

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ – НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

ІНДУКУВАННЯ ПРОТЕКТОРНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

З ВИКОРИСТАННЯМ
БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН



Методичні рекомендації

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

ІНДУКУВАННЯ ПРОТЕКТОРНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР З ВИКОРИСТАННЯМ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Методичні рекомендації

Одеса
«Астропринт»
2025

УДК 577.1
I-60

Автори:

О. О. Молодченкова, д. б. н., с. н. с., **М. А. Литвиненко**, д. с.-г. н., професор, академік НААН України, **Л. Я. Безкровна**

Рецензенти:

П. С. Тихонов, к. б. н., доцент Одеського державного аграрного університету;

Є. А. Голуб, к. с.-г. н., в. о. завідувача відділу селекції та насінництва пшениці

Друкується за рішенням вченої ради Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (протокол № 6 від 14.08.2025 р.)

I-60 Індукування протекторних реакцій рослин зернових культур з використанням біологічно-активних речовин : методичні рекомендації / авт.: О. О. Молодченкова, М. А. Литвиненко, Л. Я. Безкровна ; Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення. — Одеса : Астропринт, 2025. — 40 с.

ISBN 978—617—8569—67—9

Описано методи активації протекторних реакцій рослин пшениці та ячменю з використанням біологічно активних сполук.

Рекомендації містять інформацію щодо проведення біохімічних досліджень по підвищенню адаптивних властивостей рослин пшениці та ячменю, які можна використовувати в рослинництві та селекції.

Методичні рекомендації можуть бути використані в фізіолого-біохімічних, селекційних дослідженнях, рослинництві при створенні адаптивних до несприятливих умов вирощування сортів пшениці та ячменю.

УДК 577.1

© Молодченкова О. О., Литвиненко М. А., Безкровна Л. Я., 2025

© Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, 2025

ISBN 978—617—8569—67—9

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів	4
1. Теоретичне обґрунтування досліджень	5
2. Методика виділення лектину зародка пшениці	11
3. Методика виділення флавоноїдів сої	11
4. Методика вирощування дослідного матеріалу	11
5. Спектрофотометричний метод визначення активності інгібітора трипсину по гідролізу БАПНА	12
6. Визначення активності фенілаланіаміакліази	13
7. Визначення активності лектинів клітинних стінок проростків	15
8. Визначення вмісту білка методом Лоурі	17
9. Опрацювання результатів	18
10. Список літератури	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

БАПНА – N- α -бензоїл-L-аргинін-пара-нітроанлід

ДТТ – дитіотреїтол

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ІТ – інгібітор трипсину

НОР – надосадова рідина

ФАЛ – фенілаланінаміакліаза

ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

$\bar{x}$ – середнє арифметичне + стандартна похибка вибіркової середньої

CV– коефіцієнт варіації

1.ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проблема стійкості рослин до несприятливих чинників довкілля та отримання стабільних урожаїв в зоні ризикованого землеробства обумовлює особливу актуальність вивчення механізмів адаптації рослин до стресів різної природи. Вирішення відміченої проблеми послужить основою для створення екологічно чистих методів захисту рослин. Селекційний шлях створення генотипів, стійких до стресових біотичних та абіотичних факторів, є, безумовно, стратегічним. Він повинен реалізуватися через створення нових генотипів, які володіють комплексною стійкістю до дії стресових факторів довкілля. Проте таких сортів та гібридів у виробництві мало. Існуючі сорти та гібриди зернових культур володіють, як правило, відносною стійкістю до окремих стресових факторів.

Як відомо, для захисту рослин від хвороб широко використовуються хімічні засоби, які подавляють ріст та розвиток патогенних мікроорганізмів. Однак інтенсивне застосування пестицидів призводить, з одного боку, до хімічного забруднення екосистем та з іншої – до появи високорезистентних до хімічних засобів форм патогенів. Тому ведуться пошуки нових методів захисту рослин від шкідників і хвороб, більш досконалих в порівнянні з традиційними. Останнім часом неухильно зростає увага до проблеми придбаного фітоімунітета. На ринках світу останніми роками з'явилися препарати з механізмом дії, відмінним від пестицидів і призначені не для знищення патогенів та шкідників, а для стимуляції захисних механізмів рослин. Вони дозволяють реалізувати генетичний потенціал стійкості, внаслідок чого рослина справляється з інфекцією або стресовим фактором за допомогою власних захисних механізмів та сполук. Головна перевага біопрепаратів – природне походження. Вони не забруднюють навколишнє середовище, не виявляють шкідливої дії на людину і тварин, хоча і поступаються за ефективністю традиційним біоцидним препаратам. На гектар угідь потрібні міліграми біопрепаратів. Об'єктом дії при такому методі захисту є рослина, а не патоген. Це дозволяє індукувати системну стійкість рослин на весь період

вегетації, тому кратність обробок можна скоротити до 1-2 разів за сезон. На думку багатьох вчених, таким біологічно активним препаратам належить майбутнє. Цілеспрямована розробка індукторів стійкості рослин і методів їхнього застосування вимагає знань ключових біохімічних реакцій, впливаючи на які можна активізувати весь генетичний потенціал захисних механізмів рослин.

Формування стійкості рослин до біотичних та абіотичних несприятливих факторів пов'язане з активуванням комплексу захисних механізмів, що відповідають за збереження життєздатності та перебудову метаболізму рослини за екстремальних умов [1-4]. До стрес-індукованих реакцій належать: синтез стресових білків, утворення активних форм кисню, активація багатьох ензимів, утворення гормонів стресу та ін. [5, 6]. Відомо, що в захисних механізмах рослин при стресах різної природи беруть участь інгібітори трипсину, фенілаланіаміакліаза, лектини. Накопичення інгібіторів протеїназ у відповідь на пошкодження фітопатогенними мікроорганізмами виявлене в ряді культурних рослин, що належать до різних родів і родин. Вважається, що вони захищають рослини від дії ферментів грибів, бактерій, комах [7].

Встановлено, що інфекційний процес та деякі абіотичні стресові чинники викликають накопичення фенольних сполук, утворення лігніну. Центальною і регулюючою ланкою фенілпропанового метаболізму є реакція перетворення α -фенілаланіна на транс-коричну кислоту, яка каталізується ферментом фенілаланіаміакліазою (ФАЛ, КФ 4.3.1.5). Похідні коричневої кислоти включаються в різні біосинтетичні шляхи, які ведуть до утворення широко представлених у вищих рослинах трьох класів сполук – ефірів оксикоричних кислот, лігніну, флавоноїдів. Активність ФАЛ в рослинах значно змінюється за дії різних стресових факторів довкілля (фітопатогенів, УФ-радіації, важких металів та ін.). Підвищений синтез фенольних сполук в більшості випадків корелює з активністю ФАЛ. ФАЛ бере участь в утворенні попередників саліцилової кислоти, фітоалексинів, мономерів лігніну, які є складовою захисних реакцій рослин [8].

В літературі обговорюється питання про участь лектинів у формуванні захисних реакцій за впливу стресових факторів біотичної та абіотичної природи. Лектини специфічно зв'язуються з вуглеводними компонентами клітинної стінки багатьох фітопатогенних грибів. У зв'язку з цим основною функцією лектинів є захист рослин від грибних патогенів. Підставою для такого припущення можуть служити дослідження, проведені в нашій лабораторії, а також іншими авторами, які показують, що введення екзогенного лектину в суспензію патогена пригнічувало його розвиток, при цьому реєструвалося запобігання гальмуванню ростових процесів і зниженню біомаси рослин [9].

