НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ – НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

ВИКОРИСТАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ ОЦІНКИ РІВНЯ ПОСУХО-ЖАРОСТІЙКОСТІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Методичні рекомендації

ОДЕСА
СГІ - НЦНС
2023

УДК 577.1

Друкується за рішенням вченої ради Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (протокол № 8 від 10.11.2020 р.)

Автори:

Молодченкова О.О., д.б.н., с.н.с., **Бєлоусов А.О.**, д.б.н., с.н.с.;
Соколов В.М., член-кор. НААН, **Рищакова О.В.**, к.б.н., **Унтілова І.А.**

Рецензенти:

Вареник Б.Ф., к.с.-г.н., доцент, заступник директора СГІ-НЦНС
Тихонов П.С., к.б.н., с.н.с., доцент Одеського державного аграрного університету

Описано основні біохімічні критерії, пов’язані з формуванням посухостійкості кукурудзи.

Рекомендації містять інформацію щодо проведення біохімічних досліджень в рослинному матеріалі на ранніх етапах онтогенезу, які можна використовувати для масової оцінки селекційного матеріалу з метою добору посухостійких ліній та гібридів кукурудзи..

Методичні рекомендації можуть бути використані в фізіолого-біохімічних, селекційних дослідженнях, селекції та насінництві кукурудзи.

© Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення (СГІ – НЦНС), 2023

ЗМІСТ

		Стор.
Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів		4
1.	Теоретичне обґрунтування досліджень	5
2.	Вирощування дослідного матеріалу	8
3.	Визначення ступеня посухостійкості ліній та гібридів кукурудзи за проростанням насіння на розчинах сахарози	9
4.	Визначення активності лектинів клітинних стінок проростків	10
5.	Визначення білка за методом Лоурі	12
6.	Хроматографічний метод визначення вмісту абсцизової кислоти	13
7.	Визначення активності сахарозофосфатсинтази	15
8. 9.	Визначення вмісту ТБК–активних продуктів	16
10.	Визначення вмісту відновленого глутатіону	17
.	Опрацювання результатів	18
	Література.	22

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів

АБК – абсцизова кислота

АЗП – аглютинін зародку пшениці

АЛ – активність лектинів

АФК – активні форми кисню

ГТ – гідрокситолуол

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

М – моль

МДА – малоновий діальдегід

СФС – сахарозофосфатсинтаза

НОР – надосадова рідина

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ПСА – персульфат амонію

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТХО – трихлороцтова кислота

Трис – трисгідроксіметиламінометан

УДФГ – уридиндифосфоглюкоза

ЦТАБ – цетилтриметиламонійбромід

ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

1.ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Посуха та підвищені температури є одними з основних факторів навколишнього середовища, які лімітують продуктивність зернових культур у багатьох ґрунтово-кліматичних зонах, особливо в південних посушливих районах України. Відгук рослин на посуху та підвищену температуру дуже складний та включає взаємодію між різноманітними молекулярними та фізіолого-біохімічними процесами. Важливу роль в адаптаційних процесах рослин до посухи та підвищених температур відіграють біохімічні системи захисту. За різних стресових дій в рослинах відбуваються значні зміни гормонального балансу клітин, які змінюють, в свою чергу, структури та функції клітин рослинних організмів, притаманні звичайним умовам вирощування, на стресові програми. Значну роль у регуляції генної експресії в клітинах рослин за дії стресу відводять абсцизовій кислоті (АБК), рівень якої в цих умовах зростає, що, з одного боку, призводить до зниження активності метаболічних процесів у клітинах, зокрема тотального синтезу білка та, з іншого боку, індукції новоутворення більше десяти стресових білків [1]. Поряд із синтезом стресових білків у несприятливих умовах, а також за обробки екзогенною АБК, відбувається посилення синтезу ряду наявних у нормальних умовах білків, зокрема лектину [2]. Про це свідчать дані щодо суттєвого накопичення лектину в коріннях проростків пшениці за впливу осмотичного шоку та посухи у відповідь на засолення середовища, в культурі клітин при тепловому шоці, а також у зернівках, що розвиваються при дефіциті вологи [3]. Вміст лектину *Dolichos biflorus* (сім. Бобових) зі специфічністю до N-ацетилгалактозаміну зростало при тепловому стресі. Інкубація сім'ядолей квасолі, що розвиваються за підвищеної температури, призводила до зростання синтезу фітогемаглютиніну, проте інгібувала його транспорт в білкові тіла [4]. Здатність до індукції за абіотичних стресів притаманна манозоспецифічному лектину рису. При цьому із чотирьох ізолектинів два мали N-кінцеву послідовність, характерну для білків, що індукуються посухою. У багатьох

