічне забезпечення рослин екзогенною сахарозою або запасними речовинами ендосперму є необхідною умовою для стимулювання мітотичної активності меристематичних клітин. Тобто, пластичні та енергетичні речовини ендосперму необхідні для нормального проходження всіх фаз клітинного циклу за яровизації. Установлена залежність проліферативної активності кореневих меристем від умов трофічного забезпечення, на нашу думку, свідчить, що ці умови є одним з вагомих факторів протікання проліферативних процесів за яровизації.

#### **4.2 Вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках озимої пшениці**

Різні форми вуглеводів задіяні в регуляції яровизаційного процесу. Успішне протікання даного процесу залежить від вуглеводного обміну: вмісту та перетворення різних форм цукрів, активності гідролітичних ферментів тощо. Розчинні цукри, які є не лише метаболічними ресурсами та структурними складовими клітин, але й виступають в ролі сигнальних молекул, що регулюють різні процеси, пов'язані з ростом і розвитком рослин [136].

На ранніх стадіях онтогенезу рослин (проростання насіння та стадія проростків) для росту та підтримки осмотичного гомеостазу клітин необхідні запасні речовини, головним чином вуглеводи, які мобілізовані у вигляді розчинних цукрів (сахарози, глюкози та фруктози). Ранні етапи є найбільш уразливими до змін вмісту розчинних цукрів і тому вивчення їх метаболізму є вагомим для розуміння впливу різних факторів середовища на формування проростків [175]. Зміни рівня трофіки, вірогідно, можуть впливати на ендогенну концентрацію вуглеводів в рослинах пшениці упродовж яровизації. Для дослідження впливу трофічного фактору на вуглеводний обмін за яровизації, зокрема вмісту розчинних вуглеводів, ми змодельовали умови з різним трофічним забезпеченням цього процесу [100].

У дослідях визначали динаміку вмісту моно- та олігоцукрів протягом яровизації на 15-, 30- і 45-ту добу.

**Вміст моноцукрів в проростках сорту Дорідна.** Результати вивчення вмісту моноцукрів у проростках сорту Дорідна наведені на рис. 4.2. Вони показали, що упродовж яровизації, у цілому, спостерігалася тенденція зниження вмісту моноцукрів (моносахаридів) у рослин варіантів зернівки + вода і зернівки + сахароза, а також ізольовані зародки + сахароза, за виключенням варіанту ізольовані зародки + вода, у якому подібні зміни не виявлені. Найвищий показник був ідентифікований на 15-ту добу у варіанті зернівки + 3 % розчин сахарози, який значно не відрізнявся від варіанту зернівки + вода (рис. 4.2).

В експерименті екзогенна сахароза виконувала роль трофічного фактору і за її впливу вміст моноцукрів у 15-добових проростків, які були вирощені з ізольованих зародків без ендосперму, був дещо нижчим, ніж у варіанті з зернівки з додаванням даного дисахариду, при цьому не відрізнявся від вмісту варіанта зернівки + вода.

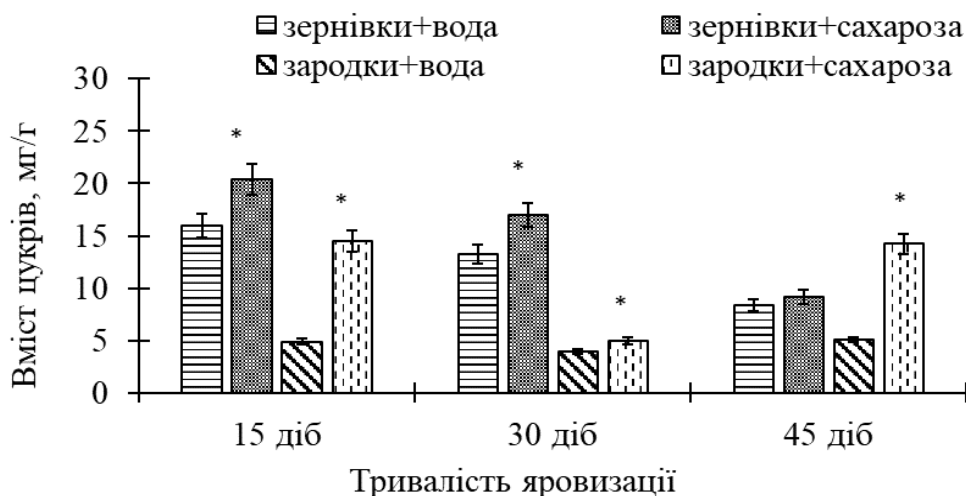


Рис. 4.2 Динаміка вмісту моноцукрів в проростках пшениці озимої сорту Дорідна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $HP_{0,05} = 5,77$  мг/г, для 30 діб  $HP_{0,05} = 2,84$  мг/г, для 45 діб  $HP_{0,05} = 3,64$  мг/г.

На 30-ту добу вміст моноцукрів знижувався у всіх варіантах досліджу. Можливо, це пов'язано з тим, що моноцукри інтенсивно залучені до метаболічних

процесів, клітинного дихання в якості субстрату, підтримки клітинного гомеостазу, як осмоліти, та ін. На 30-ту добу яровизації виявлена така ж закономірність як і на 15-ту добу. Однак, до 30-тої доби рівень вмісту моносахаридів значно знижувався у варіанті зародки + сахароза.

На 45-ту добу яровизації вміст моноцукрів зростав тільки у проростках варіанту ізолювані зародки + сахароза, а у інших – зменшувався порівняно до вмісту на 30-ту добу яровизації (рис. 4.2).

**Вміст олігоцукрів в проростках сорту Дорідна.** Вивчення динаміки вмісту олігоцукрів показало наступні результати. У цілому, їх вміст значно перевищував вміст моноцукрів. Окрім цього, динаміка вмісту олігоцукрів рослин сорту Дорідна протягом яровизації була інакшою, в порівнянні з динамікою моноцукрів. Вміст олігоцукрів на 15 добу яровизації був максимальним у проростках варіанту зернівки + вода, значно нижчим у варіанті зернівки + сахароза та мінімальним у проростках варіантів ізолювані зародки + вода та ізолювані зародки + сахароза (рис. 4.3).

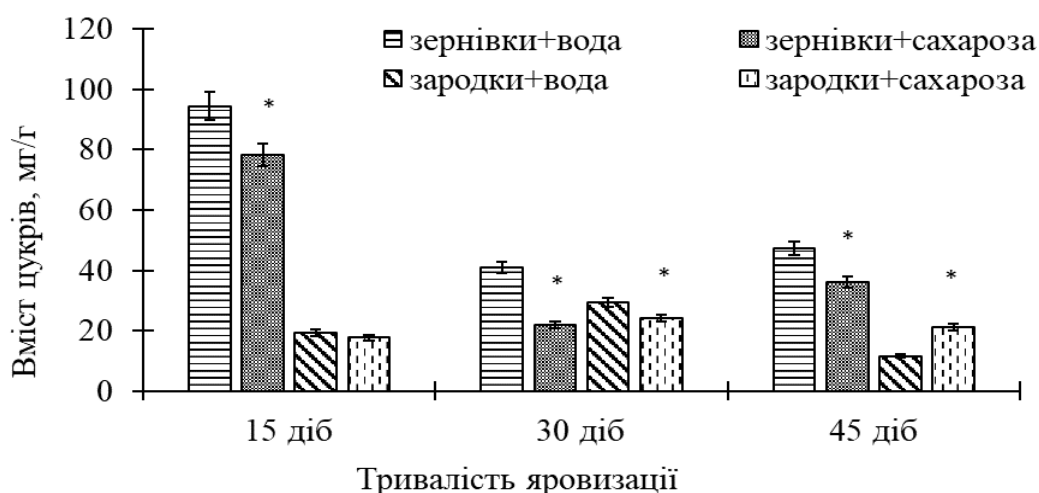


Рис. 4.3 Динаміка вмісту олігоцукрів в проростках пшениці озимої сорту Дорідна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $НІР_{0,05} = 12,88$  мг/г, для 30 діб  $НІР_{0,05} = 11,50$  мг/г, для 45 діб  $НІР_{0,05} = 9,46$  мг/г.

На 30-ту добу яровизації вміст олігоцукрів знижувався в 2 рази у варіанті зернівки + вода та в 3 рази зернівки + сахароза (рис. 4.3). Разом з тим, у проростках

варіантів ізольовані зародки + вода та ізольовані зародки + сахароза спостерігалася незначна тенденція до його підвищення. На 45-ту добу яровизації в рослинах варіанту зернівки + сахароза спостерігалася підвищення вмісту олігоцукрів, але в даному випадку він був нижчим, порівняно з варіантом зернівки + вода. Така різниця наприкінці яровизації може свідчити про те, що за умов нормального трофічного забезпечення рослин пшениці екзогенна сахароза, вірогідно, пригнічує синтез і перетворення олігоцукрів [174]. Щодо варіанту ізольовані зародки + сахароза, то показник не змінювався, а у варіанті ізольовані зародки + вода значно знижувався, що може бути пов'язано з дефіцитом трофічних факторів, які є у ендоспермі або за наявності сахарози в якості екзогенного трофічного фактору (рис. 4.3). Таким чином, протягом яровизації виявлена залежність динаміки вмісту олігоцукрів від рівня трофічного забезпечення сахарозою цього процесу.

Результати визначення динаміки загального вмісту вуглеводів, що складався із суми оліго- і моноцукрів, показали, що найвищий показник був виявлений у варіанті зернівки + вода, тобто за умов оптимального трофічного забезпечення, а також зернівка + сахароза. Причому між даними варіантами не виявлена значуща різниця (рис. 4.4).

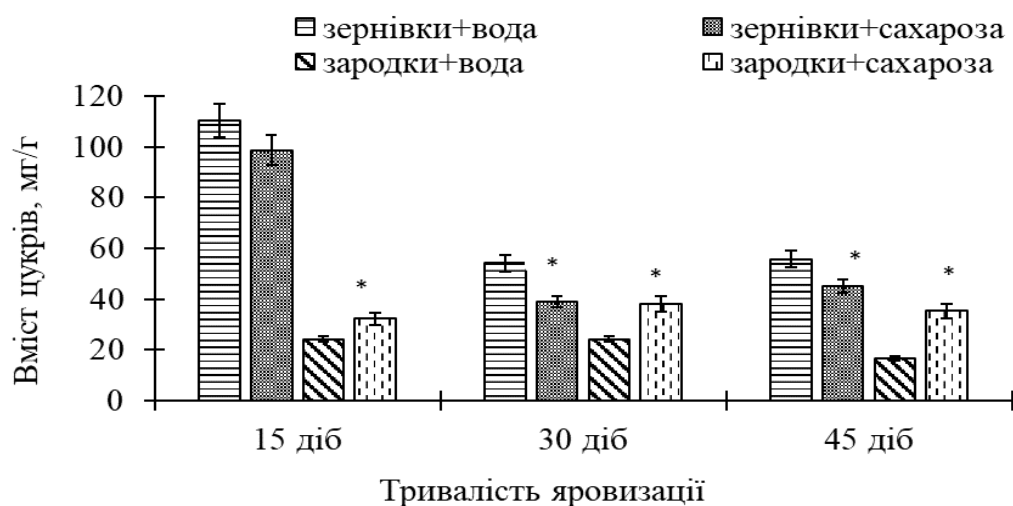


Рис. 4.4 Динаміка вмісту суми цукрів в проростках пшениці озимої сорту Дорідна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $HP_{0,05} = 12,81$  мг/г, для 30 діб  $HP_{0,05} = 9,63$  мг/г, для 45 діб  $HP_{0,05} = 11,22$  мг/г.

На 30-ту добу спостерігалось значне зниження суми цукрів у варіантів зернівки з водою і сахарозою, майже у 2 рази. Стосовно варіантів без ендосперму, і з сахарозою, і з водою подібні зміни не виявлені. На 45-ту добу показники залишалися також без змін, за виключенням варіанту зародки + вода, де спостерігалось істотне зниження суми цукрів.

**Вміст моноцукрів в проростках сорту Статна.** У сорту Статна на 15-ту добу яровизації найвищі показниками вмісту моноцукрів були характерні для варіантів зернівки + вода і зародки + сахароза, дещо нижчі – зернівки + сахароза і найнижчі – зародки + вода. У останньому варіанті вміст практично не змінювався протягом усього терміну яровизації. Імовірно, що відсутність поживних речовин ендосперму або сахарози інгібує накопичення моноцукрів ще на початку холодової експозиції (рис. 4.5).

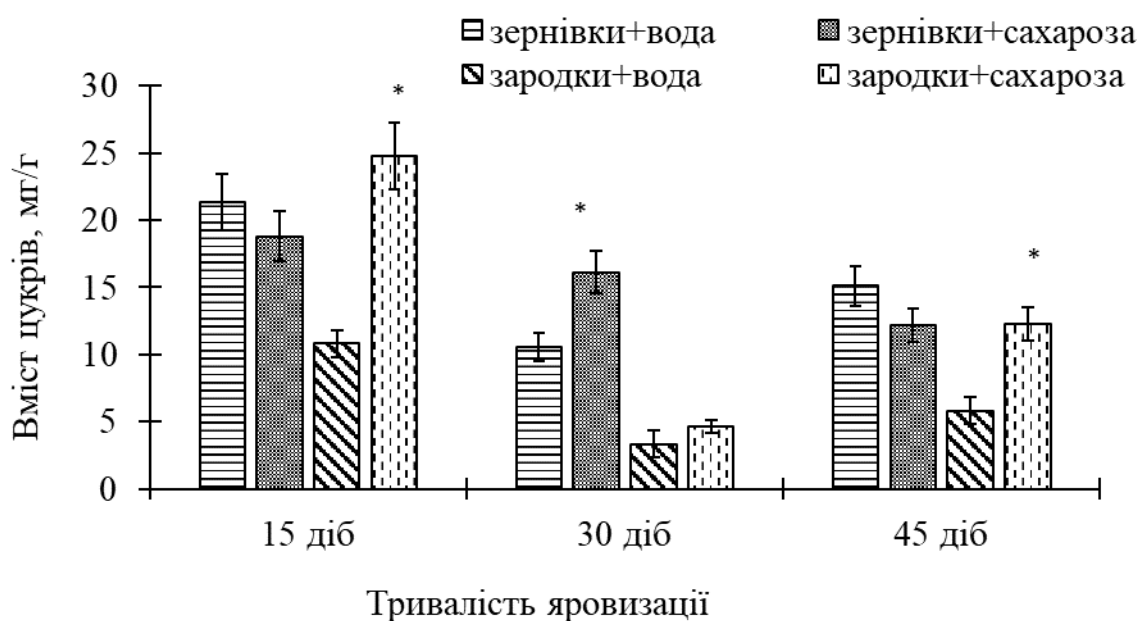


Рис. 4.5 Динаміка вмісту моноцукрів в проростках пшениці озимої сорту Статна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $НІР_{0,05} = 5,77$  мг/г, для 30 діб  $НІР_{0,05} = 2,84$  мг/г, для 45 діб  $НІР_{0,05} = 3,64$  мг/г.

Для більшості варіантів сорту Статна відбувалося зниження вмісту моноцукрів на 30-ту добу яровизації, окрім вмісту у варіанті ізольовані зернівки + сахароза. На 45-ту добу яровизації вміст моноцукрів у варіанті зернівки + вода

зростав, при цьому у варіанті зародки + сахароза – майже у 3 рази. Для варіанту зернівки + сахароза ефект був протилежний: упродовж яровизації було характерне поступове зниження вмісту моноцукрів (рис. 4.5).

На 30-ту добу, найвищий показник був виявлений у варіанті зернівки + сахароза, порівняно з іншими варіантами досліджу. А на 45-ту добу три варіанти, окрім зародки + вода, не мали значної різниці за вмістом моноцукрів. Отримані дані можуть свідчити про позитивний вплив екзогенної сахарози на процес обміну вуглеводів у сорту Статна.

**Вміст олігоцукрів в проростках сорту Статна.** Щодо вмісту олігоцукрів у рослинах цього сорту (рис. 4.6), то на 15-ту добу яровизації максимальним він був у варіанті зернівки + сахароза, нижчим у варіанті зернівки + вода, а мінімальним і однаковим у варіантах ізольовані зародки + вода та ізольовані зародки + сахароза (рис. 4.6).

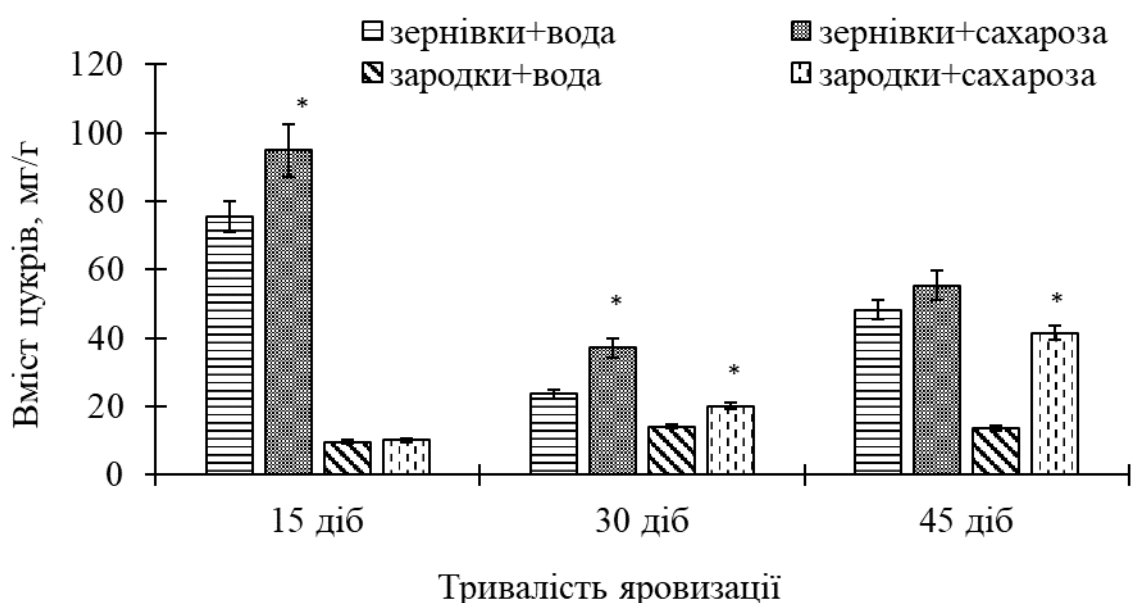


Рис. 4.6 Динаміка вмісту олігоцукрів в проростках озимої пшениці сорту Статна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $НІР_{0,05} = 12,88$  мг/г, для 30 діб  $НІР_{0,05} = 11,50$  мг/г, для 45 діб  $НІР_{0,05} = 9,46$  мг/г.

На 30-ту добу вміст олігоцукрів значно знижувався лише у варіантів зернівки + вода і зернівки + сахароза. При цьому у першого – у 3 рази, у другого –

у 2,5 рази. У рослин двох варіантів (зародки без ендосперму) відбувалося збільшення вмісту олігоцукрів. Це зростання було більшим у рослин варіанту зародки + сахароза, порівняно з варіантом ізольовані зародки + вода. На 45-ту добу даний показник збільшувався в усіх варіантах трофічного забезпечення, окрім варіанту зародки + вода, у якому спостерігалась тенденція до зниження (рис. 4.6). Дана закономірність була характерна і для вмісту моноцукрів на 45-ту добу (див. рис. 4.5).

За показником суми розчинних вуглеводів у сорту Статна протягом яровизації (рис. 4.7) дослідні варіанти можна розташувати за порядком зниження їх вмісту наступним чином: зернівки + сахароза < зернівки + вода < ізольовані зародки + сахароза < ізольовані зародки + вода. Аналізуючи динаміку суми цукрів можна виділити варіант зародки + вода, де не спостерігалось істотних змін. В інших варіантах на 30-ту добу виявлене значне зниження вмісту цукрів, за винятком варіанту зародки + сахароза, у якому він був без змін, а на 45-ту зростає (рис. 4.7).

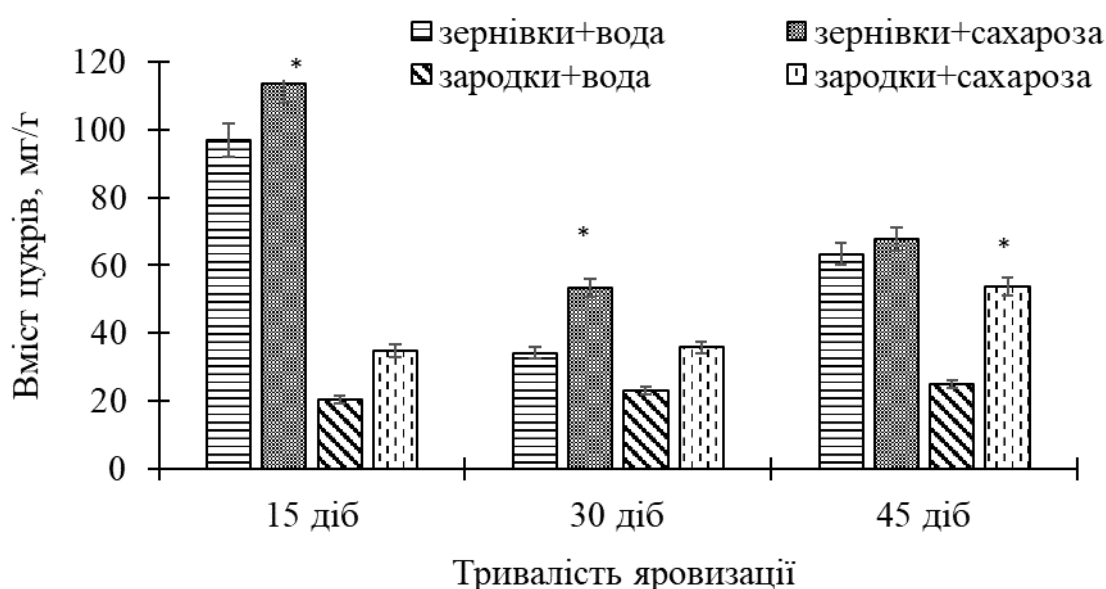


Рис. 4.7 Динаміка вмісту суми цукрів в проростках озимої пшениці сорту Статна за різних умов трофічного забезпечення упродовж яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для 15 діб  $НІР_{0,05} = 12,81$  мг/г, для 30 діб  $НІР_{0,05} = 9,63$  мг/г, для 45 діб  $НІР_{0,05} = 11,22$  мг/г.

Зіставлення динаміки вмісту вуглеводів у рослинах двох сортів протягом яровизації залежно від трофічного забезпечення показало, що вона у сорту Дорідна відрізнялася від динаміку у сорту Статна, що, можливо, пов'язано з генотиповими відмінностями між сортами за характером та, вірогідно, інтенсивністю метаболічних процесів у період яровизації.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок про більшу вагому роль сахарози в трофічному забезпеченні яровизаційного процесу рослин озимої м'якої пшениці сорту Статна, порівняно до неї у сорту Дорідна. Це, до певної міри, підтверджує положення про можливі генотипові особливості перебігу яровизаційних процесів.

За нашими даними, у варіантах з оптимальним, надлишковим і недостатнім трофічним забезпеченням вміст розчинних вуглеводів у проростках обох сортів на 45-ту добу яровизації стає вищим, ніж на 30-ту добу. Однак, за відсутності трофічного забезпечення такого підвищення не відбувається. Оскільки ми застосували модель з різним рівнем трофічного забезпечення цього процесу і виявили залежність від нього динаміки вмісту вуглеводів протягом яровизації у проростках двох сортів пшениці озимої, то можна припустити, що регуляторна функція вуглеводів за яровизації здійснюється за певного рівня їх пулу, вірогідно, оптимального у клітинах рослин. Різні трофічні умови можуть бути одним з вагомих чинників генетичної (та / або епігенетичної) регуляції процесу яровизації пшениці м'якої. Таким чином, характер зміни динаміки вмісту ендогенних цукрів у рослинах двох сортів озимої м'якої пшениці протягом яровизації залежить від рівня трофічного забезпечення цього процесу.

