

НІЩЕНКО Л. В. ✉, САХНО Л. О.

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: 10lesya0916@gmail.com

✉ 10lesya0916@gmail.com, (097) 639-11-67

**ОЦІНКА ДЕЯКИХ ФІЗІОЛОГІЧНИХ І БІОХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ПРОРОСТКІВ
РИЖІЮ (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) ЗА УМОВ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ**

Мета. З метою пошуку найбільш стійкого до посухи генотипу ярого рижію (*Camelina sativa* (L.) Crantz) і подальшого його залучення в експерименти з генетичної трансформації було досліджено деякі фізіолого-біохімічні параметри проростків за нормальних умов та за осмотичного стресу *in vitro*. **Методи.** Стерильне насіння пророщувалося на агаризованому безгормональному середовищі Мурасиге-Скуга або на середовищах того ж складу із манітолом як індуктором осмотичного стресу. У 7-добових проростків оцінювали схожість, накопичення сирової маси, вміст сумарного розчинного білка та активність супероксиддисмутази (СОД). **Результати.** Досліджувані генотипи рижію по-різному реагували на водний дефіцит в умовах *in vitro*. Виявлено, що за умов осмотичного стресу у форми ФЕОРЖЯФ-1 вища в порівнянні з іншими сортами активність СОД поєднувалась із кращою схожістю насіння та здатністю до накопичення більшої сирової маси. **Висновки.** Селекційну форму ФЕОРЖЯФ-1 можна залучати у подальші експерименти з генетичної трансформації для покращення посухостійкості. Активність СОД доцільно використовувати як параметр для відбору стійкого до осмотичного стресу рослинного матеріалу.

Ключові слова: *Camelina sativa* (L.) Crantz, посухостійкість, сумарний розчинний білок, супероксиддисмутаза.

Протягом останніх десятиліть в Україні спостерігається зміна кліматичного циклу у бік збільшення періодичності та тривалості посушливих періодів, а також нерівномірний розподіл опадів, які мають зливовий характер і не забезпечують ефективного накопичення вологи в ґрунті у весняно-літній період. Під час водного дефіциту (посухи) рослини піддаються осмотичному стресу. Посухи, особливо у поєднанні з дією підвищених температур, є головною причиною коливань валових зборів урожаю сільськогосподарських культур, зокрема олійних [1].

Здатність цих культур протистояти стресам впливає на ріст рослин, якість урожаю та жирнокислотний склад олії у насінні. У зв'язку з цим виникає необхідність пошуку та створення більш стійких до дії несприятливих факторів середовища генотипів олійних рослин. Найбільш ефективним підходом для їх створення є поєднання методів традиційної селекції та трансгенезу [2].

Вибір вихідного матеріалу та критеріїв його оцінки значною мірою забезпечують успішність досліджень. Стан рослин за умов, що змінюються, характеризують багато параметрів. Схожість насіння і здатність до накопичення біомаси проростками є вирішальними фізіологічними реакціями для росту і розвитку рослин. Вміст сумарного розчинного білка (СРБ) та активність ферментів антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази (СОД), є важливими як за переходу від однієї стадії розвитку до іншої, так і під час протидії стресам [3–4]. Крім того, відомо, що активність СОД позитивно корелює зі стійкістю рослин до водного дефіциту та сольового стресу [5–6]. Водночас з'ясовано, що підвищена активність СОД, детектована для рослин, які культивувалися в асептичних умовах, залишається характерною для них і за польових досліджень [7]. Тому доцільним може бути попередній відбір рослинного матеріалу з підвищеною активністю СОД *in vitro* для залучення в подальші експерименти з трансгенезу для отримання рослин, здатних формувати більшу біомасу і врожай насіння за дії стресів, зокрема осмотичного.

