УДК 633.11.324:577.114.083:
631.524.85

© 2017

М.А. Литвиненко,
академік НААН,
доктор сільськогосподарських наук

П.О. Феоктістов,
кандидат
біологічних наук

Д.В. Блищик,
кандидат
географічних наук

С.В. Гаврилов

Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

УДОСКОНАЛЕННЯ АНТРОНОВОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РОЗЧИННИХ ВУГЛЕВОДІВ У ВУЗЛАХ КУЩІННЯ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ ДЛЯ ОЦІНКИ СТАНУ ПОСІВІВ ПРОТЯГОМ ЗИМІВЛІ

Мета. *Удосконалення методики визначення вмісту вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої антроновим методом з урахуванням біології культури, особливостей добору, зберігання та фіксації.* **Методи.** *Уміст вуглеводів визначали антроновим методом. Оцінку сортів проводили в польових умовах 2013 та 2014 рр. біохімічними та агробіологічними методами.* **Результати.** *Досліджено динаміку накопичення вуглеводів, формування морозостійкості та розвитку рослин пшениці озимої залежно від сприятливості метеорологічних умов проходження загартування. Доведено ефективність запропонованих удосконалень антронового методу визначення вмісту вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої.* **Висновки.** *Використання вдосконаленого способу визначення вмісту вуглеводів із одночасним визначенням критичної температури вимерзання та фази розвитку дають змогу оцінити загальний стан рослин пшениці озимої та спрогнозувати перспективи їх подальшої перезимівлі з урахуванням довгострокових прогнозів погодних умов.*

Ключові слова: *пшениця озима, вуглеводи, вузли кущіння, загартування, морозостійкість, зимівля, погодні умови.*

Зміни агрометеорологічних умов осінньо-зимового періоду півдня України призвели до того, що значна частина сучасних сортів пшениці озимої не може сформувати властивого їм генетично-детермінованого рівня морозостійкості. У взаємодії системи «організм — довкілля» період осінньої вегетації рослин пшениці озимої є одним із найважливіших етапів, відповідальних за реалізацію їхнього біологічного потенціалу. Адже стан озимих посівів після припинення осінньої вегетації відіграє значну роль у їхній перезимівлі, а загартування до несприятливих метеорологічних умов зимового періоду є

одним із основних процесів, який забезпечує виживання рослин і майбутній урожай [1].

В основі загартування рослин лежить передусім метаболізм речовин вуглеводної природи. Накопичення цукрів у рослинах озимих культур під час загартування є необхідним фактором, що значною мірою визначає рівень підготовки рослин до несприятливих умов зимівлі.

З огляду на значущість накопичення цукрів рослинами озимих культур у період загартування ряд учених дійшли висновку щодо можливості використання даних про вміст цукрів як показника рівня їх загартування, а також морозо- і зимостійкості [2, 3]. Водночас деякі автори не відзначають тісного зв'язку між умістом цукрів у рослинах пшениці озимої перед входом у зиму та їх морозостійкістю [4, 5].

За даними О.І.Колоші [6], уміст розчинних редукуючих цукрів у вузлах кущіння озимих культур на кінець осінньої вегетації не завжди є показником морозостійкості. Цукри підвищують морозостійкість, але їх кількість не є вирішальною за невеликих мінусових температур повітря. Однак за температур, коли рослини потрапляють у гранично критичні умови, спостерігається чітка відповідність між морозостійкістю і вмістом суми редукуючих цукрів. Отже, уміст цукрів, який характеризує рівень загартування, слід вивчати в динаміці за умов функціонального навантаження низькими температурами. Є багато методів визначення вмісту цукрів, що ґрунтуються на їхніх фізичних чи хімічних властивостях: рефрактометричний, ареометричний, поляриметричний, хроматографічний, хімічний [7]. Використання певного методу залежить від об'єкта дослідження, умісту в ньому води та цукристих речовин. У клітинах вузлів кущіння озимих культур містяться різні види вуглеводів. Тому для визначення їх умісту найкоректнішим є використання хімічних методів, оскільки вони дають можливість проводити визначення з високою точністю у свіжому і фіксованому рослинних матеріалах. Хімічні методи залежно від використовуваного реактиву є перманганатні, антронові та ін. Так, для визначення вмісту цукрів у кормах застосовується метод згідно з ГОСТ 26176–93 [8], що передбачає його визначення у висушеному в природних умовах (сіно, комбікорм) або законсервованому (сінаж, силос) продукті. У лабораторній практиці досить часто використовують метод Бертрана та його модифікацію за В.Л. Вознесенським [9], який ґрунтується на відновленні сірчанокислої міді до закису міді, а також антроновий метод визначення вмісту цукрів[10]. Однак ці методи неопрацьовані як методики з описом особливостей відбору, зберігання та фіксації зразків, тому є недостатньо прийнятними для роботи з рослинами озимих культур, особливо під час відбору зразків у зимовий період, що має свою специфіку [11].

