DOI: 10.26898/0370-8799-2019-6-3

УДК: 631.527.2 (57.088.6)

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ ДЛЯ МАССОВЫХ АНАЛИЗОВ РАСТЕНИЙ

^{1,2}Карлов Г.И., ^{1,3}Литвинов Д.Ю., ¹Харченко П.Н., ^{1,2}Крупин П.Ю., ¹Ширнин С.Ю., ¹Черноок А.Г., ¹Назарова Л.А., ^{1,2}Дивашук М.Г.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Москва, Россия

²Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины Москва, Россия

Для цитирования: Карлов Г.И., Литвинов Д.Ю., Харченко П.Н., Крупин П.Ю., Ширнин С.Ю., Черноок А.Г., Назарова Л.А., Дивашук М.Г. Адаптация метода определения активности нитратредуктазы для массовых анализов растений // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49. № 6. С. 23–33. DOI: 10.26898/0370-8799-2019-6-3

For citation: Karlov G.I., Litvinov D.Y., Kharchenko P.N., Krupin P.Yu., Shirnin S.Yu., Chernook A.G., Nazarova L.A., Divashuk M.G. Adaptatsiya metoda opredeleniya aktivnosti nitratreduktazy dlya massovykh analizov rastenii [Adaptation of nitrate reductase activity assay for high throughput screening of crops]. Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki [Siberian Herald of Agricultural Science], 2019, vol. 49, no. 6, pp. 23–33. DOI: 10.26898/0370-8799-2019-6-3

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Изучена возможность лиофильного высушивания растительного материала и его измельчения в вибрационной шаровой мельнице для определения активности нитратредуктазы (НР). Показана эффективность применения данного подхода для массовых анализов сельскохозяйственных культур. Работа проведена на проростках мягкой пшеницы (Triticum aestivum) следующих сортов: озимых Алтиго, Васса, Гром, Дока, Собербаш, Старшина, Фишт и яровой пшеницы Новосибирская 67. Растения выращивали в течение четырех-пяти недель на субстрате без азота и на субстрате с добавкой 50 миллимоль/л (мМ) нитрата калия. Нитратредуктаза в растениях сохраняла свою активность после лиофилизации и измельчения высушенных листьев в мельнице. Применение разработанного метода корректно для образцов, содержащих активность НР, необходимую для образования нитрита в пределах 5–120 микромоль/л (мкМ) в 800 мкл реакционной смеси (например, порошок из лиофилизированных 100 мг листьев проростков пшеницы). Центрифугирование растительного лизата при 20 000 g практически не меняло результата определения активности НР по сравнению с более доступным центрифугированием при 12 000 g. Лизаты из свежих листьев проростков пшеницы содержали существенно больше общего белка, чем лизаты из лиофилизированных листьев (из расчета на одинаковое количество стартового материала). Различие лизатов из свежих и

ADAPTATION OF NITRATE REDUCTASE ACTIVITY ASSAY FOR HIGH THROUGHPUT SCREENING OF CROPS

^{1,2}Karlov G.I., ^{1,3}Litvinov D.Y., ¹Kharchenko P.N., ^{1,2}Krupin P.Yu., ¹Shirnin S.Yu., ¹Chernook A.G., ¹Nazarova L.A., ^{1,2}Divashuk M.G.

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology

Moscow, Russia

²Center of Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy

Moscow, Russia

³National Medical Research Center for
Preventive Medicine
Moscow, Russia

The possibility of freeze drying of plant material and its grinding in a shaking bead mill to determine the activity of nitrate reductase (NR) was studied. The effectiveness of applying this approach to high throughput mass screening of crops was shown. The assay was carried out on seedlings of common wheat (Triticum aestivum) of the following cultivars: Altigo, Vassa, Grom, Doka, Soberbash, Starshina, Fisht and spring wheat Novosibirskaya 67. The crops were grown during 4-5 weeks on substrate without nitrogen and on substrate supplemented with 50 millimol / l (mM) of potassium nitrate. Nitrate reductase in plants retained its activity after lyophilization and grinding of dried leaves in a mill. The proposed protocol for NR activity assay is suitable for plant lysates with an NR activity sufficient to form nitrite in the range of 5–120 micromoles /1 (μ M) in 800 μ l of reaction mix (for instance, freeze-dried sample originated from 100 mg of wheat seedling leaves). Centrifugation of a plant lysate at 20,000 g almost did not change NR activity compared to 12,000 g that is achievable for most lab centrifuges. Lysates from fresh leaves contained significantly more total protein than lysates лиофилизированных листьев в способности восстанавливать нитрат была меньше, чем различие в концентрации белка. В результате активность НР в пересчете на общий белок у лиофилизированных листьев выше. Активность НР значительно индуцировалась присутствием нитрата во всех сортах. Базовая и индуцированная активности НР существенно варьировали между разными сортами пшеницы, при выращивании с нитратом активность возрастала от 2,5 раза для Новосибирской 67 и 2,7 – для Васса до 5,4 – для Алтиго и 5,7 раза для Гром.