випадках дія абіотичного стресу призводила до транзитних піків вмісту (активності) лектинів у рослині в досліджених органах [3]. Однією з добре відомих реакцій лектинів на стрес є підвищення їхнього вмісту у відповідь на низькі температури та холодове загартування. Вплив низької позитивної температури (+2°C) індукував у меристемі вузла кущення морозостійкого сорту пшениці транзитний максимум активності (5 г) фітогемаглютиніну клітинних органел. Більш тривалі транзитні максимуми та мінімуми вмісту лектинів спостерігали за тривалої дії, що супроводжувалась холодовою адаптацією та підвищенням морозостійкості [5]. Одним із механізмів захисної дії лектинів при стресах різної природи є можливий вплив цих білків на цикл дестабілізації та стабілізації цитоскелета, що відіграє ключову роль у регуляції реакції рослини на біотичні та абіотичні стимули. Виявлено, що багато білків, які пов'язані з елементами цитоскелета, модифіковані залишками N-ацетилглюкозаміну. Лектини, специфічні до хітоолігосахаридів, зокрема і АЗП, здатні взаємодіяти з залишками N-ацетилглюкозаміну гликон'югатів та можуть бути використані для виявлення модифікованих білків. Вважається, що така модифікація є зворотньою та дуже мобільною, виконує регуляторні функції подібно фосфорилюванню. Вона виявлена у багатьох цитоплазматичних та ядерних білків. Зростання вмісту лектинів призводить також до інгібування окиснювального стресу та зниженню активних форм кисню, що, поряд зі стабілізацією нової конфігурації цитоскелета, повертає клітину у «незбуджений» стан [3]. Наведені дані дозволяють розглядати лектин як учасника неспецифічних реакцій рослин.

Відомо, що стресові чинники (посуха, гіпо-, гіпертермія та ін.) можуть спричиняти як зниження, так і підвищення вмісту в клітині розчинних цукрів [6]. Це пов'язане з фазою розвитку, різною стійкістю до стресу, ступенем ураження рослин несприятливим фактором. Одним із найважливіших осмопротекторів в умовах стресу є сахароза. Це основна транспортна форма цукрів у більшості рослин [7]. Ключовим ферментом біосинтезу сахарози є сахарозофосфатсинтаза (СФС – К.Ф.2.4.1.13), що каталізує утворення із

уридиндифосфатглюкози та фруктозо-6-фосфата сахарозофосфата, який потім за допомогою сахарозофосфатази перетворюється на сахарозу. Ключова роль СФС у накопиченні сахарози підтверджена методами генетичної інженерії. На регуляцію активності СФС в умовах стресу можуть впливати як рівень накопичення метаболітів, так і генотипові особливості, стійкість рослини до несприятливого чинника [8].

Важливою системою, яка складає основу клітинно-молекулярних механізмів адаптації рослин до несприятливих чинників середовища та визначає спрямованість загальної адаптивної реакції, є система окиснювального гомеостазу. Функціонування живих систем в умовах фізіологічного оптимуму забезпечується про-антиоксидантною рівновагою, яка є важливим механізмом окиснювального гомеостазу. Загальною реакцією живих організмів, в тому числі рослин, на дію несприятливих чинників довкілля є утворення і накопичення активних форм кисню (АФК). АФК, з одного боку, є високотоксичними інтермедіантами, а з іншого – регуляторами метаболічних процесів та захисних реакцій в рослинній клітині. Так як клітина є мембранною структурою, найбільш виявленою дією активних форм кисню є пошкодження клітинних мембран за рахунок перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Продукти ПОЛ можуть бути одночасно “індикаторами” та первинними “медіаторами” стресу як особливого стану клітини, який може призвести до підвищення стійкості. Процеси ПОЛ знаходяться у динамічній рівновазі з функціонуванням добре розвиненої в рослинних клітинах системи антиоксидантного захисту, яка представлена антиоксидантними ензимами (супероксиддисмутаза, каталаза, ензими глутатіонового циклу) та неферментними сполуками, до яких відносяться глутатіон, каротиноїди, токофероли та ін. Виявлена участь різних компонентів антиоксидантного захисту у біохімічних процесах захисту рослинної клітини за стресових чинників різної природи, зокрема гіпертермії, дефіциті вологи, впливу низьких температур [9].

Оцінка стійкості зернових культур до посухи та теплового стресу в різних селекційних установах здійснюється в неоднакових об'ємах і на різних етапах

селекційного процесу залежно від оснащення їх лабораторій та кваліфікації персоналу. Ефективність селекційного процесу за даною проблемою значною мірою залежить від комплексності досліджень. Контроль має здійснюватися на ранніх етапах селекційного процесу і при взаємодії селекціонерів з фізіологами та біохіміками. При створенні стійких сортів необхідні випробування на стійкість до абіотичних стресів значної кількості сортозразків і селекційних ліній, отриманих в процесі схрещування і подальшого добору. Тому слід віддавати перевагу експрес-методам, зокрема біохімічним. У зв'язку з цим в літературі дедалі частіше підкреслюють доцільність застосування біохімічних критеріїв при створенні стійких до абіотичних стресорів сортів зернових культур.