В рослинних тканинах виявлена складна система сигнальних систем, які регулюють біохімічні реакції відгуку в організмі рослин за дії стресових факторів різної природи. Активація багатьох сигнальних систем включає в себе ліганд регульовану активацію стартового ферменту сигнальної системи, яка відбувається за посередництва G-білків. Активованій стартовий фермент виступає в ролі генератора вторинних посередників. Потім за допомогою цих посередників відбувається активація білків-мішеней, в першу чергу, протеїназ. Останні або викликають генерацію нових посередників, або активацію спеціалізованих клітинних елементів (в першу чергу, факторів регуляції транскрипції). В результаті цього відбувається зміна експресії відповідних генів та формування фізіологічного відгуку. Кількість сполук, які виступають в ролі посередників в трансдукції стресових сигналів, а також в їхньому посиленні, постійно зростає. Таку роль можуть виконувати активні форми кисню, жасмонова, саліцилова кислоти, закис азоту та деякі інші сполуки [10]. Одним із індукторів захисних реакцій рослин є саліцилова кислота, яка виконує функції сигнального інтермедіанту та фітогормону [11, 12].

Рослини, особливо зернобобові культури, містять значну кількість поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, які є природними антиоксидантами і мають широкий спектр біологічної активності. Вони залучені у багато важливих процесів, пов'язаних з проростанням, ростом,

запиленням та розмноженням рослин. Однією із важливих їхніх функцій є захист рослин від впливу різноманітних несприятливих факторів довкілля. В реалізації стреспротекторного ефекту лежать антиоксидантні властивості цих сполук. Будь який абіотичний стресовий фактор викликає гіперпродукцію пероксиду водню в хлоропластах, мітохондріях та пероксисомах рослинної клітини поряд з вивільненням указаними органелами пероксидази та каталази. Значна кількість пероксиду водню дифундує у вакуолі – основне місце локалізації флавоноїдів, які здатні ефективно знешкоджувати пероксид водню та інші активні форми кисню. Встановлена кореляція між їхнім вмістом в рослинах та стійкістю до грибних патогенів та деяких шкідників [13].

Накопичений світовою наукою та авторами методичних рекомендацій експериментальний матеріал досить значний, але разом з тим, механізми активації та регуляції систем захисту рослин за інфікування фітопатогенами та дії абіотичних стресових факторів ще в багатьох питаннях не ясні та їхня розшифровка є одним з пріоритетних напрямків сучасної біології. Такі дослідження відкривають нові можливості для підвищення стійкості рослин до фітопатогенів та абіотичних стресових факторів за рахунок стимулювання та управління захисними системами рослин з використанням нових біологічно активних речовин, індукторів. Особливо активно дослідження по застосуванню рослинних біопрепаратів ведуться в США. Дослідники використовують, в основному, біорегулятори стероїдної природи. В багатьох країнах світу отримав розвиток напрям по імунізації рослин продуктами вбитих патогенів, ослабленими або авірулентними штамами патогенів. Використання можливості індукції стійкості рослин шляхом впливу на проміжні реакції імунної відповіді до теперішнього часу носять швидше науковий характер. З комерційних продуктів відомий препарат “Біон” фірми “Новартіс Кроп Протекшн” і препарат “Стробі” фірми “БАСФ”. У всьому світі ведуться дослідження по створенню індукторів стійкості з використанням активних компонентів різних органічних кислот. Так, поєднання елісатора (хітозану) з органічними кислотами використане при створенні препаратів “Хітозар”, “Нарцис”,

“Фітохіт”, “Агрохіт”. Проте ефективність цих препаратів поки відстає від ефективності біоцидних препаратів. Тому інтенсивні роботи в цьому напрямі продовжуються. Препарати лектинів, на даний час, випускаються на комерційній основі в багатьох країнах світу (США, Німеччина, Франція, Ізраїль, Японія, Чехія, Данія). Препарати лектинів широко використовуються в препаративних та аналітичних цілях в біохімії, клітинній біології, імунології, медицині. Тому виділення та вивчення протекторних властивостей рослинних лектинів, флавоноїдів та саліцилової кислоти для розробки нових екологічно безпечних методів захисту сільськогосподарських культур, зокрема пшениці та ячменю, заснованих на включенні власних захисних механізмів рослин, є дуже актуальним і перспективним.

В результаті проведених нами досліджень були відпрацьовані методи виділення лектинів зародка пшениці та флавоноїдів з насіння сої. Вихід лектина склав 0,158 г із 1,67 г зародків пшениці, вихід флавоноїдів склав 1,8 мг із 10 г насіння сої. Досліджено вплив саліцилової кислоти, екзогенних лектинів, флавоноїдів на ростові процеси і адаптивні властивості рослин, показники елементів структури врожаю в польових та лабораторних умовах у різних за рівнем стійкості до грибних хвороб та абіотичних стресорів сортів пшениці та ячменю на різних стадіях розвитку рослин. Отримані нами дані показали, що введення екзогенного лектину в середовище проростання патогенів (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*) пригнічує їх розвиток (табл.1). Це запобігало гальмуванню ростових процесів, зниженню біомаси рослин на фоні стимуляції захисних реакцій рослин (активності інгібітора трипсину, ендогенного лектина та фенілаланіаміакліази) (табл. 2-7). Ними встановлено, що одним із проявів захисної дії саліцилової кислоти є її здатність індукувати зміни активності захисних білків (лектинів, фенілаланіаміакліази) (табл. 8, рис.1,2), вмісту ендогенної саліцилової кислоти, оксиду азоту та оптимізувати гомеостаз про-/антиоксидантної системи в тканинах рослин зернових культур. Виявлено позитивний вплив екзогенних саліцилової кислоти

--

та лектина зародків пшениці на ростові процеси та адаптивні реакції рослин, показники елементів структури врожаю пшениці та ячменю (табл. 9).

Нашими дослідженнями встановлено, що попередня обробка насіння та пророщування насіння на розчинах флавоноїдів сої спричиняють підвищення схожості та ефективності проростання насіння пшениці, зростання довжини надземної частини та коренів проростків, визивають активацію захисних білків (інгібітора трипсину та лектинів). Попередня обробка насіння пшениці розчинами флавоноїдів з наступним посівом на фоні *Fusarium graminearum* призводить до активації ростових та адаптивних процесів у сприйнятливих сортів та збереженню або їх активації у стійких сортів пшениці (рис.3-6).

Практичним наслідком цих досліджень може бути висновок про можливість застосування екзогенних лектинів (у наших дослідженнях це – аглутенін зародка пшениці), саліцилової кислоти та флавоноїдів сої для індукування адаптивних реакцій та підвищення стійкості рослин пшениці та ячменю до біотичних та абіотичних факторів довкілля.

У даних методичних рекомендаціях в якості індукторів стійкості ми використовували лектини зародків пшениці у концентрації 10 мкг/мл, препарати флавоноїдів сої у концентрації 10⁻⁵%, розчини саліцилової кислоти (100 мг/л, 0,007мМ). Обробку рослин проводили шляхом обприскування у фазах ранне-весняного відростання (фаза 1,2 листа) (фаза 1), кущіння (фаза 2), першого флагового листа (фаза 3). В лабораторних умовах попередню обробку біологічно активними речовинами проводили шляхом замочування у розчинах впродовж 3 годин (потім його просушували на ситах) або обприскуванням рослин за 3 години до обробки стресовим чинником (0,007мМ розчин саліцилової кислоти, 10 мкг/мл розчин лектина зародків пшениці, 10⁻⁵% розчин флавоноїдів сої). У цих методичних рекомендаціях будуть викладені методики виділення лектинів зародків пшениці, флавоноїдів сої, біохімічні методики визначення біохімічних показників, що беруть участь у формуванні захисних реакцій рослин, за інфікування грибами роду *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*.

--

2. МЕТОДИКА ВИДІЛЕННЯ ЛЕКТИНА ЗАРОДКА ПШЕНИЦІ

Зернівки пшениці замочити протягом 12 годин у воді. Зародки із зерна виділити за допомогою пінцета. Лектини із зародків виділити 0,2 М NaCl у співвідношенні 1 г /10 мл 0,2 М NaCl. Зародки розтерти у ступці з піском до гомогенного стану, потім додати екстрагуючий розчин. Екстракцію провести за кімнатної температури протягом 30 хвилин при постійному струшуванні. По закінченні зазначеного часу екстракт відцентригувати за 10000 g 20 хвилин. В надосадовій рідині визначити активність лектинів. При наявності лектинової активності надосадову рідину поставити на діаліз проти води протягом ночі при 4°C, використовуючи діалізні мембрани ТЗ із RC з діаметром пор 12-14 кДа, шириною 25 мм, діаметром 15,9 мм (Fisher Scientific). Після діалізу надосадову рідину ліофільно висушити та використовувати для обробки насіння або рослин. Вихід лектина складає 0,158 г із 1,67 г зародків пшениці.