На сьогодні однією з перспективних олійних культур є рижій посівний (*Camelina sativa* (L.) Crantz) з родини *Brassicaceae* (*Cruciferae*). Насіння рижію містить до 43 % олії, яка стала альтернативним джерелом для виробництва авіаційного біопалива. Встановлено, що виробництво та використання біопалива з насіння рижію зменшує викиди парникових газів на 75 % у порівнянні з використанням нафтопро-

дуктів [8-9] та має мінімальний вплив на виробництво продуктів харчування.

Отже, завданням роботи була оцінка деяких фізіолого-біохімічних показників рослин рижю з метою відбору генотипу, який можна було б задіяти в запланованих експериментах із генетичної трансформації для отримання рослин із підвищеною посухостійкістю. Серед параметрів, що вивчалися, були схожість, накопичення сирої маси та СРБ, а також активність СОД як за осмотичного стресу, так і без нього за культивування *in vitro*. Слід зазначити, що дані з біохімічних досліджень рижю *in vitro* практично відсутні.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал та умови росту. Як вихідний матеріал для дослідження використовували насіння ярого рижю сортів Клондайк і Євро-12 та селекційної форми ФЕОРЖЯФ-1 із колекції Національного ботанічного саду (НБС) ім. М. М. Гришка НАН України (люб'язно надано д. с.-г. н. Д. Б. Рахметовим). Оригіном сорту Клондайк є Національний науковий центр «Інститут землеробства Української академії аграрних наук», сорту Євро-12 – НБС НАН України [10]. Селекційна форма ФЕОРЖЯФ-1 створена у відділі нових культур НБС НАН України [11]. Насіння стерилізували, занурюючи послідовно на 1 хв у 70 % етанол та 5–6 хв у 5% розчин гіпохлориту натрію, після чого 4 рази промивали дистильованою водою. По 15 насінин висаджували у чашки Петрі на безгормональне агаризоване середовище Мурасиге-Скуга (MS) [12] (нормальні умови) та на середовище MS з додаванням манітолу в концентрації 100 мМ або 200 мМ (моделювання осмотичного стресу). Проростання насіння відбувалося в термостаті в темряві за 24°C протягом 7 діб (рис. 1).

Біохімічні аналізи. Верхівки проростків (котиледони з прилеглою частиною гіпокотила) загальною масою 100 мг поміщали в мікропробірки Eppendorf (1,5 мл) та розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (4°C, рН 8,0), потім центрифугували за 14000g (4°C) протягом 15 хв двічі. Рідину над осадом використовували для аналізу вмісту СРБ і активності СОД.

Вміст СРБ оцінювали за методом Бредфорда [13]. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer 6131 (Eppendorf) за довжини хвилі 595 нм. Як внутрішній стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Визначення активності СОД проводили з використанням методу фотохімічного окиснення нітроблакитного театразолію. (НБТ) [14]. Реакцію з НБТ проводили в мікропробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалась із 20 мкл рослинного екстракту, 540 мкл буфера, 130 мкл 65 мМ метіоніну, 47 мкл 0,63 мМ НБТ та 12,5 мкл 1мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, інші три освітлювали протягом 4 хв лампою білого світла. Вимірювали поглинання світла за 562 нм реакційною сумішшю, витриманою на світлі, проти поглинання світла пробою, витриманою в темряві, на фотометрі BioPhotometer 6131 (Eppendorf).

Статистичний аналіз. Експерименти проводили тричі в трьох аналітичних повторях. У ході визначення активності СОД аналітичних повторів було 9. Середнє значення, стандартне відхилення, довірчий інтервал і *t*-критерій Стьюдента для статистичної значущості були розраховані з використанням стандартних функцій Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation).

