

К ВОПРОСУ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГОРМОНОВ РОСТА В РАСТЕНИЯХ

И.Г. Бруй, Е.Л. Долгова, кандидаты с.-х. наук, **Е.В. Дунькович,**

В.В. Холодинский, кандидат с.-х. наук

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

(Поступила 20.04.2021)

Рецензент: Куликович Е.Н., кандидат с.-х. наук

***Аннотация.** Изучены различные способы фиксации растительного материала растений ярового ячменя при проведении анализов по определению содержания индолил-3-уксусной кислоты (ЗИУК) (теплый этанол, сушка, заморозка). Установлено, что способы фиксации существенно влияют на определяемое количество ЗИУК. Уточнена длина волны детектирования при определении гетероауксина и производного гибберелловой кислоты ГК₃ с использованием ВЭЖХ для спектрофотометрического детектора.*

Оценка содержания гормонов в растительном организме может быть проведена различными методами. В диссертационной работе П.Б. Курапова «Гормональный баланс растений. Методы его изучения и регулирования» разработана методика анализа содержания АБК (абсцизовой кислоты) и ГК в побегах яблони, затем она была расширена для определения цитокининов, ИУК и этилена [1]. При разработке и оценке точности этих методов использовались изотопно-меченые индикаторы.

Часто используемый на практике метод биотестирования, хотя и имеет определенные достоинства (высокая скорость, простота и доступность), но и обладает существенными недостатками (низкая воспроизводимость, отсутствие селективности по отдельным гормонам, приблизительность количественной оценки). Кроме того, методом биотестирования определяется не абсолютное их содержание, а только активность в данном биотесте [2]. Описанные в литературе методики анализа фитогормонов в растительных образцах методами ИФА, ВЭЖХ, ГЖХ и ГЖХ-МС требуют многостадийной предварительной очистки и концентрирования [3, 4]. Способ очистки во многом зависит от выбора объекта исследования и возможностей экспериментатора [5].

Многие известные методики анализов содержания фитогормонов из-за своей трудоемкости на стадиях выделения и концентрирования не пригодны для серийного анализа большого количества образцов [6].

Поэтому при разработке методики, пригодной для массовой оценки содержания эндогенных фитогормонов, мы не ставили целью их точного количественного определения в образцах. Целью была разработка методик, позволяющих сравнивать содержание индолил-3-уксусной кислоты (ЗИУК, ИУК) и производного гибберелловой кислоты (ГК₃) в большом количестве растительных проб при проведении обработок посевов регуляторами роста.

Из всех индольных соединений ауксинового ряда, обладающих биологической активностью, ЗИУК наиболее эффективна и присутствует в молодых побегах в больших концентрациях, чем другие фитогормоны. Она влияет на рост клетки в фазах растяжения, регулирует коррелятивный рост. В свою очередь, ГК₃ контролирует прорастание семян, удлинение стебля, переход к цветению и развитие органов цветка. Несомненным является изменение их содержания в растениях при применении рострегулирующих препаратов (ретардантов) в результате нарушения последовательностей реакций биосинтеза [7].

Цель работы заключалась в адаптации методик анализа содержания ЗИУК и ГК₃ в навеске растительного материала при проведении скрининговых исследований большого количества растительных образцов.

Методика и условия проведения исследований. Исследования проводились в отделе биохимии и биотехнологии и лаборатории регуляции роста и развития растений РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». В лабораторных условиях анализировали способы фиксации растительного материала и экстрагирования, проводили подбор оптимальной длины волны детектирования пиков хроматограмм и условий хроматографирования при проведении ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1260 со спектрофотометрическим детектором. Обработку результатов проводили в программной среде OpenLab. В полевых условиях исследовали 2 образца ярового ячменя *Рейдер* и *Адам*, которые обрабатывали ретардантами различного механизма действия.

Результаты исследований и обсуждение. Для определения оптимального способа фиксации растительного материала проводили подготовку проб растительных образцов тремя способами (рисунок 1):

- измельчение свежего материала с фиксацией 80 % этанолом;
- высушивание и измельчение растительного материала;
- замораживание с последующим измельчением и экстракцией.



Рисунок 1 – Способы фиксации растительного материала

Для выделения ЗИУК была предложена сокращенная методика без применения многоступенчатой очистки.

Пробоподготовка для определения гетероауксина включала следующие этапы:

- измельчение растительного материала и экстрагирование ИУК этанолом;
- 50 мл экстракта концентрировали с использованием роторного испарителя с последующим растворением в ацетонитриле в ультразвуковой бане.

Количественное определение ЗИУК проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 с УФ-детектором. Использовались колонка C_{18} 5мкм 4.0×250 мм. Длина волны детектирования – 222 нм. Скорость потока элюента – 0,75 мл/мин. Подвижная фаза – вода, ацетонитрил, 0,05 % трифторуксусная кислота (45:54:1 % об./об.). Объем вводимой пробы – 25 мкл. Температура термостата колонок – 30 °С.