3. МЕТОДИКА ВИДІЛЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ СОЇ

Перед екстракцією висушене насіння сої розмолоти та знежирити гексаном протягом 1 години. Надосадову рідину злити, осад висушити при 65°C. Екстрагування флавоноїдів проводити шляхом настоювання сухого осаду в етанолі із розрахунку 1 мл етанолу на 200 мг осаду протягом 4 діб з наступною фільтрацією та ліофільною сушкою. Вихід флавоноїдів складає 1 г із 3 г насіння сої.

4. МЕТОДИКА ВИРОЩУВАННЯ ДОСЛІДНОГО МАТЕРІАЛУ

Для досліду відбирають здорове, нормально виконане зерно, що має схожість не менше 75 – 85%. Перед пророщуванням зерно дезинфікують 1% розчином KMnO₄ і заздалегідь замочують протягом 12 годин. Після цього зернівки промивають водою і злегка обсушують на фільтрувальному папері. Пророщування зерна проводять в стерильних чашках Петрі при 24°C 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 (озимої пшениці, ярого ячменю) розкладають на фільтрувальний папір по 25 – 50 зернівок в кожну чашку. У дослідному варіанті повторність 3-4-х кратна, в контрольному – 2-х кратна. У кожну чашку приливають по 25 мл води (контроль) або середовища, що містить 10^5 конідій/мл високопатогенного штаму *Fusarium graminearum* K-90 або *Alternaria alternata* (для озимої пшениці) та *Fusarium culmorum* (для ярого ячменю). Чашки поміщують в термостат на 7 діб за температури 24°C.

Водний дефіцит створити перенесенням проростків на сухий фільтрувальний папір у камеру з вологістю повітря 35-40%. Гіпертермію створити розміщенням рослин у термостаті при 39-42°C. Тривалість дії водного дефіциту і гіпертермії – 6 годин.

Після закінчення експозиції відпрепаровані надземну частину і корені проростків заморозити при -70°C, ліофільно висушити та розмолоти.

Для роботи необхідні: мірні циліндри для розливу води та суспензії грибів в чашки Петрі, ножиці, пінцети, ваги, годинні стекла (для зважування).

5. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРА ТРИПСИНУ ПО ГІДРОЛІЗУ БАПНА [14].

У 1961 році був запропонований специфічний для інгібіторів трипсину і трипсиноподібних протеаз синтетичний субстрат БАПНА (N- α -бензоїл-L-аргинін-пара-нітроанілід). При його розщеплюванні утворюється забарвлений в жовтий колір пара-нітроанілід, кількість якого визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 382,5 нм.

Реактиви:

1. Субстрат - 43,5 міліграм БАПНА розчиняють в 1 мл диметилформаміду, прогрівають на водяній бані до повного розчинення і доводять об'єм до 100 мл буфером;
2. Буферний розчин - 0,4 М Трис – HCl, pH - 7,6.

Обладнання:

1. Термостат: $+30^0 \pm 0,20^\circ\text{C}$;
2. Спектрофотометр.

Хід визначення:

У пробірці змішують рівні об'єми трипсину і досліджуваного зразка (0,3 мл + 0,3 мл), витримують 10 хвилин та відбирають 0,5 мл суміші, до якої додають 2,5 мл інкубаційної суміші, яку готують заздалегідь шляхом розведення субстрату БАПНА з буфером у співвідношенні 1:1 та відразу вимірюють екстинкцію при 382,5 нм проти води. Потім пробірки інкубують на водяній бані протягом 30-45 хвилин, залежно від активності трипсину. Одночасно ставлять контроль на активність трипсину. Для цього в пробірці змішують рівні об'єми трипсину та екстрагенту, на якому був приготовлений розчин досліджуваного зразка, в якому визначають активність інгібітору. Витримують 10 хвилин і далі поступають так, як описано вище. Крім того, готують контроль на реактиви, проти якого визначають екстинкцію на приладі (0,5 мл NaCl + 2,5 мл інкубаційної суміші). Початковий ферментний розчин трипсину розвести перед реакцією в 5-10 разів.

Обрахунок результатів:

Активність інгібітора трипсину розраховують за наступною формулою:

$$IA = (\Delta E_{\text{тр}} - \Delta E_{\text{оп}}) \cdot 40 \cdot n \cdot m / \Delta E_{\text{тр}} \cdot 1000 \text{ (г/кг)}, \text{ де}$$

40 – концентрація трипсину (розведення в 5 раз - початкова концентрація трипсину 200 мкг/мл);

n – розведення досліджуваного зразка;

m – екстракція (співвідношення наважки до екстрагенту).

6. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕНІЛАЛАНІНАМІАКЛАЗИ [15]

Реактиви:

1. Субстрат 12 мМ – α -фенілаланін: 0,198 міліграм α -фенілаланіну розчинити в 100 мл 0,1 М боратного буфера, pH 8,8.
2. 0,2 М боратный буфер:

1) 0,05М бури ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, М.М. 201,22) – 20,12 г/1000мл;

2) 0,2 М борна кислота (H_3BO_3 (М.М. 61,84)) – 12,37г/1000мл.

700 мл 0,05М бури + 300 мл 0,2М борної кислоти (розвести в 2 рази).

Обладнання:

1. Спектрофотометр;
2. Центрифуга;
3. Термостат: $37 \pm 20^\circ\text{C}$.

Виділення ферменту:

150 г рослинного матеріалу (заморожені проростки і коріння) розтирають з піском на холод до гомогенного стану, додають 2,4 мл охолодженого 0,1М боратного буферу, рН 8,8 та екстрагують фермент при постійному помішуванні протягом 30 хвилин при $+4^\circ\text{C}$. Центрифугують 20 хвилин за 10000 g. У надосадовій рідині визначають активність ФАЛ.

Хід визначення:

У пробірці змішують 0,1 мл екстракту досліджуваного зразка та 0,4 мл 0,1 М боратного буфера рН 8,8, який містить 12 мМ α -феніلالаніна, додають 2,5 мл дистильованої води та відразу вимірюють екстинкцію при 290 нм проти води (контроль). Одночасно готують дослідний зразок: 0,4 мл 0,1М боратного буфера рН 8,8, який містить 12 мМ α -феніلالаніна, та 0,1 мл екстракту досліджуваного зразка і відразу ставлять на інкубацію в термостат при 37°C на 16 годин, по закінченню часу додають 2,5 мл води та визначають екстинкцію на приладі. Крім того, готують контроль на реактиви, проти якого визначають екстинкцію дослідного зразка (0,4 мл 0,1М боратного буфера, рН 8,8, який містить 12 мМ α -феніلالаніна та 2,6 мл води). Активність ферменту вимірюють в одиницях оптичної щільності на міліграм білка ($\Delta\text{E}/\text{мг}$ білка).

7. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ КЛІТИННИХ СТІНОК ПРОРОСТКІВ [16]

Реактиви:

1. 20 мМ калій - фосфатний буфер, рН 7,4;
2. 0,05 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ);
3. 0,5 мМ дитіотреїтол (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);
7. Тритон X - 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 г ЕДТА, 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 мг NaCl, 0,05 г тритона X–100, об'єм доводять до мітки 20 мМ калій–фосфатним буфером, рН 7,4, при постійному помішуванні на магнітній мішалці.