Результати та обговорення

Сорти рижю Євро-12, Клондайк та селекційна форма ФЕОРЖЯФ-1 різнилися між собою за схожістю насіння за нормальних умов вирощування (рис.2 А). Додавання манітолу в середовище для пророщування в концентрації 100 мМ не знижувало схожість, при цьому схожість насіння ФЕОРЖЯФ-1 була вищою, ніж у інших зразків. Достовірну різницю за цим параметром мали сорти Клондайк і Євро-12 за концентрації манітолу 200 мМ (зниження на 18 % та 12 % відповідно). Також слід зазначити, що форма ФЕОРЖЯФ-1 мала високу схожість за обох концентрацій манітолу (до 98 %), вона достовірно не відрізнялася від такої за контрольних умов.

Осмотичний стрес негативно впливав на фізіолого-біохімічні показники, що вивчалися, у всіх генотипів рижю.

За накопиченням сирої маси за нормальних умов виділялися проростки ФЕОРЖЯФ-1 (рис. 2Б). Ці рослини накопичували на 17–19 % більшу сирю масу порівняно з іншими. Було детектовано, що сира маса знижувалась у всіх зразків на 22–39 % за концентрації манітолу 100 мМ у порівнянні з нормальними умовами.

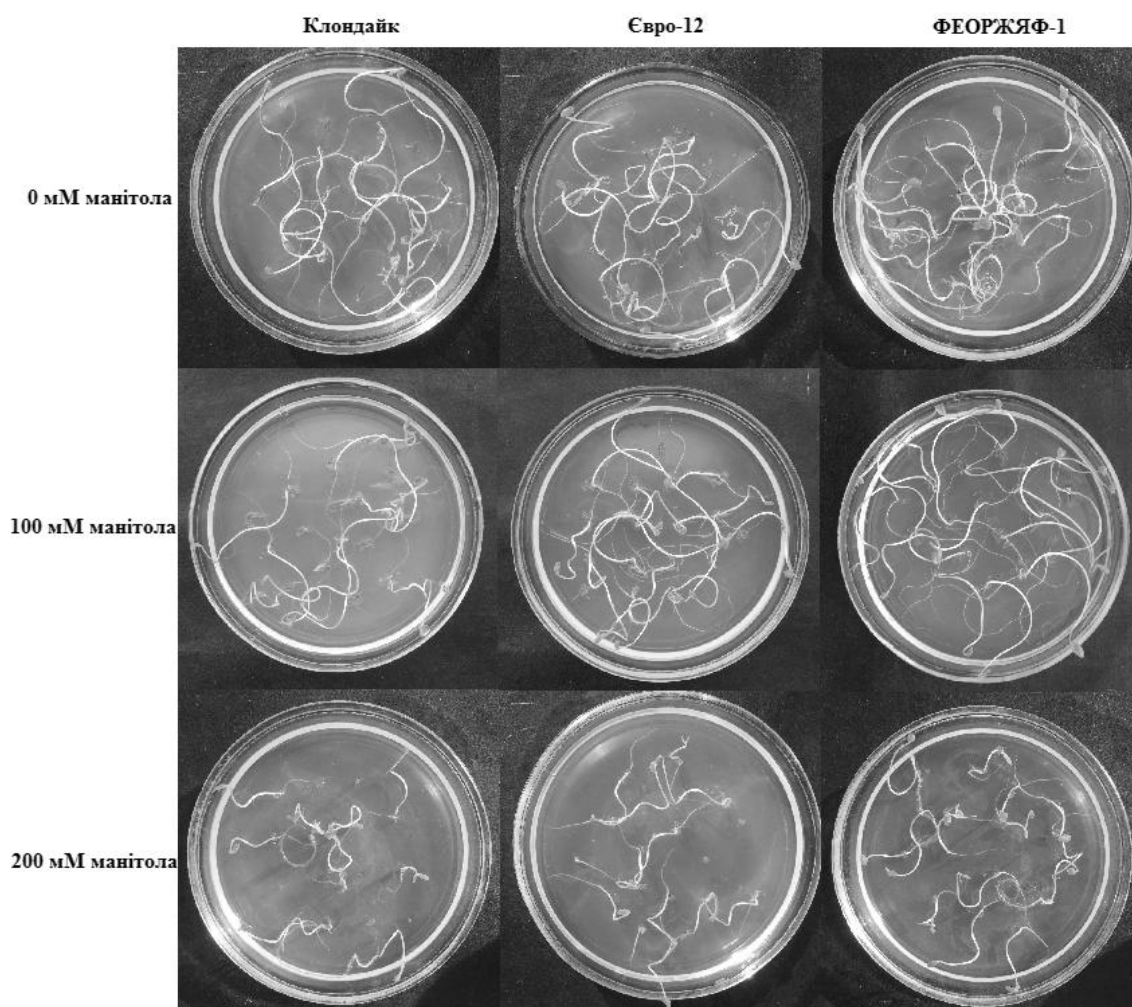


Рис. 1. Проростки рижю посівного, що культивувалися в умовах *in vitro* протягом 7 діб на середовищах MS із додаванням манітолу в різних концентраціях.

Найменше зниження сирої маси за цієї концентрації було характерне для форми ФЕОРЖЯФ-1 (22 % в порівнянні з контролем). Також ці проростки формували сиру масу на 27–31 % більшу у порівнянні з сортами Євро-12 та Клондайк відповідно. За умов збільшення осмотичного стресу (200 мМ манітолу в середовищі культивування) сира маса проростків рижю зменшувалася на 57–64 % в порівнянні з культивуванням за