



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85040 (13) C2

(51) МПК (2006)

A01G 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВПЛИВУ КСЕНОБІОТИКІВ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИН

1

2

(21) 20041008526

(22) 20.10.2004

(24) 25.12.2008

(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.

(72) ФЕДЕНКО ВОЛОДИМИР САВЕЛІЙОВИЧ, UA,
СТРУЖКО ВІКТОР СТЕПАНОВИЧ, UA(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, UA

(56) UA A69627, 15.09.2004

(57) Спосіб диференційної діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин, що включає вирощування рослин в присутності та відсутності дії стресового фактора, підготовку рослинного препарату до аналізу та визначення стійкості рослин за вмістом антиоксидантів, який **відрізняється** тим, що проводять спиртову екстракцію коренів дослідних та контрольних рослин, встановлюють вміст спирторозчинних антиоксидантів фенольного типу, періодичну зміну нагромадження яких залежно від дози ксенобіотика визначають за виразом

$$y = f_0 + A_c \cdot \sin \left(\varphi_0 + \frac{2\pi \cdot C}{K_0 + K \cdot C} \right),$$

де y - вміст антиоксидантів фенольного типу, ммоль/г сухої речовини або % до контролю;

f_0 - базова функція;

A_c - найбільше відхилення встановленого значення вмісту антиоксидантів фенольного типу від обчисленого згідно з базовою функцією f_0 , ммоль/г сухої речовини або % до контролю;

φ_0 - початкова фаза коливальності;

C - концентрація ксенобіотика у середовищі проростання, ммоль/л або мг/л;

K_0, K - коефіцієнти,

у разі однакової спрямованості базової функції f_0 порівнюють значення K для різних ксенобіотиків і при зменшенні цього показника визначають підсилення токсичного впливу ксенобіотика на рослини.

Винахід стосується рослинництва, а саме вирощування рослин в умовах дії ксенобіотиків.

Спосіб може бути використаний для диференційної оцінки токсичного впливу різних ксенобіотиків, що зменшують продуктивність рослин, оскільки знижують їх адаптивні можливості, які пов'язані з функціонуванням системи антиоксидантного захисту.

Відомий спосіб діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин, згідно з яким оцінку проводять за вмістом глутатіону [1].

До причин, що перешкоджають спрощенню та скороченню тривалості процедур пробопідготовки і аналізу слід віднести необхідність попереднього отримання похідних глутатіону при обробці спеціальними реагентами, а також складність аналітичних прийомів з використанням високоефективної рідинної хроматографії із спектрофлуориметричною детекцією. Крім того, спосіб не дає можливості проведення діагностики стійкості рослин в діапазоні токсичних доз ксенобіотика.

Найбільш близьким до об'єкта, що заявляється, є спосіб діагностики впливу стресового фактора на стійкість рослин [2], який включає вирощування тест-рослин в присутності та відсутності дії стресового фактора, підготовку рослинного препарату до аналізу та визначення стійкості рослин за вмістом антиоксидантів.

Відомий спосіб передбачає, що після вирощування рослин проводили відбір листя контрольних та дослідних рослин щодоби протягом 4 діб, розтирали наважку листя з рідким азотом до порошкоподібного стану та переносили у воду. Визначення вмісту водорозчинних антиоксидантів сульфгідрильного типу у зразках проводили після додавання реагентів (4% розчин сульфосаліцилової кислоти, 5% розчин KI, 1% розчин крохмалю) з наступним титруванням 0,001н розчином KIO_3 . Розраховували різницю вмісту антиоксидантів у зразках дослідних рослин відносно контрольних і на основі змін цього показника проводили діагностику стійкості рослин до дії стресового фактора.

(13) C2

(11) 85040

(19) UA

Операція підготовки рослинного препарату з використанням рідкого азоту відзначається складністю. Визначення вмісту антиоксидантів потребує застосування набору хімічних реагентів. Необхідність аналізу показника 4 рази протягом 4 діб підвищує тривалість процесу діагностики. Крім того, проведення діагностики при одній дозі стресового фактора встановлює стійкість рослин саме для цієї дози, що не дозволяє проводити диференційну оцінку впливу різних стресових факторів в діапазоні діючих доз.