Ключевые слова: нитратредуктаза, ферментативная активность, метаболизм азота, селекционный признак, мягкая пшеница, лиофилизация, стабильность фермента

ВВЕДЕНИЕ

Повышение урожайности – одна из основных целей селекции сельскохозяйственных растений. Эффективное усваивание азота является необходимым условием быстрого роста и высокой урожайности. Основным источником азотного питания растений в большинстве естественных хорошо аэрируемых почв являются нитраты. Более высокое содержание нитратов обеспечивается использованием нитратсодержащих удобрений, которые применяются при выращивании различных сельскохозяйственных культур. Аммонийные удобрения частично превращаются в нитраты под действием почвенных бактерий.

Азот необходим растениям для синтеза аминокислот, нуклеотидов, кофакторов и других соединений. Нитратредуктаза (НР) — первый фермент в цепочке метаболизма нитратов. Она восстанавливает нитраты в нитриты, которые далее восстанавливаются нитритредуктазой до аммиака [1]. Аммиак благодаря последовательной работе двух ферментов — глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы — используется в синтезе аминокислоты глутамата.

Ряд исследований указывают на связь между урожайностью сельскохозяйственной культуры и активностью в ней НР [2]. Полногеномный анализ показал ассоциацию вариаций в области генома с геном НР и содержания белка в зернах пшеницы [3]. Повышение активности НР в пшенице вне-

from lyophilized leaves (with an equal amount of starting wet material). The difference in the nitrate-reducing activity in lysates from fresh and lyophilized leaves was not as high as the difference in protein concentration. Thus, the activity of NR calculated per g of total protein was higher in lyophilized leaves than in fresh leaves. The activity of NR was significantly induced by nitrate for all cultivars. The basal and nitrate-induced NR activity varied widely between the cultivars, and the induction ranged from 2.5 fold for Novosibirskaya 67 variety and 2.7 fold for Vassa to 5.4 for Altigo and 5.7 fold for Grom.

Keywords: nitrate reductase, enzyme activity, nitrogen metabolism, breeding trait, common wheat, lyophilization, enzyme stability

сением дополнительного гена НР табака приводит к увеличению массы 1000 зерен и увеличению содержания белка в зерне в получившихся трансгенных растениях [4]. По данным исследователей из двух лабораторий, более высокая урожайность длиннозерного риса по сравнению с круглозерным ассоциирована с более высокой активностью НР в его растениях. Селекция данной культуры на увеличение активности НР рекомендована для получения более урожайных сортов [5, 6].

В зависимости от внешних условий активность НР регулируется растениями в широком диапазоне. Сильный эффект производят нитраты, значительно индуцируя НР. Также активность этого фермента зависит от стадии светового цикла и быстро меняется в зависимости от освещенности, влажности, засоленности, выработки растениями сахарозы, глутамина и от других факторов [7–9].

Быстрое изменение активности НР в зависимости от освещенности, влажности почвы и других факторов может негативно влиять на результаты измерений активности этого фермента при длительном времени сбора образцов для исследований. Нестабильность НР — еще один фактор, затрудняющий проведение скрининга активности фермента на большом количестве растений. Нитратредуктаза из листьев 8-дневной пшеницы теряет половину начальной активности через 30 мин при 25 °C. При 10 °C время полужизни фермента составляет 90 мин

[10]. Еще меньшая стабильность отмечена у очищенной НР из листьев 9-дневной сои (5-минутная инкубация при 20 °C приводит к потере 28% активности) [11].

В настоящее время высокопроизводительные геномные, транскриптомные, протеомные и метаболомные методы не могут в полной мере предсказать активность фермента. Увеличение производительности определения активностей различных ферментов возможно путем роботизации экспериментальных протоколов [12]. Однако стадия гомогенизации остается не роботизированной, что является препятствием для массового скрининга растений. Главная проблема заключается в том, что гомогенизация в большей или меньшей степени может инактивировать фермент, что особенно критично для таких лабильных белков, как нитратредуктаза.