Розроблені нами методи базуються на аналізі частки (%) проростання насіння кукурудзи на розчинах сахарози при підвищеній температурі (+39^{o}C), зміни активності лектинів клітинних стінок, сахарозофосфатсинтази та вмісту абсцизової кислоти, сахарози, малонового диальдегіду та відновленого глутатіону в зародках та проростках кукурудзи, які відрізнялися за рівнем посухо-жаростійкості, та вирощених в умовах водного дефіциту та підвищеної температури.

2. ВИРОЩУВАННЯ ДОСЛІДНОГО МАТЕРІАЛУ

Для досліду відбирають здорове, нормально виповнене сформоване зерно зі схожістю не менше 75 – 85%. Перед пророщуванням зерно дезінфікують 1% розчином kmno4 і заздалегідь замочують протягом 12 годин. Після цього зернівки промивають водою і злегка обсушують на фільтрувальному папері. Пророщують матеріал у стерильних чашках петрі при 24°с на фільтрувальному папері в термостаті, де можна створити постійну температуру. Якщо вологість повітря в термостаті не регулюється, на дно його розміщують кристалізатор з водою для зволоження повітря. Підготовлене зерно (пшениці, кукурудзи) розкладають на фільтрувальний папір по 25 – 50 зернівок в кожну чашку. У дослідному варіанті повторність 3-4-кратна, в контрольному – 2-кратна.

У кожну чашку доливають по 25 мл води (контроль). Чашки поміщують в термостат на 3 доби при температурі 24°с. Водний дефіцит створювали перенесенням проростків на сухий фільтрувальний папір у камеру з вологістю повітря 35–40%. Гіпертермію створювали розміщенням рослин у термостаті при 39–42ºс. Тривалість дії водного дефіциту і гіпертермії – 6 годин.

Після закінчення експозиції відпрепаровані надземну частину і корені проростків заморожували при –70ºс, ліофільно висушували та розмелювали.
для роботи необхідні: мірні циліндри для розливу води в чашки петрі, ножиці, пінцети, ваги, годинні скла (для зважування).

3. ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ПОСУХОСТІЙКОСТІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ ЗА ПРОРОСТАННЯМ НАСІННЯ НА РОЗЧИНАХ САХАРОЗИ [10]

3.1. Підбір насіння

Насіння має бути одного місця та року репродукції. Для визначення порівняльної посухостійкості сортів до них підібрати стандарти з високою та низькою посухостійкістю. Якщо зразок представлений сортом, гібридом або лінією, то і стандарт відбирається із тієї ж групи.

3.2. Приготування розчину сахарози

Для приготування розчину беруть дистильованну воду та сахарозу. Готують 11,9% розчин сахарози, потім його потрібно прокип’ятити протягом 10-15 хвилин.

3.3. Визначення схожості насіння на розчині сахарози

Визначення схожості насіння проводиться в чашках Петрі. На дно кожної чашки кладуть фільтрувальний папір в один шар, потім чашку стерилізують звичайним способом у сушильній шафі протягом 1 години при температурі 160˚С. Після стерилізації в кожну чашку слід покласти по 50 насінин кукурудзи, які заливають 25 мл розчину сахарози. Дослід потрібно проводити в

3–4–кратній повторності. Одну або дві чашки цього ж зразка заливають такою же кількістю дистильованої води для контрольного визначення лабораторної схожості. Після цього чашки петрі з насінням витримують у термостаті на 30°с та 39˚С 5-7 діб. Підраховують насінини, що проросли, кілька разів: через 3, 5 та 7 діб. Підрахунок насінин дає можливість визначити середній процент схожості досліджуваних зразків та стандартів. Схожість в розчині сахарози виражається у відсотках до контролю стосовно стандарту. Така оцінка посухостійкості дозволяє поділити лінії та гібриди на 3 групи за ступенем стійкості: високостійкі, середньо- та слабостійкі.

4. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ КЛІТИННИХ СТІНОК ПРОРОСТКІВ [5]

4.1. Реактиви

1. 20 мМ калій - фосфатний буфер, рН 7,4
2. 0,05 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ)
3. 0,5 мМ дитіотреітол (ДТТ)
4. 10 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА)
5. NaCl 0,2 м та 0,9%
6. Сахароза 0,36 м (12,3 г на 100 мл середовища а)
7. Тритон Х - 100 0,05%
8. Трипсин кристалічний
9. Середовище А: до мірної колби на 100 мл додають 850 мг ФМСФ, 7,8 мг ДТТ, 2,92 гЕДТА, 12,3 г сахарози, об'єм доводять до мітки 20 мМ калій - фосфатним буфером, рН 7,4 при постійному помішуванні на магнітній мішалці.
10. Середовище Б: до мірної колби на 100 мл додають 850 мг ФМСФ, 7,8 мг ДТТ, 2,92 г ЕДТА, 12,3 г сахарози, 900 міліграмів NaCl, 0,05 г тритона Х – 100, об'єм доводять до мітки 20 мМ калій–фосфатним буфером, рН 7,4, при постійному помішуванні на магнітній мішалці.