Визначення вмісту цукрів у вузлах кущіння озимих культур потребує збереження зразків у природному (нативному) стані до аналізу. Рослини мають аналізуватися свіжими, негайно після відбору проб або в разі відсутності такої можливості в зафіксованому й висушеному вигляді для мінімальних втрат розчинних вуглеводів. Обов'язковим є визначення частини вузла кущіння, яка найбільшою мірою характеризує вміст розчинних вуглеводів у тканинах, прилеглих до конуса росту. Слід ураховувати мінімальну глибину залягання вузла кущіння, бо для цього непотрібно проводити прояснення розчину гідролізату через забарвлення хлорофілом.

Мета досліджень — удосконалення методики визначення вмісту вуглеводів у вузлах кущіння озимих культур з урахуванням біології культури, особливостей добору, зберігання та фіксації для підвищення точності й достовірності аналізу.

Методика досліджень. Для оцінки динаміки розвитку та рівня сформованої морозостійкості використовували спосіб добору рослин з поля в пучках [12].

Для дослідження вмісту вуглеводів у вузлах кущіння рослини з польових посівів викопують, якщо ґрунт незамерзлий, або вирубують, якщо ґрунт промерз у 3-х місцях по діагоналі ділянки чи поля до 50 га, і формують пучки по 30–50 рослин. За площі поля понад 50 га її слід розділити на кілька ділянок і з кожної відібрати по 3 проби. Кожну пробу етикетують, на етикетці зазначають назву сорту, установи, номер поля, дату відбору. За температури повітря нижче –10°С проби відбирати не рекомендовано. Транспортують зразки, вміщені в поліетиленові пакети або бавовняно-паперові торбинки, за температури, близької до температури ґрунту на глибині залягання вузлів кущіння. Час доставки в лабораторію за таких умов не має перевищувати 1 добу. Упродовж зими проби відбирають та аналізують щомісяця, а за потреби

(різкі перепади температури, відсутність снігового покриву тощо) — щодекади. Із рослин струшують ґрунт, відмивають у водогінній воді, зрізають ножицями кореневу систему і надземну масу так, щоб залишилися вузли кущіння заввишки 2,0–2,5 см, видаляють відмерлі тканини. Підготовлені вузли кущіння фіксують у термостаті чи сушильній шафі загорнутими в бавовняну тканину або марлю, змочені в дистильованій воді, упродовж 15 хв за температури 105°С і висушують за температури не вище 45°С, щоб запобігти декстринізації розчинних вуглеводів, до повітряносухого стану. Висушений матеріал подрібнюють на млинку типу «Пірует» або в ступці з товкачиком і зберігають до проведення аналізу в скляних банках чи пробірках із корками.

Наважки рослинного матеріалу вагою 20 мг у 2-х повтореннях, зважені з точністю до 0,001 г, насипають у хімічні пробірки і заливають 10 см^3 дистильованої води, нагрітої до температури 60°С. Пробірки поміщають у термостат за температури 60°С на 30 хв, періодично перемішуючи їх уміст скляними паличками. Після закінчення процесу екстракції вміст пробірок фільтрують через скляну лійку з паперовим фільтром у мірні колби місткістю 100 см^3. Скляну паличку обполіскують на фільтр. Осад промивають невеликою кількістю теплої дистильованої води. Після охолодження в колбу наливають дистильовану воду до риски 10 см^3 і ретельно перемішують. Отримують вихідний екстракт розчинних вуглеводів.