Цель исследований — изучить возможность лиофильного высушивания растительного материала и его измельчения в шаровой мельнице для высокопроизводительного определения активности нитратредуктазы в лизатах растений.

Задачи исследований — оптимизация разработанного метода для измерений активности нитратредуктазы в листьях проростков пшениц и проведение пилотного эксперимента, в котором сравнивали базовую и стимулированную нитратами активность нитратредуктазы в восьми сортах мягкой пшеницы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе использованы сорта мягкой пшеницы (Triticum aestivum): озимые Алтиго (Limagrain, Франция), Васса, Гром, Дока, Собербаш, Старшина, Фишт (Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Россия) и яровая пшеница Новосибирская 67 (Сибирский научноисследовательский институт растениеводства и селекции — филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Россия). Проростки пшеницы выращивали в стаканчиках с

10 г вермикулита по три растения одного сорта на стаканчик в растворе Хогланда, с заменами $Ca(NO_3)_2$ на $CaCl_2$ и KNO_3 на K_2SO_4 так, что молярность кальция и калия в растворе сохранялась. Состав модифицированного раствора Хогланда (MPX): 5 мМ $CaCl_2$, 2,5 мМ K_2SO_4 , 2 мМ $MgSO_4$, 1 мМ KH_2PO_4 , 46 мкМ H_3BO_3 , 9 мкМ $MnCl_2$, 8 мкМ $ZnSO_4$, 0,5 мкМ PATA-Fe, Na, 0

Определение активности НР. При определении активности фермента в свежих листьях и корнях гомогенизировали фрагменты листьев (корней) массой около 30 мг. Для этого использовали 400 мкл буфера для экстракции (ЭБ), состоящего из 100 мМ КН₂РО₄, 1 мМ ЭДТА рН 7,5. Непосредственно перед применением в ЭБ добавляли 1 мкМ молибдата натрия, 12 мМ бета-меркаптоэтанола и 250 мкМ фенилметилсульфонилфторида. Гомогенизацию проводили пластмассовыми пестиками "Pellet pestles" (Millipore Sigma) в 1,5 мл пробирках типа Эппендорф. К гомогенизированному материалу добавляли 800 мкл ЭБ. Далее суспензию деликатно перемешивали переворачиванием пробирки и центрифугировали 5 мин при 4 °С на скорости 12 000 g. Надосадочную жидкость (супернатант) после переноса в новую пробирку центрифугировали при таких же условиях. Полученный супернатант (далее – лизат) переносили в новую пробирку и его аликвоты использовали для реакции восстановления нитрата в нитрит и для определения белка по методике Брэдфорда.

При определении активности в лиофилизированных листьях фрагменты массой 80—120 мг помещали в пробирки (емкость 2 мл) со сферическим дном. Растительный материал через 1 ч подвергался обработке в лиофильной сушилке Freezone 2.5 (Labconco) при температуре минус 55 °C. Через 15—24 ч пробирки вынимали, в них помещали шарик из нержавеющей стали диаметром 7 мм

(1,38 г). Высушенные листья измельчали в вибрационной шаровой мельнице (шариковом гомогенизаторе) TissueLyser II (Qiagen) одним 30-секундным циклом на частоте 28 колебаний/с. Полученный мелкий порошок находился 4 ч при комнатной температуре и 6 ч при 8 °C. Далее, не вынимая шарики, в пробирки наливали по 1,2 мл ЭБ и порошок суспендировался в растворе деликатным переворачиванием пробирок. Пробирки центрифугировали 5 мин при 4 °C на скорости 6000 g, супернатант после переноса в новую пробирку центрифугировали 10 мин при 4 °C на скорости 12 000 g. Полученный супернатант (лизат) переносили в новую пробирку и его аликвоты использовали аналогично лизатам, полученным из свежих (нелиофилизированных) растений.