#### **4.3 Вплив контрастних трофічних умов яровизації на ріст проростків та темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці**

Трофічні фактори грають важливу роль в процесах росту і розвитку рослин пшениці озимої м'якої протягом онтогенезу. Від рівня забезпеченості трофічними речовинами залежать ростові процеси рослин. У першу чергу, до них відносяться азотовмісні речовини і вуглеводи, які є продуктами фотосинтезу та кореневого

живлення [1, 39]. Ще на ранніх етапах індивідуального розвитку, вуглеводи, які містяться в ендоспермі насіння пшениці, забезпечують рослинний організм пластичними і енергетичними ресурсами. Наприклад, крохмаль, який під дією ферменту амілази розщепляється до олігосахаридів, забезпечує рослину цими ресурсами. Перехід рослин озимої м'якої пшениці від вегетативного до генеративного етапу розвитку – один із ключових і переломних моментів, для реалізації якого необхідний комплекс взаємопов'язаних ендо- та екзогенних факторів. Період дії низьких температур, або яровизація – один із найважливіших процесів онтогенезу рослин озимої пшениці, внаслідок якого відбувається перехід у генеративний стан. Про забезпеченість яровизації трофічними факторами стало відомо ще у XX століття. Було показано, що тільки у результаті дії зниженої температури на зародки пшениці озимої або рослини на розчині сахарози в повній темряві або на світлі, але в останньому випадку, при наявності в атмосфері CO<sub>2</sub> [53, 55], рослини переходили до колосіння. Таким чином, метаболічні фактори в процесі яровизації озимих злаків – необхідна і достатня умова для переходу рослин до цвітіння. Результати вивчення вуглеводного, білкового обміну у проростках озимих злаків за яровизації показали зміну їх характеру та інтенсивності [10]. Це також свідчить про вагомую роль трофічного фактору в яровизації. Однак до нині ще не з'ясована залежність перебігу росту і розвитку рослин, вирощених з яровизованого насіння, яке різнилося за рівнем трофічного забезпечення.

Виходячи з цього, ми проводили визначення динаміки ростової реакції – лінійного росту і накопичення біомаси – рослин трьох озимих сортів *Triticum aestivum* L. на фоні різного трофічного забезпечення за яровизації [5].

Аналіз ростової реакції рослин озимої м'якої пшениці сорту Дорідна показав (рис. 4.8), що протягом яровизації відбувалося поступове посилення лінійного росту надземної частини та кореневої системи проростків у варіантах з оптимальним рівнем трофічного забезпечення, а також з його надлишком – у варіантах зернівки + вода і зернівки + 3% сахароза, відповідно [100]. У варіанті ізольовані зародки + вода без ендосперму, за відсутності трофічних факторів, ростові процеси протягом яровизації практично не відбувалися (рис. 4.8).

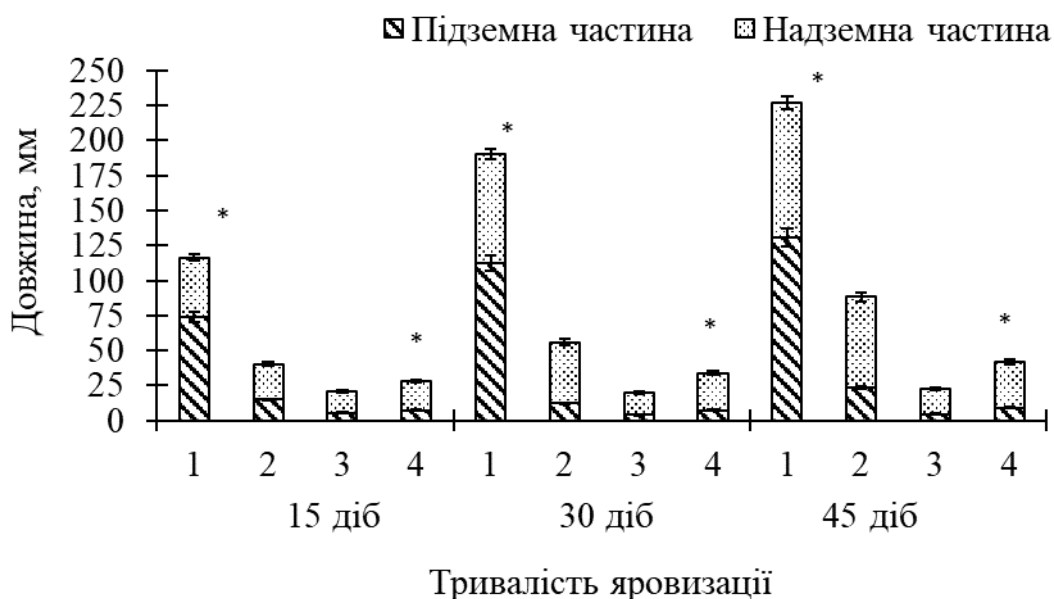


Рис. 4.8 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку росту проростків пшениці озимої сорту Дорідна протягом яровизації: 1 - зернівки + вода; 2 - зернівки + 3 % розчин сахарози; 3 - ізольовані зародки + вода; 4 - ізольовані зародки + 3 % розчин сахарози

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для надземної частини  $НІР_{0,05} = 10,12$  мм, для підземної частини  $НІР_{0,05} = 15,69$  мм.

Найбільш інтенсивно протягом усього періоду яровизації відбувався ріст проростків у довжину у варіанті зернівки + вода (оптимальне трофічне забезпечення), приблизно у 3-4 рази повільніше – у варіанті зернівки + 3 % сахароза (надмірне трофічне забезпечення), ще повільніше – у варіанті ізольовані зародки + 3% сахароза (обмежене трофічне забезпечення) та майже не росли проростки варіанту ізольовані зародки + вода (відсутність трофічного забезпечення). Вигляд проростків усіх досліджуваних варіантів значно відрізнявся один від одного (рис. 4.9) вже на першу дату визначення морфометричних параметрів – на 15-ту добу, а також на 30-ту добу і наприкінці періоду яровизації – на 45-ту добу.

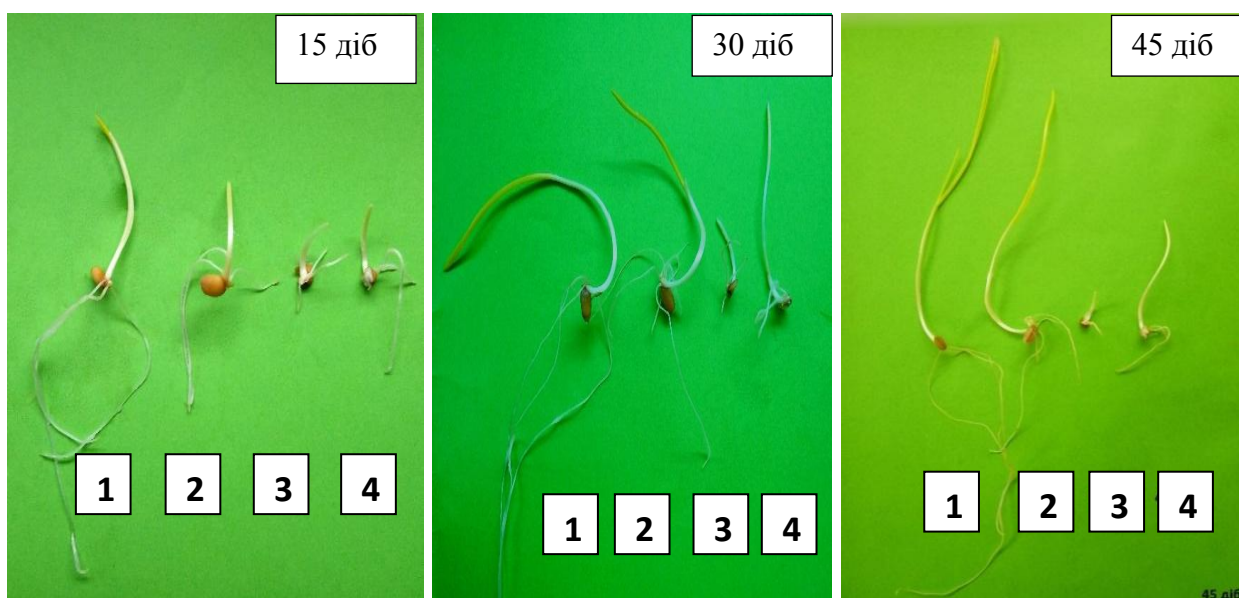


Рис. 4.9 Вигляд проростків пшениці озимої м'якої сорту Дорідна на 15, 30 і 45-ту добу яровизації залежно від трофічного забезпечення: 1 - зернівки + вода; 2- зернівки + 3% розчин сахарози; 3- ізолювані зародки + вода; 4- ізолювані зародки + 3% розчин сахарози

Результати визначення ростової реакції рослин сорту Статна були подібні тим, які одержані у досліді з сортом Дорідна. А саме, максимальний показник був характерний для варіанту проростки з ендоспермом і водою; екзогенна сахароза значною мірою інгібувала ріст проростків з ендоспермом. У варіанті без ендосперму з додаванням сахарози, коли остання виконувала роль трофічного фактору, показник ростової реакції проростків був більший, ніж у варіанта без ендосперму з додавання води.

Отже, лінійний ріст надземної частини і коренів протягом яровизації поступово посилювався за всіх варіантів трофічного забезпечення, окрім варіанту за його відсутності (ізолювані зародки + вода) (рис. 4.10).



Рис. 4.10 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку росту проростків пшениці озимої сорту Статна протягом яровизації: 1 – зернівки + вода; 2 – зернівки + 3 % розчин сахарози; 3 – ізолювані зародки + вода; 4 – ізолювані зародки + 3 % розчин сахарози

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для надземної частини  $НІР_{0,05} = 8,81$  мм, для підземної частини  $НІР_{0,05} = 13,19$  мм.

За інтенсивністю росту рослин залежно від рівня трофічного забезпечення варіанти ранжуються наступний чином: зернівки + вода > зернівки + сахароза > ізолювані зародки + сахароза > ізолювані зародки + вода. За яровизації проростків варіанту зародки на сахарозі спостерігалась значне стимулювання розвитку кореневої системи, що супроводжувалось більш інтенсивним ростом головного кореня та формуванням більшої кількості корінців на рослині. Вигляд проростків варіантів сорту Статна наведені на рис. 4.11.

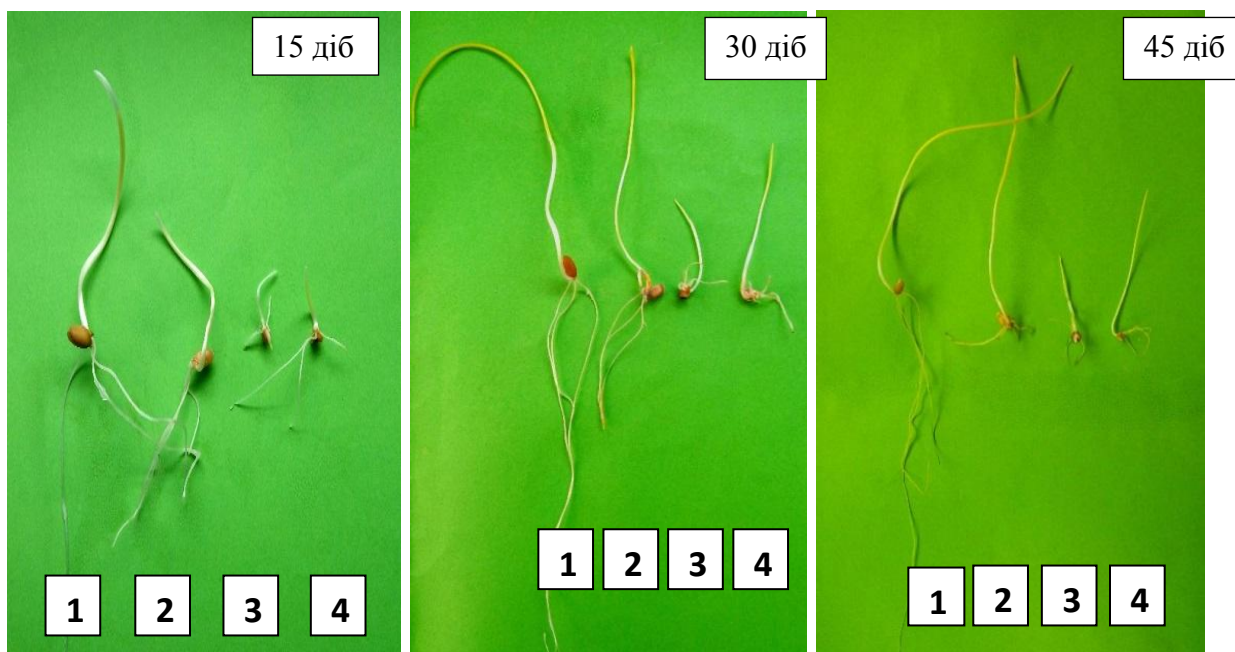


Рис. 4.11 Вигляд проростків пшениці озимої м'якої сорту Статна на 15, 30 і 45-ту добу яровизації залежно від рівня трофічного забезпечення: 1 - зернівки + вода; 2 - зернівки + 3 % розчин сахарози; 3 - ізолювані зародки + вода; 4 - ізолювані зародки + 3 % розчин сахарози

Стосовно визначення ростових параметрів сорту Досконала, то результати були подібні тим, які одержані у досліді з сортами Дорідна і Статна. Однак, довжина проростків даного сорту, порівняно з нею у двох інших сортів, менша і не перевищує 170 мм у варіанті зернівки + вода на 45-ту добу холодової експозиції (рис. 4.12).

Підсумовуючи отримані дані з визначення лінійного росту трьох сортів озимої м'якої пшениці, можна виділити декілька загальних закономірностей.

По-перше, на всіх етапах – 15, 30 і 45 дiб яровизації у варіанті зернівки + вода коренева система перебільшувала надземну частину проростків, на відміну від інших варіантів у сортів Дорідна, Статна, Досконала. Зокрема, на 15-ту добу: підземна частина майже в 2 рази перевищувала надземну.

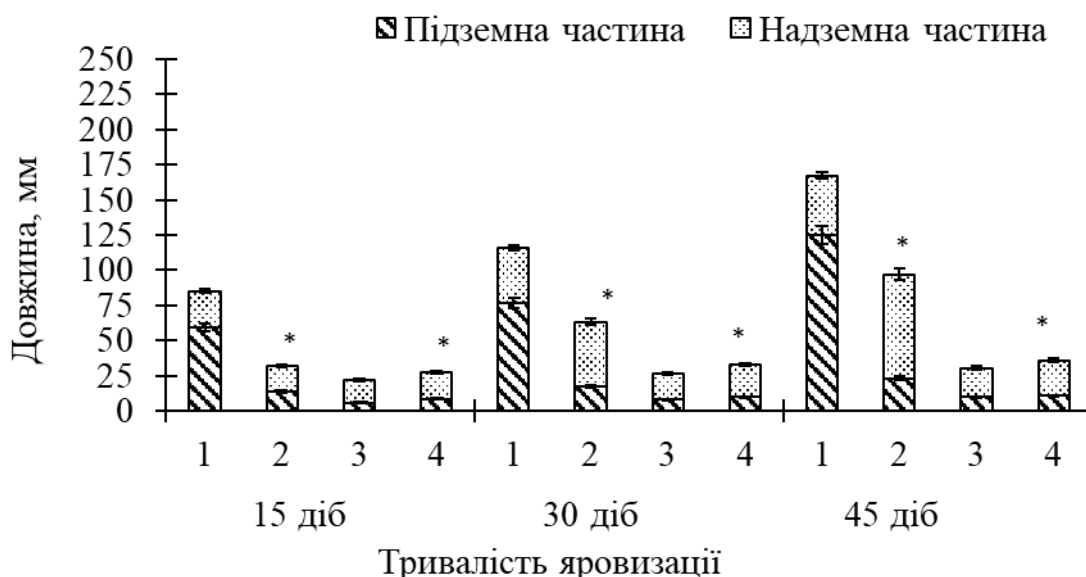


Рис. 4.12 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку росту проростків пшениці озимої сорту Досконала протягом яровизації: 1 – зернівки + вода; 2 – зернівки + 3 % розчин сахарози; 3 – ізольовані зародки + вода; 4 – ізольовані зародки + 3 % розчин сахарози

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для надземної частини  $НІР_{0,05} = 6,02$  мм, для підземної частини  $НІР_{0,05} = 6,19$  мм.

Це можна пояснити тим, що її основна роль в *Triticum aestivum* L., як і у інших рослин, полягає в поглинанні води і поживних речовин з навколишнього середовища та забезпеченні ними інших органів рослин, особливо на ранніх етапах розвитку [148].

По-друге, сахароза у варіанті зернівки + сахароза пригнічувала ростові процеси як надземної частини, так і коренів. Це вірогідно, пояснюється тим, що надлишок цукрів здатен пригнічувати мобілізацію поживних речовин та тим самим може гальмувати розвиток та ріст у довжину надземної частини рослини [173].

По-третє, у варіанті зі штучним трофічним забезпеченням – ізольовані зародки з додаванням сахарози – екзогенний дисахарид виконував роль трофічного субстрату та значно стимулював лінійний ріст на 30 і 45-ту добу у сорту Статна. Разом з тим, у даному варіанті у двох сортів Дорідна і Досконала такої вираженої стимуляції не спостерігалось, що може свідчити про генотипову відмінність сортів

за здатністю залучати сахарозу до метаболічних процесів, яка не може безпосередньо бути використана для процесів обміну [22].

Таким чином, лінійний ріст проростків трьох сортів озимої пшениці залежить від рівня трофічного забезпечення. Як його надлишок (зернівки + сахароза), так і нестача (ізолювані зародки + вода), а також відсутність трофічного забезпечення (зародки + вода) інгібують лінійний ріст проростків, порівняно до оптимального забезпечення (зернівки + вода) [5].

Відомо, що інтегральним показником функціонування рослинного організму є біосинтетичні процеси, які характеризуються накопиченням біомаси рослиною. Тому ми вивчали динаміку біомаси проростків досліджуваних сортів пшениці за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення цього процесу. Результати дослідження показали, що біомаса проростків сорту Дорідна протягом яровизації збільшувалася за всіх варіантів трофічного забезпечення, окрім варіанту з його відсутністю (рис. 4.13) [5].

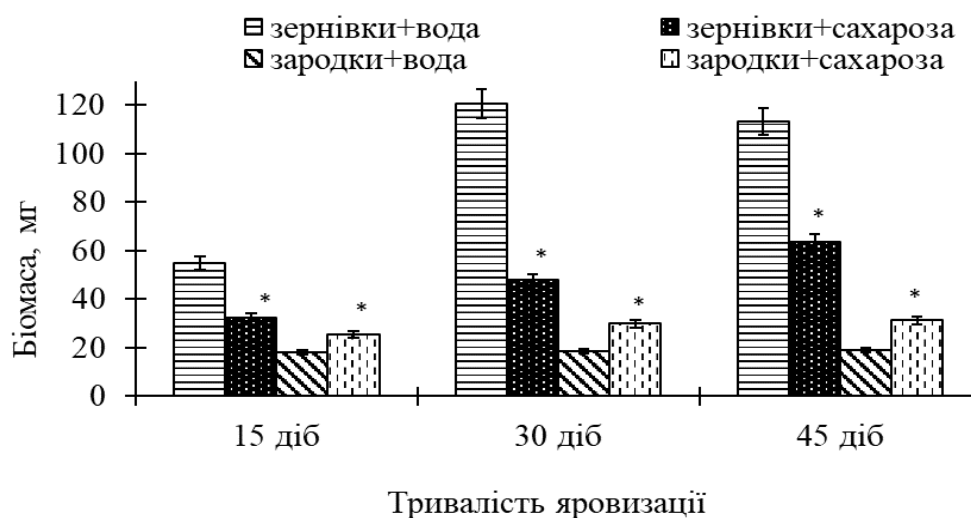


Рис 4.13 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку накопичення біомаси проростків пшениці озимої сорту Дорідна протягом яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 9,14$  мг.

Інтенсивність накопичення біомаси залежала від рівня трофічного забезпечення. Найбільш інтенсивно відбувалося накопичення маси проростками

за оптимального рівня (зернівки + вода) протягом усіх етапів яровизації. Надлишкове забезпечення (зернівки + сахароза) інгібувало біосинтетичні процеси, в порівнянні з варіантом за оптимального забезпечення. При цьому інгібування проявлялося більшою мірою у варіанті зародки + сахароза (рис. 4.13). А у варіанті з відсутністю трофічних факторів – зародки + вода – змін у прирості біомаси не спостерігалось.

Динаміка формування біомаси проростками сорту Статна загалом була подібною до цього процесу у сорту Дорідна, але за окремими виключеннями (рис. 4.14). Найбільш інтенсивно наростала біомаса проростків за оптимального трофічного забезпечення. За його надлишку (зернівки + сахароза) біомаса проростків сорту Статна зростала до 30-ї доби яровизації, але знижувалася до 45-ї доби. У цьому варіанті відбувалося інгібування накопичення біомаси проростками протягом яровизації, порівняно до нього у варіанті з оптимальним трофічним забезпеченням.

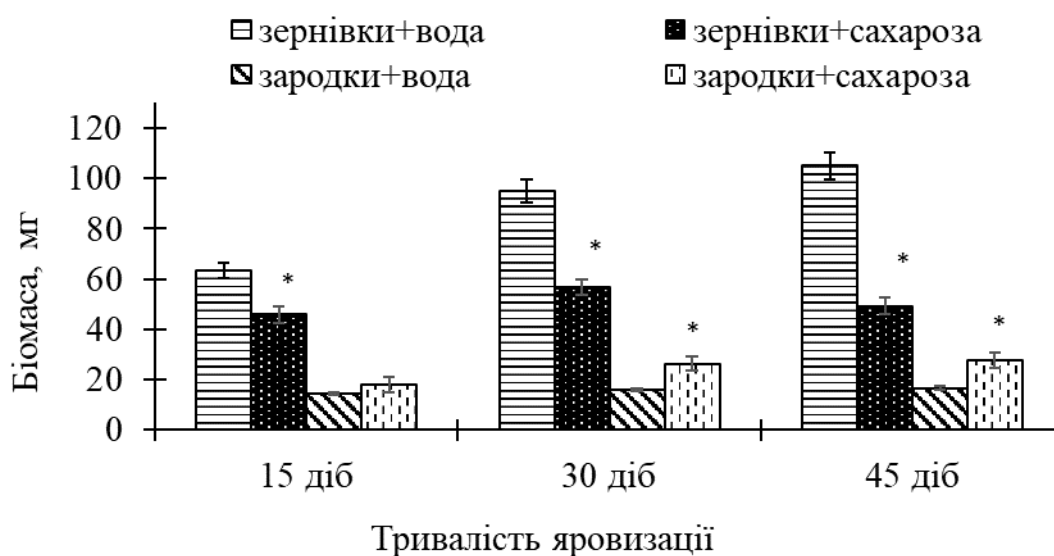


Рис 4.14 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку накопичення біомаси проростків пшениці озимої сорту Статна протягом яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 12,62$  мг.

Маса проростків сорту Статна за штучного трофічного забезпечення (додавання екзогенної сахарози) зростала протягом яровизації, але у декілька разів повільніше, ніж за оптимального та надлишкового. При відсутності забезпечення

(зародки + вода) маса проростків не змінювалася упродовж всього періоду яровизації (рис. 4.14).

Щодо динаміки накопичення біомаси у сорту Досконала за контрастних умов трофічного забезпечення, то вона є подібною до динаміки у двох попередніх сортів, але має декілька відмінностей. Найвищі показники були у варіанті зернівки + вода (як і у сортів Статна і Дорідна), а найнижчі – зародки + вода (рис. 4.15).