нормальних умов. Форма ФЕОРЖЯФ-1 була більш стійкою до втрати сирої маси за цих умов і накопичувала її на 24–34 % більше, ніж проростки сортів Євро-12 та Клондайк, відповідно. Отже, селекційна форма ФЕОРЖЯФ-1 мала найкращі показники зі схожості та сирої маси за нормальних умов та за умов індукованої посухи.

Проростки рижю різних генотипів, що вивчалися, мали відмінності за вмістом СРБ за

нормальних умов і за дії осмотичного стресу (рис. 3А).

За концентрації манітолу в середовищі культивування 100 мМ вміст СРБ достовірно зростав у проростків сорту Євро-12 та форми ФЕОРЖЯФ-1 порівняно з нормальними умовами. За підвищення осмотичного тиску в середовищі (200 мМ манітолу) вміст СРБ знижувався у всіх проростків і достовірної різниці між ними за цим параметром не спостерігалось. При цьому як для сорту Клондайк, так і для форми ФЕОРЖЯФ-1 вміст СРБ був схожим за нормальних умов і за 200 мМ манітолу.

Активність СОД достовірно не відрізнялась у проростків рижю досліджуваних генотипів за нормальних умов (рис. 3Б). У проростків, що культивувалися на середовищі з додаванням 100 мМ манітолу, вона достовірно знижувалась у сортів Євро-12 і Клондайк і залишалася без змін у проростків форми ФЕОРЖЯФ-1. За під-

вищення осмотичного стресу активність СОД значно знижувалась у всіх зразках у порівнянні з контролем, але залишалася вищою у проростків форми ФЕОРЖЯФ-1 порівняно з іншими генотипами. Зниження активності СОД свідчить

про зниження здатності тканин проростків протидіяти стресу. У форми ФЕОРЖЯФ-1 вища активність СОД поєднувалась із кращою схожістю насіння та здатністю до накопичення більшої сирої маси за осмотичного стресу.