Совершенствование методики предполагало обеспечить высокую селективность определения ЗИУК. Для этого было проведено уточнение длины волны детектирования. Сканирован спектр от 200 до 400 нм для раствора элюэнта и раствора стандартного образца ЗИУК в концентрации 50 мкг/л. Как видно из рисунка 2, в нулевом растворе наблюдается 2 пика на длинах волн 281 и 338 нм, на длине волны 273 нм отчетливо выражен пик для ЗИУК, отсутствующий в растворе элюэнта. Таким образом, было принято решение о смене длины волны с 222 нм на 273 нм при хроматографировании опытных образцов.

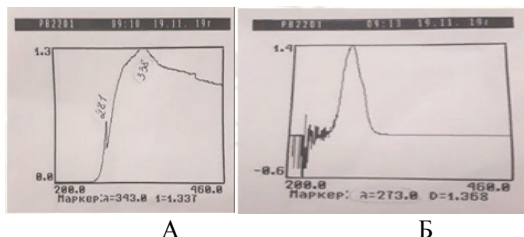


Рисунок 2 – Кривые поглощения нулевого раствора (А) и стандарта ЗИУК (Б) на участке спектра от 200 до 460 нм (сканирование проведено на UV/VIS спектрофотометре Solar 2201)

При хроматографировании стандартного раствора ЗИУК с новыми условиями проведения анализа на хроматограмме детектируется 4 пика (рисунок 3).

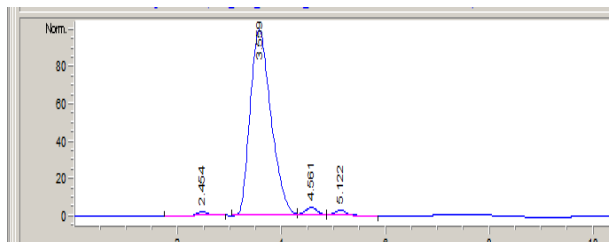


Рисунок 3 – Хроматограмма стандартного раствора ЗИУК концентрации 50 мкг/л

За характерный нами принят основной пик наибольшей площади, минорные пики, могут свидетельствовать о наличии изоформ ИУК в исследуемом растворе.

Дальнейшие исследования были направлены на определение содержания в отобранных растительных образцах гибберелловой кислоты (GK_3). Для уточ-

нения длины волны детектирования ГК₃ нами было проведено сканирование стандартного раствора в интервале от 190 до 220 нм. Определено, что специфический пик наблюдается при λ 208 нм (рисунок 4).

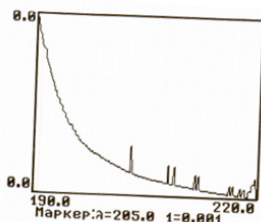


Рисунок 4 – Кривая изменения оптической плотности стандартного раствора ГБ₃ на участке спектра от 190 до 220 нм

Для определения ГК₃ навеску отбирали массой 20 г, объем экстрагирующего раствора этанола составил 80 мл. Таким образом, условия хроматографирования имели вид: колонка C18 5 мкм 4.0 × 250 мм. Длина волны детектирования 208 нм, скорость потока элюента – 0,75 мл/мин. Подвижная фаза – вода/ацетонитрил (50/50). Объем вводимой пробы 5 мкл. Температура термостата колонок 30 °С. Время анализа 12 минут.

В полевых условиях был заложен опыт на двух сортах ярового ячменя **Рейдер** и *Адам*, который обрабатывали ретардантами различного механизма действия на основе прогексадиона Са, тринексапак-этила, влияющих на синтез, а так же активность собственных растительных гормонов. На второй и пятый дни были отобраны растительные образцы и проведены лабораторные анализы по определению содержания в них ИУК при различных вариантах фиксации и подготовки проб.

Таблица – Содержание ИУК в образцах зеленой массы ярового ячменя нг/г сухого вещества

Образец	Тип фиксации образца подготовки пробы		
	Фиксация 80 % теплым этанолом зеленой массы с последующей экстракцией	Фиксация заморозкой, с последующей экстракцией этанолом	Фиксация высушиванием в сушильных шкафах с последующей экстракцией этанолом
АВ	1286±260	966±193	595±119
КА	1054±210	890±178	357±71
АМ	1130±226	923±184	670±134
Среднее	1156,7	926,3	540,7
КО	984±196	744±149	235±47
КС	870±174	623±125	242±48
РЕ	930±186	784±157	147±29
МЕ	765±153	540±108	361±72
АД	698±134	571±114	139±28
Среднее	849,4	576,0	224,8

Из приведенных в таблице данных видно, что в лабораторном опыте не удалось достичь воспроизводимых результатов при одинаковых условиях экстракции, но с применением разных способов фиксации материала.

Наиболее достоверные результаты, на наш взгляд, были получены при применении фиксации и последующей экстракции в 80 % теплом этаноле. В качестве заморозки нами были применены низкотемпературные морозильные камеры, однако отсутствовала стадия фиксации в жидком азоте, что тоже повлияло на воспроизводимость результатов. Фиксация высокой температурой оказалась неприемлемой из-за вероятного разрушения целевых веществ.