Для отримання гідролізатів легкогідролізованих вуглеводів осад із фільтра після видалення розчинних вуглеводів ретельно змивають через отвір за допомогою піпетки розчином сірчаної кислоти з молярною концентрацією 0,25 моль/дм^3 у пробірку, в якій проводили екстракцію. Загальний об'єм розчину в пробірці має становити 10 см^3. Пробірки в штативах ставлять на киплячу водяну баню на 30 хв у ввімкнену витяжну шафу. Уміст пробірок періодично перемішують скляними паличками, потім його фільтрують через скляну лійку з паперовим фільтром у мірну колбу місткістю 100 см^3. Осад на фільтрі промивають дистильованою водою після охолодження фільтрату. Об'єм рідини в колбі доводять до риски 10 см^3 дистильованою водою й ретельно перемішують. Отримують гідролізат легкогідролізованих вуглеводів. Екстракт і гідролізат зберігають у холодильнику не більше доби.

Забарвлення розчинів екстракту і гідролізату проводять у термостійких пробірках, у які в 2-х повтореннях дозатором або піпеткою вливають 0,5 см^3 екстракту та гідролізату, обережно і швидко додають до них по 2,5 см^3 антронового реактиву. Окремо наливають у пробірки 0,5 см^3 стандартного розчину глюкози з додаванням по 2,5 см^3 антронового реактиву в кожну. Для контролю на реактиви роблять нульовий розчин (0,5 см^3 води з додаванням 2,5 см^3 антронового реактиву). Уміст пробірок ретельно перемішують скляними паличками. Потім їх переносять на водяну баню під увімкнену витяжну шафу, розміщуючи штатив з пробірками так, щоб його дно не торкалося дна бані. Під час нагрівання спостерігають, щоб у пробірки не потрапила вода. Фарбування триває 5 хв за температури 100°С. Після забарвлення розчинів пробірки виймають з бані, охолоджують у водогінній воді до кімнатної температури і через 30 хв визначають оптичну густину стандартного розчину та розчинів проб відносно нульового розчину за довжини хвилі 630 нм на спектрофотометрі. Якщо вихідні розчини, приготовлені без розведення, під час вимірювання мають дуже низьку оптичну густину, аналіз повторюють, збільшуючи наважку проби або об'єм розчинів екстракту, гідролізату, які використовують для освітлення. Якщо отримують високу оптичну густину, дослідні розчини перед фарбуванням розводять нульовим розчином.

Результати досліджень. Масову частку розчинних вуглеводів (цукрів) у дослідній пробі (ω_1) розраховують за формулою:

$$\omega_1 = \frac{m_{ст} \cdot D_x \cdot n \cdot 100}{D_{ст} \cdot m_0 \cdot 1000}, \qquad (1)$$

де $m_{ст}$ — маса глюкози в стандартному розчині, 50 мкг; D_x — оптична густина в дослідній пробі; n — розведення дослідної проби; 100 — коефіцієнт перерахування у відсотки; $D_{ст}$ — оптична густина стандартного розчину; m_0 — наважка, 20 мг; 1000 — коефіцієнт перерахування мг глюкози в мкг.

Масову частку легкогідролізованих вуглеводів у дослідній пробі (ω_2) розраховують за формулою:

$$\omega_2 = \frac{m_{ст} \cdot D_x \cdot n \cdot 100 \cdot 0,9}{D_{ст} \cdot m_0 \cdot 1000}, \qquad (2)$$

де $m_{ст}$ — маса глюкози в стандартному розчині, 50 мкг; 100 — коефіцієнт перерахування мг

глюкози у мкг; 0,9 — коефіцієнт перерахунку частки розчинних вуглеводів на частку легкогідролізованих вуглеводів.