4.2. Устаткування

1. Пластикові планшетки з u-образними лунками
2. Центрифуга
3. Термостат

4.3. Виділення лектинів клітинних стінок проростків

0,3 г рослинного матеріалу (коріння, надземна частина проростків) розтирали з піском до гомогенного стану в 0,9 мл середовища А. Отриманий гомогенат фільтрували через два шари бавовняної тканини. Отриманий на тканинному фільтрі осад, що містить клітинні стінки, тричі промивали 20 мМ калій - фосфатним буфером, pH 7,4, потім ресуспензували в 0,9 мл того ж буфера та центрифугували при 10,000 об/хв.. НОР відкидали, а з осаду (клітинні стінки) виділяли лектини середовищем Б і настоюванням протягом 4 годин з постійним помішуванням при температурі + 4˚С. Після цього екстракт центрифугували 30 хв. при 15.000 об/хв, осад відкидали, а в НОР визначали активність лектинів.

Активність лектинів оцінювали по гемаглютинації еритроцитів крові білих щурів.

4.4. Отримання суспензії еритроцитів

Кров одного щура вносити до 200 мл 0,2 М NaCl, струшувати і центрифугувати 10 хвилин при 1000 об/хв., НОР злити, процедуру повторювати тричі, до повного осадження еритроцитів. Потім відмиті еритроцити обробити трипсином в концентрації 1,5 мг/мл протягом 1 години при 37°С в термостаті. По закінченні часу еритроцити тричі промивати 0,2 М NaCl з подальшим центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 10 хвилин.

4.5. Визначення активності лектинів

Реакцію гемаглютинації здійснювати при кімнатній температурі, використовуючи 4% суспензію еритроцитів (0,4 мл еритроцитів, що осіли, довести до 10 мл 0,2 М NaCl). Перед мікротитруванням досліджуваний розчин

заздалегідь розводять у 2,4,8,16,32 і т.д. Рази залежно від очікуваної лектинової активності в досліджуваному зразку.

Мікротитрування проводять таким чином: у лунки планшеток вносять по 20 мкл кожного розведення досліджуваного зразка, потім додають 20 мкл 4% суспензії еритроцитів. Результати гемаглютинації реєструють через 2 години після початку мікротитрування. Лектинову активність розраховують за формулою, як величину, зворотну мінімальної концентрації білка, при якій відбувається аглютинація еритроцитів. У початковому екстракті досліджуваного зразка визначити білок за методом Лоурі.

$$АЛ=1/X\ (мг/мл)^{-1},\ де$$

$X= \Delta E_{білка} \cdot n \cdot 1000/m$

n – розведення досліджуваного зразка,

m – розведення екстракту при мікротитруванні.

5. ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА ЗА МЕТОДОМ ЛОУРІ[11]

5.1. Реактиви

1. Реактив А: 2% (маса:об'єм) розчин Na_2CO_3 в 0,1М NaOH
2. Реактив Б: 0,5% $CuSO_4$ у 1% розчині лимоннокислого натрію ($(CH_2OOH)_2C(OH)COONa$)
3. Реактив В: 1 мл реактиву Б довести реактивом А до 50 мл (готують в день визначення)
4. Реактив Фоліна: 100г вольфрамокислого натрію ($NaWO_4 \cdot 2H_2O$) та 25 г молібденокислого натрію ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) розчиняють в 700 мл дистильованої води, потім додають 50 мл 85% ортофосфорної кислоти (H_3PO_4) та 100 мл концентрованої соляної кислоти (HCl). Нагрівають в колбі ємністю 1,5 л із зворотним холодильником протягом 10 годин. Охолоджують, додають 150 г сульфату літію, 50 мл води і поступово, краплями, додають бром. Залишок брому відігнати нагріванням колби без холодильника. Після охолоджування об'єм довести до 1л і фільтрувати. Розчин має бути золотисто-жовтого кольору

без зеленого відтінку. Для визначення білка використовують реактив, розведений водою в 2 рази. Калібрувальну криву для реактиву Фоліна будували за методом Крилової.

5.2. Хід визначення

У пробірки піпеткою вносять 0,2 мл досліджуваного розчину білка, доливають 2 мл реактиву В, перемішують і через 10 хвилин додають 0,2 мл реактиву Фоліна. Витримують 30 хвилин та вимірюють оптичну щільність при 750 нм на спектрофотометрі проти проби холостого досліду (0,2 мл екстракту, 2 мл реактиву В, 0,2 мл реактиву Фоліна). Білок розраховують по формулі:

$$C=\Delta E \cdot n \cdot m/K, \text{ (мг/г)}$$

ΔЕ – екстинція

n – екстракт,

m– разведення

k – коефіцієнт перерахунку за реактивом Фоліна.

6. ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ [12]

6.1. Обладнання та реактиви

1. Хроматограф газовий з можливістю програмування температури до 330°С, з полум’яно-іонізаційним детектором та цифровим інтегратором (“Shimadzu” (Японія))
2. Шафа сушильна вакуумна з температурою до 120°С згідно з чинним нормативним документом.
3. Колонка хроматографічна стальна (краще скляна) діаметром 2 мм та довжиною 180 см, з OV-17 на Chromaton W-AP, 80/100 меш. Згідно з чинним нормативним документом.
4. Газ-носій гелій (азот, аргон), не нижче 99,99% чистоти згідно з чинним нормативним документом.

5. Мікрошприц на 10 мкл згідно з чинним нормативним документом.
6. Діетиловий ефір, х.ч., згідно з чинним нормативним документом.
7. Діазометан, кваліфікація для метилірування.
8. Сірчана кислота, згідно з чинним нормативним документом.
9. Ізопропанол, х.ч., згідно з чинним нормативним документом.
10. Пробірки типу “епендорф” на 1,2 мл згідно з чинним нормативним документом.
11. Спирт етиловий 96%, ректифікат згідно з чинним нормативним документом.
12. Сульфат натрію безводний, ч. згідно з чинним нормативним документом.
13. Піпетки градуйовані місткістю 1; 2; 5 $см^3$, згідно з ГОСТ 29227.
14. Колби мірні 2-100-2, згідно з ГОСТ 1770.

6.2. Обладнання та реактиви

Наважку проби (3 г) суспензувати в 15 мл 80% етанолу. Залишають на ніч при температурі 4˚С. Центрифугують при 3-4 g НОР висушують до водного залишку при температурі 45-50˚С під вакуумом. Підкислюють розчин 1 н сірчаною кислотою до pH 3,0. Екстрагують АБК з розчину діетиловим ефіром 3 рази двократним об’ємом. Висушують ефір до сухого залишку при температурі 30˚С. До сухого залишку додають 1,5-2 мл діазометану до повного розчину залишку. Залишити у темному місці на 10 хв. Висушити під вакуумом. Залишок розчинити в 1 мл ізопрапанолу та перенести у пробник, після чого проба готова до вводу у хроматограф.

6.3. ***Умови проведення випробування***

Аналіз проводять з програмуванням температури від 140˚С до 330˚С та швидкістю 10˚С/хв., при температурі випарника 350˚С, детектора 330˚С.

6.4. Обробка результатів

При визначені вмісту абсцизової кислоти використовують метод абсолютного калібрування по абсцизовій кислоті.

7. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ САХАРОЗОФОСФАТСИНТАЗИ

Активність сахарозофосфатсинтази (СФС) – (УДФ-глюкоза :D-фруктозо-6-фосфат-2-α-глюкозилтрансфераза, К.Ф. 2.4.1.14) визначали за [13]. Метод ґрунтується на визначенні вмісту сахарози, що утворюється в реакціях:

1. УДФГ+фруктозо-6-фосфат → сахарозо-6-фосфат + УДФ (каталізує СФС);
2. сахарозо-6-фосфат+H_2O→сахароза + P_i(каталізує сахарозофосфатаза)

7.1. Обладнання та реактиви

1. Цитратний буфер (pH 7,5)
2. Трис-HCl буфер (pH 7,5) з додаванням 1мМ ЕДТА, 10 мМ $MgCl_2$
3. $MgSO_4$
4. Глюкозо-6-фосфат
5. Фруктозо-6-фосфат
6. 5н NaOH
7. 30% HCl
8. 0,1% спиртовий розчин резорцину
9. УДФГ
10. Спектрофотометр
11. Центрифуга

7.2. Хід визначення

Екстракт сахарозофосфатсинтази одержували шляхом гомогенізації 1 г листків з 8 мл трис-HCl буферу (pH 7,5), в який додавали 1мМ ЕДТА, 10 мМ $MgCl_2$. Екстракт центрифугували при 10000g протягом 10 хвилин. Надосадову

рідину використовували як ферментний препарат. Всі операції виконували при 4°С. Інкубаційна суміш (0,3 мл) містила: 50 мкл цитратного буферу (рН 7,5); 90 мкМ $MgSO_4$; 60 мкМ УДФГ; 240 мкМ глюкозо-6-фосфату; 60 мкМ фруктозо-6-фосфату; 50 мкл ферментного препарату.

Контрольна суміш містила такі ж компоненти, але у ній фермент до інкубації інактивували прогріванням на киплячій водяній бані протягом 1 хвилини. Інкубацію проводили 60 хвилин при 35°С, по завершенні якої фермент інактивували, як і в контролі.

Вміст сахарози у контролі та після інкубації визначали резорциновим методом. Для цього пробірки з 50 мкл інкубаційної суміші та 50 мкл 5н NaOH поміщали на 5 хвилин на киплячу водяну баню. Після охолодження у пробірки додавали 0,5 мл розчину резорцину, 3,5 мл 30% HCl, нагрівали на водяній бані протягом 20 хвилин при 80°С. Оптичну щільність розчину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 540нм, активність ферменту виражали у мкМ утвореної сахарози на 1 мг білка або на 1 г тканини за 1 годину.

8. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТБК–АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ [14]

Інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом речовин, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні сполуки, в основному МДА).

8.1. Реактиви та обладнання

1. 20 % трихлороцтова кислота (ТХО)
2. 0,1 М трис-HCl буфері, рН 7,6 з додаванням 0,35 М NaCl
3. ТБК-реактив (0,5 % ТБК в 20 % ТХО, яка містить 0,01 % ГТ)
4. Спектрофотометр
5. Центрифуга

8.2. Хід визначення

Наважку тканин (≈ 0,4 г) пагонів або коренів інтактних проростків кукурудзи гомогенізувати в 0,1 М трис-HCl буфері, рН 7,6 з додаванням 0,35 М NaCl, кінцевий об’єм гомогенату – 15 мл. До гомогенату додати 5 мл

0,5%-ного розчину ТБК в 20%-ній ТХО. Суміш нагріти на киплячій водяній бані протягом 30 хвилин і профільтрувати. Оптичну густину фільтрату визначати за довжини хвилі 532 нм відносно буферу з реагентом, але без рослинного матеріалу. Концентрацію ТБК-активних сполук розраховували за молярною екстинкцією МДА (ε = 1,56 · 10−5 М−1см−1). Вміст ТБК-активних продуктів виражали в наномолях на грам сухої речовини

9. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ

Вміст глутатіону відновленого визначали за методикою E. Beutler et al. (1963) у модифікації В. М. Гришка та Д. В. Сищикова [15].В основі методики лежить реакція тіолосульфідного обміну, під час якої вивільнюється аніон 2-нітро-5-тіобензоату, що має поглинання при довжині хвилі 412 нм.

9.1. Реактиви та обладнання

1. 0,3 М калій-фосфатному буфері, pH 7,5
2. Осаджувальний реактив (у 100 мл реактиву міститься 1,67 г HPO3, 0,2 г трилону Б, 30 г NaCl).
3. 1 мМ реактив Елмана.

9.2. Хід визначення

Для визначення відновленої форми глутатіону використовують 20% гомогенат рослинних тканин, виготовлений на 0,3 М калій-фосфатному буфері з pH 7,5. Отриманий гомогенат центрифугують протягом 20 хвилин при 6 000 g. Осад, що утворився при цьому, містить ядра, фрагменти клітинних стінок і, частково, пластиди. До 2 мл супернатанту додають 3 мл осаджувального реактиву та проводять повторне центрифугування протягом 10 хвилин при 6 000 g. Потім у кювету вносять 2 мл 0,3 М калій-фосфатного буфера, 0,05 мл 1 мМ розчину реактиву Елмана, 2 мл отриманого супернатанту та проводять вимірювання оптичної густоти при 412 нм на спектрофотометрі. Вміст відновленого глутатіону обчислювали за калібрувальною кривою і виражали в мМ/г.

ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За допомогою запропонованих методів була проведена оцінка на посухостійкість ліній та гібридів кукурудзи, які відрізнялися за рівнем посухостійкості. Для оцінки використовувалися надземна частина та коріння 3–7-ми добових проростків. Дослідження показали, що дія несприятливих чинників (водного дефіциту, гіпертермії) викликала значне збільшення (у 1,5–2,71 раза) активності лектинів у клітинних стінках проростків посухостійких ліній і гібридів кукурудзи, а у слабопосухостійких – зниження їхньої активності відносно контролю, що підтвердило отримані нами попередні результати [16]. Виявлена також диференційована зміна вмісту АБК за дії стресових факторів, що вивчалися, в залежності від посухостійкості ліній кукурудзи (табл.). Визначення активності СФС та вмісту сахарози в проростках ліній і гібридів кукурудзи, які відрізнялися за рівнем посухостійкості, за впливу водного дефіциту та гіпертермії показало, що у посухостійких ліній та гібридів кукурудзи СФС достовірно активувалась за дії стрес-факторів як в надземній частині проростків, так і в коренях. У нестійких до посухи генотипів стрес-фактори або інгібували, або не змінювали активності СФС в надземній частині та коренях рослин (табл.). Дія стресових чинників впливала також на рівень вмісту сахарози в проростках кукурудзи. Так, у посухостійких ліній і гібридів кукурудзи активування СФС супроводжувалося значним збільшенням вмісту сахарози як в надземній частині, так і в коренях проростків. Інгібування активності СФС за водного дефіциту та гіпертермії у непосухостійких ліній і гібридів кукурудзи мало впливало на вміст сахарози в проростках, однак спостерігалася тенденція до його збільшення.

Визначення інтенсивності процесів ПОЛ (за вмістом ТБК-активних продуктів) та відновленого глутатіону в проростках кукурудзи за впливу водного дефіциту, гіпертермії та спільної дії цих чинників показало, що вміст відновленого глутатіону зростав значною мірою в проростках посухостійких ліній та гібридів кукурудзи та знаходився у зворотній пропорційній залежності

від зміни кількості ТБК-активних продуктів, що є наслідком витрачання відновленого глутатіону при окиснювальних процесах (відмінності між посухостійкими та слабопосухостійкими лініями за зміною кількості ТБК-активних продуктів та відновленого глутатіону за дії несприятливих чинників достовірні при $p<0,01$) (табл.).