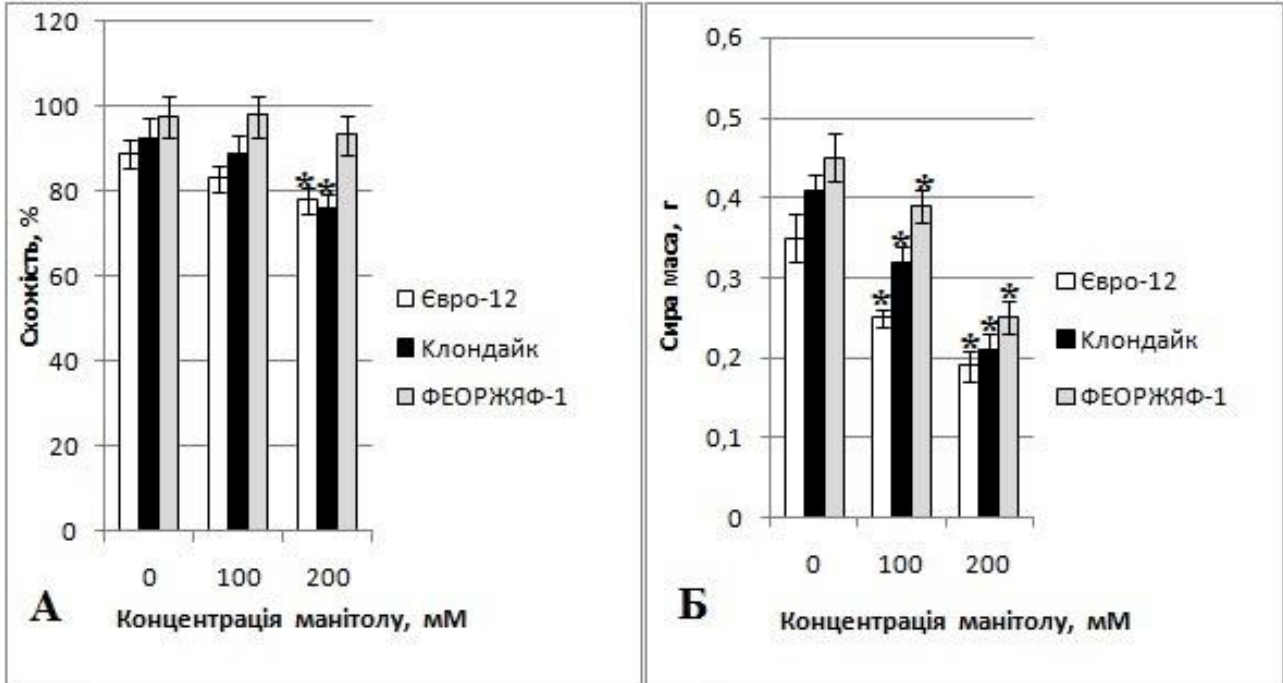


Рис. 2. Схожість (А) та сира маса (Б) 7-добових проростків рижю в умовах *in vitro* за нормальних умов та за умов осмотичного стресу. * – різниця достовірна в порівнянні з контролем за $p < 0,05$.