Масову частку розчинних (ω_1) і легкогідролізованих (ω_2) вуглеводів у відсотках на суху речовину розраховують за формулами:

$$\omega_1 = \frac{\omega_р \cdot 100}{100 - \omega_{д.п}}, \quad (3)$$

де $\omega_р$ — масова частка розчинних вуглеводів у дослідній пробі, %; $\omega_{д.п}$ — масова частка вологи у дослідній пробі, %:

$$\omega_2 = \frac{\omega_л \cdot 100}{100 - \omega_{д.п}}, \quad (4)$$

де $\omega_л$ — масова частка легкогідролізованих вуглеводів у дослідній пробі, %; $\omega_{д.п}$ — масова частка вологи у дослідній пробі, %.

За кінцевий результат випробування приймають середнє арифметичне результатів 2-х паралельних визначень. Результати розраховують до другого десяткового знаку і округлюють до першого десяткового знаку.

Дослідження закономірностей накопичення та витрачання вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої у зв'язку з їхньою зимостійкістю та вдосконалення методики визначення вмісту розчинних вуглеводів у тканинах рослин дали змогу встановити, що накопичення розчинних вуглеводів у рослинах озимих культур у зимовий період носить градієнтний характер. Тому для об'єктивного та достовірного визначення вмісту розчинних вуглеводів у вузлах кущіння пшениці м'якої озимої слід відбирати на аналіз фрагменти вузлів кущіння довжиною 2,5 см від основи вузла [11]. Крім того, ця частина вузла кущіння практично завжди є етиольованою, що не потребує проведення додаткових біохімічних заходів, пов'язаних із проясненням розчину гідролізату через забарвлення хлорофілом. Також установлено, що зберігання відібраних рослин, їх транспортування, підготовка до аналізу з моменту інактивації ферментних систем мають проходити за знижених температур і займати якнайменше часу — не більше 1–2 год.

Результати досліджень динаміки накопичення цукрів, формування морозостійкості та розвитку рослин пшениці озимої залежно від сприятливості метеорологічних умов загартування наведено в таблиці.

Аналіз залежності формування морозостійкості від кількості накопичених цукрів свідчить про наявність певної тенденції прямого зв'язку між ними. Скажімо, у 2013 р. спостерігалося поступове зниження кількості цукрів у вузлах кущіння на фоні зростання морозостійкості рослин пшениці озимої. Це пов'язано з витратою енергетичного пулу на інтенсивні ростові процеси, які відбувалися на фоні високих середньодобових температур повітря, що спостерігалися до II декади листопада і становили понад 10°С, а в максимумі досягали 18,9°С. У подальшому температура знизилася

Динаміка формування морозостійкості, розвитку і вмісту розчинних вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої в сприятливому (2013) та несприятливому (2014) роках за температурно-світловими умовами загартування

Сорт	Дата відбору				
	31.X	10.XI	20.XI	30.XI	10.XII
Сівба 09.10.2013 р.					
Фаза розвитку	2–3 листки	Початок кущіння	1–2 пагони	2 пагони	2–3 пагони
Цукри, % на масу сухої речовини	20,0±0,6	17,4±0,5	14,6±0,5	29,2±0,6	54,2±1,2
Критична температура на глибині вузла кущіння, °С	–8	–10	–11	–13	–17
Сівба 10.10.2014 р.					
Фаза розвитку	2–3 листки	Початок кущіння	2 пагони	2–3 пагони	3–4 пагони
Цукри, % на масу сухої речовини	19,0±0,6	20,8±0,5	25,1±0,5	23,3±0,6	31,4±0,9
Критична температура на глибині вузла кущіння, °С	–6	–8	–9	–11	–13

і впродовж майже 45-ти діб була сприятливою для проходження першої фази загартування, а в грудні спостерігався поступовий її перехід через 0°С, що сприяло ефективному проходженню другої фази загартування. Це дало змогу до настання істотних морозів, які наприкінці січня досягли –22°С, сформувати високий рівень морозо- та зимостійкості, що позитивно позначилося на вдалій перезимівлі та майбутній урожайності.