Для реакции нитратредуктазы в пробирке (емкость 2 мл) смешивали 50-600 мкл лизата (выбор объема обсуждается в разделе статьи «Результаты и обсуждение») с 0–550 мкл ЭБ (вместе с лизатом объем должен составить 600 мкл) и 200 мкл 4-кратного реакционного буфера (4х РБ). Состав 4х РБ: ЭБ с добавкой 120 мМ NaNO₃ и растворенной непосредственно перед экспериментом навеской натриевой соли (НАДН), создающей 0,8 мМ НАДН. Лизаты должны использоваться непосредственно после их приготовления. Реакция проводилась при температуре 25 °C в темноте в течение 1 ч, после чего добавляли 1,2 мл реактива Грисса (два раствора, смешанные 1:1 в день эксперимента: 1% сульфаниламида в 5%-й фосфорной кислоте и 0.1% N-(1-нафтил) этилендиамин гидрохлорида в Н₂О). Также реактив Грисса (1,2 мл) добавляли к 800 мкл стандартных растворов NaNO, (0, 10, 50, 100 и 200 мкМ), приготовленных разбавлением 10 мМ NaNO, смесью ЭБ и 4х РБ в отношении 3 : 1. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли в кювете (оптический путь 1 см) на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen) на длине волны 540 нм. Измерения начинались в интервале 90-120 мин после начала реакции Грисса и длились для всех образцов не более 20 мин, чтобы медленное падение окраски реакционной смеси не внесло ошибки. Полученные значения оптической плотности пересчитывали на концентрацию нитрита, используя разведения стандартного раствора ${\rm NaNO}_2$. Концентрацию пересчитывали на 800 мкл лизата. При использовании 400 мкл лизата концентрацию умножали на два, при 200 мкл лизата — на четыре и т.д.

Содержание белка в лизатах определяли по стандартной методике Брэдфорда [13]. К 100 мкл лизатов, а также серии разбавлений бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ЭБ (0; 0,2; 0,5 и 1,0 мг/мл), добавляли 1,9 млреагента Брэдфорда (Millipore Sigma). Полученную смесь измеряли в кювете (1 см) на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen) на длине волны 595 нм. Полученные значения оптической плотности пересчитывали в концентрацию белка, используя разведения БСА. Поскольку окраска белка реагентом Брэдфорда не является стабильной, все измерения проводили в интервале 15-45 мин после добавления реагента Брэдфорда, с числом образцов в серии, которые требовали не более 15 мин для измерений. Значение активности НР (мкмоль/ч/г) получали делением концентрации образовавшегося за 1 ч нитрита (мкМ) на концентрацию общего белка в лизате (мг/мл).

Статистическая обработка. Полученные данные представлены в тексте как средние значения «плюс—минус» стандартное отклонение, и на рисунках — как средние значения и планки, отображающие стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между активностью нитратредуктазы при 0 мМ KNO_3 и 50 мМ использован t-критерий Стьюдента. Различия принимались как значимые при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение оптимального объема лизата для корректного измерения активности нитратредуктазы.

Экспериментально определение активности НР происходит в два этапа. На первом этапе при участии НР происходит превращение нитрата в нитрит за счет окисления НАДН. На втором этапе концентрация образовавшегося нитрита определяется стан-

дартным аналитическим методом - с помощью реактива Грисса. При недостаточной активности НР в реакционной смеси будет образовано нитрита менее нижнего уровня детекции реактивом Грисса (в протоколе данного исследования - около 2-4 мкМ нитрита). При избыточной активности НР в реакционной смеси результаты измерения будут не корректны (занижены) за счет исчерпания НАДН, который в реакционной смеси самый ограниченный из расходуемых компонентов (200 мкМ). Более высокую концентрацию НАДН в эксперименте не использовали, так как при этом образование окрашенного продукта в реакции Грисса будет заметно подавляться. От избытка НАДН можно избавляться введением еще одного этапа, в котором оставшийся НАДН удаляется энзиматическим или химическим путем после реакции восстановления нитрата и перед добавлением реактива Грисса. В протоколе данного исследования этого этапа нет в целях максимального упрощения метода. В зависимости от условий эксперимента активность НР может меняться в широком диапазоне, поэтому для каждого исследования необходимо подбирать подходящий объем лизата. В связи с этим в каждом эксперименте определяется линейная область образования нитрита в зависимости от объема лизата, для чего используют лизаты с ожидаемой высокой активностью НР или смесь нескольких таких образцов. Пример зависимости образования нитрита от объема лизата представлен на рис. 1. В этом эксперименте концентрация НАДН составляла половину от стандартных 200 мкМ, и максимальная выработка нитрита составила 60 мкМ. В данном случае корректными объемами лизатов являются те, которые образуют 10-55 мкМ нитрита (область линейной зависимости образования нитрита). Этот результат получен в предварительном эксперименте. В дальнейшем концентрация НАДН в реакционной смеси повышена до 200 мкМ и при использовании стандартного протокола линейность наблюдалась в диапазоне 5-120 мкМ нитрита. Все значения нитрита, выходящие за пределы линейной зависимости от объема лизата, нельзя считать достоверными, и они должны исключаться.