В основу винаходу поставлено задачу у способі диференційної діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин шляхом виключення прийому гомогенізації рослинного зразка у рідкому азоті в операції підготовки препарату, проведення спиртової екстракції коренів, виключення прийому обробки екстракту аналітичними реагентами, одночасового встановлення змін вмісту антиоксидантів фенольного типу в тест-рослинах в діапазоні діючих доз стресового фактора за параметрами власного поглинання рослинного екстракту забезпечити спрощення та скорочення тривалості процедур підготовки препарату до аналізу і виміру діагностичного показника.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі диференційної діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин, який включає вирощування рослин в присутності та відсутності дії стресового фактора, підготовку рослинного препарату до аналізу та визначення стійкості рослин за вмістом антиоксидантів згідно з винаходом проводять спиртову екстракцію коренів дослідних та контрольних рослин, встановлюють вміст спирторозчинних антиоксидантів фенольного типу, періодичну зміну нагромадження яких залежно від дози ксенобіотика визначають за виразом

$$y = f_0 + A_c \cdot \sin\left(\varphi_0 + \frac{2\pi \cdot C}{K_0 + K \cdot C}\right),$$

де y - вміст антиоксидантів фенольного типу, ммоль/г сухої речовини або % до контролю;

f_0 - базова функція;

A_c - найбільше відхилення встановленого значення вмісту антиоксидантів фенольного типу від обчисленого згідно базової функції f_0 , ммоль/г сухої речовини або % до контролю;

φ_0 - початкова фаза коливальності;

C - концентрація ксенобіотика у середовищі проростання, ммоль/л або мг/л;

K_0, K - коефіцієнти;

у разі однакової спрямованості базової функції f_0 порівнюють значення K для різних ксенобіотиків і при зменшенні цього показника визначають підсилення токсичного впливу ксенобіотика на рослини.

Спосіб базується на загальній закономірності: реакції живих організмів на дію несприятливих умов середовища можуть мати ефект стимуляції або пригнічення залежно від дози стрес-фактора, що призводить до періодичного характеру адаптивних змін. Терміном "базова функція" позначена залежність, яка задає спрямованість змін (наприклад, лінійна залежність $y=a+bx$ або поліном другого ступеню $y=a+bx+cx^2$). Дослідними рослинами

вважають рослини, які вирощені при дії ксенобіотика, а контрольними рослинами - рослини, які вирощені при відсутності такої дії.

Підготовка препарату до аналізу не потребує додаткового прийому гомогенізації з використанням рідкого азоту. Додаткова обробка екстракту аналітичними реагентами стає непотрібною, оскільки аналіз проводять за власними спектральними характеристиками спирторозчинних антиоксидантів фенольного типу в екстракті. Діагностичний показник визначають одноразово, а встановлення його залежності від концентрації ксенобіотика згідно математичного виразу дозволяє порівнювати вплив різних ксенобіотиків в діапазоні діючих доз замість оцінки фізіологічного стану рослин при певній дозі одного стрес-фактора. Внаслідок цього забезпечується спрощення та скорочення тривалості процедур підготовки препарату до аналізу і виміру діагностичного показника.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином.

Одночасно пророщують насіння дослідних рослин на живильних розчинах з різною концентрацією ксенобіотика і контрольних рослин при відсутності такої дії. Проводять відбір коренів рослин і висушують зразки. Отримують спиртовий екстракт коренів, визначають на спектрофотометрі оптичну густину екстракту при аналітичному значенні довжини хвилі встановлюють вміст антиоксидантів фенольного типу у рослинному препараті. На основі цих даних визначають вид базової функції f_0 і значення A_c , φ_0 , K_0 , K у математичному виразі. В разі однакової спрямованості базової функції f_0 порівнюють значення K для різних ксенобіотиків і при зменшенні цього показника визначають підсилення токсичного впливу ксенобіотика на рослини.