За даними кореляційного аналізу з рівнем посухостійкості статистично достовірно корелюють такі досліджені показники:

– зміна активності лектинів за умов стресу ($r= 0,95$ при $p=0,01$ між рівнем активності лектинів надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії, $r=0,83$ при $p=0,01$ між рівнем активності лектинів в надземній частині та коренях проростків після дії водного дефіциту, $r= 0,78$ при $p=0,01$ між рівнем активності лектинів в надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії та водного дефіциту;

– зміна вмісту абсцизової кислоти в умовах стресу ($r= 0,529$ при $p=0,05$ між вмістом АБК в надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії; $r=0,646$ при $p=0,05$ між вмістом АБК в надземній частині та коренях проростків після дії водного дефіциту; $r=0,62$ при $p=0,05$ між вмістом АБК в надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії та водного дефіциту);

– зміна активності сахарозофосфатсинтази за умов стресу ($r=0,60$ при $p=0,01$ між рівнем активності сахарозофосфатсинтази в надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії; $r=0,80$ при $p=0,01$ між рівнем активності сахарозофосфатсинтази в надземній частині та коренях проростків після дії водного дефіциту; $r= 0,58$ при $p=0,01$ між рівнем активності сахарозофосфатсинтази в надземній частині і коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії та водного дефіциту).

Підсумування отриманих результатів дозволило зробити висновок, що індукована зміна активності лектинів клітинних стінок, сахарозофосфатсинтази, вмісту абсцизової кислоти, відновленого глутатіону за дії водного дефіциту, гіпертермії та сумісній дії цих стресових чинників на

рослини кукурудзи свідчить про залучення цих біологічно активних речовин до формування механізмів посухо-жаростійкості рослин кукурудзи, які зумовлені генетичними особливостями вивчених ліній та гібридів. Методами кореляційного аналізу виявлені статистично значимі відношення вивчених біохімічних показників до фактичного рівня посухостійкості ліній та гібридів, що може бути застосовано в селекції для добору посухостійких генотипів кукурудзи.

Запропоновані біохімічні методи оцінки посухостійкості кукурудзи потрібно розглядати як додаткові, експресні методи контролю. Враховуючи той факт, що оцінка селекційного матеріалу проводиться у строго контрольованих умовах, факти випадкових помилок та впливу зовнішніх чинників середовища виключені. Для аналізу, в залежності від методу, потрібно 50-150 мг вирощеного матеріалу або 200 зернівок для 4-кратної повторності досліджуваного зразка. Перевагою розроблених методів є їхня експресність, контрольовані умови оцінки, висока відтворюваність, що дозволяє проводити оцінку селекційного матеріалу з ранніх етапів селекції та в короткі строки.

Таблиця

Зміна біохімічних показників, пов'язаних з формуванням адаптаційних процесів рослин, у проростках кукурудзи, вирощених за умов водного дефіциту та гіпертермії (% від контролю, середнє по групах)

Показник	Посухостійкі лінії, гібриди			Непосухостійкі лінії, гібриди		
	ВД	ТШ	ВД+ТШ	ВД	ТШ	ВД+ТШ
	Надземна частина проростків					
Лектини	149,2± 5,8	271,3±10,2	157,2± 9,8	87,5 ±7,6	67,8± 4,9	79,3±9,1
АБК	141,7±11,8	175,0±18,7	147,3±6,5	77,3±18,5	95,1±9,9	67,6±5,0
СФС	125,2 ± 8,8	183,0±9,6	136,3±12,9	76,6±6,3	81,6±4,2	63,1±6,59
Сахароза	215,0±16,9	143,3±11,1	144,6±31,5	107,4±5,8	118,7±9,1	114,5±5,4
МДА	77,8±4,6	85,9±7,9	93,5±8,7	138,5±8,4	129,6±7,9	142,7±10,2
Відновлений глутатіон	157,4±8,4	167,7±9,6	194,4±12,4	138,9±8,4	124,8±4,2	116,5±3,4
	Коріння					
Лектини	143,9± 5,8	236,6±19,4	220,1± 13,7	62,8± 4,8	85,6 ± 6,7	56,3±7,4
АБК	222,2±17,2	185,0±13,8	85,0±10,0	76,9±12,0	76,8±13,3	89,4±0,6
СФС	217,2 ±11,7	114,3±15,3	158,1±21,4	64,3 ± 3,9	66,1± 5,7	61,8±3,49
Сахароза	225,2 ± 9,3	139,2±15,3	153,8±34,6	119,3±13,6	104,5±8,6	105,2± 3,6
ТБКАП	83,8±9,6	91,0±9,4	93,7±7,5	156,2±9,3	176,3±7,9	187,5±11,6
Відновлений глутатіон	120,2 ±7,7	220,3±12,3	250,1±11,4	110,5± 5,8	78,3± 6,7	98,4±8,4