При определении белка объем лизата должен быть таким, чтобы определяемые концентрации находились внутри линейной зоны калибровочной кривой реагента Брэдфорда (0,1–1 мг/мл). В данном эксперименте это обеспечивалось при 100 мкл лизата.

Активность НР вычисляется как концентрация нитрита (мкМ), образовавшегося за 1 ч, деленная на концентрацию белка в лизате (мг/мл). Получающееся значение имеет размерность мкM/ч/г, где г – масса общего растворимого белка. Вместо концентрации белка в лизате может использоваться общая масса исходного (сырого) растительного материала, взятого для приготовления лизата. В таком случае необходимо учесть объем раствора, в котором происходила гомогенизация. В протоколе исследований это 1,2 мл. Для вычисления активности НР нужно поделить концентрацию образовавшегося нитрита (мкМ) на массу исходного (сырого) растительного материала в миллиграммах и умножить на 1,2 мл. Полученное значение будет иметь размерность мкмоль/ч/г, где г – масса сырого материала.

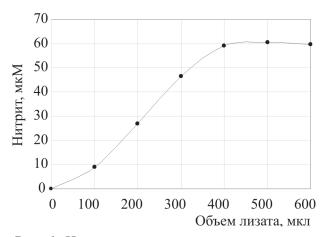


Рис. 1. Насыщение реакции превращения нитрата в нитрит в течение 1 ч при высокой активности НР в лизате и при низкой концентрации НАДН (100 мкМ). Линейность в данных условиях отмечена в области 10–55 мкМ нитрита.

Fig. 1. Saturation of the reaction of conversion of nitrate to nitrite during 1 hour at high activity of NR in the lysate and at a low concentration of NADH (100 μ M). Linearity in these conditions is observed in the range of 10–55 μ M nitrite.

Нормализация активности НР по общему белку, экстрагированному при гомогенизации листьев, корней, стебля, предпочтительна, поскольку характеризует число активных метаболизирующих клеток в использованном растительном материале и нивелирует возможное различие в содержании механической ткани.

Проверка необходимости центрифугирования при 20 000 д. Ряд протоколов определения активности НР предполагает центрифугирование лизата при 20 000 g. Многие центрифуги не могут обеспечить такие условия. В связи с этим проведено сравнение лизатов, приготовленных в более жестких условиях центрифугирования (20 000 g), а также в условиях, которые более легко достижимы (12 000 g) и использованы в стандартном протоколе. Свежие листья проростков пшеницы гомогенизировали и центрифугировали 5 мин при 12 000 g, затем переносили в новую пробирку и центрифугировали в таких же условиях повторно. Так удалось избавиться от остатков растительной ткани, которые в некоторых образцах

частично захватываются при отборе супернатанта после первого центрифугирования. Полученный стандартный лизат разделяли на две аликвоты. Одну часть дополнительно центрифугировали 10 мин при 20 000 g, другая в это время находилась в холодильнике для обеспечения равных температурных условий с первой (все центрифугирования проводятся при 4 °C). После этого в обеих аликвотах проводили определение активности НР, следуя стандартному протоколу. Результатом дополнительного центрифугирования при 20 000 g стало статистически незначимое снижение концентрации белка (на 5%) и образовавшегося нитрита (на 3%) и незначимое повышение активности НР на 2% (см. рис. 2). Таким образом, центрифугирование при 20 000 g не вносит заметных изменений в результаты определения активности НР. В данном исследовании определено, что центрифугирование при 20 000 g необязательно. Оно не включено в стандартный протокол определения активности НР и не использовано в других описанных здесь экспериментах.