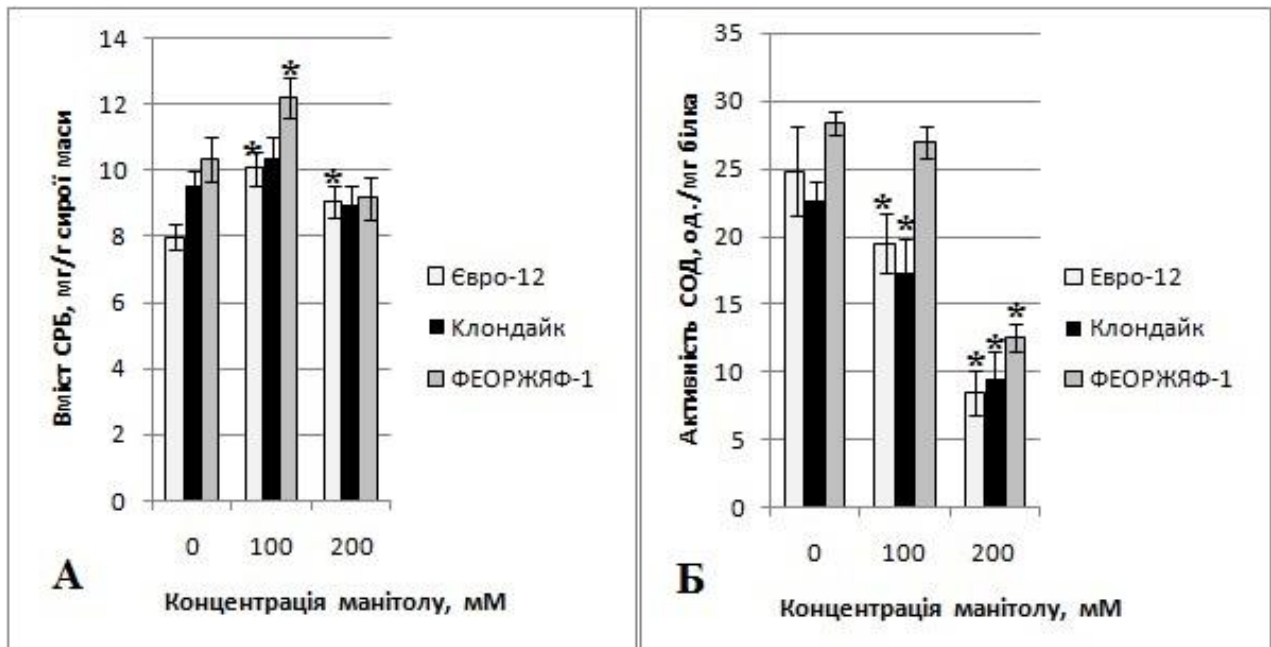


Рис. 3. Вміст СРБ (А) та активність СОД (Б) 7-добових проростків рижю *in vitro* за нормальних умов та за умов осмотичного стресу. * – різниця достовірна в порівнянні з контролем за $p < 0,05$.

Висновки

Три генотипи рижю української селекції були вперше охарактеризовані за такими параметрами: схожість насіння, накопичення біомаси, вміст СРБ і активність СОД в асептичних умовах за дії осмотичного стресу і без нього. За схожістю насіння, накопиченням біомаси, вмістом СРБ за нормальних умов і осмотичного стресу *in vitro* найкращі показники серед проростків рижю мала форма ФЕОРЖЯФ-1. Досліджувані генотипи не відрізнялися між собою за активністю СОД в нормальних умовах. Однак за

дії осмотичного стресу активність СОД була вищою у проростків ФЕОРЖЯФ-1 порівняно з сортами Євро-12 і Клондайк. Це характеризує форму ФЕОРЖЯФ-1 як найбільш перспективний генотип для проведення експериментів із генетичної трансформації для отримання рослин із підвищеною стійкістю до водного дефіциту та засолення – несприятливих умов, компонентом яких є осмотичний стрес.

Робота виконувалася за часткової фінансової підтримки гранту НАН України № 0115U005022.