Приклад 1. Для визначення диференційної діагностики впливу важких металів (свинець та кадмій) на стійкість рослин пророщували насіння кукурудзи (гібрид Дніпровський 284МВ) в рулонах фільтрувального паперу на розчинах з різною концентрацією нітратів свинцю та кадмію ($2,5 \div 100 \cdot 10^{-5}$ моль/л), а також воді (контроль) при однаковій кількості тест-рослин ($n=25$) та об'ємі живильного середовища в усіх варіантах (200мл). По завершенні біотестування (10 діб) проводили відбір зразків коренів. Вміст антиоксидантів фенольного типу (ммоль/г сухої речовини) визначали відомим методом після екстракції сухих коренів 80% ізопропанолом та виміру оптичної густини екстракту при 260нм на спектрофотометрі ДУ-7. На основі отриманих результатів встановили, що базова функція має вигляд лінійної залежності однакової спрямованості. Періодична зміна нагромадження антиоксидантів залежно від діючої дози свинцю визначали за виразом

$$y = 131,7 - 0,06 \cdot C + 34,0 \cdot \sin\left(22 + \frac{2\pi \cdot C}{17,0 + 0,68 \cdot C}\right);$$

коефіцієнт кореляції між експериментальними та обчисленими значеннями $r=0,93$, $p=0,001$. Аналогічна залежність для кадмію мала вигляд

$$y = 142,5 - 0,27 \cdot C + 20,0 \cdot \sin\left(2,0 + \frac{2\pi \cdot C}{10,0 + 0,38 \cdot C}\right)$$

($r=0,88$, $p=0,001$).

Для підтвердження змін фізіологічного стану рослин паралельно визначали загальноприйнятий показник - індекс толерантності (приріст головного кореня дослідних рослин відносно контролю, %).

Зниження коефіцієнта К для кадмію (0,38) порівняно із свинцем (0,62) співпадало з більш значним пригніченням життєдіяльності рослин за індексом толерантності: $10 \cdot 10^{-5}$ моль/л - 47,2% (Cd^{2+}), 76,6% (Pb^{2+}); $100 \cdot 10^{-5}$ моль/л - 23,7% (Cd^{2+}), 34,6% (Pb^{2+}).

Приклад 2. Аналогічно прикладу 1 порівнювали вплив на рослини кукурудзи (гібрид Дніпровський 284МВ) гербіцидів трофі (діюча речовина - ацетохлор) та крос (діюча речовина - хлорсульфурон та хлорсульфоксим) в діапазоні концентрацій $2,5 \div 100$ мг/л (в розрахунку на діючу речовину). Згідно експериментальних результатів за базову функцію визначено поліном другого ступеня з однаковою спрямованістю. Періодична зміна нагромадження антиоксидантів (% до контролю) залежно від концентрації трофі визначалась за виразом

$$y = 100 + 0,834 \cdot C - 0,0031 \cdot C^2 + 17,7 \sin\left(\frac{2\pi \cdot C}{22,85 + 0,76 \cdot C}\right)$$

($r=0,98$, $p=0,001$).

Аналогічна залежність для кросу мала вигляд

$$y = 107,1 + 0,395 \cdot C - 0,0045 \cdot C^2 + 7,1 \sin\left(1,57 + \frac{2\pi \cdot C}{6,3 + 0,38 \cdot C}\right)$$

($r=0,95$, $p=0,001$).

В обраному діапазоні концентрацій спостерігалось посилення токсичного впливу ксенобіотиків на рослини при зростанні їх дози, однак ступінь цього ефекту суттєво різнився. Величина індексу толерантності рослин для трофі знижувалось в інтервалі значень $78,4 \div 38,9\%$, а для кросу $32,0 \div 11,7\%$, що підтверджувалось зменшенням значення коефіцієнту К: 0,76 (трофі) та 0,38 (крос).

Таким чином, наведені приклади підтверджують, що при здійсненні заявленого способу досягнуто спрощення та скорочення тривалості процедур підготовки препаратів до аналізу і виміру діагностичного показника для диференційної оцінки токсичного впливу різних ксенобіотиків на стійкість рослин.

Джерела інформації

1. Gulner G., Kömives T., Rennenberg H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides // J. Exp. Bot. - 2001. - V.52, N358. - P. 971-979.
2. А.с. СРСР №1507254, МКВ⁴ А01G7/00, 1989.