У 2014 р. тривалість температурно-світлових умов, сприятливих для проходження першої фази загартування, становила лише 14 діб. Аналогічно з 2013 р. достовірної кореляції між рівнем цукрів і морозостійкістю рослин пшениці озимої до стійкого переходу температури повітря через 0°С не спостерігалося. Через недостатню тривалість першої фази загартування на час настання істотних морозів, які в грудні досягли –16°С, критична температура вимерзання на глибині вузла кущіння становила лише –12°С.

Висновки

Дослідження динаміки вмісту розчинних вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої з одночасним визначенням рівня критичної температури вимерзання в польових умовах конкретного року дають змогу не лише скоригувати й оцінити загальний стан озимих посівів, а й спрогнозувати перспективи їх подальшої перезимівлі з урахуванням довгострокових прогнозів погодних умов. Рекомендовані вдосконалення до методики визначення вмісту вуглеводів у вузлах кущіння рослин пшениці озимої антроновим методом дають можливість підвищити економічну ефективність та інформативність досліджень з урахуванням біології культури, особливостей добору, зберігання та фіксації зразків.

Бібліографія

1. *Полевой А.Н.* Моделирование формирования зимостойкости растениями озимой пшеницы/ А.Н. Полевой, Д.В. Блыщик, П.А. Феоктистов//Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. — М., 2015. — Т. XXVI, № 1. — С. 28–48.

2.*Кружилин А.С*. Накопление сахаров у озимых «двуручек» и яровых пшениц при пониженных температурах/А.С. Кружилин// Физиол. раст. — 1963. — Т. 10. — Вып. 3. — С. 374–379.

3. *Полтарев Е.М.* Анализ взаимосвязи между содержанием растворимых углеводов и критическими температурами у злаковых культур в период зимовки/Е.М. Полтарев, В.Д. Золочевская// Селекция и семеноводство: межвед. темат. научн. сб. — К.: Урожай, 1978. — Вып. 24. — С. 61–68.

4. *Мусич В.Н.* Количественное содержание и качественный состав сахаров у растений озимой пшеницы при закаливании/В.Н. Мусич//Рост и устойчивость растений. — К.: Наук. думка, 1967. — Вып. 3. — С. 210–214.

5. *Орлов В.М.* О зимостойкости озимой пшеницы/В.М. Орлов//Донской зональный НИИСХ, 1978. — Вып. 10. — С. 63–68.

6. *Колоша О.И.* Физиологические основы морозостойкости озимых зерновых культур/О.И. Колоша//Научные труды ВАСХНИЛ: методы и приемы повышения зимостойкости зерновых культур. — М.: Колос, 1975. — С. 294–306.

7. *Методы* биохимического исследования растений/А.И. Ермаков, В.В.Арасимович, Н.П. Ярош и др. — 3-е изд., перераб. и доп. — Ленинград: Агропромиздат, 1987. — 430 с.

8. *Корма,* комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов: ГОСТ 26176–93. — М.: Госстандарт, 1993. — 17 с.

9. *Определение* сахаров по обесцвечиванию жидкости Феллинга/В.Л. Вознесенский, Г.И. Горбачева, Т.П. Штанько, Л.А. Филиппова//Физиология растений. — 1962. — Т. 9, № 2. — С. 255–256.

10. *Практикум* по общей биохимии: учеб. пособие для студентов хим. специальностей пед. ин-тов; под ред. Ю.Б. Филипповича. — М.: Просвещение, 1975. — 318 с.

11. *Метод* визначення вмісту розчинних вуглеводів у вузлах кущіння озимої пшениці: метод. реком./Н.І. Рябчун, В.І. Долгополова, В.М. Іванова, О.М. Четверик. — УААН, Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН. — Х., 2006. — 12 с.

12. *Методологічні* принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах Півдня України: методичні рекомендації/П.О. Феоктістов, С.В. Гаврилов, А.К. Ляшок та ін. — К.: Видавничий центр НАУ, 2006. — 36 с.

Надійшла 13.02.2017.