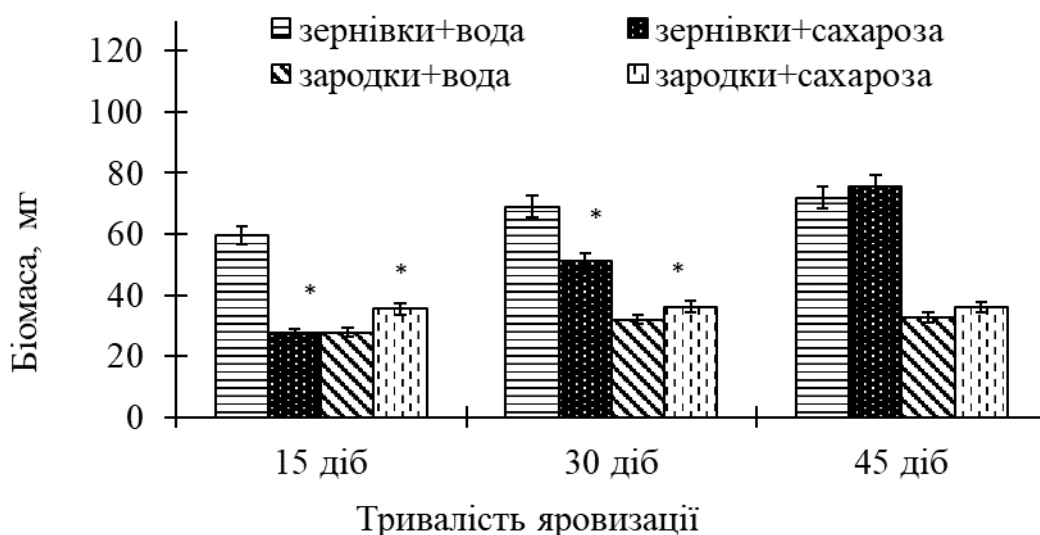


Рис 4.15 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку накопичення біомаси проростків пшениці озимої сорту Досконала протягом яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 10,18$  мг.

Разом з тим, у варіанті з оптимальним забезпеченням істотний приріст відбувався лише на 30-ту добу яровизації, на 45-ту – змін не було. У варіанті з надлишком трофічних факторів також відбувалося пригнічення накопичення біомаси. Однак, на 45-ту добу показник був практично таким же як і у варіанту зернівки + вода, а також максимум не перевищував 80 мг, тоді як у сорту Статна і Дорідна максимальним він був приблизно 105 і 120 мг відповідно. Необхідно також зазначити, що між варіантами з дефіцитом і відсутністю трофічних факторів, зародки + сахароза і зародки + вода відповідно, не було істотної різниці протягом усього періоду яровизації, тоді як у двох попередніх сортів різниця була на користь першого варіанту.

Отже, порівнюючи три досліджувані сорти озимої пшениці за показниками ростової реакції за умов контрастного трофічного забезпечення, можна зробити висновок про однакову закономірність у відповідь на діючий фактор. Однак, залежно від генотипу дослідні сорти відрізнялися між собою певним чином: рослини сорту Дорідна мали, порівняно з іншими, вищі показники біомаси і практично однакові показники за лінійним ростом з сортом Статна, рослини якого, у свою чергу, були більш стійкими до умов дефіциту трофіки, а рослини сорту Досконала мали найменші показники досліджуваних процесів.

Таким чином, визначення ростових процесів трьох сортів пшениці озимої показало їх залежність від трофічної забезпеченості за яровизації. Ці результати дають підставу припустити, що трофічне забезпечення процесу яровизації поряд з біологічно активними речовинами та генетичними факторами, може виступати вагомим чинником регуляції процесів росту, і, вірогідно, розвитку пшениці озимої.

З огляду на це, ми вивчали залежність темпів розвитку досліджуваних сортів від трофічних умов яровизації проростків [5].

**Темпи розвитку.** За даними дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації всі варіанти досліду рослин трьох сортів озимої пшениці значною мірою відрізнялися за темпами розвитку та тривалістю вегетаційного періоду (табл. 4.2). Зазначимо, що ми визначали такий показник як приживаність проростків у ґрунті за умов вегетаційного досліду.

Це було пов'язано з різним рівнем розвитку проростків за варіантами досліду, а також запобіганням можливих помилок при спостереженнях за розвитком рослин.

Ступінь приживаності яровизованих рослин значно відрізнявся по варіантах досліду (табл. 4.2). Вона відображувала кількість рослин у відсотках від загальної кількості рослин, які прижилися у вегетаційних посудинах у ґрунтовій культурі до умов вегетаційного експерименту у факторостатній камері за контрольованих умов: температурний режим 22 / 18 °C (день / ніч), освітленість 15 кЛк, 16-годинний фотоперіод, 70 % вологість повітря.

Таблиця 4.2

**Тривалість фенологічних фаз у рослин сортів пшениці озимої за різних умов трофічного забезпечення процесу яровизації (вегетаційний дослід)**

| Варіант досліджу          | Прижива-<br>ність, % | Діб від висаджування до початку фенофази |                |           |            |
|---------------------------|----------------------|------------------------------------------|----------------|-----------|------------|
|                           |                      | кущіння                                  | вихід у трубку | колосіння | дозрівання |
| Сорт Дорідна              |                      |                                          |                |           |            |
| зернівки + вода           | 100                  | 23 ± 1                                   | 60 ± 2         | 80 ± 3    | 92 ± 3     |
| зародки + вода            | 13                   | 35 ± 1                                   | 70 ± 2         | 100 ± 3   | 112 ± 3    |
| зародки + 3 %<br>сахароза | 27                   | 29 ± 1                                   | 65 ± 2         | 88 ± 3    | 98 ± 3     |
| Сорт Статна               |                      |                                          |                |           |            |
| зернівки + вода           | 100                  | 17 ± 1                                   | 37 ± 1         | 62 ± 2    | 72 ± 2     |
| зародки + вода            | 33                   | 31 ± 1                                   | 50 ± 2         | 86 ± 3    | 96 ± 3     |
| зародки + 3 %<br>сахароза | 45                   | 22 ± 1                                   | 44 ± 1         | 73 ± 2    | 84 ± 3     |
| Сорт Досконала            |                      |                                          |                |           |            |
| зернівки + вода           | 100                  | 22 ± 1                                   | 42 ± 1         | 76 ± 2    | 86 ± 3     |
| зародки + вода            | 13                   | 36 ± 1                                   | -              | -         | -          |
| зародки + 3 %<br>сахароза | 25                   | 27 ± 1                                   | 54 ± 2         | 84 ± 3    | 95 ± 3     |

Було виявлено, що рослини варіанту зернівки + вода, які проходили яровизацію за умов оптимального трофічного забезпечення, усіх трьох сортів характеризувалися максимальними показниками приживаності, а мінімальними – рослини, яровизовані на воді без ендосперму, тобто у мовах відсутності трофічних факторів.

На етапі кушіння була виявлена різниця тривалості фенофаз між варіантами у трьох сортів – перехід до цієї фази подовжувався за варіантів зародки + вода і зародки + 3 % сахароза (табл. 4.2) [5].

Рослини, які були вирощені з ізольованих зародків на воді за умов яровизації, переходили до генеративної фази розвитку (колосіння) на 22–24 доби пізніше порівняно до варіанту з ендоспермом зернівки + вода (табл. 4.2). Але в ході вегетаційного експерименту варіант зародки + вода сорту Досконала виявився нежиттєздатним і як результат – ми не отримали даних з визначення періодів «сходи-колосіння» (ПСК) в даному випадку. Стосовно варіанту, рослини якого проходили яровизацію з додаванням 3 % розчину сахарози, то вони колосилися на 10–12 діб пізніше, порівняно до варіанту зернівки + вода.

Порівнюючи між собою ПСК трьох сортів, можна зазначити, що рослинам для всіх варіантів сорту Дорідна характерний більш тривалий період «сходи-колосіння» у порівнянні з їх тривалістю у сорту Досконала. А у сорту Статна темпи розвитку були швидшими, ніж у сорту Досконала. Отже, серед досліджуваних сортів, сорт Статна має найкоротший період «сходи-колосіння» і рослини швидше переходять до колосіння (табл. 4.2). Вірогідно, що різні темпи розвитку сортів, які обумовлені різним рівнем трофічного забезпечення за яровизації, можуть бути пов'язані з генотиповими їх особливостями.

Вигляд рослин трьох сортів озимої м'якої пшениці, які перейшли до колосіння, наведені на рис. 4.16. Незалежно від трофічних умов яровизації, яровизовані рослини всіх варіантів досліджуваних сортів, переходили до колосіння, але за різних термінів (табл. 4.2).

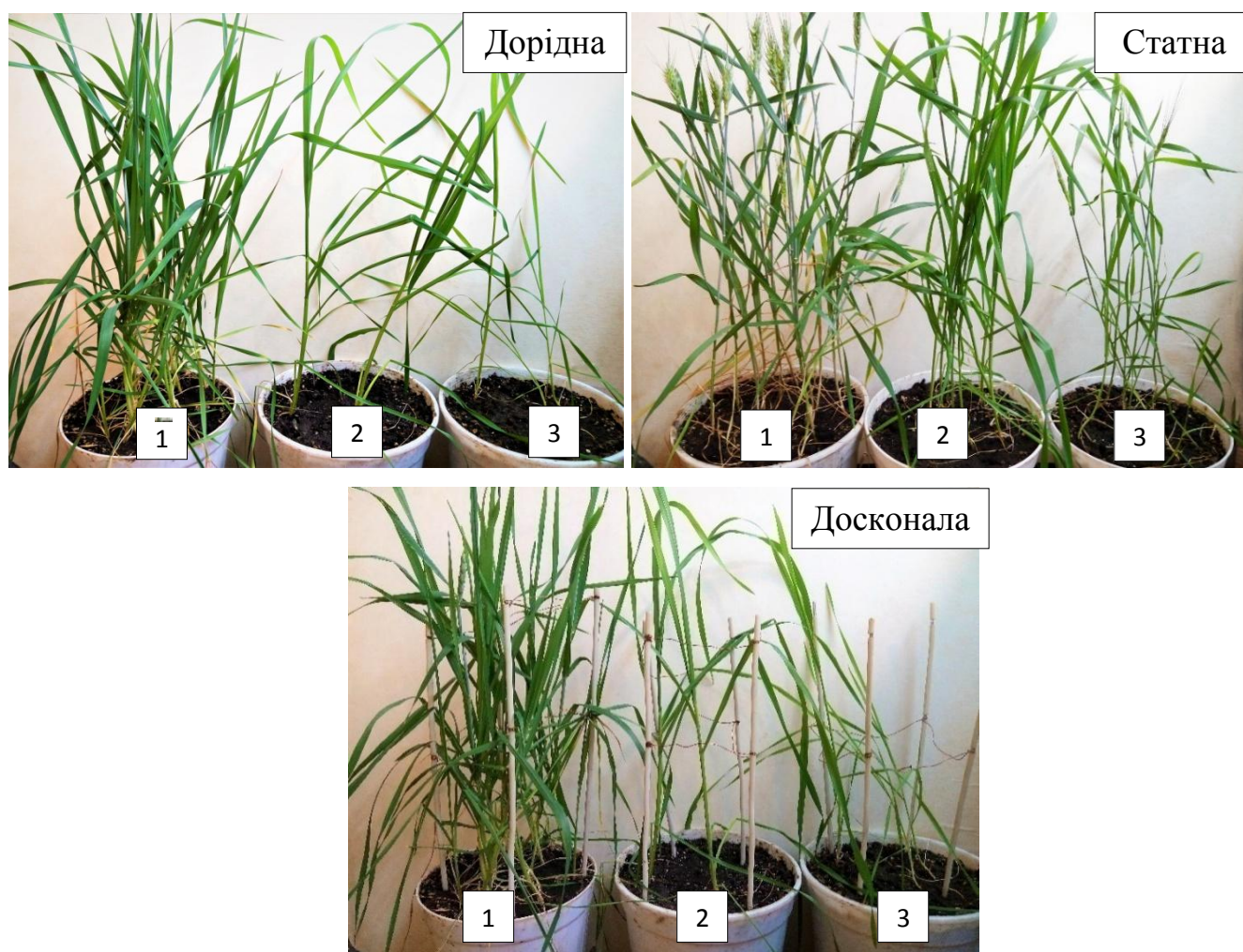


Рис. 4.16 Фаза колосіння: сорти Дорідна, Статна і Досконала, варіанти: 1 – зернівки + вода, 2 – зародки + вода, зародки + 3 % сахароза

Це можна пояснити тим, що генетичний та епігенетичний контроль експресії генів яровизації здійснюється за дії низьких позитивних температур, а умови трофічного забезпечення яровизаційного цього процесу впливають на темпи розвитку та швидкість проходження фенологічних фаз. Отже, генетична і трофічна регуляція цього процесу пов'язані між собою і впливають на темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці.

Таким чином, результати вивчення впливу різного рівня трофічного забезпечення яровизації проростків на інтенсивність поділу клітин, лінійний ріст, накопичення біомаси протягом яровизації та темпів розвитку рослин пшениці м'якої озимої, вирощених з яровизованих проростків, дає підставу вважати, що

рівень трофічного забезпечення є вагомим фактором регуляції інтенсивності протікання досліджуваних процесів.

Виявлена різниця між дослідними сортами за інтенсивністю перебігу цитологічних та ростових процесів, а також розвитком рослин на фоні варіантів різного трофічного забезпечення яровизації проростків, вірогідно, пов'язана з генотиповими їх особливостями.

#### **Висновки до розділу 4**

1. Встановлено, що 3 %-ний розчин сахарози стимулює мітотичну активність корневих меристем у проростків, яровизованих без ендосперму, порівняно до активності у проростках, яровизованих з ендоспермом та з ендоспермом на 3 %-ній сахарозі. Це свідчить про залежність проліферації клітин від рівня трофічного забезпечення.
2. Виявлено, що контрастні умови трофічного забезпечення яровизаційного процесу обумовлюють динаміку змін лінійного росту, накопичення біомаси та вмісту розчинних вуглеводів в яровизованих проростках досліджуваних сортів.
3. Темпи розвитку рослин досліджуваних сортів залежали від рівня трофічного забезпечення проростків за яровизації. За оптимального і штучного трофічного забезпечення яровизації проростків рослини, вирощені з них, розвивалися значно швидше, ніж вирощені з проростків, яровизованих без трофічного забезпечення. Це вказує на залежність темпів розвитку пшениці озимої від рівня трофічного забезпечення яровизації.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [5, 84].

## РОЗДІЛ 5

### ФІТОГОРМОНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ ЯРОВІЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ

#### 5.1 Дослідження впливу гіберелінів в період яровизації на ріст і вміст розчинних вуглеводів проростків озимої пшениці

Гібереліни (ГК) грають вагому роль у регуляції фізіолого-біохімічних процесів росту і розвитку рослин, для нормального протікання яких необхідні трофічні речовини, в першу чергу вуглеводи. Відомо, що ГК беруть участь у процесах проростання насіння різних рослин, зокрема злаків, у процесах відповіді на абіотичний стрес, а також здатні до стимуляції ростових процесів пагону: подовження стебла та збільшення листкової пластинки у рослин [45, 51, 102, 118]. Дія низьких температур призводить до біосинтезу біологічно активних гіберелінів, в основному ГК4, які індукують синтез ферментів, що беруть участь у мобілізації запасних речовин в ендоспермі [93]. Окрім того, ГК4 викликає експресію генів, які кодують ферменти, що перетворюють тригліцериди в цукри [55]. Гібереліни і вуглеводи пов'язані на рівні регуляції трансдукції гормональних і цукрових сигналів та їх активності при проростанні насіння та крохмального обміну [136]. ГК здатні посилювати метаболічну активність ферментів вуглеводного обміну, зокрема сахарозофосфатсинтази, яка каталізує реакцію біосинтезу сахарози – взаємодію D-фруктозо-6-фосфата з УДФ-глюкозою з утворенням УДФ і сахарозо-6-фосфату, який за дії сахарозофосфатази перетворюється в вільну сахарозу [135, 175, 184]. Окрім того, вони можуть змінювати вміст розчинних вуглеводів в умовах стресу [118].

Отже, виконуючи ряд функцій в регуляції фізіолого-біохімічних процесів в рослині, ГК через експресію певних генів можуть здійснювати і експресію генних локусів, пов'язаних з індукцією цвітіння. Окрім того, за допомогою молекулярно-генетичних досліджень даних генних локусів, були встановлені механізми і зв'язок між яровизаційним і гібереліновим шляхами регуляції індукції цвітіння [63]. У даному випадку таким генним локусом опосередковано є SOC1,

експресія якого активується за впливу ГК і призводить до підвищення експресії гена LFY, який, в свою чергу, індукує квітковий морфогенез в стебловій апікальній меристемі. На експресію SOC1 впливає опосередковано головний репресор цвітіння FLC, який до яровизації блокує формування сигналів від гену FT [63]. Показано, що гібереліни здатні частково замінити період дії яровизації, при цьому сприяти переходу довгоденних рослин (ДДР) до генеративної фази розвитку в умовах короткого дня [127, 161].

Таким чином, ГК можуть, вірогідно, брати участь у регуляції ростових процесів і процесів вуглеводного обміну за яровизації пшениці озимої м'якої за умов контрастного трофічного забезпечення.

З огляду на це, нами було проведено визначення лінійного росту проростків, їх надземної та підземної частин, накопичення ними біомаси, а також вмісту розчинних вуглеводів за праймування зернівок ГК після яровизації.

**Ростові параметри за впливу гіберелінів в період яровизації.** Результати визначення довжини надземної частини і коренів проростків трьох сортів озимої м'якої пшениці – Дорідна, Статна і Альянс – показали, що екзогенний розчин гібереліну, ГКЗ з концентрацією 10 мг/л, значно стимулював лінійний ріст надземної частини як проростків, одержаних з цілих зернівок, так і проростків, одержаних з ізолюваних зародків, порівняно до відповідних контрольних варіантів – зернівки + вода та зародки + вода (рис. 5.1) [78].

За порівняння всіх варіантів досліду було виявлено, що у проростків варіантів з відсутністю трофічного забезпечення – ізолювані зародки без ендосперму – був значно пригнічений ріст у довжину надземної частини у порівнянні з їх ростом проростків варіантів з оптимальним забезпеченням – зернівки + вода (рис. 5.1). Причому, між досліджуваними сортами в однакових умовах впливу ГК залежно від рівня трофіки були виявлені відмінності за рівнем прояву ефекту фітогормону на лінійний ріст.

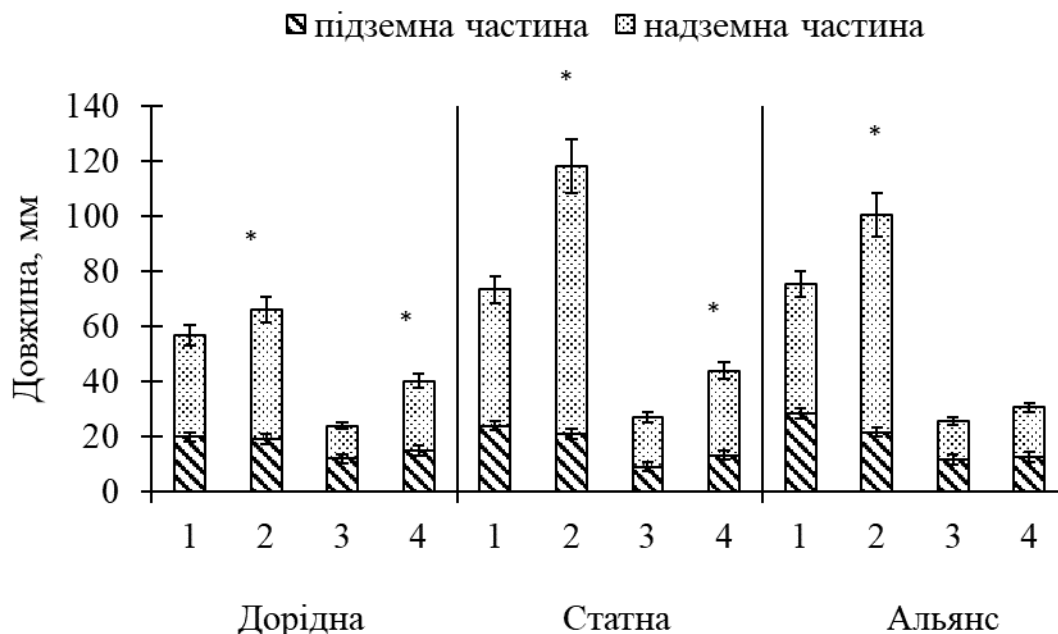


Рис. 5.1 Вплив гібереліну в умовах різного трофічного забезпечення на лінійний ріст органів рослин озимої пшениці на 45-ту добу яровизації. Варіанти досліду: 1 - зернівки + вода; 2 - зернівки + ГК (10 мг/л); 3 - ізолювані зародки + вода; 4 - ізолювані зародки + ГК (10 мг/л)

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща для підземної частини  $HP_{0,05} = 5,85$  мм, для надземної частини  $HP_{0,05} = 15,18$  мм.

Стимулювання ГК лінійного росту проростків сорту Дорідна, які яровизували в умовах оптимальної трофіки, було меншим, ніж у сортів Статна і Альянс. Однак у варіантів сорту Дорідна з відсутністю трофічних факторів ендосперму додавання розчину ГК стимулювало ростові процеси більшою мірою, порівняно з сортами Статна і Альянс. Ми пропускаємо, що виявлені відмінності пов'язані з особливостями генотипу сортів, які можуть бути обумовлені різним рівнем фітогормональної регуляції перебігу трофічних процесів.

Стосовно впливу ГК на лінійний ріст кореневої системи трьох сортів пшениці, то за оптимального трофічного забезпечення спостерігалось його пригнічення лише у сорту Альянс, у той час як у сортів Статна і Дорідна значущих відмінностей не було. У варіантах з відсутності ендосперму ГК не впливав на ростові процеси підземної частини проростків (рис. 5.1).

Інтегральним показником функціонування рослинного організму є біосинтетичні процеси, які характеризуються накопиченням біомаси рослиною. Тому ми визначали біомасу проростків досліджуваних сортів пшениці за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення цього процесу за праймування насіння розчином ГК. Було показано, що за рівня оптимального трофічного забезпечення біомаса проростків майже у 3 рази перевищувала біомасу проростків, що проходили яровизацію за дефіциту трофічного фактору (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Вплив гібереліну на накопичення біомаси рослин пшениці озимої за різних трофічних умов яровизації**

| Сорт    | Варіант         | Біомаса проростків, мг |
|---------|-----------------|------------------------|
| Дорідна | Зернівки + вода | 55,43 ± 10,71          |
|         | Зернівки + ГК   | 61,00 ± 12,14          |
|         | Зародки + вода  | 17,86 ± 1,34*          |
|         | Зародки + ГК    | 27,00 ± 1,41*          |
| Статна  | Зернівки + вода | 60,13 ± 1,54*          |
|         | Зернівки + ГК   | 70,56 ± 5,14*          |
|         | Зародки + вода  | 22,00 ± 2,72*          |
|         | Зародки + ГК    | 30,25 ± 2,25*          |
| Альянс  | Зернівки + вода | 54,29 ± 6,19*          |
|         | Зернівки + ГК   | 64,33 ± 8,33*          |
|         | Зародки + вода  | 17,88 ± 1,25*          |
|         | Зародки + ГК    | 25,00 ± 1,31*          |

*Примітка.\** Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 8,19$  мг

В умовах оптимального трофічного забезпечення (зернівки + ГК) у сортів Статна і Альянс, за винятком цього варіанту сорту Дорідна, праймування ГК стимулювало накопичення біомаси. Аналогічно і за його дефіциту (варіант ізольовані зародки + ГК), але без виключення, тобто у всіх сортів (табл. 5.1).

Отримані результати з вираженого позитивного ефекту праймування розчином ГК на лінійний ріст і накопичення біомаси у варіанті зернівки + ГК, порівняно до варіанту зернівки + вода можна пояснити наступним. При проростанні насіння ГК сприяє експресії генів синтезу  $\alpha$ -амілази, включаючи транскрипційний фактор *GAMYb*, який специфічно зв'язується з промоторами генів відповіді на ГК [51]. Надходження ГК через щиток зародка до ендосперму пов'язано з індукцією експресії генів  $\alpha$ -амілази в алеїроновому шарі і зумовлює зростання активності цього ферменту, у результаті чого запасний крохмаль гідролізується до D-глюкози та інших простих вуглеводів, які забезпечують ростові процеси необхідною речовиною та енергією [55, 82]. Стимуляція ГК ростових процесів у проростках, одержаних з ізольованих зародків, може бути пов'язана з посиленням обмінних процесів за рахунок зростання активності ферментів, у тому числі сахарофосфатсинтази [184], яке відбувається за дії екзогенного розчину ГК.