Обладнання:

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

Виділення лектинів клітинних стінок проростків

0,3 г рослинного матеріалу (коріння, надземна частина проростків) розтирають з піском до гомогенного стану в 0,9 мл середовища А. Отриманий гомогенат фільтрують через два шари бавовняної тканини. Отриманий на тканинному фільтрі осад, що містить клітинні стінки, тричі промити 20 мМ калій - фосфатним буфером, рН 7,4, потім ресуспензувати в 0,9 мл того ж

буфера та відцентрифугувати за 10000 g. НОР відкинути, а з осаду (клітинні стінки) виділяють лектини середовищем Б і настоюванням протягом 4 годин з постійним помішуванням за температури +4°C. Після цього екстракт відцентрифугувати 30 хв за 15000 g, осад відкинути, а в НОР визначати активність лектинів.

Активність лектинів оцінювати по гемаглютинації еритроцитів крові білих щурів.

Отримання суспензії еритроцитів [17]

Кров одного щура внести до 200 мл 0,2 М NaCl, струшувати і відцентрифугувати 10 хвилин за 1000 g, 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°C в термостаті. По закінченні часу еритроцити тричі промити 0,2 М NaCl з подальшим центрифугуванням за 1000 g протягом 10 хвилин.

Хід визначення:

Реакцію гемаглютинації здійснювати за кімнатної температури, 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.

Обрахунок результатів:

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.

$$AJ=1/X \text{ (мг/мл)}^{-1}, \text{ де}$$

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

n – розведення досліджуваного зразка;

m – розведення екстракту при мікротитруванні.

8. ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА МЕТОДОМ ЛОУРІ[18]

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 $((\text{CH}_2\text{OOH})_2\text{C}(\text{OH})\text{COONa})$;
3. Реактив В: 1 мл реактиву Б довести реактивом А до 50 мл (готують в день визначення);
4. Реактив Фоліна: 100г вольфрамокислого натрію ($\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) та 25 г молібденокислого натрію ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 бромовидігнати нагріванням колби без холодильника. Після охолодження 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 будують за методом Крилової.

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 досліді (0,2 мл екстракту, 2 мл реактиву В, 0,2 мл реактиву Фоліна). Білок розраховують за формулою:

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

ΔE – екстинкція;

n – розведення досліджуваного зразка;

m – екстракція (співвідношення наважки до екстрагенту);

k – коефіцієнт перерахунку за реактивом Фоліна.

ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За допомогою запропонованих методів була проведена оцінка на стійкість генотипів озимої пшениці та ярого ячменю до збудників фузаріозу (*Fusarium graminearum* K90 та *Fusarium culmorum*), які відрізнялися за стійкістю до фузаріозної інфекції та на стійкість до абіотичних чинників (водного дефіциту та гіпертермії). Як початковий матеріал для оцінки використовувалися надземна частина проростків та коріння 3-7-х добових проростків, а так само на цьому матеріалі було проведено визначення активності інгібітора трипсина, фенілаланіаміаціязи та активності лектинів зародків. Польові досліді були проведені на дослідних полях СГП-НЦНС на ділянках площею 1м², повторність – триразова. Варіанти досліді були розміщені стандартним способом. Попередник – соняшник.

В результаті проведених досліджень було показано, що саліцилова кислота в концентрації 0,01 %, лектин зародків пшениці у концентрації 10 мкг/мл та флавоноїди сої в концентрації 10⁻⁵ % при попередньому замочуванні зерна в розчинах біологічно активних речовин та обприскуванні рослин на різних фазах вегетації позитивно впливають на показники елементів структури врожаю пшениці та біохімічні показники, пов'язані з формуванням стійкості рослин до грибних патогенів (активність інгібітора трипсину, лектинів, вміст флавоноїдів) (табл.1-9, рис.1-4). Найбільш кращі показники прибавки врожаю були отримані у сорту Покровська за обробки зерна та рослин розчином лектину та флавоноїдів, у сорту Злагода одеська за обробки зерна та рослин саліциловою кислотою, у сортів Відповідь одеська та Позиція одеська за обробки рослин на 2 фазах вегетації розчином лектину. За обробки рослин біологічно активними речовинами за прибавки врожаю спостерігалася також індукція захисних реакцій рослин (табл.10-11). Найбільш високий вміст флавоноїдів, наприклад, спостерігався у рослин сорту Відповідь одеська за

обробки флавоноїдами сої, у рослин сорту Позиція одеська – за обробки саліциловою кислотою, у рослин сорту Покровська – за обробки лектином та саліциловою кислотою, у рослин сорту Злагода одеська – за обробки саліциловою кислотою та флавоноїдами сої. Проведені дослідження відкривають нові можливості для підвищення та регулювання адаптивних реакцій та продуктивності рослин пшениці за рахунок стимулювання та управління захисними системами рослин за допомогою біологічно активних речовин. Створення та застосування на основі представлених методик нових екологічно безпечних методів боротьби з фітопатогенами і підвищення стійкості до абіотичних екстремальних абіотичних чинників дозволить скоротити об'єм використання засобів хімічного захисту, вартість яких з кожним роком стає все більш дорогою, і як наслідок, це благотворно позначиться на збереженні чистоти довкілля та здоров'ї людини.

Таблиця 1. Вплив лектину на розвиток колоній грибів *Fusarium graminearum* та *Fusarium culmorum* (мм)

Патоген	Середній діаметр колонії		
	Контроль	Лектин 5мкг/мл	Лектин 10 мкг/мл
<i>Fusarium graminearum</i>	46± 0,5	38±0,2	33±0,3
<i>Fusarium culmorum</i>	52±0,6	36±0,3	28±0,2

Таблиця 2. Вплив лектину на розвиток проростків озимої пшениці та ярого ячменю

Варіант дослідження	Стойкі генотипи			Сприйнятливі генотипи		
	% проростання	Довжина надз.част. проростка см	Довжина кореня, см	Біомаса проростка мг	Довжина надз.част. проростка, см	Біомаса проростка мг
ОЗИМА ПШЕНИЦЯ						
Контроль	99,0 ± 1,0	8,1±0,7	8,7±1,1	64,0± 5,7	7,8±0,5	10,4±1,5
Лектин (5 мкг/мл)	100,0±2,3	8,7±0,9	8,8± 1,2	70,1±6,2	9,4±0,8	12,2±0,7
Лектин (10 мкг/мл)	100,0±3,1	10,2± 1,9	8,9± 0,9	81,1±6,5	8,4±0,5	11,0±0,9
ЯРИЙ ЯЧМЕНЬ						
Контроль	86,0±4,5	8,8± 1,4	10,6±1,6	134,9±7,5	10,4±1,3	11,3±1,4
Лектин (5 мкг/мл)	87,0± 2,3	8,9± 0,9	11,9±2,1	148,3±6,4	10,5± 0,6	11,2± 0,9
Лектин (10 мкг/мл)	88,0± 3,2	9,9±1,3	12,7±1,1	172,2±8,2	10,6± 0,7	11,8± 1,2
						82,2±6,7
						80,7±8,4
						84,9±7,1
						161,4±6,5
						162,6±5,2
						163,2±3,1

Таблиця 3. Вплив лектину на розвиток проростків озимої пшениці та ярого ячменю при зараженні фузаріозною інфекцією