Примітка. Посухостійкі лінії: Од 329, Од. 221 МВ, П29-231-1, ИК107 зМ, ГКБ23/119-31, МСА224-131, ВС3/53МВ, ЛБ329/22, ЛБF2/Мо17-28/421; гібриди Етюд, Веселка МВ, Кобза МВ, Шаланда МВ, Флагман, Одеський 385 МВ, Легіонер.
Непосухостійкі лінії: ГК 26, СМ 7 SL, ГКБ23/NS183-111, ЛБ228, МСА224-112, ИК107ВС3/66, помірно посухостійкі гібриди:Фея, Яхта, Діалог.
За 100 % приймали активність лектинів, СФС, вміст сахарози в контрольних рослинах
Лектинова активність в контрольних зразках (0,001-0,863 (мкг білка/мл)$^{-1}$
Активість сахарозофосфасинтази (СФС) в контрольних зразках (1,87-5,73 мкМ сахарози/мг білка год)
Вміст сахарози в контрольних зразках (11,18-24,51 мг/г сухої речовини)
Вміст абсцизової кислоти (АБК) в контрольних зразках (0,04-0,36 мг/г сирої маси)
Вміст ТБКАП(ТБК-активні продукти) в контрольних зразках (5-10 мкМ/г сирої маси)
Вміст відновленого глутатіону в контрольних зразках (60-180 мМ/г сирої маси)
ВД– водний дефіцит
ТШ– гіпертермія

ЛІТЕРАТУРА

1. Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. & Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv*. Vol. 32. P. 40-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.006
2. Santos A. F. S., da Silva M. D. C., Napoleão T. H., Paiva P. M. G., Correia M. T. S., Coelho L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*. Vol.15. P. 41-62.
3. Naithani S., Komath S.S.,Nonomura A.,Govindjee G. (2021).Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond.Journal of Plant Physiology. Vol. 266.153531. doi:10.1016/j.jplph.2021.153531
4. Etzler M.E. (1998).From structure to activity: new insights into the functions of legume lectins .*Trends Glycosci. Glycotechnol*. Vol.10. No. 53. P. 247—255.
5. Поспєлов С. В., Чеботарьова Л. В., Поспєлова Г. Д., Корнієнко А. О. (2019). Оцінка біологічної активності фітолектинів пшениці озимої. *Вісник ПДАА*. № 4. С. 73−82. doi: 10.31210/visnyk2019.04.09
6. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. (2010). Участие растворимых углеводов и низкомолекулярных соединений азота в адаптивных реакциях растений *Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология*. Вып. 2 (20). С. 36-53.
7. Castrillo M. (1992). Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *J. Exp. Bot*. Vol. 43. No 257. P. 1557-1561.
8. Worrell A.C., Bruneau J.M., Summefelt et al. (1991). Expression of maize sucrose phospate synthase in tomato alters carbohydrate partitioning. *Plant Cell*. Vol. 3. P. 1121-1130.
9. Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Бацманова Л.М. (2004). Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля . *Фізіологія та біохімія культур*. Т. 36. № 1. С. 3-14.

10. Удовенко Г.В. (1 976). Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 318 с.
11. Lowry O.H., Rozebrough N.I., Farr F.L., Rondall R.T. (1951). Protein measurement with Folin reagent. *Biol. Chem.* Vol. 193. P. 265-275.
12. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. (1987). Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 430 с.
13. Сакало В.Д., Ларченко Е.А., Курчий В.М. (2009). Синтез и метаболизм сахарозы в листьев проростков кукурузы. *Физиология и биохимия культурных растений*. Т. 41. № 4. С. 305-312.
14. Стальная И.Д. (1997). Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Соврем. методы в биохимии*. Т. 1. С. 66-68.
15. Гришко В.Н., Сыщиков Д.В. (2002). Метод определения восстановленной формы глутатиона в вегетативных органах растений. *Украинский биохимический журнал*. Т. 24. № 4б. С. 123-124.
16. Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Белоусов А.А., Соколов В.М., Тихонова О.В., Попов С.В., Безкровная Л.Я., Якименко И.А. (2010). Активность нитратредуктазы и лектинов клеточных стенок у растений кукурузы, выращенных в условиях водного дефицита и теплового шока. *Физиология и биохимия культурных растений*. Т. 41. № 4. С. 330-338.

Науково-виробниче видання

СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ – НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

ВИКОРИСТАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ ОЦІНКИ РІВНЯ ПОСУХО-ЖАРОСТІЙКОСТІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Методичні рекомендації

Автори: Молодченкова О. О., Бєлоусов А.О., Соколов В. М., Рищакова О. В., Унтілова І. А.

Підписано для друку з готового оригінал-макета _____.

Умов. друк. арк. . Формат 60х84 1/16.

Папір офсетний. Друк різографічний.

Тираж прим. Зам. № ___.

Друкарня

65012, м. Одеса, вул.

Тел.