Крім того, отримані результати до певної міри підтверджуються даними наших досліджень [5], які показали, що в умовах дефіциту трофічних факторів екзогенна сахароза (3 %-й розчин) стимулювала ростову реакцію яровизованих проростків пшениці озимої, але в умовах оптимального трофічного забезпечення вона гальмувала ростові процеси [5].

Отже, виявлена закономірність, що ефекти ГК на ростові процеси зі значно більшою інтенсивністю проявляються у всіх сортів у варіантах з оптимальним трофічним забезпеченням, ніж за його нестачі, вірогідно, свідчить про зв'язок регуляції росту цим гормоном спільно з трофічними факторами за яровизації пшениці озимої [78].

**Вміст вуглеводів за впливу гіберелінів в період яровизації.** Розчинні вуглеводи є сигнальними молекулами, що активізують специфічні шляхи трансдукції стресового або гормонального сигналу, в результаті чого відбуваються експресія / репресія генів, що беруть участь у фотосинтезі, гліколізі, азотному метаболізмі і метаболізмі сахарози та інші [87, 88, 98, 135, 174]. Ми припускаємо, що регуляторний ефект розчинних цукрів реалізується в умовах їх оптимальної

концентрації в клітині, але не може реалізуватися якщо їхній вміст у надлишку або дефіциті. Про це свідчить встановлена нами закономірність залежності ростових процесів від рівня трофічної забезпеченості проростків за яровизації [100].

Ми визначали вміст розчинних вуглеводів у проростках трьох сортів *Triticum aestivum* L. на завершення періоду 45-добової яровизації, одержаних із зернівок, які праймували ГК.

**Моноцукри.** Дослідження впливу праймування гібереліном на фоні контрастних умов трофічного забезпечення на вміст моноцукрів у проростках трьох досліджуваних сортів пшениці озимої м'якої показали, що після 45 діб яровизації найнижчий показник серед усіх варіантів досліду був виявлений у варіанті з дефіцитом трофічних факторів – зародки + вода (рис. 5.2). При цьому, серед досліджених сортів найнижчим показник був у сорту Статна, що може свідчити про більш виражену чутливість цього сорту до даних умов експерименту.

За умов нестачі трофічного забезпечення у варіанті зародки + ГК праймування ГК стимулювало накопичення моноцукрів у двох сортів Статна і Альянс, а у сорту Дорідна таке стимулювання проявлялося як тенденція. За умов оптимального трофічного забезпечення у всіх сортів між варіантами зернівки + вода і зернівки + ГК не було виявлено істотних відмінностей (рис. 5.2).

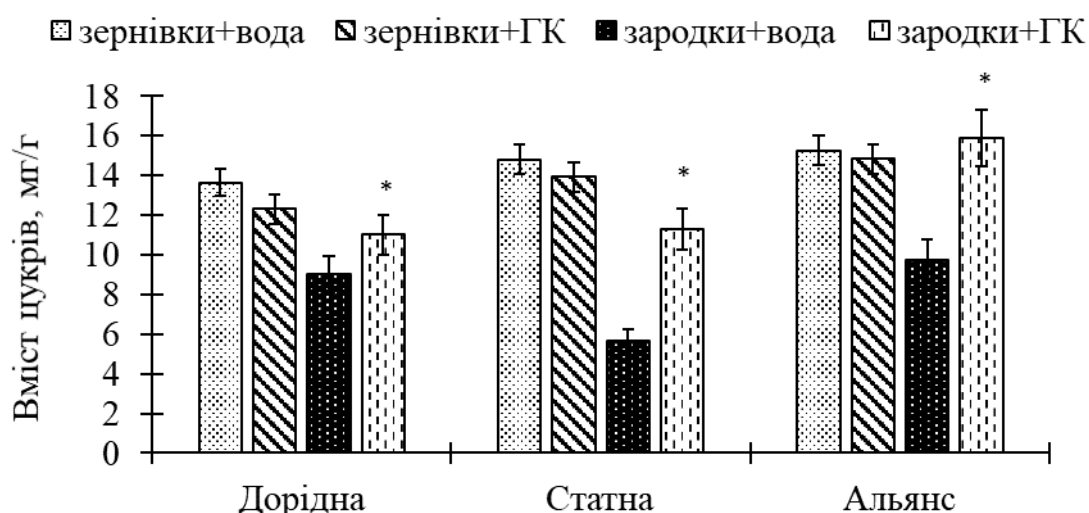


Рис. 5.2 Вплив ГК та контрастних умов трофічного забезпечення на вміст моноцукрів в проростках трьох сортів озимої м'якої пшениці за яровизації

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 2,22$  мг/г.

Необхідно зазначити, що найвищий показник вмісту моноцукрів був виявлений у варіанті з відсутністю трофічного забезпечення з додаванням розчину ГК у сорту Альянс. Вірогідно, праймування розчином фітогормону компенсувало стресові умови – нестачу трофічних речовин ендосперму – і зумовило зростання вмісту моноцукрів. Подібні дані за обробки розчином ГК3 рослин *Satureja hortensis* L. була одержані в роботах Firuzeh та інших [118].

**Олігоцукри.** Результати визначення вмісту олігоцукрів показали відмінності між варіантами у сортів пшениці за ефектом праймування ГК. В умовах оптимального трофічного забезпечення екзогенна ГК зумовлювала зростання вмісту олігоцукрів у проростках сорту Дорідна, але у сортів Статна і Альянс ефект був протилежним (рис. 5.3). Вірогідно, це пов'язано з особливостями генотипів сортів.

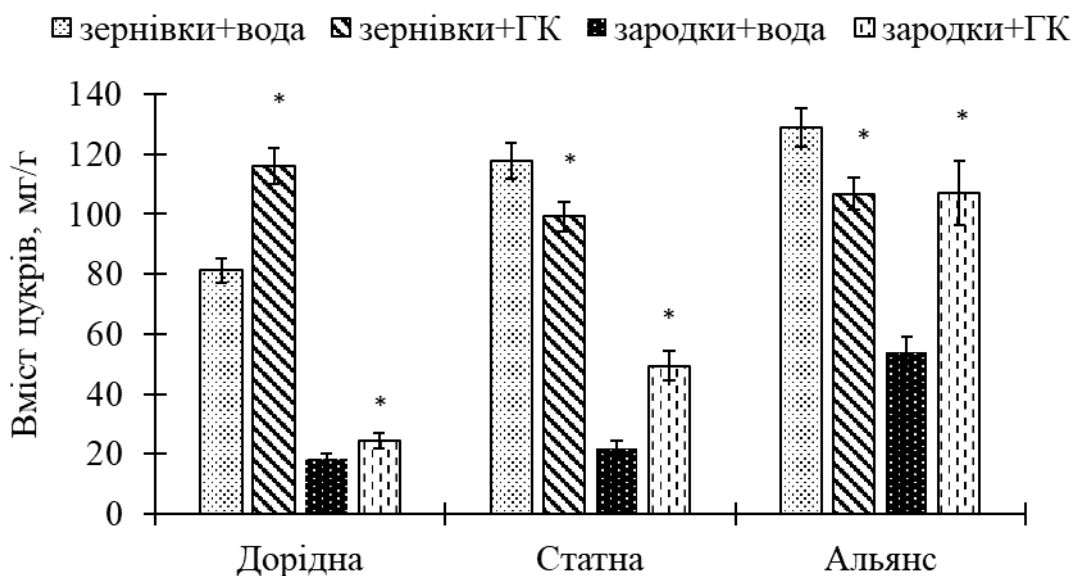


Рис. 5.3 Вплив ГК за контрастних умов трофічного забезпечення на вміст олігоцукрів в проростках трьох сортів пшениці озимої м'якої за яровизації

Примітка. \* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 6,96$  мг/г.

У варіанті з відсутністю трофічних факторів був виявлений стимулюючий ефект ГК на вміст вуглеводів у всіх сортів, окрім сорту Дорідна. У сортів Статна і Альянс даний показник перевищував показник варіанту зародки + вода у 2 рази

(рис. 5.3). Найнижчий вміст олігоцукрів, аналогічно з показниками вмісту моноцукрів (див. рис. 5.2), був характерний для варіанту зародки + вода сорту Дорідна.

**Сума цукрів.** Описані ефекти ГК у варіантах досліду всіх сортів проявлялися за рахунок зміни вмісту олігоцукрів. А отже, різниця між варіантами експерименту за вмістом суми цукрів була аналогічною до різниці вмісту олігоцукрів (рис. 5.3, табл. 5.2).

Таблиця 5.2

**Вплив ГК та контрастних умов трофічного забезпечення на загальний вміст розчинних вуглеводів в проростках трьох сортів пшениці озимої м'якої за яровизації**

| Сорт    | Варіант                    | Сума цукрів, мг/г |
|---------|----------------------------|-------------------|
| Дорідна | Зернівки + вода (контроль) | 93,76             |
|         | Зернівки + ГК              | 128,20*           |
|         | Зародки + вода             | 32,76             |
|         | Зародки + ГК               | 37,24             |
| Статна  | Зернівки + вода (контроль) | 131,52            |
|         | Зернівки + ГК              | 111,94*           |
|         | Зародки + вода             | 38,28*            |
|         | Зародки + ГК               | 59,02*            |
| Альянс  | Зернівки + вода (контроль) | 142,90            |
|         | Зернівки + ГК              | 118,91*           |
|         | Зародки + вода             | 65,10*            |
|         | Зародки + ГК               | 129,84*           |

Примітка.\* Різниця між варіантами значуща  $HP_{0,05} = 15,20$  мг/г

Виявлені особливості прояву ефектів ГК на вміст вуглеводів, на нашу думку, можуть бути пов'язані зі стимуляцією фітогормоном ростових процесів – лінійного росту та накопичення біомаси. У сорту Дорідна вона проявлялася меншою мірою,

ніж у сортів Статна і Альянс (див. рис. 5.1), що зумовлює у першого відповідно менші витрати вуглеводів на ростові процеси, ніж у двох останніх, а отже, і нижчий їх вміст у проростках цих сортів за дії ГК [78].

Таким чином, визначення вмісту розчинних цукрів і ростових процесів в проростках трьох сортів озимої м'якої пшениці показало їх залежність від трофічної забезпеченості процесу яровизації. Встановлено, що праймування гібереліном зернівок досліджуваних сортів перед яровизацією інтенсивно стимулювало ростову реакцію проростків упродовж яровизації, як в умовах оптимального, так і в умовах дефіциту трофічного забезпечення. У той же час, вміст вуглеводів у яровизованих проростках залежав від рівня стимулюючої дії ГК на ростові процеси. В основному, ефект ГК проявлявся у зростанні вмісту розчинних вуглеводів в умовах дефіциту трофіки.

Узагальнюючи отримані результати, можна припустити, що трофічне забезпечення процесу яровизації, поряд з фітогормональним контролем та генетичними факторами, може виступати вагомим чинником регуляції процесів росту і, вірогідно, розвитку пшениці озимої.

## **5.2 Темпи розвитку яровизованих рослин сортів пшениці за дії гіберелінів в період яровизації**

Фітогормональна регуляція грає істотну роль в протіканні процесів росту та розвитку рослин, оскільки фітогормони є хімічними месенджерами, які забезпечують реакцію-відповідь рослин на ендогенні та екзогенні чинники на рівні цілісного організму [45, 47, 50, 95]. Для багатьох видів вищих рослин для переходу у генеративний стан необхідний певний період дії низьких температур – яровизація (верналізація) [77].

Гібереліни (ГК) є ключовими гормонами в регуляції переходу рослин до генеративного етапу розвитку. Крім того, ГК беруть участь у регуляції процесів упродовж яровизації [141, 142]. Відомо, що період дії низьких температур стимулює експресію генів біосинтезу ГК, а також сприяє підвищенню активності ГК [147, 180]. З іншого боку, за дії довгого дня ГК через активацію транскрипції

локусу *CO* сприяють активації транскрипції генного локусу *FT*, продуктом якого є білок флориген – стимул цвітіння [103].

Аналізуючи сучасну літературу, можна стверджувати, що ГК здатні впливати не лише на протікання процесів метаболізму, а й генетичний контроль розвитку рослин [161, 180]. Оскільки, зовнішні (температура, світло, вологість тощо) і внутрішні фактори (генетична і гормональна регуляція, метаболічні процеси) впливають на процеси життєдіяльності рослин не кожен окремо, а у взаємозв'язку, то, вірогідно, забезпеченість трофічними факторами і праймування ГК за яровизації можуть впливати на темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці. Виходячи з цього, ми досліджували вплив ГК на темпи розвитку рослин сортів пшениці за умов різного рівня трофічного забезпечення яровизаційного процесу.

Результати нашого дослідження впливу ГК за різного рівня трофічного забезпечення яровизаційного процесу на темпи розвитку рослин наведені у таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

**Приживаність проростків і тривалість фенологічних фаз рослин трьох сортів пшениці озимої за дії ГК та впливу контрастних умов яровизації (вегетаційний дослід)**

| Варіант досліджу | Прижива-<br>ність, % | Діб від висаджування до початку фенофази |                |           |            |
|------------------|----------------------|------------------------------------------|----------------|-----------|------------|
|                  |                      | кущіння                                  | вихід у трубку | колосіння | дозрівання |
| Сорт Дорідна     |                      |                                          |                |           |            |
| Зернівки + вода  | 80 ± 3,2             | 25 ± 1                                   | 64 ± 2         | 80 ± 3    | 92 ± 3     |
| Зернівки + ГК    | 70 ± 2,8             | 24 ± 1                                   | 70 ± 2         | 88 ± 3    | 100 ± 3    |
| Сорт Статна      |                      |                                          |                |           |            |
| Зернівки + вода  | 80 ± 4,0             | 19 ± 1                                   | 40 ± 1         | 64 ± 2    | 75 ± 2     |
| Зернівки + ГК    | 80 ± 3,2             | 18 ± 1                                   | 35 ± 1         | 53 ± 2    | 64 ± 2     |
| Сорт Альянс      |                      |                                          |                |           |            |
| Зернівки + вода  | 20 ± 0,9             | 28 ± 1                                   | 85 ± 2         | 100 ± 3   | 115 ± 3    |
| Зернівки + ГК    | 55,56 ± 2,2          | 26 ± 1                                   | 72 ± 2         | 90 ± 3    | 102 ± 3    |

Незалежно від варіанту досліду, яровизовані рослини досліджуваних сортів переходили до колосіння (рис. 5.4), але за різних термінів (табл. 5.3). Вигляд рослин дослідного і контрольного варіантів трьох сортів озимої м'якої пшениці, які перейшли до цвітіння, наведений на рис. 5.4.

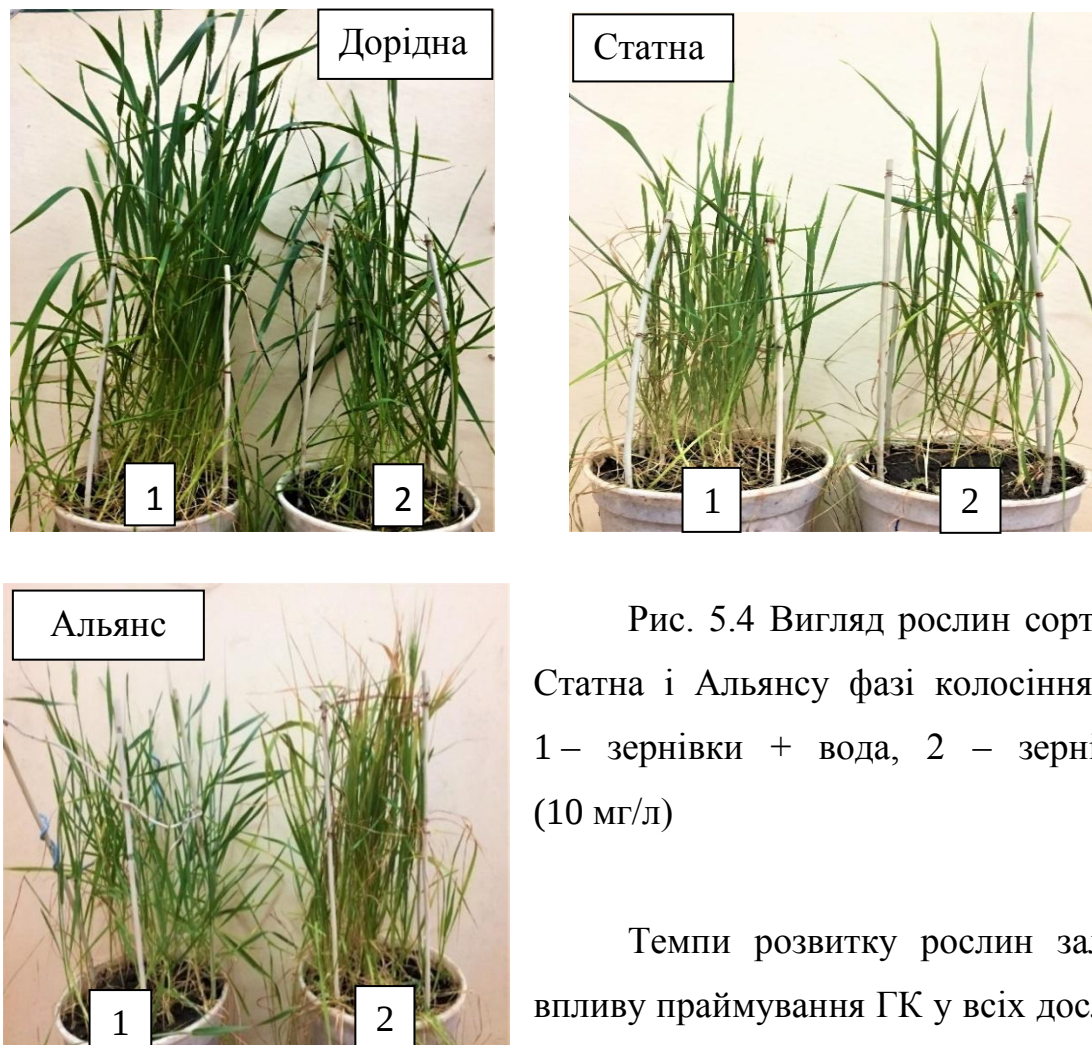


Рис. 5.4 Вигляд рослин сортів Дорідна, Статна і Альянсу фазі колосіння. Варіанти: 1 – зернівки + вода, 2 – зернівки + ГК (10 мг/л)

Темпи розвитку рослин залежали від впливу праймування ГК у всіх досліджуваних сортів на фоні різного трофічного забезпечення – зернівки + вода та зернівки + ГК, бо мали істотні відмінності за тривалістю вегетаційного періоду (табл. 5.3).

У ході дослідження було виявлено, що проростки варіантів зернівки + вода і зернівки + розчин ГК досліджених сортів, які проходили яровизацію за умов оптимального трофічного забезпечення, стали повноцінними рослинами в умовах вегетаційного експерименту. У той час як з проростків, яровизованих без ендосперму на воді та на розчині ГК, повноцінні рослини не були отримані. Тому

наводимо порівняльний аналіз за темпами розвитку досліджуваних сортів по варіантах зернівки + вода (контроль) і зернівки + ГК – дослідний варіант.

Порівнюючи тривалість переходу до колосіння дослідних і контрольних варіантів трьох сортів, можна зазначити, що для рослин сорту Альянс характерний більш довгий період до колосіння (90-100 діб) у порівнянні з його тривалістю у сортів Дорідна (80-88 діб) і Статна (53-64 доби).

За результатами вегетаційного експерименту сорт Статна має найкоротший період до колосіння (табл. 5.3). Отже, за даним показником дослідні сорти можна ранжувати за такою послідовністю Статна < Дорідна < Альянс. Різниця між сортами за тривалістю періоду до колосіння, на нашу думку, може бути пов'язана з їх генотиповими особливостями.

Тим не менше, темпи розвитку досліджуваних сортів різнилися, залежно від впливу ГК. Так, ефекти ГК на розвиток проявлялися у тому, що сорти Статна та Альянс значно прискорювали перехід до виходу у трубку, колосіння і дозрівання (табл. 5.3) порівняно до темпів розвитку у контролі – без дії ГК. Водночас у сорту Дорідна, навпаки, за дії ГК перехід до генеративного стану і дозрівання гальмувався (табл. 5.3).

Отримані дані, вірогідно, можуть свідчити про різну чутливість досліджених сортів до праймування ГК. За нашими даними різниця реакції сортів на дію ГК проявлялася і у ростовій реакції (див. рис. 5.1 і табл. 5.1) та вмісті розчинних вуглеводів (див. табл. 5.2). Так, в умовах оптимального трофічного забезпечення ГК значно посилював біосинтетичні процеси рослин сортів Статна і Альянс, а у сорту Дорідна такого значного ефекту не виявлено. Щодо вмісту вуглеводів, зокрема олігоцукрів, то у рослин сорту Дорідна був вищий показник, ніж у сортів Статна і Альянс (див.рис. 5.3 і табл. 5.2).

Отримані результати можна пояснити тим, що генетичний та епігенетичний контроль експресії генів *Vrn* здійснюється за дії низьких позитивних температур, а обробка ГК протягом періоду цієї дії впливає на темпи розвитку та швидкість проходження фенологічних фаз. Низькі температури сприяють експресії генів синтезу ГК, що опосередковано впливає на активацію генних локусів,

відповідальних за ініціацію цвітіння. При цьому праймування ГК, вірогідно, може впливати на трансдукцію гормонального сигналу. Оскільки у пшениці ГК здатні прискорювати перехід до цвітіння ярих сортів, вирощених за умов довгого дня, озимих сортів, які піддавалися яровизації [161]. Отже, генетична і фітогормональна регуляція верналізації пов'язані між собою, що проявляється у зміні темпів розвитку рослин озимої м'якої пшениці.

### **Висновки до розділу 5**

1. Встановлено, що праймування ГК в період яровизації стимулює ростові процеси та біосинтез розчинних вуглеводів за рахунок фракції олігоцукрів у проростків досліджуваних сортів. Інтенсивність цих процесів залежить від рівня трофічного забезпечення яровизації.
2. Показано, що пролонгована дія оптимальних умов трофічного фактору та праймування фітогормоном ГК<sub>3</sub> на темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці проявляється у прискоренні переходу до колосіння, що є фенотиповим доказом позитивного впливу досліджуваних факторів на експресію генів *Vrn*.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [78].

## РОЗДІЛ 6

### ДОСЛІДЖЕННЯ ЯРОВИЗАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ В СИСТЕМІ КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

#### **6.1 Вплив тривалості яровизації на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці**

Культура клітин і тканин рослин відіграє значну роль у вивченні шляхів морфогенезу, так як в системі *in vitro* виявляється найбільш широкий діапазон морфогенетичного потенціалу рослини [21, 54]. На молекулярному рівні морфогенез пов'язаний з активністю проліферації, росту та диференціації клітин в осередках органогенезу. Програма реалізації морфогенезу здебільшого залежить від ендогенних факторів, в основному, генотипу рослини-донора та взятого від нього експланту [62, 201]. Окрім цього, вона також детермінована комплексом екзогенних факторів. До останніх факторів можна віднести умови культивування: склад живильного середовища, вологість, світло та температура. Температура є одним з найважливіших чинників, що визначає етапність онтогенезу і впливає на фенотиповий прояв генотипу рослин. Для озимої пшениці період тривалого впливу низькими позитивними температурами є обов'язковим для переходу до генеративного розвитку, тобто повної реалізації морфогенезу. Температурні умови разом з іншими умовами культивування, зокрема фітогормональним складом живильного середовища, можуть впливати на прояв морфогенетичних реакцій калусної культури злаків [62].

Ряд дослідників відмічають, що рослини озимої пшениці здатні переходити до цвітіння після періоду дії позитивних низьких температур тривалістю від 35 до 60 діб залежно від генотипу, біологічних особливостей сорту та географічного положення місця вирощування [71].

Ми припускаємо, що тривала експозиція калусної культури озимої м'якої пшениці за низькотемпературних умов може стимулювати шляхи морфогенезу в умовах *in vitro*, можливо за рахунок експресії генів *Vrn*.