Варіант досліду	Спійкі генотипи				Сприйнятливі генотипи			
	% проростання	Довжина надз.част. проростка см	Довжина кореня, см	Біомаса проростка, мг	% проростання	Довжина надз.част. проростка см	Довжина кореня, см	Біомаса проростка, мг.
		О З И М А			П Ш Е Н И Ц Я			
<i>F. graminearum</i>	61,0 ± 5,0	5,0 ± 1,6	4,2 ± 0,4	44,5 ± 6,6	51,32 ± 6,3	5,2 ± 0,2	4,4 ± 0,9	65,6 ± 5,3
<i>F. graminearum</i> + лектин (5мкг/мл)	68,3 ± 3,6	6,5 ± 1,8	4,8 ± 1,2	55,9 ± 3,9	53,0 ± 5,2	7,9 ± 0,2	6,4 ± 0,5	77,9 ± 7,8
<i>F. graminearum</i> + лектин (10 мкг/мл)	87,2 ± 4,1	5,1 ± 0,4	4,3 ± 0,5	50,8 ± 3,2	55,0 ± 6,3	5,3 ± 0,3	4,5 ± 0,3	69,4 ± 4,1
		Я Р И Й			Я Ч М І Н Ї			
<i>F. culmorum</i>	56,2 ± 5,2	8,3 ± 1,2	6,7 ± 1,1	122,4 ± 7,5	45,0 ± 5,9	8,0 ± 0,9	5,6 ± 0,6	119,2 ± 7,6
<i>F. culmorum</i> + лектин (5мкг/мл)	59,1 ± 4,7	10,3 ± 0,8	9,1 ± 0,2	164,5 ± 5,4	63,5 ± 6,5	8,1 ± 1,1	6,8 ± 0,2	119,8 ± 5,9
<i>F. culmorum</i> + лектин (10 мкг/мл)	62,3 ± 2,8	9,4 ± 1,9	6,8 ± 0,1	152,8 ± 6,8	57,5 ± 5,8	8,5 ± 1,4	6,4 ± 0,6	132,6 ± 8,1

Таблиця 4. Зміна активності інгібітора трипсину у різних за стійкістю генотипів зернових культур при введенні в середовище пророщування лектина (стійкі генотипи)

Варіанти досліду	Озима пшениця				Ярий ячмінь			
	контроль	лектин		<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> + лектин		контроль	<i>Fusarium</i>
		5 мкг/мл	10 мкг/мл		5 мкг/мл	10 мкг/мл		
Надземна частина проростків	0,160	0,226	0,223	0,297	0,346	0,282	0,195	0,250
% від контролю		141,2	139,4	185,5	216,2	176,8		0,203
Коріння	0,160	0,241	0,352	0,282	0,435	0,570	0,150	128,2
%		150,6	220,0	176,2	171,9	356,2	0,224	0,119
Сума	0,320	0,467	0,575	0,579	0,781	0,853	0,345	149,3
% від контролю		145,9	179,7	180,9	244,1	266,6	0,534	0,312
							173,3	137,4
							154,8	90,4
							102,3	

Примітка. Достовірно при р=0,05 (критична величина t=2,306 при n=5)

Таблиця 5. Зміна активності інгібітора трипсину у різних за стійкістю генотипів зернових культур при введенні в середовище пророщування лектина (сприйнятливі генотипи)

Варіанти досліду	Озима пшениця				Ярий ячмінь			
	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> + лектин	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> + Лектин
		5 мкг/мл	10 мкг/мл			5 мкг/мл	10 мкг/мл	
Надземна частина проростків	0,277	0,217	0,253	0,245	0,194	0,234	0,247	0,152
% від контролю		78,3	91,3	88,4		120,6	127,3	78,3
Коріння	0,246	0,200	0,150	0,233	0,138	0,111	0,087	0,052
%		81,3	61,0	94,7		80,4	63,4	37,7
Сума	0,523	0,417	0,403	0,478	0,332	0,345	0,333	0,204
% від контролю		79,7	77,0	91,4		103,9	100,3	61,4
Примітка. Достовірно при $p=0,05$ (критична величина $t=2,306$ при $n=5$)								

Таблиця 6. Зміна активності фенілаланінаміакліази та ендогенних лектинів у різних за стійкістю до фузаріозу генотипів зернових культур при введенні в середовище пророщування лектина (стійкі генотипи)

Варіанти досліду	Озима пшениця				Ярий ячмінь			
	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> + лектин (10мкг/мл)	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> + Лектин (10 мкг/мл)
		5 мкг/мл	10 мкг/мл			5 мкг/мл	10 мкг/мл	
Надземна частина проростків	0,043	0,114	0,254	0,312	0,364	0,250	0,427	0,667
Коріння	0,089	0,382	0,534	0,892	0,305	0,322	0,571	0,476
Сума	0,132	0,496	0,788	1,204	0,669	0,572	0,998	1,143
% від контролю		375,7	597,0	932,0		174,5	135,7	199,8
Надземна частина проростків	0,141	0,167	0,146	0,336	0,144	0,156	0,178	0,278
Коріння	0,043	0,050	0,183	0,067	0,409	0,083	0,153	0,125
Сума	0,184	0,217	0,325	0,403	0,553	0,239	0,331	0,403
% від контролю		117,9	176,6	219,0	300,0	138,5	109,6	168,6
Примітка. Достовірно при $p=0,05$ (критична величина $t=2,306$ при $n=5$)								

Таблиця 7. Зміна активності фенілаланінаміази та ендогенних лектинів у різних за стійкістю до фузаріозу генотипів зернових культур при введенні в середовище пророщування лектина (сприйнятливі генотипи)

Варіанти досліду	Озима пшениця				Ярий ячмінь					
	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> + лектин (10 мкг/мл)	Контроль	Лектин		<i>Fusarium</i> (10 мкг/мл)		
		5 мкг/мл	10 мкг/мл			5 мкг/мл	10 мкг/мл			
Лектинова активність (мкг/мг) ⁻¹										
Надземна частина проростків	0,198	0,417	0,699	0,344	0,606	0,196	0,725	0,394	0,199	0,502
Коріння	0,454	0,877	0,571	0,833	0,417	0,215	0,032	0,209	0,237	0,282
Сума	0,652	1,294	1,270	1,177	1,023	0,411	0,757	0,605	0,436	0,784
% від контролю		198,5	194,8	180,5	156,9		184,2	147,2	106,1	190,7
Активність фенілаланінаміази (ΔЕ/мг)										
Надземна частина проростків	0,399	0,245	0,210	0,290	0,348	0,158	0,194	0,238	0,263	0,195
Коріння	0,424	0,575	0,416	0,357	0,635	0,730	0,382	0,581	0,502	0,414
Сума	0,823	0,820	0,626	0,647	0,983	0,888	0,576	0,819	0,765	0,609
% від контролю		99,6	76,1	78,6	119,4		54,9	92,2	86,2	74,0

Таблиця 8. Активність розчинних лектинів в проростках пшениці за дії грибних патогенів та індукторів стійкості 1х10⁻² (мкг білка/мл)⁻¹