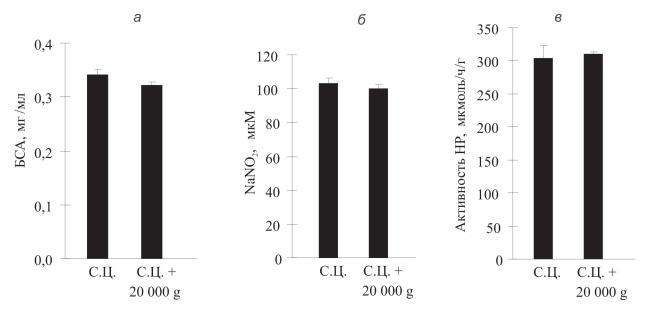


Рис. 2. Влияние центрифугирования лизата при 20 000 g после стандартного центрифугирования (двукратное центрифугирование при 12 000 g, обозначено "С.Ц.") на: a — содержание общего белка в лизатах; δ — уровень нитрита после восстановления нитрата лизатами в течение 1 ч; ϵ — активность HP.

Fig. 2. The effect of centrifugation of the lysate at 20,000 g after standard centrifugation (double centrifugation at 12,000 g, denoted as "C.II.") on: a – the total protein content in the lysates; δ – the level of nitrite after reduction of nitrate with lysates for 1 hour; e – nitrate reductase activity.

Определение активности НР в лиофилизированных и измельченных в шаровой мельнице листьях. Активность НР в листьях растений быстро изменяется в зависимости от внешних условий. Нестабильность этого фермента затрудняет исследование его активности, поскольку требует практически одновременного определения ее во всех образцах. При значительном числе растительных образцов приготовление лизатов и определение активности НР за ограниченное время не представляется возможным. Однако в короткий срок значительное число образцов можно собрать и поместить для высушивания в лиофильную сушку. Чтобы проверить, сохраняет ли НР активность, близкую к нативной после лиофилизации и после измельчения в шаровой мельнице, сравнили активность НР, определенную для одних и тех же 4-недельных проростков пшеницы в свежих листьях (С.Л.) и в лиофилизированных листьях (Л.Л.), измельченных перетиранием вручную в ступке или в мельнице. При определении активности НР в свежем листе использовали 30 мг материала, для лиофилизации использовали 80-120 мг листьев. Несмотря на различие в начальном весе материала, в лизатах из С.Л. находилось больше общего белка, чем в лизатах из Л.Л. (см. рис. 3, a). Измельчение в шаровой мельнице в условиях, описанных в разделе «Материал и методы», приводило к более полному высвобождению белка из Л.Л. по сравнению с деликатным измельчением в ступке. Разброс концентраций белка и нитратов между повторами в случае применения мельницы наблюдался в меньшей степени, чем в случае использования ступки. Это свидетельствует о более строгой повторяемости условий измельчения (см. рис. $3, a, \delta$). Несмотря на меньшее количество белка, лизаты из Л.Л. проявляли более высокую активность в восстановлении нитратов (см. рис. 3, б). Активность НР, которая определяется в пересчете на белок, была существенно выше у Л.Л. (см. рис. 3, в). Более высокая активность НР в Л.Л., вероятно, объясняется тем, что в них НР экстрагируется лучше, чем в среднем прочие белки. Таким образом, при лиофилизации и последующим измельчении высу-

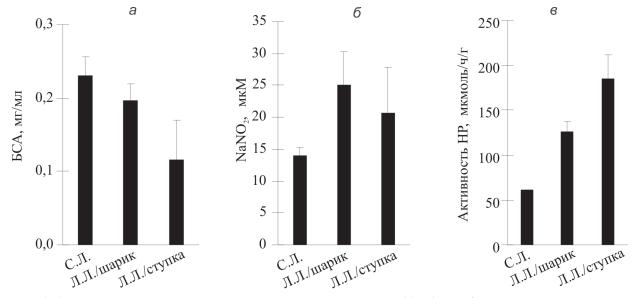


Рис. 3. Определение активности HP в лизатах свежих листьев (С.Л.), лиофилизированных листьях, измельченных шариками (Л.Л./ шарик) и лиофилизированных листьях, измельченных в ступке (Л.Л./ ступка). Определены: a — содержание общего белка; δ — концентрация нитрита, образованного лизатом из нитрата за 1 ч; ϵ — активность HP.

Fig. 3. Determination of the activity of NR in lysates from fresh leaves (C. Π .), lyophilized leaves, ground in bead mill (Π . Π ./ шарик) and lyophilized leaves, ground in a mortar (Π . Π ./ ступка). The following were determined: a – total protein content; δ – the concentration of nitrite generated from nitrate by the lysate for 1 hour; a – NR activity.

шенного материала вибрационной шаровой мельницей активность HP сохраняется. Этот способ подготовки растительного материала можно использовать в исследованиях.