Дослідження впливу низької температури на прояв морфогенетичних реакцій проводили на калусній культурі третього пасажу. Вторинну пересадкову калусну культуру досліджуваних сортів витримували 15, 30 та 45-ти діб в холодильній камері в темряві за температури  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , а контрольний варіант – протягом 15, 30 та 45-ти діб за  $26^\circ\text{C}$  у термостаті в темряві. Наприкінці експозиції калуси пасивували на регенераційне живильне середовище МС з додаванням 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК та культивували на світлі з інтенсивністю 2 кЛк, за температури  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Аналіз морфогенетичних реакцій проводили на 28 добу.

За результатами експериментів було показано, що у всіх варіантах озимих сортів пшениці проявлялися морфогенетичні реакції, проте різною мірою. При цьому калусні культури відрізнялися за морфологією.

На першому етапі культивування, дослідні сорти відрізнялися за показником ефективності утворення калусу лише протягом перших 7 діб. На 14-ту добу вона у всіх сортів становила 100 % (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

**Ефективність первинного калусогенезу сортів пшениці озимої м'якої, %**

| Сорт    | Тривалість культивування | Ефективність калусогенезу |
|---------|--------------------------|---------------------------|
| Дорідна | 7 діб                    | $56,67 \pm 2,83$          |
|         | 14 діб                   | $100,00 \pm 4,33$         |
| Статна  | 7 діб                    | $75,00 \pm 3,75$          |
|         | 14 діб                   | $100,00 \pm 4,55$         |
| Астет   | 7 діб                    | $75,00 \pm 3,75$          |
|         | 14 діб                   | $100,00 \pm 4,33$         |

Примітка.\* Різниця між варіантами значуща при  $p \leq 0,05$

В цілому, утворені калуси були жовто-білого кольору, обводнені та пухкі. При цьому зрілі зародки, які використовували в якості одних з найбільш ефективних експлантів, культивували на живильному середовищі МС

з додаванням синтетичного ауксину 2,4-Д в концентрації 2 мг/л, яка є оптимальною для індукції калусогенезу злаків [7, 183].

Після 8 тижнів культивування вторинну калусну культуру усіх сортів, гетерогенну за структурою, використовували для дослідів зі впливу тривалої експозиції за низькотемпературних умов. Необхідно зазначити, що наприкінці 8 тижнів культивування у темряві за 26 °С, перед постановкою експерименту, у всіх сортів спостерігалось явище спонтанного ризогенезу (рис. 6.1).



Рис. 6.1 Вторинна калусна культура трьох сортів озимої м'якої пшениці перед постановкою експерименту

Стосовно схеми експерименту зазначимо, що тривалість 15, 30 і 45 діб експозиції калусної культури дослідних сортів *Triticum aestivum* L. за низької температури була обрана згідно з отриманими даними попередніх досліджень *in vivo* – дослідження вуглеводного обміну, ростової реакції, темпів розвитку та алельного стану генів яровизації *Vrn* [3, 4, 5, 78, 84, 100]. Врахували результати інших дослідників про вплив тривалості періоду яровизації на перехід до генеративного розвитку рослин пшениці озимої *in vivo*, [23, 24, 66]. Це дало підставу припустити, що і в умовах *in vitro* тривалість експозиції 45 діб достатня для повної реалізації програми морфогенезу. Аналіз низькотемпературних ефектів через 15, 30 і 45 діб дозволяв виявити динаміку морфогенетичних процесів у ході яровизації.

Після експозиції в холодильнику (дослідний) і в термостаті (контрольний варіант) протягом 15, 30 і 45-ти діб відбирали калуси гетерогенні та щільні за

структурою, оскільки вони мали меристематичні осередки та зони, в яких почалися реакції диференціації. Візуально калуси дослідних і контрольних варіантів трьох сортів не відрізнялися, але контрольні характеризувалися дещо меншим приростом калусної тканини за об'ємом та площею. Калуси трьох сортів, культивовані в різних умовах протягом 15-ти діб, безпосередньо перед пасажом на регенераційне середовище МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК представлені на рис. 6.2.

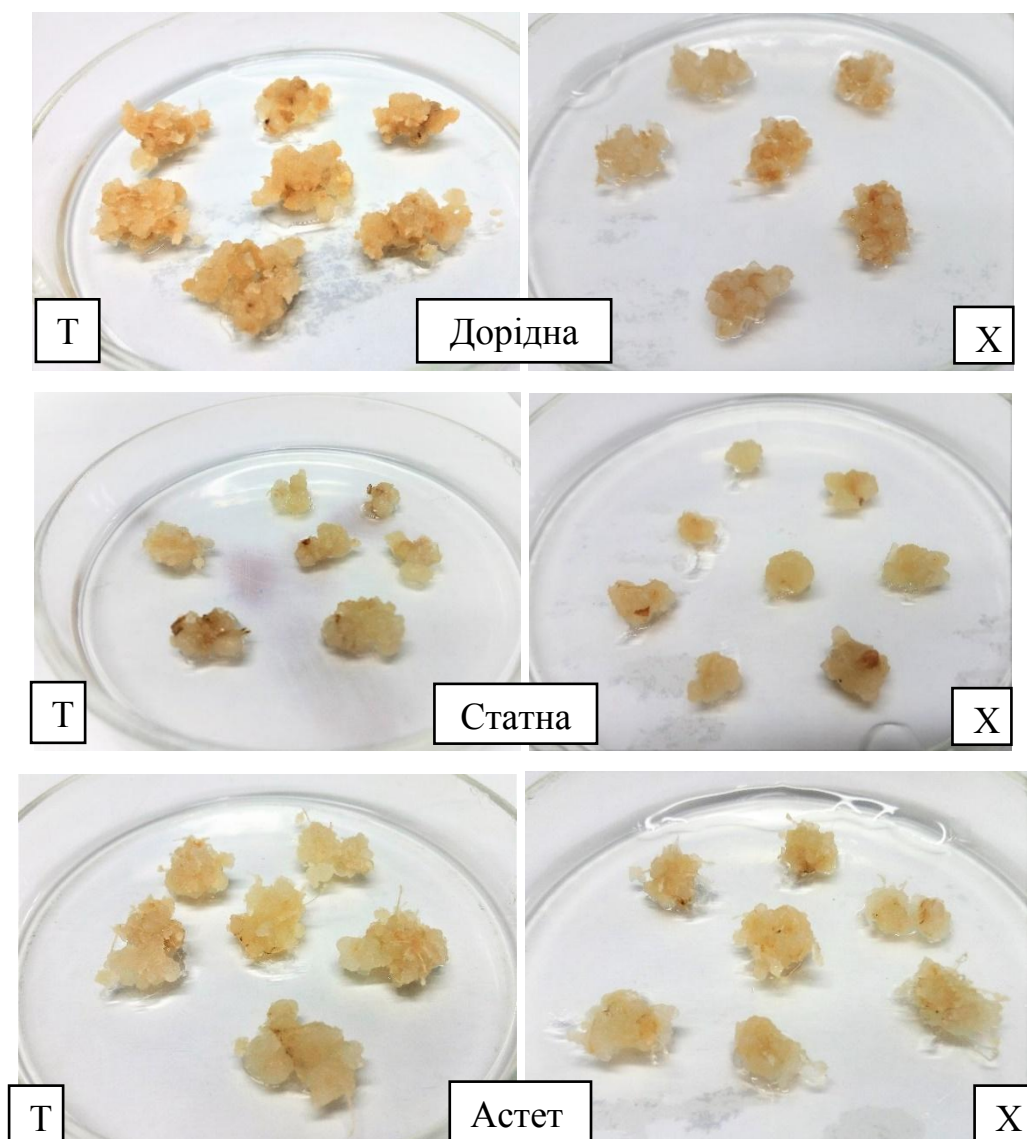


Рис. 6.2 Пересадкова калусна культура озимої пшениці після 15-ти діб низькотемпературної експозиції перед пасажом на регенераційне середовище: Т – (контроль – термостат,  $t = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); Х (дослід – холодильна камера,  $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

На 28 добу культивування на регенераційному середовищі з додавання фітогормонів, на світлі та  $22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  аналізували морфогенетичні реакції за

показниками: частота гемогенезу (%), ризогенезу (%), хлорофілогенезу (%) та розраховували кількість утворених морфогенних структур на калус: меристематичних осередків та корінців. Було виявлено, що у всіх варіантах, окрім контролю (26 °C) сорту Дорідна, відбувалося позеленіння калусної тканини, що свідчить про біосинтез основного пігменту фотосинтезу – хлорофілу (табл. 6.2).

Процес хлорофілогенезу в калусній культурі може виникати за дії таких факторів як світло, певного балансу ендогенних і екзогенних фітогормонів, зміни концентрації речовин у живильному середовищі, наприклад, зниження концентрації сахарози, а також температуру [16, 62].

У цілому, хлорофілогенез проявлявся по-різному: як формування зелених меристематичних осередків, зелених корінців (аномальний шлях розвитку) і загальне позеленіння калусної тканини (формування міксотрофного калусу).

*Таблиця. 6.2*

**Вплив тривалості 15-тидобової холодової експозиції на морфогенез калусної культури пшениці озимої**

| Сорт    | Варіант, °C | Хлорофілогенез, % | Гемогенез, % | Ризогенез, % |
|---------|-------------|-------------------|--------------|--------------|
| Дорідна | 26 °C       | 0,0               | 11,1 ± 0,9   | 42,9 ± 2,5   |
|         | 4 °C        | 14,3 ± 0,6*       | 56,8 ± 2,7*  | 46,2 ± 2,6   |
| Статна  | 26 °C       | 57,1 ± 2,6        | 71,4 ± 3,1   | 92,8 ± 4,2   |
|         | 4 °C        | 78,6 ± 35,3*      | 85,7 ± 3,8*  | 85,7 ± 3,7   |
| Астет   | 26 °C       | 90,0 ± 4,2        | 92,9 ± 4,2   | 100,0 ± 4,1  |
|         | 4 °C        | 100,0 ± 3,9*      | 100,0 ± 4,2  | 100,0 ± 4,9  |

*Примітка.\** Різниця між варіантами значуща при  $p \leq 0,05$

Проведений аналіз частоти хлорофілогенезу свідчить, що тривала дія низьких позитивних температур стимулювала процес позеленіння калусів усіх дослідних сортів пшениці (табл. 6.2.). При цьому, максимальний показник був характерний для сорту Астет, а мінімальний – для сорту Дорідна. Виявлена різниця за проявом даної реакції між сортами може свідчити про різний

морфогенний потенціал кожного сорту і сприйнятливість до умов культивування калусної культури.

Стосовно частоти гомогенезу, то була виявлена аналогічна до хлорофілогенезу тенденція, оскільки другий процес передує першому. У калусах дослідних варіантів даний показник був більшим, ніж у контрольних, за виключенням сорту Астет – достовірної різниці не було. Необхідно зазначити, що частоту гомогенезу розраховували як кількість калусів з меристематичними осередками до загальної кількості. Адже поява меристематичних осередків на калусних тканинах рослин передує морфогенезу. Окрім цього, розраховували середню кількість меристематичних осередків на один калус. Результати проведеного аналізу показали, що кількість даних структур дослідного варіанту була в 4 і 2,5 рази вищою за таку контрольного варіанту сортів Дорідна і Статна відповідно.

Оскільки в меристематичних осередках диференціюються зачатки стебла, кореня, листка або квіткової бруньки, то, відповідно, відбувається стебловий, кореневий, листковий і флоральний органогенез. Такі меристематичні осередки можуть виникати на периферії калусної тканини або бути зануреними в неї [16]. У наших дослідях спостерігалася як перша, так і друга локалізація даних структур, незалежно від умов культивування. Калусна культура з морфогенними структурами дослідного і контрольного варіантів трьох сортів пшениці представлена на рис. 6.3. Зелені ділянки з тонкими нитчастими структурами, що мають чітко виражені межі, та з яких у подальшому розвивалися листя та корені – процес геморизогенезу [85].

У всіх варіантах дослідів був відмічений добре виражений ризогенез (табл. 6.2, рис. 6.3) [85]. Тривала дія низьких температур упродовж 15 діб не впливала на частоту утворення коренів на калусах дослідних сортів. При цьому найбільшою вона була у сортів Статна і Астет незалежно від експериментальних умов і перевищувала у 2 рази таку у сорту Дорідна.

Аналіз отриманих даних із впливу низької температури на прояв морфогенетичних реакцій калусної культури протягом 30 діб виявив схожу до

впливу протягом 15 діб тенденцію: збільшення частоти гомогенезу та хлорофілогенезу. При цьому у дослідного варіанту збільшення частоти хлорофілвмісних ділянок спостерігалось лише у сортів Статна і Астет, а частоти формування меристематичних осередків (початок гомогенезу) – у всіх сортів. Збільшення кількості останніх на один калус було значущим лише у сорту Статна. Стосовно частоти утворення коренів, то істотне стимулювання було виявлено у сорту Астет (табл. 6.3).

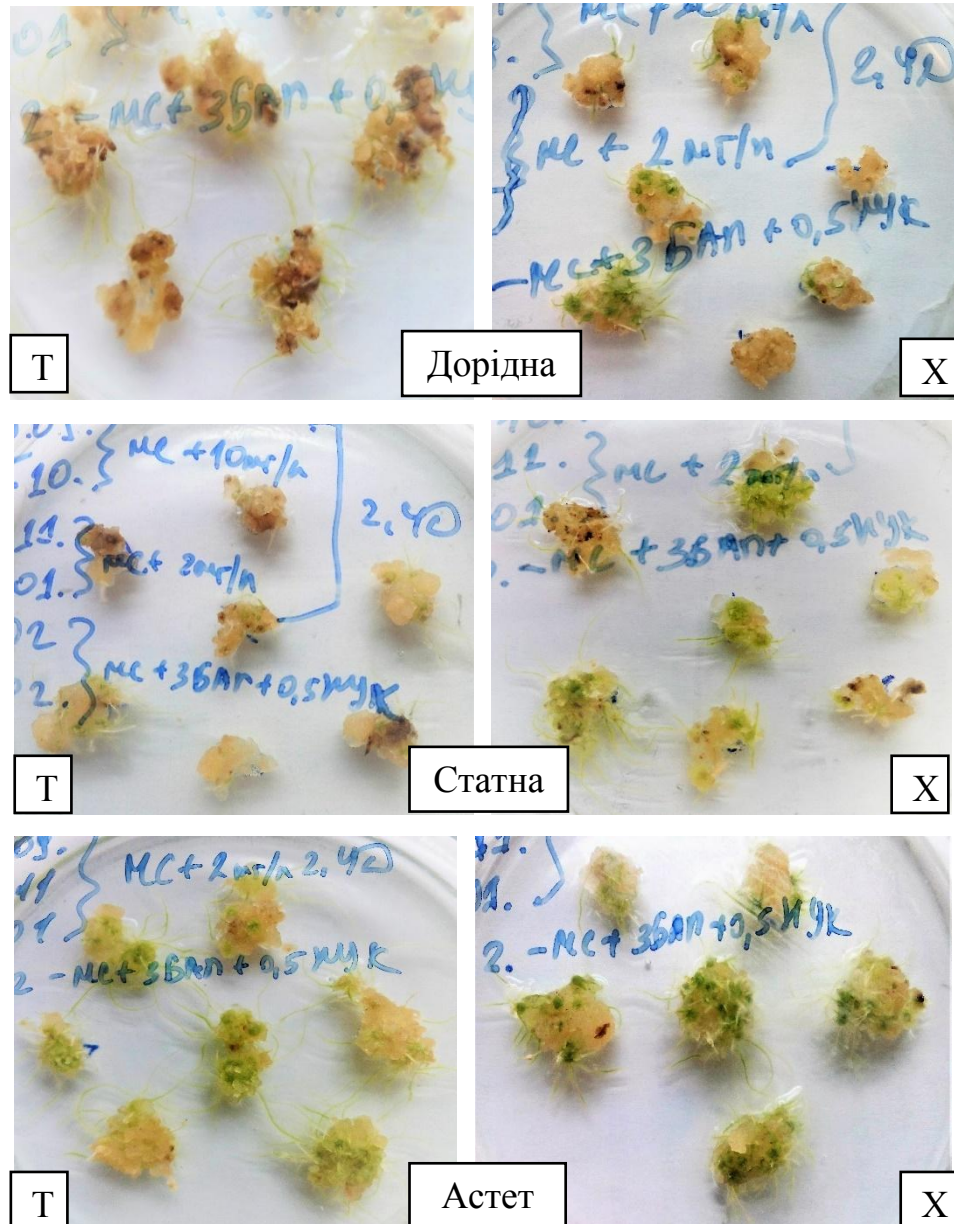


Рис. 6.3 Морфогенетичні ефекти у калусній культурі після 15-добової холодової експозиції порівняно з контролем: Т (контроль –  $t = 26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ); Х (холод –  $t = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Порівняння одержаних даних за показниками морфогенетичних реакцій у сортів показує, що сорти Статна та Астет характеризуються максимальними показниками частоти хлорофілогенезу і гемогенезу та загальною кількістю морфогенних структур, а мінімальними – Дорідна (табл. 6.3). Вірогідно, це може свідчити про безпосередній вплив генотипу та інших біологічних особливостей сорту на прояв морфогенезу в культурі *in vitro* [85].

Таблиця. 6.3

**Вплив тривалості 30-добової холодової експозиції на морфогенез калусної культури пшениці озимої**

| Сорт    | Варіант, °C | Хлорофілогенез, % | Гемогенез, % | Ризогенез, % |
|---------|-------------|-------------------|--------------|--------------|
| Дорідна | 26 °C       | 38,5 ± 1,9        | 0,0          | 53,8 ± 3,9   |
|         | 4 °C        | 38,5 ± 1,9        | 15,4 ± 0,7*  | 46,1 ± 3,9   |
| Статна  | 26 °C       | 72,0 ± 3,5        | 50,0 ± 2,4   | 100,0 ± 4,9  |
|         | 4 °C        | 80,0 ± 3,8*       | 71,4 ± 3,5*  | 100,0 ± 4,9  |
| Астет   | 26 °C       | 90,0 ± 4,4        | 60,0 ± 3,0   | 44,4 ± 2,2   |
|         | 4 °C        | 100,0 ± 4,8*      | 81,8 ± 3,9*  | 100,0 ± 4,9* |

Примітка. \* Різниця між варіантами значуща при  $p \leq 0,05$

Окрім вище названих відмінностей, між собою сорти по варіантах досліду відрізнялися за морфологічною характеристикою калусів. Калуси сорту Дорідна, в цілому, були світло-коричневі, пухкі, обводнені, з зеленими корінцями, мали некротичні ділянки коричневого кольору. У дослідного варіанту з 30-добовою експозицією були виявлені меристематичні осередки зеленого кольору з коренями. Калуси сортів Статна і Астет – матові, біло-жовті, з зеленими хлорофіловмісними ділянками, корінцями та меристематичними осередками, пухкі і обводнені (рис. 6.4).

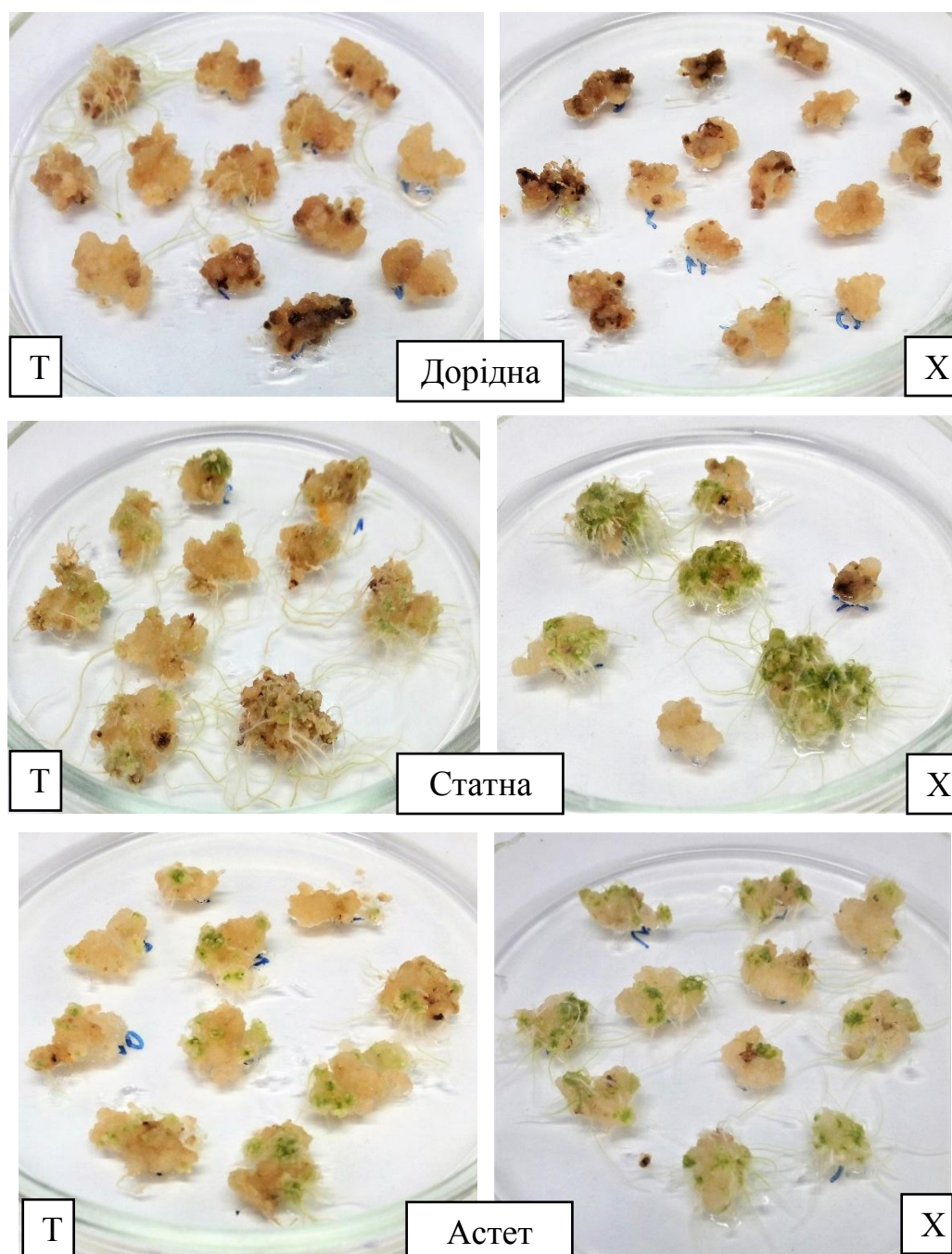


Рис. 6.4 Вигляд калусів після 30-добової холодової експозиції порівняно з контролем: Т (контроль –  $t = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); Х (холод –  $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

У калусів з холодовою експозицією сортів Статна і Астет відбувалося збільшення кількості меристематичних осередків із зачатками листя і розгалуженими корінцями, які були ідентифіковані як зелені ділянки з щільною структурою та диференційованими клітинами (рис. 6.4).

Стосовно спостережень та аналізу морфогенного потенціалу калусної культури з витримкою протягом 45 діб, то отримані результати були подібними до

вище описаних, але з деякими відмінностями. Тривалий вплив низької температури протягом 45 діб стимулював біосинтез хлорофілу у сортів пшениці: Дорідна і Статна – приблизно в 3 рази, а Астет – у 2 рази, порівняно до контролю (табл. 6.4).