Выводы

Для анализа гетероауксина в растительном материале ярового ячменя, можно использовать два способа фиксации:

- отбор наземной части растений по диагонали делянки, быстрое (в течение 10 минут) измельчение, затем отбор средней пробы массой 20 грамм в четырех-пяти повторностях и *фиксация 80% этанолом*;

- отбор наземной части растений по диагонали делянки, плотная упаковка в полиэтиленовые пакеты, дальнейшая *заморозка и хранение при температуре 15-20 °С*. При проведении анализа замороженная растительная масса быстро измельчается, производится отбор средней пробы массой 20 грамм в четырех-пяти повторностях и фиксируется 80 % этанолом.

Способ пробоподготовки не оказывает существенного влияния на положение пиков хроматограммы, однако существенно изменяет определяемое количество фитогормонов. Колебание содержания ЗИУК в растительных образцах ярового ячменя в зависимости от примененного регулятора роста при фиксации 80 % этанолом составило от 1286±260 до 698±134 нг/г сухого вещества.

Использование предлагаемой методики хроматографического определения содержания ЗИУК в растительных образцах ячменя при использовании для детектирования длины волны 273 нм позволяет получить дифференцированный и четко идентифицируемый пик.

Литература

1. *Курапов, П.Б.* Гормональный баланс растений методы его изучения и регулирования : автореферат дис. ... докт. биол. наук : 03.00.12 / П.Б. Курапов; Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева. – М., 1996. – 49 с.
2. *Кефели, В.И.* Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале / В.И. Кефели [и др.] // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. – М. 1973. – С. 7-21.
3. *Савчук, А.Л.* Иммунохимический анализ brassinosteroidов: разработка методологии, синтез аналитических компонентов, прикладные аспекты : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / А.Л. Савчук; Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2016. – 27 с.
4. Методы определения фитогормонов: твердофазный иммуноферментный анализ абсцизовой кислоты, ауксинов и цитокининов / Составитель Р.А. Борзенкова // Учебное пособие. – Екатеринбург: ИПЦ «Издательство УрГУ», 2006. – 43 с.

5. Кефели, В.И. Газохроматографическое определение абсцизовой и индолил-3-уксусной кислоты в растительных тканях / В.И. Кефели, Е.Н. Кислин // Физиология растений. 1982. – Т. 29, вып. 2 – С. 407-413.

6. Рудиковский, А.В. Сравнительный анализ содержания индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в побегах карликовой и высокорослой форм яблони сибирской в природных условиях и при интродукции / А.В. Рудиковский [и др.] // Известия Иркутского государственного университета – 2013. – Т. 6, №2. – С. 34-42.

7. Дитченко Т.И. Учебно-методический комплекс по учебной дисциплине: «Рост, развитие и основы биотехнологии растений» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/106310/1/umk_tgrobr.pdf. – Дата доступа: 20.04.2021.

ON THE PROBLEM OF IMPROVING THE METHODOLOGY FOR IDENTIFYING GROWTH HARMONES IN PLANTS

I.G. Brui, E.L. Dolgova, E.V. Dunkovich, V.V. Kholodinsky

Different methods of fixing plant material of spring barley were studied while conducting analyses to determine the content of 3-indoleacetic acid (warm ethanol, drying, freezing). It was established that the methods of fixation affected greatly the number of 3-indoleacetic acid to be determined. Wave detection length was defined more precisely while identifying heteroauxin and gibberelic acid CA₃ with the use of HPLC (high performance liquid chromatography) for spectrophotometric detector.

УДК 633.16:581.19

СОДЕРЖАНИЕ 3-ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ И ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТ В РАСТЕНИЯХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ В ТЕЧЕНИЕ ВЕГЕТАЦИИ

И.Г. Бруй, Е.Л. Долгова, кандидаты с.-х. наук

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

(Поступила 20.04.2021)

Рецензент: Шишлова Н.П., кандидат биол. наук

Аннотация. В статье представлены результаты оценки уровня гормонов в растениях ярового ячменя трех сортов – Магутны, Рейдер и Адаман. Установлено влияние регуляторов роста Мессидор, Моддус и Серон на количество 3-индолилуксусной и гибберелловой кислот в растениях ячменя в период выхода растений в трубку.

Решая прикладные задачи в растениеводстве с помощью биологически активных веществ необходимо основываться на знаниях механизмов и специфичности действия этих веществ на определенные системы регуляции, характерные для состояния растительного организма в зависимости от этапа его онтогенетического развития. К веществам, изменяющим рост и развитие, относятся химические соединения, которые в малых количествах способны вызывать заметное изменение интенсивности биохимических процессов в растении. Особый интерес представляет группа биологически активных соединений, которые управляют процессами растяжения и формирования клеточной стенки растений, изменяют ее архитектуру, физико-химические и механические свойства. Под