Определение активности HP в зависимости от наличия нитратов в субстрате для проростков восьми сортов пиеницы. Нитраты способны сильно индуцировать активность HP. Для верификации предложенного метода были измерены активности HP в разных сортах мягкой пшеницы в зависимости от наличия нитрат-ионов в субстрате. Для эксперимента часть проростков пшеницы была выращена на субстрате с модифицированным раствором Хогланда (MPX), который не содержал нитраты. Другая часть — на субстрате с MPX, в который было добавлено 50 мМ KNO₃. Активность HP определяли во флаговом (верхнем)

листе 5-недельных проростков, при этом использовали вариант с лиофильным высушиванием листа, измельченного в шаровой мельнице (см. раздел «Материал и методы»). Активность измеряли у двух растений на субстрате без нитратов и двух растений, пророщенных в присутствии нитратов. Все сорта реагировали на присутствие нитратов повышением уровня активности НР (см. рис. 4). Наименее отзывчивым на нитраты сортом оказался Новосибирская 67 (индукция активности НР в 2,5 раза), максимально отзывчивыми сортами – Гром и Алтиго (индукция в 5,7 и 5,4 раза) (см. таблицу). Таким образом, активность НР и чувствительность к действию нитратов статистически значимо варьируются между сортами пшеницы.

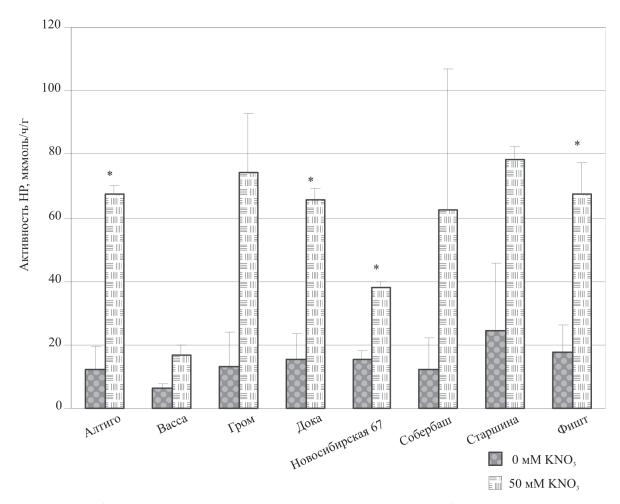


Рис. 4. Базовая (не индуцированная присутствием нитратов в субстрате) и стимулированная нитратами (50 мМ KNO_3) активность HP для восьми сортов пшеницы.* p < 0.05.

Fig. 4. Basal (not induced by the presence of nitrates in substrate) and nitrate-stimulated (50 mM KNO₃) NR activity for eight wheat cultivars. * p < 0.05.

Отношение активностей HP у растений при 50 мМ KNO₃ и при 0 мМ KNO₃ (AHP(50)/AHP(0)). The ratio of NR activities in plants at 50 mM KNO₃ and at 0 mM KNO₃

Сорт	AHP(50)/AHP(0)
Алтиго	$5,43 \pm 3,03$
Bacca	$2,73 \pm 0,91$
Гром	$5,72 \pm 5,00$
Дока	$4,31 \pm 2,39$
Новосибирская 67	$2,48 \pm 0,50$
Собербаш	$5,08 \pm 5,48$
Старшина	$3,18 \pm 2,71$
Фишт	$3,78 \pm 1,85$