Таблиця. 6.4

**Вплив тривалості 45-добової холодової експозиції на морфогенез калусної культури озимої пшениці**

| Сорт    | Варіант, t °C | Хлорофілогенез, % | Гемогенез, % | Ризогенез, % |
|---------|---------------|-------------------|--------------|--------------|
| Дорідна | 26 °C         | 30,8 ± 1,5        | 0,0          | 84,6 ± 4,20  |
|         | 4 °C          | 94,5 ± 4,7*       | 35,0 ± 1,7*  | 100,0 ± 5,0* |
| Статна  | 26 °C         | 20,0 ± 1,0        | 0,0          | 60,0 ± 3,0   |
|         | 4 °C          | 69,5 ± 3,4*       | 30,0 ± 1,5*  | 100,0 ± 5,0* |
| Астет   | 26 °C         | 37,5 ± 1,9        | 0,0          | 80,0 ± 3,9   |
|         | 4 °C          | 71,4 ± 3,6*       | 12,5 ± 0,6*  | 100,0 ± 5,0* |

*Примітка.* \* Різниця між варіантами значуща при  $p \leq 0,05$

Окрім процесу хлорофілогенезу у дослідному варіанті сортів Дорідна, Статна і Астет було виявлено, що частота формування меристематичних осередків становила 35, 30 і 12,5 % відповідно, в той час як у контрольному варіанті ці процеси не відбувалися. В калусній культурі сорту Статна було ідентифіковано формування надземних органів – листя (рис. 6.5). Окрім цього, кількість меристематичних осередків становила 3-4 на калус. Також збільшення кількості корінців і частоти їх утворення спостерігалось у трьох сортів за умов низькотемпературної експозиції, порівняно до контролю (табл. 6.4). Таке стимулювання процесу ризогенезу у всіх сортів відбувалося лише після 45 діб дії яровизації, оскільки на 15-ту добу не було виявлено істотних змін (табл. 6.2), а на 30-ту добу – лише у сорту Астет (рис. 6.3). Виявлена закономірність може свідчити про те, що зі збільшенням тривалості дії низької температури на калусну культуру

зростає інтенсивність процесу ризогенезу і, як наслідок, кількість елементів кореневої системи на один калус. Можна зробити припущення, що тривалість даного фактору може детермінувати розвиток кореневої системи в культурі *in vitro*.

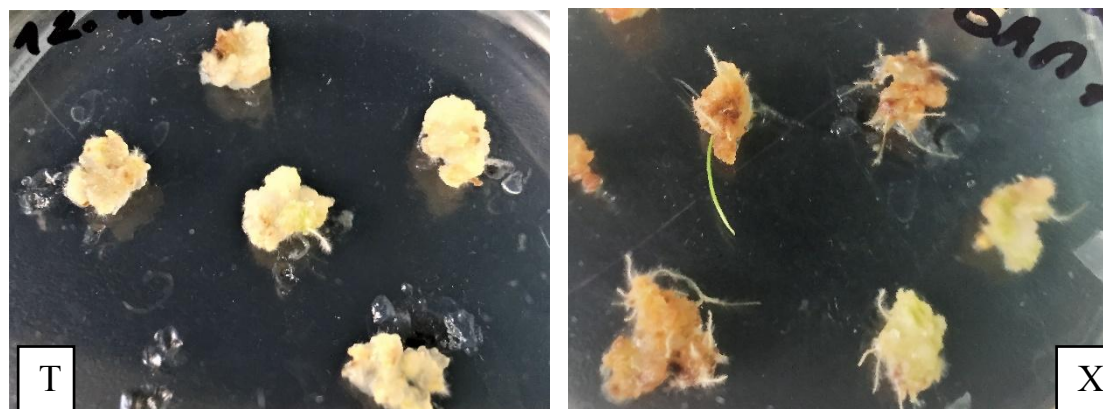


Рис. 6.5 Вигляд калусів сорту Статна після 45-добової холодової експозиції порівняно з контролем: Т (контроль –  $t = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); Х (холод –  $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

У цілому, довготривала витримка протягом 45-ти діб за умов зниженої температури стимулювала утворення морфогенних структур, зокрема листя (рис. 6.5, Х).

Отже, узагальнюючи вище описані результати, можна зробити висновок, що на всіх етапах експозиції за низьких температур – 15, 30 і 45 діб – відбувався органогенез, який проявлявся шляхом формування меристематичних осередків і інтенсивного утворення корінців. При цьому формування корінців відбувалося більш інтенсивно, ніж гомогенез у всіх сортів, незалежно від температурних умов і тривалості впливу фактору. У всіх варіантах трьох сортів озимої пшениці з експозицією при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  було відзначено збільшення частоти формування меристематичних осередків. Максимальна інтенсивність гомогенезу виявлена у сорту Астет, мінімальна у сорту Дорідна. Залежно від тривалості, низькотемпературний вплив стимулював морфогенетичні реакції калусної культури досліджуваних сортів озимої м'якої пшениці.

Викладене дає підставу припустити, що в калусній культурі, як в умовах *in vivo*, відбуваються яровизаційні процеси, які, вірогідно, необхідні для прискорення розвитку.

## **6.2 Дослідження впливу фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури сортів озимої пшениці**

Відомо, що за умов культури *in vitro* реалізується більше різноманіття шляхів морфогенезу ніж в умовах *in vivo*. Оскільки в умовах *in vitro* відбуваються складні перебудови клітин – їх дедиференціювання, що призводить до втрати спеціальних функцій і появи нових властивостей, зокрема здатності клітин до необмеженого поділу. Систему *in vitro* можна контролювати, а саме спрямовувати у потрібний напрямок процеси морфогенезу – органогенез і соматичний ембріогенез. Це дає можливість отримувати нові рослини-регенеранти [30].

В роботах багатьох дослідників є дані про вплив різних факторів на прояв морфогенетичних реакцій в культурі рослинних клітин і тканин, зокрема пшениці, а також їх поетапне протікання. Це ендогенні – генотип і тип експланту, а також екзогенні фактори – склад живильного середовища, температура, світло, фітогормональний баланс і т.д. [15, 41, 62]. Особливе місце у дослідженні впливу різних екзогенних факторів належить вивченню ефектів складу фітогормональному середовища, так як він може впливати на прояв і протікання морфогенетичних реакцій культури *in vitro*. Зазвичай для оптимізації складу найпоширенішого і універсального поживного середовища Мурасіге і Скуга (МС) в якості регуляторів росту і розвитку використовують фітогормони ауксини і цитокініни у різних співвідношеннях і концентраціях. Однак даних про вплив ГК недостатньо, зокрема для культури пшениці озимої. Відомо, що ГК сприяє росту зачатків стебла в калусній культурі [15, 16], а також у культурі пиляків ГК стимулює процеси андрогенезу – проростання пилкових зерен і ріст пилкових трубок [185, 186].

Нами було проведено дослідження впливу гіберелінів на фоні певного фітогормонального складу регенераційного поживного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури озимої пшениці. За результатами якого було показано, що шляхом додавання ГК у комплексі з ауксинами і цитокінінами можна стимулювати процеси органогенезу – гемо- та ризогенезу.

У дослідях використовували регенераційне живильне середовище (РС) Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням гіберелінів, цитокінінів та ауксинів у різних концентраціях для індукції морфогенезу. В якості контрольного варіанту використовували РС (МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК), дослідними були 4 варіанти з додаванням вище вказаних фітогормонів та ГК різної концентрації: 0,1 (РС 1); 0,5 (РС 2); 1,0 (РС 3) та 10 (РС 4) мг/л. Протягом чотирьох тижнів культивування на регенераційному середовищі за умов освітлення 2 кЛк, 16-годинному фотоперіоду та температури  $22 \pm 1$  °С проводили спостереження та аналіз прояву гемо- та ризогенезу калусної культури пшениці озимої м'якої сорту Альянс (табл. 6.5). Було показано, що культивування калусів на МС 2 з додаванням 0,5 мг/л ГК протягом першого тижня стимулювало процес гемогенезу (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

**Вплив ГК на ефективність гемогенезу пересадкової калусної культури  
пшениці озимої сорту Альянс, %**

| Варіант                                    | Гемогенез після культивування, тижнів |                |                |                |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                            | Один                                  | Два            | Три            | Чотири         |
| РС (МС + 3 мг/л БАП + 5 мг/л НОК) Контроль | $23,3 \pm 0,7$                        | $26,6 \pm 1,7$ | $26,6 \pm 1,7$ | $26,6 \pm 1,7$ |
| РС + ГК 0,1 мг/л                           | $20,0 \pm 0,5$                        | $23,3 \pm 0,7$ | $23,3 \pm 0,7$ | $26,6 \pm 1,7$ |
| РС + ГК 0,5 мг/л                           | $26,6 \pm 1,7$                        | $30,0 \pm 1,1$ | $30,0 \pm 1,1$ | $30,0 \pm 1,1$ |
| РС + ГК 1,0 мг/л                           | $20,0 \pm 0,5$                        | $20,0 \pm 0,5$ | $20,0 \pm 0,5$ | $23,3 \pm 0,7$ |
| РС + ГК 10 мг/л                            | $20,0 \pm 0,5$                        | $20,0 \pm 0,5$ | $20,0 \pm 0,5$ | $23,3 \pm 0,7$ |

Максимальний показник частоти цього процесу був характерний для варіанту РС 2, який складав 26,6 %, дещо меншим для МС К – 23,3 %, а мінімальними для РС 1, РС 3 і РС 4 – 20,0 %. При цьому, на деяких калусах спостерігалось утворення листя і колеоптелів.

Протягом другого і третього тижня спостерігалася аналогічна тенденція, окрім цього, кількість калусів збільшувалася (рис. 6.6). На кінцеву дату, після 4 тижнів культивування загальна картина дослідження не змінювалася, спостерігався інтенсивний ріст і розвиток наземних органів (рис. 6.6).

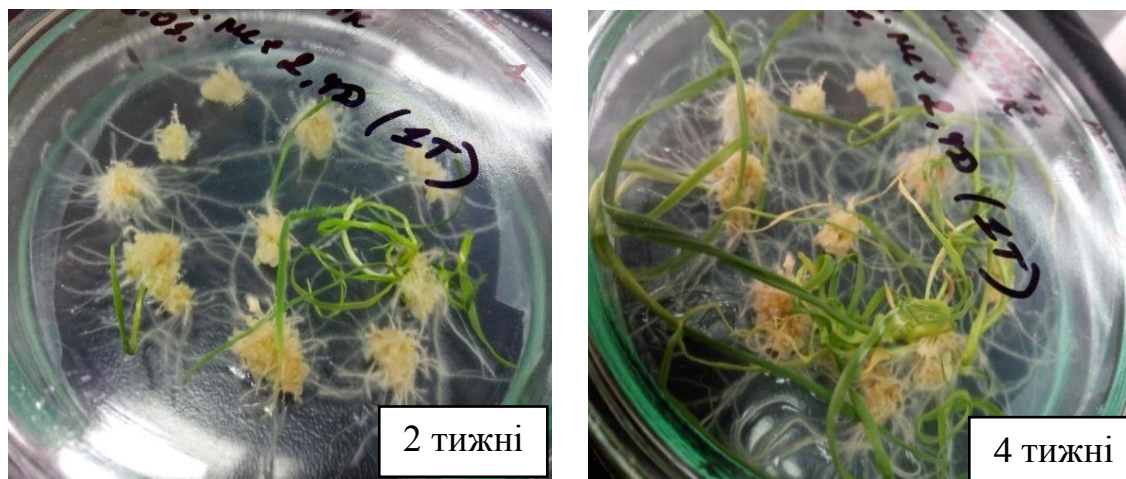


Рис. 6.6 Інтенсивний гемогенез при культивуванні калусів на живильному середовищі РС з додаванням ГК в концентрації 0,5 мг/л

Виявлено, що найбільша кількість утворених морфогенних структур (листя, колеоптилів) спостерігалась при культивуванні калусів після чотирьох тижнів на РС + ГК 0,1 мг/л та РС + ГК 0,5 мг/л (табл. 6.5). У цілому, упродовж усього періоду культивування калуси, культивовані на середовищах РС + ГК 1,0 мг/л і РС + ГК 10 мг/л, характеризувалися нижчими показниками гемогенезу порівняно з контролем, що може свідчити про негативний вплив концентрацій ГК 1,0 і 10 мг/л на формування наземної частини рослин.

Окрім визначення ефективності гемогенезу пере садкової калусної культури озимої пшениці за впливу різного фітогормонального складу ЖС визначали ефективність хлорофілогенезу – процес біосинтезу хлорофілу.

Позеленіння калусної тканини спостерігали вже протягом першого тижня. Найвищий показник прояву хлорофілогенезу був ідентифікований у контролі, РС + ГК 0,1 мг/л і РС + ГК 0,5 мг/л, дещо менший на РС + ГК 1 мг/л, а найнижчий на РС + ГК 10 мг/л, порівняно до контролю (табл. 6.6). При цьому стимулювання ГК процесів за концентрації 0,5 і 1,0 мг/л відбувалося більшою мірою, ніж в контролі

та інших варіантах. Порівняння динаміки позеленіння калусів по варіантах показало, на РС + ГК 0,5 мг/л її частота різко зростала вже на другому тижні культивування і складала 100 %.

Таблиця 6.6

**Вплив ГК на прояв хлорофілогенезу пересадкової калусної культури пшениці озимої сорту Альянс, %**

| Варіант                                    | Хлорофілогенез після культивування, тижнів |            |             |             |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------|-------------|-------------|
|                                            | Один                                       | Два        | Три         | Чотири      |
| РС (МС + 3 мг/л БАП + 5 мг/л НОК) Контроль | 73,3 ± 5,2                                 | 93,3 ± 2,5 | 95,0 ± 0,9  | 95,0 ± 0,9  |
| РС + ГК 0,1 мг/л                           | 76,6 ± 2,3                                 | 83,3 ± 2,1 | 90,0 ± 2,7  | 93,3 ± 1,5  |
| РС + ГК 0,5 мг/л                           | 75,5 ± 3,7                                 | 85,8 ± 3,4 | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |
| РС + ГК 1,0 мг/л                           | 60,0 ± 4,9                                 | 76,6 ± 2,3 | 90,0 ± 2,7  | 93,3 ± 1,5  |
| РС + ГК 10 мг/л                            | 46,6 ± 1,6                                 | 61,5 ± 3,1 | 72,7 ± 4,1  | 72,7 ± 4,1  |

Зазначимо, що протягом досліді і на четвертий тиждень на РС + ГК 10 мг/л було виявлена найменша кількість калусів, які містили хлорофіл серед усіх варіантів. Отже, можна стверджувати про інгібуючий ефект ГК на хлорофілогенез з концентрацією 10 мг/л у складі регенераційного середовища.

Ризогенез на усіх живильних середовищах, включно з контролем, відбувався майже однаково та досить інтенсивно. Вже на 1-му тижні культивуванні майже на усіх калусах утворились корінці (табл. 6.7).

Після чотирьох тижнів культивування на РС + ГК 0,5 мг/л було виявлена найменша кількість коренів, а на МС 1 найбільша. Коріння утворювало щільну розгалужену сітку по всій чашці Петрі, у результаті чого відбувалося швидке виснаження живильного середовища (рис. 6.7).

Таблиця 6.7

**Вплив ГК на ефективність ризогенезу пере садкової калусної культури  
пшениці озимої сорту Альянс, %**

| Варіант                                   | Ризогенез після культивування, тижнів |         |         |         |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|
|                                           | Один                                  | Два     | Три     | Чотири  |
| РС (МС + 3мг/л БАП + 5 мг/л НОК) Контроль | 93,3 ± 5,7                            | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| РС + ГК 0,1 мг/л                          | 96,6 ± 5,7                            | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| РС + ГК 0,5 мг/л                          | 100 ± 0                               | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| РС + ГК 1,0 мг/л                          | 100 ± 0                               | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| РС + ГК 10 мг/л                           | 100 ± 0                               | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |



Рис. 6.7 Інтенсивний ризогенез при культивуванні калусів на живильному середовищі РС + ГК 1,0 мг/л

Інтенсивний ризогенез негативно впливає на протікання морфогенетичних реакцій, оскільки він вважається «тупиком» морфогенезу. Отже, необхідно створювати та впроваджувати ефективний режим та умови культивування калусної культури пшениці, які будуть сприяти розвитку наземних органів.

Таким чином, в ході проведених експериментів було показано, що додавання в живильне середовище для культивування пшениці м'якої сорту Альянс

в культурі *in vitro* гіберелінів у концентрації 0,1 і 0,5 мг/л найкраще стимулювало процеси морфогенезу *in vitro*. Висока концентрація гіберелінів може негативно впливати на морфогенні потенції калусної культури.

Результати показали, що ГК у випробуваних концентраціях у живильному середовищі не впливав на процеси ризогенезу, оскільки вони відбувалися інтенсивно за всіх варіантів досліду.

Зважаючи на те, що концентрація інших гормонів у середовищі була постійною, а ГК – наростала, і при цьому в межах його концентрації 0,5 і 1,0 мг/л відбувалася стимуляція гемо- та хлорофілогенезу, а при зростанні концентрації ГК до 10,0 мг/г відбувалося інгібування цих процесів, можна вважати, що ефекти ГК залежать від співвідношення гормонів у живильному середовищі. Отже, ГК може бути застосований у культурі *in vitro* поряд з іншими фітогормонами для регуляції морфогенетичних процесів.

## Висновки до розділу 6

1. Встановлено, що низькотемпературний вплив на калусну культуру – яровизація – стимулює прояв морфогенетичних процесів, особливо по її завершенні – на 45-ту добу. Це може свідчити, що у культурі *in vitro*, як і в *in vivo*, відбуваються яровизаційні процеси, зумовлюючи експресію генів *Vrn*, ефекти яких проявляються у стимуляції морфогенезу.
2. Додавання в поживне середовище МС гіберелінів у концентрації 0,5 мг/л значно стимулює морфогенетичні реакції калусів та ефективність процесу отримання рослин-регенерантів за умов культури *in vitro*. Отже, доповнення комплексу фітогормонів у МС гіберелінами є вагомим чинником регуляції морфогенетичних процесів.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [7, 85].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Спираючись на літературні та власні дані, можна зробити наступне узагальнення щодо закономірностей генетичного контролю, гормональної та трофічної регуляції яровизаційних процесів пшениці озимої м'якої та ефектів генів потреби у яровизації у культурі *in vitro*.

Нами показано, що алельний стан генів *Vrn* у ізогенних ліній *Vrn-1*, *Vrn-2* і *Vrn-3* відрізняється і це зумовлює різні темпи їх розвитку у вегетаційних та польових дослідках, що співпадає з літературними даними (Стельмах, 2000, Cosgum et al., 2007). Нами вперше показано, що яровизація проростків за різного трофічного забезпечення зумовлює зміну у алельному стані гена *Vrn-B1*, головного репресора переходу до цвітіння пшениці озимої (Distelfeld et al., 2009). З'ясовано, що різний рівень трофічного забезпечення за яровизації зумовлював зміни у обміні вуглеводів та темпах розвитку рослин, вирощених з яровизованих за цих умов проростків. Отже, генетична регуляція яровизаційних процесів залежить від їх трофічного забезпечення.

Відомо, що одним із шляхів регуляції яровизаційних процесів є гібереліновий (Davis, 2009; Pearce et al., 2013). Нами вперше показано, що праймування ГК за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення зумовлює зміни у обміні вуглеводів, ростових процесах і темпах розвитку рослин. Це є свідченням зв'язку гіберелінового шляху яровизації з трофічними процесами.

Умовою коректних досліджень генетичного контролю морфогенезу у культурі *in vitro* є стабільність геному (Бавол и др., 2008). Нами показаний практично ідентичний алельний стан генів *Vrn* культурі *in vitro* та у *in vivo*. Встановлено також, що інтенсивність морфогенезу у культурі *in vitro* залежала від генотипу ліній за генами *Vrn*. З'ясовано, що протягом періоду яровизації калусної культури *in vitro* посилювалися морфогенетичні процеси у сортів пшениці озимої. Отже, система генів *Vrn* зберігає стабільність у культурі *in vitro*, а морфогенез підлягає контролю цими генами.

Фітогормональний комплекс у живильному середовищі визначає перебіг морфогенезу у культурі *in vitro*. Він складається з гормонів цитокінінової та ауксинової природи, але, як правило, не містить гіберелінів. Відомо, що ці фітогормони проявляють істотні регуляторні ефекти, зокрема визначають специфічний тип росту злаків, однак вони практично не досліджені у культурі *in vitro* пшениці. Нами вперше показано, що ГК у складі живильного середовища здатен стимулювати морфогенез у культурі калусів пшениці озимої м'якої, доповнюючи ефекти інших фітогормонів.

Таким чином, фітогормональні і трофічні фактори у взаємозв'язку між собою та генетичними факторами відіграють істотну роль у регуляції яровизаційних процесів, а відтак і темпів розвитку пшениці озимої м'якої.

## ВИСНОВКИ

Вперше проведено комплексне дослідження взаємозв'язку генетичних, трофічних та фітогормональних факторів регуляції яровизаційного процесу за умов *in vivo* та *in vitro*. Показано, що трофічні умови яровизації та праймування гібереліном визначають інтенсивність мітотичної активності, хід ростової реакції проростків, динаміку накопичення розчинних цукрів та темпи розвитку рослин озимої пшениці.

1. З'ясовано, що ізогенні за генами *Vrn* лінії пшениці м'якої відрізняються за алельним станом цих генів, що обумовлює різні темпи їх розвитку.

2. Показано, що оптимальні умови трофічного забезпечення яровизації (нативні та штучні) по його завершенні призводять до змін у алельному стані локусу гену *Vrn-B1* - головного репресора цвітіння м'якої пшениці *Triticum aestivum* L.

3. Встановлено, що 3 %-ний розчин сахарози стимулює мітотичну активність корневих меристем у проростків, яровизованих без ендосперму, порівняно до активності у проростках, яровизованих з ендоспермом та з ендоспермом на 3 %-ній сахарозі. Це свідчить про залежність проліферації клітин від рівня трофічного забезпечення.

4. Виявлено, що контрастні умови трофічного забезпечення яровизаційного процесу обумовлюють динаміку змін лінійного росту, накопичення біомаси та вмісту розчинних вуглеводів в яровизованих проростках досліджуваних сортів.

5. Показано, що праймування ГК<sub>3</sub> в період яровизації стимулює ростові процеси та біосинтез розчинних вуглеводів за рахунок фракції олігоцукрів у проростків досліджуваних сортів. Інтенсивність цих процесів залежить від рівня трофічного забезпечення яровизації.

6. Встановлено, що пролонгована дія оптимальних умов трофічного фактору та праймування фітогормоном ГК<sub>3</sub> на темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці проявляється у прискоренні переходу до колосіння, що є фенотиповим доказом позитивного впливу досліджуваних факторів на експресію генів *Vrn*.

7. З'ясовано, що в пересадковій калусній культурі *in vitro* 2-3 пасажу ізогенних за генами *Vrn* ліній зберігається алельний стан локусів генів потреби у яровизації, подібно тому, який характерний для *in vivo*. Це свідчить про стабільність системи генів *Vrn* озимої пшениці за умов культивування *in vitro*.

8. Показано, що низькотемпературний вплив на калусну культуру та додавання в живильне середовище МС гіберелінів у концентрації 0,5 мг/л значно стимулює морфогенетичні реакції калусів та ефективність процесу отримання рослин-регенерантів за умов культури *in vitro*.

9. Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційних процесів є необхідною умовою забезпечення нормального перебігу яровизації та експресії генів *Vrn*, що визначає темпи розвитку пшениці озимої м'якої.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авксентьева О. А., Жмурко В. В. Физиология цветения: учебное пособие. Харьков, 2010. 132 с.
2. Авксентьева О. А., Шулик В. В., Жмурко В. В. Аллельные варианты генов *VRN* и темпы развития изогенных линий мягкой пшеницы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 17–21.
3. Авксентьева О. А., Петренко В. А. Роль генотипа, состава среды и типа экспланта в формировании первичного каллуса изогенных линий пшеницы. *Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия «Биология»*. 2009. Вып. 9, № 856. С. 56–62.
4. Авксентьева О. О., Шулік В. В. Алельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*. *Biosystems Diversity*. 2016. Vol. 24, No 1. С. 222–229.
5. Авксентьева О. О., Шулік В. В. Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем, ріст та розвиток озимої пшениці. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 2 (5). С. 4–9.
6. Авксентьева О. А., Зубрич А. И., Васильченко М. С., Шулик В. В. Эффекты генов контроля темпов развития растений в формировании индивидуальной продуктивности пшеницы и сои. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. № 23. С. 261–267.
7. Авксентьева О. О., Шулік В. В. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*. Харьков, 2017. 92 с.
8. Алёхина Н. Д., Балнокин Ю. В., Гавриленко В. Ф. и др. Физиология растений: уч. для студ. вузов. Москва, 2005. 640 с.
9. Ашапкин В. В., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. Эпигенетическая изменчивость у растений: наследуемость, адаптивность, эволюционное значение. *Физиология растений*. 2016. Т. 63, № 2. С. 191–204.