№	Лінія, сорт	Стійкість до фітозахворювань (польова оцінка)	Контроль			<i>Fusarium graminearum</i> <i>Alternaria alternata</i>			СК+ <i>Fusarium graminearum</i> <i>Alternaria alternata</i>		
			надз. част. проростків	коріння	надз. част. проростків	надз. част. проростків	коріння	коріння	надз. част. проростків	коріння	коріння
1	Егігроспермум 84/06	Стійкий до фузаріозу	3,8 ± 0,12	3,4 ± 0,14	4,4 ± 0,13	3,8 ± 0,08	5,1 ± 0,11	5,2 ± 0,08	5,1 ± 0,11	5,2 ± 0,08	
2	Ластівка одеська	Стійкий до фузаріозу	2,5 ± 0,13	1,9 ± 0,08	3,5 ± 0,11	2,5 ± 0,06	4,2 ± 0,11	4,5 ± 0,12	4,2 ± 0,11	4,5 ± 0,12	
3	Вихованка одеська	Стійкий до фузаріозу	4,2 ± 0,21	3,2 ± 0,17	6,4 ± 0,11	5,2 ± 0,07	6,1 ± 0,12	5,2 ± 0,05	5,1 ± 0,55	4,9 ± 0,23	
	Середнє		3,5 ± 0,51	2,8 ± 0,47	4,7 ± 0,85	3,8 ± 0,77	5,1 ± 0,55	4,9 ± 0,23	145,7	175,0	
	% від контролю				134,3	135,7			1,9 ± 0,03	3,0 ± 0,05	
4	Вікторія	Стійкий до альтернاریозу	1,5 ± 0,08	2,1 ± 0,07	1,9 ± 0,03	3,1 ± 0,08	4,9 ± 0,12	3,8 ± 1,2	4,9 ± 0,12	3,8 ± 1,2	
5	Ніконія	Стійкий до альтернاریозу	3,4 ± 0,12	2,9 ± 1,2	4,2 ± 0,11	3,9 ± 1,3	3,5 ± 0,40	3,4 ± 0,40	3,1 ± 1,15	3,4 ± 0,40	
	Середнє		2,4 ± 0,95	2,5 ± 0,40	3,1 ± 1,15	3,5 ± 0,40	3,4 ± 0,40	3,4 ± 0,40	141,6	136,0	
	% від контролю				129,2	140,0			2,8 ± 0,04	3,6 ± 0,03	
6	Ніконія	Сприйнятливий до фузаріозу	3,4 ± 0,12	2,9 ± 1,2	2,8 ± 0,04	1,8 ± 0,03	3,6 ± 0,03	3,3 ± 0,05	3,8 ± 0,06	2,8 ± 0,03	
7	Кузальник	Сприйнятливий до фузаріозу	2,7 ± 0,09	2,5 ± 0,11	2,1 ± 0,05	1,5 ± 0,02	2,1 ± 0,04	3,4 ± 0,03	2,1 ± 0,04	3,4 ± 0,03	
8	Одеська напівкарликова	Сприйнятливий до фузаріозу	1,6 ± 0,07	2,8 ± 0,06	1,2 ± 0,02	2,1 ± 0,02	1,8 ± 0,17	3,2 ± 0,18	128,0	118,5	
	Середнє		2,5 ± 0,52	2,7 ± 0,12	2,0 ± 0,46	1,8 ± 0,17	3,2 ± 0,53	3,2 ± 0,18	128,0	118,5	
	% від контролю				80,0	66,7			2,0 ± 0,09	3,3 ± 0,03	
	Одеська напівкарликова	Сприйнятливий до альтернاریозу	1,6 ± 0,07	2,8 ± 0,06	1,2 ± 0,01	1,9 ± 0,03	67,8	125,0	125,0	117,8	
	Середнє				75,0	67,8			125,0	117,8	
P ₁					<0,05	<0,05			<0,05	<0,05	
P ₂					< 0,05	<0,05			<0,05	<0,05	

P₁ – рівень значимості, при якому достовірно відрізняються середні дані за активністю лектинів у стійких та сприйнятливих до фузаріозу сортів та ліній пшениці
P₂ – рівень значимості, при якому достовірно відрізняються середні дані за активністю лектинів у стійких та сприйнятливих до альтернاریозу сортів та ліній пшениці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LCW 127 5	Контроль	480	480	44,5	49,2	4,57	3,85	44	49	45,12	46,32
	фаза 1,2 листа	420	450	44,7	48,9	4,83*	3,72	38	45	44,74	47,48*
	Кушння	460	390	41,4	51,5*	5,56*	3,17	43	38	42,20	52,08*
	перший флаговий лист	480	420	43,7	52,7*	4,62	3,42	44	42	42,26	40,32
	усі 3 фази	490	490	47,2*	51,7*	4,99*	5,04*	48*	49	46,16	46,96
Куяльник	Контроль	420	430	46,21	45,67	4,21	4,35	38	39	40,20	39,98
	фаза 1,2 листа	440	450*	52,59*	51,45*	5,25*	5,46*	42*	41*	40,82	41,43
	кушння	410	412	48,85*	49,43*	4,18	5,32*	41*	43*	40,57	42,23*
	перший флаговий лист	510*	525*	54,67*	48,34*	4,96*	5,21*	50*	51*	41,55*	43,55*
	усі 3 фази	530*	528*	50,32*	50,23*	4,56	5,12*	52*	52*	40,03	43,45*
Щедрість	Контроль	510	370	69,10	64,73	7,12	6,45	53	38	38,46	39,01
	фаза 1,2 листа	420	390*	65,14	63,72	7,03	6,03	41	39	36,57	39,75
	кушння	420	380	65,00	67,01*	6,78	6,60	45	36	40,62*	38,72
	перший флаговий лист	470	410*	67,42	62,46	6,83	5,71	51	43*	38,10	39,40
	усі 3 фази	510	410*	67,54	65,16	6,84	6,90*	55*	39	41,62*	41,65*
Снігова королева	Контроль	360	460	48,75	48,98	3,14	2,59	28	36	45,51	45,73
	фаза 1,2 листа	360	460	46,11	49,00	3,94	3,13	29	35	46,78	48,15*
	кушння	350	459	45,04	48,89	3,86	3,23*	30	36	46,42	48,26*
	перший флаговий лист	370	469	46,29	49,12	3,93	3,48*	29	36	47,68*	46,90
	усі 3 фази	380*	480*	49,21	52,12*	3,95	3,24*	29	37	47,34*	47,41*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Буревій	Контроль	210	330	46,19	51,72	4,00	4,36	16	22	47,55	48,20
	фаза 1,2 листа	220	335	49,29*	51,04	6,00*	4,68	15	25*	47,46	48,15
	кушння	210	340	57,95*	48,65	4,68	5,70*	21*	23	49,76*	48,26
	перший флаговий лист	230*	346*	54,00*	51,80	3,94	4,88	22*	27*	48,98*	48,08
	усі 3 фази	290*	340	52,72*	55,91*	4,58	4,55	24*	25*	48,56*	49,28*

Примітка: Розмір ділянок 1 м². Похибка досліду не перевищувала 4%.

* – відмінності між дослідом та контролем достовірні при P≤0,05

Таблиця 11. Активність інгібітора трипсину та лектинів в рослинах пшениці озимої м'якої та ячменю озимого в залежності від обробки біологічно активними речовинами