References

1. Reyer C.P.O., Leuzinger S., Rammig A., Wolf A., Bartolomeus R.P., Bonfante A., de Lorenzi F., Dury M., Gloning P., Jaoudé R.A., Klein T., Kuster T.M., Martins M., Niedrist G., Riccardi M., Wohlfahrt G., de Angelis P., de Dato G., François L., Menzel A., Pereira M. A plant's perspective of extremes: terrestrial plant responses to changing climatic variability. *Global Change Biology*. 2013. Vol. 19. P. 75–89. doi: 10.1111/gcb.12023.
2. Nath U.K., Wilmer J.A., Wallington E.J., Becker H.C., Möllers C. Increasing erucic acid content through combination of endogenous low polyunsaturated fatty acids alleles with *Ld-LPAAT+Bn-fae1* transgenes in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2009. Vol. 118. P. 765–773. doi.org/10.1007/s00122-008-0936-7.
3. Diaz-Vivancos P., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Hernandez J.A. Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants. *Biol. Plant.* 2010. Vol. 54. P. 76–82. doi.org/10.1007/s10535-010-0011-5.
4. Matamoros M.A., Loscos J., Dietz K.J., Aparicio-Tejo P.M., Becana M. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits. *J. Exp. Bot.* 2010. Vol. 61. P. 87–97. doi: 10.1093/jxb/erp285.
5. Pandey P., Srivastava R.K., Dubey R.S. Water deficit and aluminum tolerance are associated with a high antioxidative enzyme capacity in Indica rice seedlings. *Protoplasma*. 2014. Vol. 251. P. 147–160. doi: 10.1007/s00709-013-0533-8.
6. Zaoui S., Gautier H., Bancel D., Chaabani G., Wasli H., Lachaâl M., Karray-Bouraoui N. Antioxidant pool optimization in *Carthamus tinctorius* L. leaves under different NaCl levels and treatment durations. *Acta Physiol. Plant.* 2016. Vol. 38. Article 187. doi: 10.1007/s11738-016-2204-9.
7. Gusta L.V., Benning N.T., Wu G. Luo X., Liu X., Gusta M.L., McHughen A. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology. *Mol. Breed.* 2009. Vol. 24. P. 103–115. doi.org/10.1007/s11032-009-9274-y.
8. Shonnard D.R., Williams L., Kalnes T.N. Camelina-derived jet fuel and diesel: sustainable advanced biofuels. *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 2010. Vol. 29. P. 382–392. doi.org/10.1002/ep.10461.
9. Moore R.H., Thornhill K.L., Weinzierl B., Sauer D., D'Ascoli E., Kim J., Lichtenstern M., Scheibe M., Brian Beaton B., Beyersdorf A.J., Barrick J., Bulzan D., Corr C.A., Crosbie E., Jurkat T., Martin R., Riddick D., Shook M., Slover G., Voigt C., White R., Winstead E., Yasky R., Ziemba L.D., Brown A., Schlager H., Anderson B.E. Biofuel blending reduces particle emissions from aircraft engines at cruise conditions. *Nature*. 2017. Vol. 543. P. 411–414. doi.org/10.1038/nature21420.
10. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2019. P. 242. URL: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin> (Last accessed: 28.01.2019).
11. Rakhmetov D.B., Rahmetova S.O., Boychuk Yu.N., Blume Ya.B., Yemets A.I. Physiological and morphological characteristics of new forms and varieties of spring false flax (*Camelina sativa*). *Visn. ukr. tov. genet. sel.* 2014. Vol. 12 (1). P. 65–77. [In Ukrainian] / Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Бойчук Ю.І., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Фізіологічні та морфометричні характеристики нових форм та сортів яркого рижю (*Camelina sativa*). *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12 (1). С. 65–77.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
14. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 161. P. 559–566. doi: 10.1016/0003-2697(87)90489-1.

NISHCHENKO L. V., SAKHNO L. O.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: 10lesya0916@gmail.com*

EVALUATION OF SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ SEEDLINGS UNDER OSMOTIC STRESS

Aim. To find the most drought resistant spring camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) genotype for further involvement in genetic transformation experiments, the some physiological and biochemical parameters of seedlings have been investigated under normal conditions and osmotic stress *in vitro*. **Methods.** Sterile seeds were planted on Murashige and

Skoog agarized medium without hormones or the same media supplemented with mannitol as an osmotic stress induc-
tor. Germination, fresh weight, total soluble protein content, and superoxide dismutase (SOD) activity have been inves-
tigated in 7-day-old seedlings. **Results.** The analyzed camelina genotypes were differed in their reactions on water defi-
cit *in vitro*. It has been revealed that higher SOD activity of FEORZhYaF-1 seedlings was accompanied by higher ger-
mination and higher ability to fresh weight accumulation under osmotic stress as compared to other varieties. **Conclu-
sions.** FEORZhYaF-1 breeding form could be involved in genetic transformation experiments to improve drought resis-
tance. SOD activity should be used as a parameter for selection of osmotic stress resistant plant material.

Keywords: *Camelina sativa* (L.) Crantz drought resistance, superoxide dismutase, total soluble protein.