10. Бабенко В. И. Метаболические аспекты ранних фаз онтогенеза культурных злаковых растений: автореф. дис. на соискание учёной степени доктора биол. наук.: спец. 03.00.12 «Физиология растений». Киев, 1974. 62 с.
11. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. *Комаровские чтения*. 2007. Вып. 45. С. 184–212.
12. Бавол А. В., Дубровная О. В., Лялько И. И. Регенерация растений из различных типов эксплантов мягкой пшеницы. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2008. Т. 40, № 2. С. 150–156.
13. Барашкова Э. А. Динамика компонентного состава легкорастворимых белков и изозимов некоторых ферментов озимой пшеницы после промораживания. Москва, 1979. 153 с.
14. Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятов А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Москва, 2004. 312 с.
15. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва, 1999. 160 с.
16. Войнов Н. А., Волова Т. Г., Зобова Н. В. и др. Современные проблемы и методы биотехнологии: электрон. учеб. пособие / под науч. ред. Т. Г. Воловой. Красноярск, 2009. 418 с.
17. Ву Л. М., Вэй Ю. М., Чжен Ю. Л. Влияние нитрата серебра на культуру незрелых зародышей пшеницы. *Физиология растений*. 2006. Т. 53, № 4. С. 592–596.
18. Гонтаренко С. Н., Сердюк Е. М. Экспрессия репродуктивного развития микрорастений сахарной свеклы в условиях *in vitro*. *Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків*. 2010. Вип. 11. С. 190–196.
19. Гончаров Н. П. Локализация генов у мягкой пшеницы. Новосибирск, 1992. 150 с.
20. Гончарук О. М., Бавол А. В., Дубровна О. В. Морфогенез в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46, № 3. С. 245–251.

21. Горбатюк І. Р. Оптимізація *Agrobacterium*-опосередкованої біотехнології трансформації *Triticum aestivum* в культурі *in vitro* та методом *in planta*: дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук.: спец. 03.00.20 «Біотехнологія». Київ, 2016. 193 с.
22. Дерябин А. Н., Трунова Т. И. Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля, экспрессирующих ген *SUC2* инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*, при выращивании *in vitro*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2014. № 4 (28). С. 150–168.
23. Долгушин Д. А., Никифоров О. А. Итоги и перспективы исследований по стадийному развитию сельскохозяйственных растений. Вопросы генетики, селекции и семеноводства: сб. науч. тр. Одесса, 1974. Вып. 11. С. 14–25.
24. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ, 2014. 375 с.
25. Емцева М. В., Ефремова Т. Т., Арбузова В. С. Время колошения замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы с доминантными аллелями *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16, № 1. С. 69–76.
26. Есимбекова М. А., Моргунов А. И., Зыкин В. А., Зеленский Ю., Середа Г. А., Бекенова Л. В., Цыганков В. И., Шпигун С. С., Байтасов А. А., Булатова К. М. Генетические ресурсы яровой мягкой пшеницы для селекции на адаптивность и продуктивность – Казахстанско-Сибирская сеть по улучшению яровой пшеницы (КАСИБ). *Известия НАН РК. Серия Биологическая*. 2010. С. 34–37.
27. Жмурко В. В., Авксентьева О. А., Зубрич А. И., Юхно Ю. Ю., Петренко В. А., Попова Ю. В., Самойлов А. М., Хань Б. Эффекты генов фотопериодической чувствительности (*Prd* и *EE*) и потребности в яровизации (*Vrn*) на физиолого-биохимические процессы у растений. *Fiziologia și Biochimia Plantelor: Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2011. № 3 (315). С. 72–79.
28. Жмурко В. В., Авксентьева О. О., Юхно Ю. Ю., Попова Ю. В., Самойлов А. М., Тимошенко В. Ф., Васильченко М. С., Шулік В. В., Зубрич О. І. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості і потреби в яровизації на фізіолого-біохімічні

- процеси у рослин пшениці м'якої та сої культурної. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. 2017. С. 187–196.
29. Жексембекова М. А Соматический эмбриогенез в культуре тканей амаранта: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Алма-Аты, 1996. 41с.
  30. Журавлев Ю. Н., Омелько А. М. Морфогенез растений *in vitro*. *Физиология растений*. 2008. Т. 55, № 5. С. 643–664.
  31. Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.yuriev.com.ua/images/pdf/Katalog\\_WINTER\\_WHEAT\\_2018.pdf](http://www.yuriev.com.ua/images/pdf/Katalog_WINTER_WHEAT_2018.pdf)
  32. Казаков Е. Д. Карпиленко Г. П. Биохимия зерна и хлебопродуктов. С.-Петербург, 2005. 512 с.
  33. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. 488 с.
  34. Каталог сортов и гибридов [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://poisksorta.com/catalog/item684.html>
  35. Коновалов И. Н., Попова Г. М. Изменение синтетической способности растений в связи с предпосевной яровизацией семян. *ДАН СССР*. 1941. Т. 31, № 5. С. 59–60.
  36. Колупаев Ю. Е., Борисенко Л. Р., Рябчун Н. И. Особенности проявления активности инвертазы в условиях гипотермии в связи с морозостойкостью озимых злаков. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1993. № 25 (4). С. 378–393.
  37. Круглова Н. Н., Сельдиминова О. А., Зайцев Д. Ю., Катасонова А. А. Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре *in vitro* в целях адаптационной селекции в условиях южного Урала. *Известия Челябинского научного центра*. 2006. Вып. 2, № 32. С. 94–98.
  38. Кручинина Ю. В., Ефремова Т. Т., Чуманова Е. В., Попова О. М., Арбузова В. С., Першина Л. А. Влияние аллелей Vrn-B1 на продолжительность фаз развития замещённых и изогенных линий мягкой пшеницы при

- естественном длинном дне. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017. №1. С. 278–286.
39. Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений: учеб. для вузов. Москва, 2005. 736 с.
  40. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. *Биополимеры и клетка*. 1998. Т. 14, № 4. С. 298–319.
  41. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ, 2005. 730 с.
  42. Лихенко И. Е., Стасюк А. И., Щербань А. Б., Зырянова А. Ф., Лихенко Н. И., Салина Е. А. Изучение аллельного состава генов Vrn-1 и Ppd-1 у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18, № 4 (1). С. 691–703.
  43. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. С.-Петербург, 2003. 228 с.
  44. Лысенко Т. Д. Агробиология. Работы по вопросам генетики, селекции и семеноводства. Москва, 1952. <http://imichurin.narod.ru/lysenko>
  45. Медведев С. С. Физиология растений: учебник. С.-Петербург, 2012. 512 с.
  46. Медведев С. С., Шарова Е. И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов. *Journal of Siberian Federal University. Biology* 2. 2010. № 3. С. 109–129.
  47. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник за ред. професора В. Д. Мельничука. Київ, 2003. 520 с.
  48. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. Ленинград, 1987. 430 с.
  49. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Отримання стійких до стресів рослин пшениці біотехнологічними методами. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку*. 2017. С. 393–413.
  50. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин: підручник, 2-е вид., вип. та доп. Київ, 2001. 392 с.

51. Нефедьева Е. Э., Белопухов С. Л., Верхотуров В. В., Лысак В. И. Роль фитогормонов в регуляции прорастания семян. *Известия вузов. прикладная химия и биотехнология*. 2013. № 1 (4). С. 61–66.
52. Никитина Е. Д., Хлебова Л. П. Особенности морфогенеза яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* в зависимости от условий произрастания. *Ульяновский медико-биологический журнал, Экология*. 2015. № 2. С. 123–128.
53. Никифоров О. А. Особенности прохождения вегетирующими растениями начальных этапов развития: автореф. дис. на соиск. уч. ст. д. б. н.: спец. 03.00.12 «Физиология растений». Ленинград, 1974. 45 с.
54. Носов А. М. Культура клеток высших растений - уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*. 1999. Т. 46. С. 837–844.
55. Обручева Н. В. Переход от гормональной к негормональной регуляции на примере выхода семян из покоя и запуска прорастания. *Физиология растений*. 2012. Т. 59, № 4. С. 591–600.
56. Опарин А. И., Зенченко В. А. Направленность действия ферментов и влияние на нее яровизации. *Проблемы биохимии в мичуринской биологии*. Москва, 1949. С. 81–89.
57. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. Москва, 1988. 271 с.
58. Потокина Е. К., Кошкин В. А., Алексеева Е. А., Матвиенко И. И., Филобок В. А., Беспалова Л. А. Комбинация аллелей генов *Rpd* и *Vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16, № 1. С. 77–86.
59. 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.
60. Ригин Б. В. Яровой тип развития мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): фенологический и генетический аспекты. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012. Т. 170. С. 17–34.
61. Россеев В. М., Белан И. А. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой. *Вестник АГАУ*. 2016. № 2. С. 5–9.

62. Сельдимирова О. А., Круглова Н. Н., Зинатуллина А. Е. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *invitro*: обзор проблемы. *Научный результат. Физиология*. 2017. Т. 3, № 1. С. 8–13.
63. Смашевский Н.Д. Флориген как универсальный дистанционный сигнал времени зацветания растений: от концепции до химической идентификации. *Астраханский вестник экологического образования*. 2012. № 1 (19). С. 107–116.
64. Стельмах А. Ф. В.И. Файт, В. Р. Мартынюк. Генетические системы типа и контроля скорости развития мягкой пшеницы. *Цитология и генетика*. 2000. Т. 34, № 2. С. 39–45.
65. Степаненко И. Л., Смирнова О. Г., Титов И. И. Модель генной сети регуляции времени цветения у озимой пшеницы и ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16, № 1. С. 99–106.
66. Тевфик А. Ш. Индукция морфогенеза *in vitro* и регенерация растений в культуре вегетативных почек и зародышей Канна садовой (*Canna × hybrid hort. ex backer*) : автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук : спец. 03.02.01 – «Ботаника». Национальный научный центр «Никитский ботанический сад, г. Ялта, 2016. 24 с.
67. Тимофеева О. А., Румянцева Н. И. Культура клеток и тканей растений: учебное пособие. Казань, 2012. 91 с.
68. Утевская О. М., Атраментова Л. А., Статистические методы в биологии: учебник. Горловка, 2008. 248 с.
69. Фадина О. А. Структурные особенности гена FRIGIDA у видов Brassica: дис. на соиск. уч. ст. к. б. н.: 03.01.06. Москва, 2014. 137 с.
70. Файзиева С. А. Регенерационная активность разных генотипов пшеницы и эгилопса в культуре *invitro* : автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук : спец. 03.00.12 «Физиология растений». Институт физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, г. Душанбе, 2009. 28 с.
71. Файт В. И. Генетическая система контроля различий по продолжительности яровизации у озимой пшеницы. *Цитология и генетика*. 2003. Т. 37, № 5. С. 69–76.

72. Федоров А. К. Растения двуручки. Алма-Ата, 1983. 13 с.
73. Цыбулько В. С., Жмурко В. В. Связь яровости и озимости хлебных злаков с активностью ферментов. Физиологические основы управления ростом и продуктивностью растений в регулируемых условиях. *Сб. науч. тр. АФИ*. Ленинград, 1988. С. 31–38.
74. Цыбулько В. С., Жмурко В. В., Гридин Н. Н. Метаболическая теория озимости растений. Харьков, 2000. 140 с.
75. Цыбулько В. С., Карпухина А. М., Жмурко В. В. Содержание витаминов у пшеницы и ржи в связи с яровостью и озимостью. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1987. Т. 19, № 6. С. 597–601.
76. Щербань А. Б., Салина Е. А. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов яровизации. *Цитология*. 2013. Т. 55, № 4. С. 234–237.
77. Чайлахян М. Х. Регуляция цветения высших растений. Москва, 1988. 559 с.
78. Чумакова В. В., Авксентьева О. О. Вплив праймування гібереліном за яровизації на ріст та вміст розчинних вуглеводів в проростках пшениці м'якої. *Біологічні системи: теорія та інновації*. 2018. № 287. С. 173–183.
79. Abbasabad E. Z., Mohammadi S. A., Moghaddam M. V., Kamali M. R. J. Variation in the first intron of VRN-1 gene in winter and spring Iranian wheat landraces. *Biological Forum – An International Journal*. 2015. № 7 (2). P. 395–400.
80. Achrem M., Skuza L., Kalinka A., Szucko I., Filip E., Słominska-walkowiak R., Rogalska S. M. Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta biologica cracoviensia series botanica*. 2012. № 54 (1). P. 7–15.
81. Adamczuk A., Siegien I., Ciereszko I. Morphogenesis of plants *in vitro* under stress conditions. *Biological diversity - from cell to ecosystem*. 2012. P. 25–40.
82. Aoki N., Scofield G. N., Wang X.-D., Offler C. E., Patrick J. W., Furbank R. T. Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiology*. 2006. № 141. P. 1255–1263.
83. Avksentyeva O. A. and Petrenko V. A. The characteristic of primary callus NILs for PPD genes of winter wheat, *Triticum aestivum* L. *Annual Wheat Newsletter*. 2012. Vol. 58. P. 215–217.

84. Avksentiieva O. O., Shulik V. V., Taran N. Y. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of Vrn genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018. Vol. 64. No. 1. P. 73–81.
85. Avksentiieva O. O., Shulik V. V., Terentiieva N. V. Culture *in vitro* – model system for the study of morphogenetic and adaptative potential of soft wheat *Triticum aestivum* L. *Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences: International research and practice conference*, 27–28 December 2017. Lublin, 2017. P. 263–267.
86. Aydin M., Tosun M., Haliloglu K. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. *African Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10, No. 70. P. 15749–15755.
87. Baena G. E., Rolland F., Thevelein J. M., Sheen J. A central integrator of transcription network in plant stress and energy signaling. *Nature*. 2007. № 448 (7156). P. 938–942.
88. Baier M., Hemman G., Holman R., Corke F., Card R., Smith C., Rook F., Bevan M. W. Characterization of mutants in Arabidopsis showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiology*. 2004. № 134 (1). P. 81–91.
89. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J. W., Laurie D. A. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2007. № 115 (5). P. 721–733.
90. Benderradji L., Brini F., Kellou K., Ykhlef N., Djekoun A., Masmoudi K., Bouzerzour H. Callus Induction, Proliferation, and Plantlets Regeneration of Two BreadWheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions. *International Scholarly Research Network, ISRN Agronomy*. Vol. 2012, Article ID 367851. P. 1–8.
91. Benkirane H., Sabounj S., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2000. № 61. P. 107–113.

92. Benlioğlu B., Birsin M. A. A thidiazuron (TDZ) – based efficient plant regeneration system from callus cultures, obtained through various embryo sources, in common winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2017. № 32 (11). P. 254–223.
93. Binenbaum J., Weinstain R., Shani E. Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends in Plant Science*. 2018, Vol. 23, No. 5. P. 410–421.
94. Bond D. M., Dennis E. S., Finnegan E. J. The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. *Plant, Cell and Environment*. 2011. 34. P. 1737–1748.
95. Buchanan B., Gruissem W., Jones R., Russell L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd Edition.  
URL: <https://books.google.com.ua/books?id=9YAZCgAAQBAJ&hl=ru&lr=>
96. Carver B. F. Wheat: Science and Trade. Willey-Blackwell. 2009. P. 61–67.
97. Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X. and Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *MC Plant Biology*. 2013. № 13. P. 199.
98. Cho Y. H., Yoo S. D., Sheen J. Regulatory functions of nuclear hexokinase 1 complex in glucose signaling. *Cell*. 2006. № 127 (3). P. 579–589.
99. Chu C.-G., Tan C. T., Yu G.-T, Zhong S., Xu S. S. and Yan L. A Novel Retrotransposon Inserted in the Dominant Vrn-B1 Allele Confers Spring Growth Habit in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.). *Genes, Genomes and Genetics*. 2011. № 1. P. 637–645.
100. Chumakova V. V., Avksentieva O. A. Effect of trophic support on the dynamics of growth processes and carbohydrate content of winter wheat sprouts under vernalization. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series “Biology”*. 2018. Vol. 31. P. 138–147.
101. Cocram J., Jones H., Leigh F. J. et al. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity. *J. Exp. Botany*. 2007. Vol. 58, No. 6. P. 1231–1244.

102. Colebrook E. H., Thomas S. G., Phillips A. L., Hedden P. The role of gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress. *The Journal of Experimental Biology*. 2014. № 217. P. 67–75.
103. Conti L. Hormonal control of the floral transition: Can one catch them all? *Developmental Biology*. 2017. P. 1–14.
104. Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searleain, Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science*. 2007. Vol. 316, No. 5827. P. 1030-1033.
105. Corbesiert L., Coupland G. The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* 2007. № 13. P. 3395–3403.
106. Davis S.J. Integrating hormones into the floral-transition pathway of Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*. 2009. № 32, P. 1201–1210.
107. Delporte F., Pretova A., Jardin P., Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*. 2014. № 251. P. 1455–1470.
108. Deng W., Casao M. C., Wang P., Sato K., Hayes P. M., Finnegan E. J., Trevaskis B. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops. *Nature communications*. 2015. № 6 (5882). P. 1–8.
109. Dennis E. S., Peacock W. J. Vernalization in cereals. *Journal of Biology*. 2009. Vol. 8, No. 6. P. 57.
110. Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. № 12. P. 1–7.
111. Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., and Dubcovsky J. Genetic and Molecular Characterization of the VRN2 Loci in Tetraploid Wheat. *Plant Physiology*. 2009. P. 245–257.
112. DNA Extraction from maizecallus, maize leaf tissue, orsoybean leaf tissue for PCR. DNA Extractionfor PCR 1. Plant Transformation Facility, 2003.

113. Dubcovsky J., Li C., Distelfeld A., Pidal B., Tranquilli G. Genes and gene networks regulating wheat development. In Proceedings of the 11th International Wheat Genet Symposium, Brisbane, Australia, 2008. URL: <http://hdl.handle.net/2123/3211>.
114. Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L.B., Cheng K.-J. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. № 73. P. 147–157.
115. Eveland A., Jackson D. Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 63, No. 3. P.1–11.
116. Evex [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://evexdb.org/>
117. Filippov M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 2016. № 84. P. 213–222.
118. Firuzeh R., Khavari-Nejad R. A., Najafi F., Saadatmand S. Effect of Gibberellins on Sugar, Protein and Malondialdehyde Contents in Savory Plant (*Sature jahortensis* L.) under Salt Stress. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 2015. № 5 (7S). P. 23–29.
119. Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., Zitzewitz J., Hayes P. M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics*. 2005. № 273. P. 54–65.
120. Gol L., Tome T., Korff M. Floral transitions in wheat and barley: interactions between photoperiod, abiotic stresses, and nutrient status. *Journal of Experimental Botany*. 2017. № 68 (7). P. 1–12.
121. Gonz'alez J. M., Frierio E., Jouve N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars. *Plant J.* 2001. № 5. P. 285–297.
122. Gopitha K., Bhavani Lakshmi A., Senthilmanickam J. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2010. Vol. 1. P. 1–7.
123. Guedira M., Xiong M., Hao Y. F., Johnson J., Harrison S., Marshall D. et al. Heading Date QTL in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Coincide with Major

- Developmental Genes VERNALIZATION1 and PHOTOPERIOD1. *PLoS ONE*. 2016. No 11 (5). P. 1–21.
124. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. *Biologia plantarum*. 2006. № 50 (3). P. 326–330.
  125. Hassan M., Ahmed Z., Munir M., Malik S. I., Shahzad K. Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8, No. 23. P. 6529–6535.
  126. Henderson I. R., Shindo C., Dean C. The need for winter in the switch to flowering. *Annu. Rev. Genet.* 2003. Vol. 37. P. 371–392.
  127. Hu C. B., Chen Y. F., Liu S. H., Peng J. T. Regulation of flowering time of Chinese cabbage by Paclobutrazol and Gibberellin. *J. Mount. Agric. Biol.* 2016. № 35, P. 73–75.
  128. Jin F. F. and Wei L. The Expression Patterns of Three VRN Genes in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Response to Vernalization. *Cereal Research Communications*. 2016. № 44 (1). P. 1–12.
  129. Joseph C., Seigneuret, Touraud G., Billot J. The free gibberellins of *Cichorium intybus* L. root: identification and changes during vernalization. *Z. Pflanzenphysiol.* № 110. P. 401–407.
  130. Kane N. A., Agharbaoui Z., Diallo A. O. Et al. TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene TaVRN1. *Plant J.* 2007. Vol. 51. P. 670–680.
  131. Karimzadeh G., Francis D. And Davies M. S. Low Temperature-induced Accumulation of Protein is Sustained both in Root Meristems and in Callus in Winter Wheat but not in Spring Wheat. *Annals of Botany*. 2000. No 85. P. 769–777.
  132. Kazan K., Lyons R. The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 2016. Vol. 67, No. 1. P. 47–60.
  133. Kim D.-H., Sung S. Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization. *The Arabidopsis Book*. 2014. P. 1–15.
  134. Kippes N. et al. Identification of the VERNALIZATION 4 gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *PNAS*. 2015. № 112. P. E5401–E5410.

135. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004. Vol. 7, No. 3. P. 235–246.
136. Koch K. E. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. № 47. P. 509–540.
137. Kocsy G., Kellos T., Stein N., Galiba G. Effect of chromosome 5A on gene expression during cold hardening in wheat. *Acta BiologicaSzegediensis*. 2008. № 52 (1). P. 73–74.
138. Kondic Sipka A., Hristov N., Kobiwski B. In vitro screening for low temperature tolerance of wheat genotypes. *Genetika*, 2006. Vol. 38, No. 2. P. 137–144.
139. Kumar S., Sharma V., Chaudhary S., Tyagi A., Mishra P., Priyadarshini A., Singh A. Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. *Journal of Genetics*. 2012. № 1. P. 1–12.
140. Kumar A., Sengar R. S., Sharma M. K., Singh V. K. Effect of Plant Growth Regulators on *in vitro* Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Embryos. *International journal of plant research*. 2005. № 28 (3). P. 54–61.
141. Lang A. Induction of flower formation in biennial *Hyoscyamus* by treatment with gibberellin. *Naturwissenschaften*. 1956. Vol. 43. P. 284–285.
142. Lang A. Physiology of flower initiation. In W Ruhland, ed, *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, 1965. Vol 15. P. 1380–1536.
143. Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *The Plant Journal*. 2011. № 67. P. 763–773.
144. Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *Plant J*. 2008. Vol. 55. P. 543–554.

145. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., and Dubcovsky J. Regulation of VRN-1 Vernalization Genes in Normaland Transgenic Polyploid Wheat. *Plant Physiology*. 2005. Vol. 138. P. 2364–2373.
146. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1998. Vol. 53, №1. P. 67-74.
147. MacMillan C. P., Blundell C. A., King R. W. Flowering of the Grass *Lolium perenne*. Effects of Vernalization and Long Days on Gibberellin Biosynthesis and Signaling. *Plant Physiology*. 2005. Vol. 138. P. 1794–1806.
148. Man J., Shi Y., Yu Z., Zhang Y. Root growth, soil water variation, and grain yield response of winter wheat to supplemental irrigation. *Plant Production Science*. No 19 (2). P. 193–205.
149. Martin T., Hellmann H., Schmidt R. et al. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J*. 1997. P. 53–62.
150. MASwheat [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://maswheat.ucdavis.edu>
151. Michaels S. D. Flowering time regulation produces much fruit. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. Vol. 12, No. 1. P. 75–80.
152. Michniewicz M., Kriesel K., Rozej B. Role of endogenous growth regulators in vernalization of seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). *Acta SOC Bot Pol*. 1981. № 50. P. 653–666.
153. Milec Z., Tomkova L., Sumikova T., Pankova K. A new multiplex PCR test for the determination of Vrn-B1 alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed*. 2012. № 30. P. 317–323.
154. Mino M., Oka M., Tasaka Y., Iwabuchi M. Thermoinduction of genes encoding the enzymes of gibberellin biosynthesis and a putative negative regulator of gibberellin signal transduction in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Cell Rep*. 2003. Vol. 22, No. 2. P. 159–165.
155. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. № 15. P. 473–497.