Сорти	Фази вегетації (обробка біологічно активними речовинами)	Активність інгібітора трипсину, г/кг				Активність лектинів, 1 x 10 ⁻³ (мкг/мл) ⁻¹			
		СК		лектин		СК		лектин	
		наземна частина	коріння	наземна частина	коріння	наземна частина	коріння	наземна частина	коріння
1	Житиння	2	3	4	5	6	7	8	9
		Контроль	0,12±0,001	0,08±0,0001	0,11±0,003	0,07±0,0002	0,03±0,0002	0,07±0,003	0,01 ± 0,0002
		фаза 1,2 листа	0,18±0,004*	0,12±0,0002*	0,21±0,002*	0,12±0,0003*	0,05±0,0002*	0,09±0,002*	0,03±0,0004*
		Кушніня	0,17±0,003*	0,14±0,0002*	0,25±0,004*	0,22±0,0005*	0,06±0,0003*	0,11±0,006*	0,05±0,0004*
		перший флаговий лист	0,18±0,004*	0,16±0,0003*	0,26±0,005*	0,24±0,0004*	0,08±0,0006*	0,15±0,007*	0,07±0,0004*
Беретиня	усі 3 фази	Контроль	0,21±0,0007*	0,25±0,0008*	0,31±0,006*	0,28±0,0005*	0,09±0,007*	0,18±0,008*	0,09±0,005*
		фаза 1,2 листа	0,16±0,0001	0,13±0,0005	0,15±0,003	0,14±0,002	0,32±0,002	0,75±0,003	0,13 ± 0,002
		Кушніня	0,15±0,0002	0,16±0,0003	0,17±0,004	0,19±0,006*	0,35±0,002	0,73±0,004	0,24 ± 0,003*
		перший флаговий й лист	0,19±0,0004	0,21±0,0005*	0,22±0,004*	0,18±0,003	0,64±0,007*	1,13±0,004*	0,94 ± 0,005*
		усі 3 фази	0,17±0,0003	0,18±0,0004*	0,21±0,0005*	0,19±0,004*	0,74±0,008*	1,33±0,005*	1,19 ± 0,002*
Мелодія	усі 3 фази	Контроль	0,22±0,0005*	0,23±0,0006*	0,24±0,005*	0,26±0,007*	0,84±0,007*	1,52±0,008*	2,19 ± 0,004*
		фаза 1,2 листа	0,09±0,0001	0,12±0,0004	0,11±0,002	0,13±0,0002	0,012±0,0002	0,032±0,0003	0,013 ± 0,0002
		Кушніня	0,17±0,0003*	0,15±0,0003	0,19±0,004*	0,12±0,0007	0,017±0,0003*	0,019±0,0005	0,019 ± 0,0004*
		перший флаговий лист	0,27±0,0004*	0,25±0,0005*	0,29±0,009*	0,22±0,0007	0,018±0,0005*	0,023±0,0006	0,022 ± 0,0007*
		усі 3 фази	0,18±0,0006*	0,23±0,0007*	0,19±0,005*	0,24±0,0007*	0,038±0,0006*	0,054±0,0007*	0,033 ± 0,0009*
LCW 1275	усі 3 фази	Контроль	0,28±0,003*	0,25±0,0006*	0,29±0,008*	0,29±0,0008*	0,048±0,0007*	0,055±0,0008*	0,05 ± 0,0009*
		фаза 1,2 листа	0,04±0,0005	0,17±0,0006	0,06±0,005	0,16±0,004	0,04±0,0002	0,03±0,0003	0,02 ± 0,0004
		Кушніня	0,06±0,0001	0,19±0,0004	0,11±0,002*	0,18±0,0002	0,05±0,0002	0,03±0,0004	0,03 ± 0,0002
		перший флаговий лист	0,11±0,0003*	0,22±0,0006*	0,19±0,004*	0,22±0,0007*	0,07±0,0003*	0,05±0,0005*	0,05 ± 0,0004*
		усі 3 фази	0,27±0,0004*	0,25±0,0005*	0,24±0,009*	0,24±0,0007*	0,08±0,0005*	0,06±0,0007*	0,06 ± 0,0007*
	усі 3 фази	Контроль	0,28±0,006*	0,29±0,0007*	0,29±0,005*	0,26±0,0007*	0,09±0,0006*	0,07±0,0007*	0,09 ± 0,0009*
		фаза 1,2 листа	0,09±0,0001	0,12±0,0004	0,11±0,002	0,13±0,0002	0,03±0,0002	0,07±0,003	0,02±0,0002
		Кушніня	0,13±0,004	0,15±0,0002	0,16±0,002*	0,18±0,0003*	0,06±0,0003*	0,09±0,005	0,04±0,0004*
		перший флаговий лист	0,17±0,003*	0,19±0,0002*	0,25±0,004*	0,22±0,0005*	0,06±0,0003*	0,11±0,006*	0,05±0,0004*
		усі 3 фази	0,18±0,004*	0,21±0,0005*	0,28±0,005*	0,24±0,0004*	0,08±0,0006*	0,15±0,007*	0,08±0,0004*
Шелрість	усі 3 фази	Контроль	0,21±0,0007*	0,15±0,0008	0,23±0,006*	0,18±0,005*	0,09±0,007*	0,18±0,008*	0,09±0,0005*
		фаза 1,2 листа	0,21±0,0007	0,15±0,0008	0,24±0,006	0,25±0,005	0,05±0,0007	0,09±0,0003	0,12±0,0004*
		Кушніня	0,26±0,0008	0,23±0,0005*	0,27±0,004	0,28±0,007	0,08±0,0002*	0,16±0,0004*	0,08±0,0003
		перший флаговий лист	0,29±0,0008*	0,28±0,0005*	0,29±0,004	0,28±0,003	0,09±0,0007*	0,23±0,0006*	0,34 ± 0,005*
		усі 3 фази	0,27±0,0003	0,28±0,0004*	0,31±0,005*	0,29±0,004	0,14±0,008*	0,33±0,005*	0,29 ± 0,003*
Снігова королева	усі 3 фази	Контроль	0,27±0,0004	0,12±0,0005	0,29±0,009	0,13±0,0007	0,011±0,0002	0,016±0,0006	0,012 ± 0,0007
		фаза 1,2 листа	0,28±0,0006	0,18±0,0007*	0,29±0,005	0,24±0,0007*	0,028±0,0006*	0,024±0,0007*	0,023 ± 0,0004*
		Кушніня	0,29±0,003	0,25±0,0006*	0,31±0,008	0,29±0,0008*	0,038±0,0007*	0,025±0,0008*	0,024 ± 0,0009*
		перший флаговий лист	0,31±0,0005	0,32±0,0006*	0,33±0,005	0,31±0,0007*	0,042±0,0002*	0,031±0,0003*	0,026 ± 0,0004*
		усі 3 фази	0,36±0,0004*	0,39±0,0004*	0,31±0,002	0,38±0,0002*	0,052±0,0002*	0,033±0,0004*	0,035 ± 0,0002*

Примітка: Розмір ділянок 1 м². * – відмінності між дослідом та контролем достовірні при P< 0,05

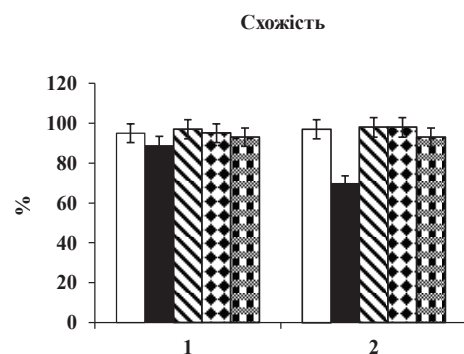
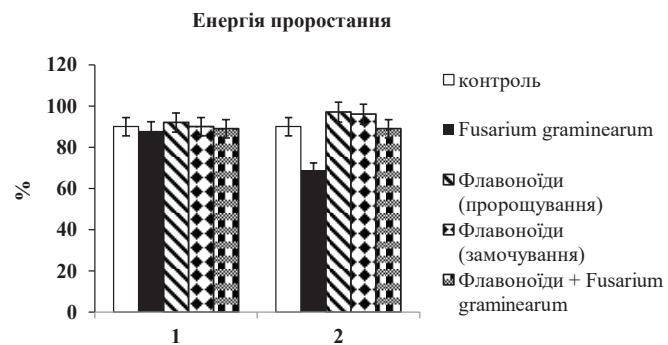


Рис. 1. Визначення енергії проростання та лабораторної схожості проростків пшениці за впливу флавоноїдів сої:
1 – сорт Ластівка одеська;
2 – сорт Ніконія одеська.

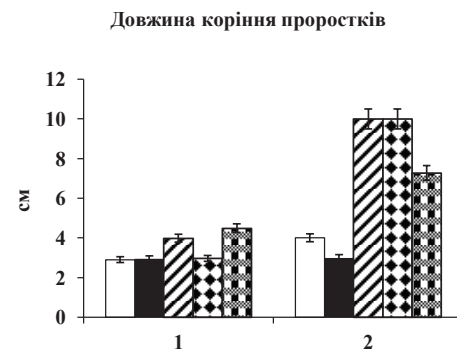
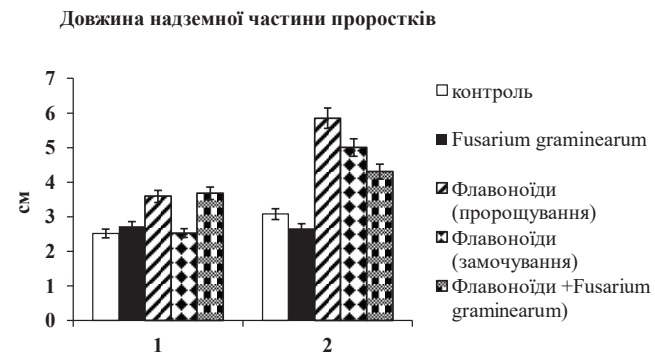


Рис. 2. Визначення довжини надземної частини та коренів проростків пшениці за впливу флавоноїдів сої:
1 – сорт Ластівка одеська;
2 – сорт Ніконія одеська.