156. Muterko A. F., Balashova I. A., Fayt V. I., Sivolap Yu. M. Molecular Genetic Mechanisms of Regulation of Growth Habit in Wheat. *Cytology and Genetics*. 2015. Vol. 49, No. 1. P. 58–71.
157. Nasircilar A. G., Turgut K., Fiskin K. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pak. J. Bot.* 2006. № 38 (2). P. 637-645.
158. Niittylä T., Messerli G., Trevisan M., Chen J. Smith A. M., Zeeman S. C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*. 2004. № 303. P. 87–89.
159. NCBI [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
160. O'Haraa L. E., Paulb M. J., Wingler A. How Do Sugars Regulate Plant Growth and development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate. *Molecular Plant*. 2013. Vol. 6, No. 2. P. 261–274.
161. Pearce S., Vanzetti L. S., Dubcovsky J. Exogenous Gibberellins Induce Wheat Spike Development under Short Days Only in the Presence of VERNALIZATION1. *Plant Physiology*. 2013. Vol. 163. P. 1433–1445.
162. Phillips G. C. Invited review: in vitro morphogenesis in plants – recent advances. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2004. № 40. P. 342–345.
163. Pijnacker L., Ferwerda M. Effect of sucrose or polyploidization in early callus cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant, Cell, Tis. aid Organ Cult.* 1990. P. 153–157.
164. Prasil I. T., Prasilova P., Pankova K. The relationship between vernalization requirement and frost tolerance in substitution lines of wheats. *Biologia Plantarum*. 2005. № 49 (2). P. 195-200.
165. Preston J., Kellogg E. Discrete Developmental Roles for Temperate Cereal Grass VERNALIZATION1/FRUITFULL-Like Genes in Flowering Competency and the Transition to Flowering. *Plant Physiology*. 2008. Vol. 146. P. 265–276.
166. Pugsley A. T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica*. 1972. № 21 (3). P. 547–552.
167. Rahman M. M., Shamsuddin A. K. M., Asad U. In vitro regeneration from mature embryos in spring wheat. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2008. № 3 (2). P. 76–80.

168. Rashid H., Ghani R. A., Chaudhry Z. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*. 2002. № 1 (1). P. 49–54.
169. Rashid U. Et al. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 12, No. 3. P. 1–12.
170. Reda F., Larsen P., Rasmussen O. E. Levels of growth regulating substance during vernalization of winter wheat. *Physiology Plant*. 1978. № 42. P. 109–113.
171. Redway F. A., Vasil V., Lu D., Vasil I. K. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical Applied Genetics*. 1990. № 79. P. 609–617.
172. Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy J., Murray J. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and cellular biology*. 2000. Vol. 20, No. 13. P. 4513–4521.
173. Rolland F., Moore B., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*. 2002. № 14. P. 185–205.
174. Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J. A., Hilal M., Prado F. E. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. 2009. № 4 (5). P. 388–393.
175. Sakr S., Wang M., Dedaldechamp F., Perez-Garcia M.-D., Oge L., Hamama L., Atanassova R. The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, № 19 (2506). P. 1–42.
176. Santra D. K., Santra M., Allan R. E., et al. Genetic and molecular characterization of vernalization genes Vrn-A1, Vrn-B1 and Vrn-D1 in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest region of the U.S.A. *Plant Breed.* 2009. № 128. P. 576–584.
177. Satyavathi V. V., Jauhar P. P., Elias E. M., Rao M. B. Effects of Growth Regulators on In Vitro Plant Regeneration in Durum Wheat. *Crop Science*. 2004. Vol. 44. P. 1839–1846.

178. Shah M. M., Khalid Q., Khan U. W., Shah S. A. H., Shah S. H., Hassan A., Pervez A. Variation in genotypic responses and biochemical analysis of callus induction in cultivated wheat. *Genet. Mol. Res.* 2009. № 8 (3). P. 783–793.
179. Shan X., Li D., Qu R. Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2000. № 36 (3). P. 207–210.
180. Shang M., Wang X., Zhang J., Qi X., Ping A., Hou L., Xing G., Li G., Li M. Genetic Regulation of GA Metabolism during Vernalization, Floral Bud Initiation and Development in Pak Choi (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis* Makino). *Front. Plant Sci.* 2017. Vol. 8. No. 1533. P. 1–10.
181. Sharma V. K., Robert H., Ralf R. M., Jutta S. Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 2005. № 56. P. 1913–1922.
182. Shimada S., Ogawa T., Kitagawa S., Suzuki T., Ikari Ch., Shitsukawa N., Abe T., Kawahigashi H., Kikuchi R., Handa H., Murai K. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an APETALA1/FRUITFULL-like gene, VRN1, is upstream of FT. *The Plant Journal*. 2009. № 58. P. 668–681.
183. Sikandar, Waqar A., Israr K., Iqbal M. Optimization of in vitro Conditions for Callus Induction, Proliferation and Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Biotechnology*. 2007. № 6. P. 420–425.
184. Silva Vieira M. R., Simoes A. N., Rocha A. T., Silva L. Z., Sousa P. A. Relationship between gibberellins and carbohydrates in vegetable products. *African Journal of Plant Science*. 2013. Vol. 7, No. 10. P. 445–447.
185. Singh K, Weaver R. J., Johnson J. O. Effect of applications of gibberellic acid on berry size, shatter, and texture of Thompson Seedless grapes. *Amer. J. Enol. Vitic.* 1978. Vol. 29, No. 4. P. 258–262.
186. Singh R. J. Plant cytogenetics. *CRC PRESS*. 2002. 463 p.
187. Smeeckens S.. Sugar-induced signal transduction. *Ann. Rev. of Plant Physiology and Molecular Biology*. 2000. № 51. P. 49–81.
188. Song J., Angel A., Howard M., Dean C. Vernalization – a cold-induced epigenetic switch. *Journal of Cell Science*. 2012. Vol. 125, No. 16. P. 3723–3731.

189. Stelmakh A. Genetic systems regulating flowering response in wheat. *Euphytica*. 1998. № 100. P. 359–369.
190. Suge H., Takahashi H. The role of gibberellins in the stem elongation and flowering of Chinese cabbage, *Brassica campestris* var. *pekinensis* in their relation to vernalization and photoperiod. *Rep Inst Agric Tohoku Univ*. 1982. № 33. P. 15–34.
191. Sugiura A., Inaba A. Studies on the mechanism of gibberellin induced seedlessness of Delaware grapes. Effect of prebloom gibberellin treatment on pollen germination. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 1966. Vol. 35. P. 233–241.
192. Sung S., Amasino R. M. Vernalization and epigenetics: How plants remember winter. *Current Opinion Plant Biology*. 2004. Vol. 7. P. 4–10.
193. Sung S., Amasino R. M. Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. Vol. 56. P. 491–508.
194. Timperio A. M., Egidi M. G., Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stress: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*. 2008. № 71. P. 391–411.
195. Trevaskis B. Wheat gene for all seasons. *PNAS*. 2015. № 112(39). P. 11991–11992.
196. Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals. *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 479–487.
197. Trevaskis B., Bagnall D. J. et al. MADS-box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *PNAS*. 2003. P. 13099–13104.
198. Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R. P., Laurie D. A. The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*. 2005. № 310 (5750). P. 1031–1034.
199. Tyankova N. D., Zagorska N. A. Genetic control *in vitro* response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2001. Vol. 37, No 5. P. 524–530.
200. Voss-Fels et al. VERNALIZATION1 Modulates Root System Architecture in Wheat and Barley. *MolecularPlant*. 2018. № 11. P. 226–229.
201. Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leafbase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004. Vol. 77, No 2. P. 149–153.

202. Wen F., Zhang Zh., Bai T., Xu Q., Pan Y. Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Science*. 2010. № 178. P. 170–175.
203. West G., Inze D., Beemster G. Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of Arabidopsis to Salt Stress. *Plant Physiology*. 2004. Vol. 135, No. 2. P. 1050–1058.
204. Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T., Aeschbacher R. Trehalose induces the ADP glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2000. № 124 (1). P. 105–114.
205. Xu F., Rong X., Huang X., Cheng S. Recent Advances of Flowering Locus T Gene in Higher Plants. *Int. J. Mol. Sci*. 2012. № 13. P. 3773–3781.
206. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*. 2008. № 59. P.225–251.
207. Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky S. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *PNAS*. 2006. Vol. 103. P. 19581–19586.
208. Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet*. 2004. № 109. P. 1677–1686.
209. Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *PNAS*. 2003. № 100. P. 6263–6268.
210. Yasmin S., Khan I. A., Khatri A., Seema N., Nizamani G. S. and Arain M. A. In vitro plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot*. 2009. № 41 (6). P. 2869–2876.
211. Ying-HuaSu, Yu-Bo Liu, Xian-Sheng Zhang. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant*. 2011. Vol. 4. P. 616–625.
212. Yuanyuan M., Yali Z., Jiang L., Hongbo S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*. 2009. № 8 (10). P. 2004–2010.

213. Zale J. M., Borchardt-wier H., Kidwell K. K., Steber C. M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004. № 76 (3). P. 277–281.
214. Zanevich K. P., Rood S. B. Vernalization and Gibberellin Physiology of Winter Canola. *Plant Physiology*. 1995. Vol. 108. P. 615–621.
215. Zhang X., Gao M., Wang S., Chen F., Cui D. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci*. 2015. № 6. P. 470.
216. Zhang X. K., Xiao Y. G., Zhang Y. et al. Allelic Variation at the Vernalization Genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese Wheat Cultivars and Their Association with Growth Habit. *Crop Sci*. 2008. № 48. P. 458.
217. Zhang J., Wang Y., Wu S., et al. A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. *Theor Appl Genet*. 2012. №125. P. 1697–1704.

## ДОДАТКИ

## Додаток А

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

## Публікації у фахових виданнях України:

1. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.**, Жмурко В. В. Аллельные варианты генов VRN и темпы развития изогенных линий мягкой пшеницы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 17–21. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).
2. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем, ріст та розвиток озимої пшениці. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 2 (5). С. 4–9. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
3. Авксентьева О. А., Зубрич А. И., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Эффекты генов контроля темпов развития растений в формировании индивидуальной продуктивности пшеницы и сои. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. № 23. С. 261–267. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
4. **Чумакова В. В.**, Авксентьева О. О. Вплив праймування гібереліном за яровизації на ріст та вміст розчинних вуглеводів в проростках пшениці м'якої. *Біологічні системи: теорія та інновації*. 2018. № 287. С. 173–183. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
5. **Chumakova V. V.**, Avksentieva O. A. Effect of trophic support on the dynamics of growth processes and carbohydrate content of winter wheat sprouts under vernalization. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 2018. Vol. 31. P. 138–147. (Здобувач брала участь

в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Публікація у фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази:**

6. Авксентьєва О. О., Шулік В. В. Алельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*. *Biosystems Diversity*. 2016. Vol 24, No 1. С. 222–229. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень) (Web of Science).

**Наукова праця, в якій опубліковані основні наукові результати дисертації у зарубіжному спеціалізованому виданні:**

7. Avksentiieva O. O., Shulik V. V., Taran N. Yu. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of *Vrn* genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018. Vol. 64. No. 1. P. 73–81. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Наукова праця, яка додатково відображає наукові результати дисертації:**

8. Жмурко В. В., Авксентьєва О. О., Юхно Ю. Ю., Попова Ю. В., Самойлов А. М., Тимошенко В. Ф., Васильченко М. С., Шулік В. В., Зубрич О. І. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості і потреби в яровизації на фізіолого-біохімічні процеси у рослин пшениці м'якої та сої культурної. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. 2017. С. 187–196. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та статистичній обробці результатів досліджень).

**Наукові праці апробаційного характеру за темою дисертації:**

9. Шулік В. В., Авксентьєва О. О. Молекулярно-біологічне дослідження алельного стану генів контролю темпів розвитку *Triticum aestivum* L. // Молодь

і поступ біології : матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, 20–23 квітня 2015 р., Львів, 2015. С. 532. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

10. **Шулик В. В.** Аллельное состояние локусов генов системы Vrn пшеницы мягкой в условиях *in vivo* и *in vitro* // Матеріали III Міжнародного форуму студентів, аспірантів і молодих учених, 23–24 квітня 2015 р., Дніпропетровськ, 2015. С. 468.
11. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.** Изучение аллельных вариантов локусов генов VRN пшеницы мягкой в течение яровизации и в связи с темпами развития // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействиях : материалы VIII съезда общества физиологов растений России, 21–26 сентября 2015 г., Петрозаводск, Россия, 2015. С. 24. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
12. **Shulik V. V.**, Koskova V. A. Trophic factors effect on the proliferative activity of apical meristem of winter wheat two varieties under vernalization // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали IV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 12–14 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. С. 316–317. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
13. **Шулік В. В.**, Кириленко А. С., Коскова В. А. Вплив трофічного фактору на алельний стан гену *VRN-A1* та морфометричні показники проростків озимої пшениці за яровизації // Біологічні дослідження – 2016 : матеріали VII Всеукраїнської науково-практичної конференції для молодих учених і студентів, 10–11 березня 2016 р., Житомир, 2016. С. 142–143. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
14. **Шулік В. В.** Біоінформаційне дослідження системи генів яровизаційного контролю у представників родини *Poaceae* // Біологія: від молекули до

біосфери : матеріали X Міжнародної конференції молодих учених, 2–4 грудня 2015 р., Харків, 2015. С. 31.

15. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Молекулярно-генетичні дослідження системи генів *VRN in vivo та in vitro* // Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці : матеріали міжнародної конференції, присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення, 1–3 червня 2016 р., Одеса, 2016. С. 67–68. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
16. Авксентьева О. А., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Роль генетических систем контроля темпов развития растений в детерминации каллусогенеза изолиний NILs пшеницы и сои // Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма : материалы годичного собрания Общества физиологов растений России, 21–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург, 2016. С. 87–88. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
17. **Шулік В. В.** Вплив трофічного фактору за умов яровизації на вміст редукуючих цукрів у проростках озимої пшениці // Біологія: від молекули до біосфери : матеріали XI Міжнародної конференції молодих учених, 29 листопада–2 грудня, 2016 р., Харків, 2016. С. 107–108.
18. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Популяризація знань з біології рослин в роботі викладачів кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2017. С. 54–56. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
19. **Шулік В. В.**, Самойлов А. М. Молекулярно-біологічні методи дослідження фізіологічних процесів рослин та мікроорганізмів як складова підготовки магістрів на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В.

- Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2016. С. 63–65. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень)*.
20. **Шулік В. В.** Дослідження впливу різних умов трофічного забезпечення на фізіолого-біохімічні процеси та алельний стан гену *Vrn-A1* в проростках озимої пшениці упродовж яровизації // Біологія рослин і біотехнологія : III конференція молодих учених, 16–18 травня 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 31.
21. Avksentieva O. A., **Shulik V. V.**, Taran N. Yu. Research of Influence of Contrasting Trophic Conditions of Vernalization on the Allelic State of VRN Genes and the Development Rates of *Triticum aestivum* L. // SmartBio : International Conference, 18–20 May 2017 : abstr. Kaunas, 2017. P. 23. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень)*.
22. **Шулік В. В.** Дослідження впливу сахарози та гіберелінів на вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках озимої пшениці // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 320–321.
23. Терентьєва Н. В., Степченкова С. В., **Шулік В. В.**, Авксентьєва О. О. Вплив ліофілізованого препарату молозива корів на ростову реакцію та морфо-фізіологічні особливості калусної культури // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 86–88. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень)*.
24. Avksentieva O. O., **Shulik V. V.**, Terentieva N. V. Culture *in vitro* - model system for the study of morphogenetic and adaptative potential of soft wheat *Triticum aestivum* L. // Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences : International research and practice conference,

- 27–28 December 2017, Lublin, 2017. С. 263–267. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, статистичній обробці та обговоренні результатів досліджень).*
25. **Shulik V. V.** Effect of low-temperature exposure on the morphogenesis reactions of the callus culture of winter wheat // Клеточная биология и биотехнология растений : Междунар. науч.-практ. конф., 28–31 мая 2018 г. : тез. докл. Минск, 2018. С. 56–57.
26. **Chumakova V. V.** The role of *Vrn* genes system, phytohormonal and trophic regulation of vernalization process of winter wheat *in vivo* and *in vitro* // Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : IV Міжнародна наукова конференція, 9–10 жовтня 2018 р. : тези доп. Харків, 2018. С. 27–28.
27. **Чумакова В. В.** Вплив фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури озимої м'якої пшениці // Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : V Міжнародна наукова конференція, 12–13 лютого 2020 р. : тези доп. Харків, 2020. С. 89–90.
28. **Chumakova V., Avksentyeva O.** Morphogenetic Responses of Winter Wheat Callus Culture Under Prolonged Period of Low-Temperature Exposure // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020. № 30 (3). Р. 287. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*

**Додаток Б****Тест-система для виділення ДНК «Diatom Prep 100» (Ізоген, Росія)****Процедура виконання аналізу:**

1. Підготувати проби до аналізу (якщо потрібна попередня пробопідготовка).  
Дістати набір реактивів з холодильника, підігріти до кімнатної температури.
2. У пробірку 1,5 мл внести 100 мкл проби, додати 400 мкл Лізуючого розчину, ретельно перемішати.
3. Перенести у термостат на 40 хвилин при температурі 65 °С.
4. Центрифугувати 30 секунд при 5000 об/хв. Супернатант перенести у нову пробірку (приблизно 200 мкл).
5. Перемішати Сорбент на вортексі і додати 20 мкл в кожну пробірку.
6. Пробірки перенести на вортекс та перемішувати 10 хвилин (7-10 об/хв).
7. Центрифугувати 30 секунд при 5000 об/хв.
8. Обережно видалити супернатант. До осаду додати 200 мкл Лізуючого розчину, ретельно перемішати на вортексі до повного гомогенного стану.
9. Додати у пробірку 1 мл Буфера. Перемішати перегортанням 5-10 разів.
10. Центрифугувати 30 секунд при 5000 об/хв. Обережно злити супернатант.
11. Додати у пробірку 1 мл Буфера, перемішати на вортексі, центрифугувати 30 секунд при 5000 об/хв, злити супернатант.
13. Повторити пункт 11.
14. Підсушити осад на термостаті 4-5 хвилин при температурі 65 °С. Кришки пробірок при цьому повинні бути відкритими.
15. Додати 50-100 мкл Розчинника. Перемішати на вортексі до одержання гомогенної суспензії.
16. Перенести у термостат на 4-5 хвилин при температурі 65 °С.
17. Ще раз перемішати вміст пробірки на вортексі. Центрифугувати 1 хвилину при 14000 об/хв.
18. Перенести супернатант з ДНК у чисту пробірку. Зберігати при 4 °С.

## Додаток В

Таблиця В 1

## Умови проведення ПЛР з алель-специфічними праймерами

| Праймери                              | Умови ПЛР                      |                 |                     |                |                   |                             |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|
|                                       | Початкова денатурація, t° (хв) | Число циклів    | Денатурація, t° (с) | Відпал, t° (с) | Елонгація, t° (с) | Фінальна елонгація, t° (хв) |
| VRN AF // VRN-INT1R                   | 94 (10)                        | 38              | 94 (45)             | 55 (45)        | 72 (60)           | 72 (5)                      |
| VRN AF // VRN1R                       | 94 (7)                         | 40              | 95 (30)             | 60 (30)        | 72 (60)           | 72 (10)                     |
| Intr1/C/F // Intr1/AB/R               | 94 (7)                         | 38              | 94 (30)             | 57 (30)        | 72 (45)           | 72 (7)                      |
| Intr1/A/F2 // Intr1/A/R3              | 94 (7)                         | 38              | 94 (30)             | 60 (30)        | 72 (45)           | 72 (7)                      |
| Intr1/B/F // Intr1/B/R3 // Intr1/B/R4 | 94 (10)                        | 44 (Touch-down) | 94 (45)             | 58-63 (45)     | 72 (69)           | 72 (10)                     |
| Intr1/D/F // Intr1/D/R3 // Intr1/D/R4 | 94 (10)                        | 44 (Touch-down) | 94 (45)             | 63-65 (45)     | 72 (90)           | 72 (10)                     |

### Приготування і зберігання реактивів

#### 1. 10×боратний буфер:

Борна кислота ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) - 12 г; Натрій тетраборнокислий 10-водневий ( $\text{Na}_2\text{B}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) - 19 г; дистильована вода ( $\text{H}_2\text{O}$ ) - 1000 мл.

Наважки всіх реактивів розчинити в дистильованій воді, перенести в мірну колбу на 1000 мл і довести обсяг до мітки дистильованою водою, перемішати. Зберігати при 4 °С до закінчення використання. Для електрофорезу використовувати 1×розчин буфера, для цього стоковий розчин розвести в 10 разів дистильованою водою.

#### 2. бромистий етидій 10 мг/мл:

Бромистий етидій - 1 г; дистильована вода ( $\text{H}_2\text{O}$ ) - 100 мл.

Наважку бромистого етидія перенести в хімічний стакан, додати 75 мл дистильованої води, накрити фольгою і перемішати на магнітній мішалці до повного розчинення (кілька годин). Готовий розчин перелити в мірну колбу на 100 мл і довести дистильованою водою до мітки. Зберігати при 4 °С в посуді темного кольору або в темному місці, так як бромистий етидій руйнується на світлі і при нагріванні.

#### 3. Бромфеноловий синій:

Бромфеноловий синій - 0,125 г; сахароза - 20 г; дистильована вода ( $\text{H}_2\text{O}$ ) – 50 мл.

Наважки реактивів розчинити в дистильованій воді, перенести в мірний циліндр і довести до позначки 10 мл дистильованою водою, перемішати. Зберігати при кімнатній температурі або при 4 °С.

#### 4. Агарозний гель:

Таблиця Г 1

## Склад агарозного гелю

| Склад агарозного гелю | 1,5 % гель |     |     |
|-----------------------|------------|-----|-----|
|                       | 1,5        | 3,0 | 4,5 |
| Агароза, г            | 1,5        | 3,0 | 4,5 |
| 1× боратний буфер, мл | 100        | 200 | 300 |
| Бромистий етидй, мкл  | 5          | 15  | 20  |

5. Лізуючий розчин № 1 (зі СТАВ) для виділення ДНК:

5М NaCl - 56 мл; 0,5 М ЕДТА рН = 8,0 - 8 мл; 2М Тріс HCl рН = 8,0 - 10 мл; СТАВ - 4 г. Наважки всіх реактивів розчинити в 200 мл дистильованої води.

6. Лізуючий розчин № 2:

28,66 г Гуанідин HCl розчинити в дистильованій воді при 57 °С, довести до 50 мл. Зберігати протягом 6 місяців при + 4 °С.

7. Промивний буфер (розрахунок на 100 мл):

20М Тріс - 0,96 г; 1М ЕДТА - 0,116 г; 50 мМ NaCl - 1,16; 50 % етанол - 52 мл 96 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН. Наважки всіх реактивів розчинити в 100 мл дистильованої води.

8. Сорбент (50% Silica Sigma-5631) в воді):

Зважити 0,5 г Silica в епіндорф додати 0,5 мл бідистильованої води. Перемішати, і через 5 хвилин центрифугувати, а потім супернатант видалити. Повторити процедуру 4 рази. Останню суспензію залишити на зберігання при + 4 °С.

## Додаток Д

Приготування маткових розчинів, вітамінів, гормонів для середовища Мурасіге і Скуга (МС) з розрахунку на 1 л – макросолі і 100 мл – мікросолі.

Макросолі:

$\text{KNO}_3$  - 19,0 г;

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 16,5 г;

$\text{CaCl}_2$  - 3,3 г;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 3,7 г;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,7 г.

Мікросолі:

$\text{H}_3\text{BO}_3$  - 620 г;

$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 2230 мг;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 860 мг;

KI - 83 мг;

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 25 мг;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 2,5 мг;

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 2,5 мг.

Для приготування розчину Fe-хелату необхідно  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (557 мг) і  $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (745 мг). Наважки розчинити окремо в дистильованій воді, злити і довести до кипіння. Охолодити, зберігати в темній посуді в холодильнику при 2-4 °С.

Для приготування розчинів кожну сіль зважують і розчиняють окремо в новій порції води. Маточні розчини мікроелементів готують в концентраціях, які в 10 разів перевищують необхідні, з розрахунку, щоб в 1 мл розчину містилася маса речовини, необхідна для приготування 1 л середовища. Розчини вітамінів і фітогормонів готують в концентрації 1 мг/мл. Розчиняють в дистильованій воді і зберігають в замороженому стані в морозильній камері.