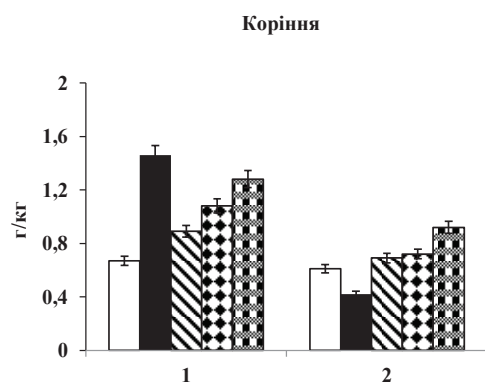
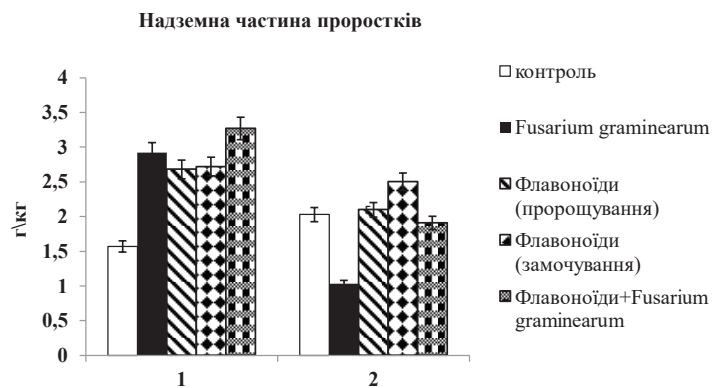


Рис. 3. Активність інгібітора трипсину в проростках пшениці за дії флавоноїдів сої:

1 – сорт Ластівка одеська;

2 – сорт Ніконія одеська.

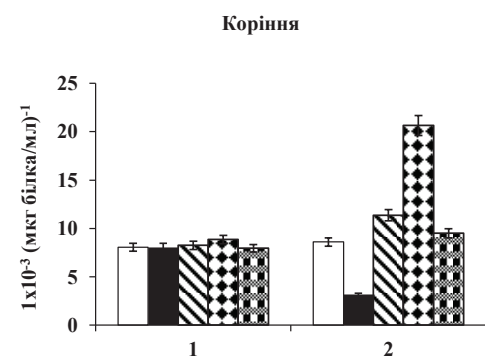
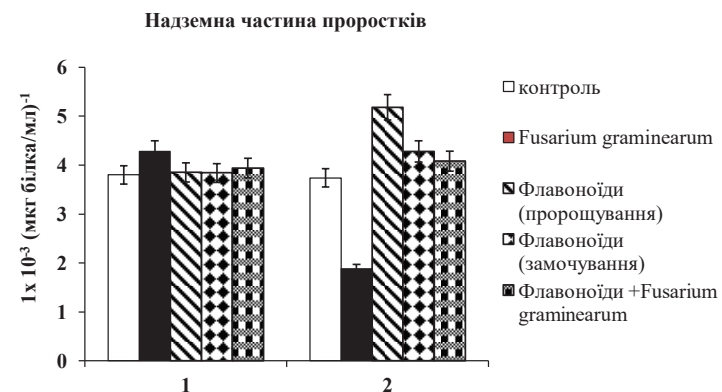


Рис. 4. Активність лектинів в проростках пшениці за дії флавоноїдів сої:

1 – сорт Ластівка одеська;

2 – сорт Ніконія одеська.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kaur S., Kumar S.M.K., Choudhary M., Choudhary M., Pandey A.K., Sharma A., Thakur J. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiol Mol Biol Plants*. 2022. Vol. 28(2). P. 485–504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>
2. Імунітет рослин . Євтушенко М.Д., Лісовий М.П., Пантелєєв В.К., Слюсаренко О.М.]. К. : Колобїг, 2004. 303 с.
3. Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F.A., Baenziger P.S., Börner A. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. *J Mol Sci*. 2019. Vol. 20. No.13. P. 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms20133137>. PMID: 31252573
4. Randhawa M.S., Pawan S.B., Huerta-Espino K.S.J., Singh R.P. Disease Resistance in Wheat: Present Status and Future Prospects. 2019. P. 61-81. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20728-1_4
5. Kolupaev, Yu., Karpets, Yu.V. Reactive oxygen species, antioxidants and plant resistance to influence of stressors. 2019. Kyiv: Logos, 277 p.
6. Ćerekovic N., Poltronieri P. Plant signaling pathways activating defence response and interfering mechanisms by pathogen effectors, protein decoys and bodyguards. *AIMS Molecular Science*. 2017. Vol. 4 (3). P. 370-388. <https://doi.org/10.3934/molsci.2017.3.370>
7. Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA, Sánchez-López EF, Sander VA, Ramos-Duarte VA, et al. Plant serine protease inhibitors: Biotechnology. Application in agriculture and molecular farming. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 1345. <https://doi.org/10.3390/ijms20061345>
8. Chen Y., Li F., Tian L., Huang M., Deng R., Li X., Chen W., Wu P., Li M., Jiang H., Wu G. The Phenylalanine ammonia lyase gene LjPAL1 is involved in plant defense responses to pathogens and plays diverse roles in *Lotus japonicus*-*Rhizobium* symbioses. *MPMI*. Vol. 30(9). P. 739- 753. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-17-0080-R>
9. Coelho L.C.B.B., Silva P.M.S., Oliveira W.F., Moura M.C., Pontual E.V., Gomes E.V., Paiva P.M.G., Napoleao T.H., Correia M.T.S. Lectins as antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol*. 2018. Vol. 125. P.1238–1252. <https://doi.org/10.1111/jam.140559>
10. Nykiel M., Gietler M., Fidler J., Prabucka B., Rybarczyk-Płońska A., Graska J., Boguszewska-Mańkowska D., Muszyńska E., Morkunas I., Labudda M. Signal transduction in cereal plants struggling with environmental stresses: from perception to response. *Plants*. 2022. Vol.11(8). P.1009. <https://doi.org/10.3390/plants11081009>
11. Chuanfu A., Zhonglin M. Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology*. 2011. Vol. 53(6). P. 412-428. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x>
12. Liu X., Rockett K.S., Kørner C.J., Pajerowska-Mukhtar K.M. Salicylic acid signalling: new insights and prospects at a quarter-century milestone. *Essays In Biochemistry*. 2015. Vol. 58. P.101-113. <https://doi.org/10.1042/bse0580101>
13. Mathesius U. Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. *Plants (Basel)*. 2018. Vol. 7(2): P. 30. <https://doi.org/10.3390/plants7020030>
14. Вовчук С.В. Спектрофотометричний метод визначення інгібітора трипсину за гідролізом БАПНА. *Збірник наукових праць СГІ*. 1979. С. 63-64.
15. Zucker M. Induction of phenylalanine ammonia lyase by light and its relation to chlorogenic acid in Potato Tuber Tissue. *Plant physiology*. 1965. Vol. 40(5). P. 779-784.
16. Поспелов С. В., Чеботарьова Л. В., Поспелова Г. Д., Корнієнко А. О. Оцінка біологічної активності фітолектинів пшениці озимої. *Вісник ПДАА*. 2019. № 4. С. 73–82. <https://doi.org/10.31210/visnyk2019.04.09>
17. Луцик М.Ф., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектини. Львів: Вища школа, 1981. 150с.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr F.L., Randall R.T. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Biol. Chem*. 1951. Vol. 193. P. 265-275.

Науково-виробниче видання

**МОЛОДЧЕНКОВА Ольга Олегівна
ЛИТВИНЕНКО Микола Антонович
БЕЗКРОВНА Лідія Яківна**

**ІНДУКУВАННЯ ПРОТЕКТОРНИХ
РЕАКЦІЙ РОСЛИН ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР
З ВИКОРИСТАННЯМ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

Методичні рекомендації

Надруковано з готового оригінал-макета
в авторській редакції

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*
Дизайнер обкладинки *О. А. Кунтарас*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 2,33.
Тираж 100 прим. Зам. № 495 (146).

Видавництво і друкарня «Астропринт»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21
Тел.: (0482) 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855
e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.