выводы

- 1. При определении активности НР следует контролировать корректность результатов, измеряя активности в растворах с различными разбавлениями лизатов. Полученные значения должны находиться в линейной зоне зависимости образования нитратов от объема лизата.
- 2. Исследование активности НР на лиофилизированных листьях, приготовленных на вибрационной шаровой мельнице, более производительно, чем на материале, гомогенизированном по традиционной ручной технологии, и позволяет проводить гомогенизацию в 96-луночном формате. Лиофилизированный материал долго сохраняет свойства при комнатной температуре в отличие от замороженного растительного материала, белковые компоненты которого после размораживания быстро деградируют. В представленном методе используется небольшое количество материала, что сводит повреждение растения к минимуму и делает возможным дальнейшее определение его урожайности и других показателей. Предложенная технология исследований позволяет проводить массовые анализы растений в полевых условиях.
- 3. Активность НР и ее изменение при применении нитратов в различных сортах мягкой пшеницы варьируются в широком диапазоне. Разработанный метод открывает возможность проверить гипотезу об НР как признаке, по которому можно проводить селекцию, используя большое число растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Морозкина Е.В., Звягильская Р.А. Нитратредуктазы: структура, функции, влияние факторов стресса // Биохимия. 2007.
 Т. 72, № 10. С. 1413–1424. DOI: 10.1134/s0006297907100124.
- 2. Johnson C., Whittington W., Blackwood G. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield // Nature. 1976. Vol. 262, N 5564. P. 133–134. DOI: 10.1038/262133a0.
- 3. Nigro D., Gadaleta A., Mangini G., Colasuonno P., Marcotuli I., Giancaspro A., Giove S.L., Simeone R., Blanco A. Candidate genes and genome-wide association study of grain protein content and protein deviation in durum wheat // Planta. 2019. Vol. 249, N 4. P. 1157–1175. DOI: 10.1007/s00425-018-03075-1.
- 4. Zhao X.Q., Nie X.L., Xiao X.G. Over-expression of a tobacco nitrate reductase gene in wheat (Triticum aestivum L.) increases seed protein content and weight without augmenting nitrogen supplying // PLoS One. 2013. Vol. 8, N 9. P. e74678. DOI: 10.1371/journal. pone.0074678.
- 5. Gao Z., Wang Y., Chen G., Zhang A., Yang S., Shang L., Wang D., Ruan B., Liu C., Jiang H., Dong G., Zhu L., Hu J., Zhang G., Zeng D., Guo L., Xu G., Teng S., Harberd N.P., Qian Q. The indica nitrate reductase gene OsNR2 allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency // Nat Commun. 2019. Vol. 10, N 1 P. 5207. DOI: 10.1038/s41467-019-13110-8.
- 6. Yi J., Gao J., Zhang W., Zhao C., Wang Y., Zhen X. Differential Uptake and Utilization of Two Forms of Nitrogen in Japonica Rice Cultivars From North-Eastern China. // Front Plant Sci. 2019. Vol. 4, N 10 P. 1061. DOI: 10.3389/fpls.2019.01061.
- 7. Bolshakova L.S., Bulgakova N.N. Effect of nitrate nutrition on nitrate compartmentation, nitrate reductase activity and productivity in spring wheat. Wheat: Prospects for Global Improvement. Developments in Plant Breeding, Vol 6. Springer, Dordrech, 1997. P. 437–443. DOI 10.1007/978-94-011-4896-2_58.
- 8. *Yanagisawa S*. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants // Plant Sci. 2014. Vol. 229. P. 167–171. DOI: 10.1016/j. plantsci.2014.09.006.

- 9. *Клименко С.Б.*, *Пешкова А.А.*, *Дорофеев Н.В.* Активность нитратредуктазы у озимой пшеницы при тепловом шоке // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2006. Т. 2. № 1. С. 50–56.
- 10. *Sherrard J. H., Dalling M. J.* In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves: I. Stability of highly purified enzyme and its component activities // Plant Physiol. 1979. Vol. 63. N 2. P. 346–353. DOI: 10.1104/pp.63.2.346.
- 11. Evans H.J., Nason A. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants // Plant Physiol. 1953. Vol. 28. N 2. P. 233–254. DOI: 10.1104/pp.28.2.233.
- 12. Gibon Y., Blaesing O. E., Hannemann J., Carillo P., Höhne M., Hendriks J.H., Palacios N., Cross J., Selbig J., Stitt M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness // Plant Cell. 2004. Vol. 16, N 12. P. 3304–3325. DOI: 10.1105/tpc.104.025973.
- 13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

REFERENCES

- 1. Morozkina E.V., Zvyagil'skaya R.A. Nitratreduktazy: struktura, funktsii, vliyanie faktorov stressa [Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors]. *Biokhimiya* [Biochemistry], 2007, vol. 72, no. 10, pp. 1413–1424. (In Russian). DOI: 10.1134/s0006297907100124.
- 2. Johnson C., Whittington W., Blackwood G. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. *Nature*, 1976, vol. 262, no. 5564, pp. 133–134. DOI: 10.1038/262133a0.
- 3. Nigro D., Gadaleta A., Mangini G., Colasuonno P., Marcotuli I., Giancaspro A., Giove S.L., Simeone R., Blanco A. Candidate genes and genome-wide association study of grain protein content and protein deviation in durum wheat. *Planta*, 2019, vol. 249, no. 4, pp. 1157–1175. DOI: 10.1007/s00425-018-03075-1.
- 4. Zhao X.Q., Nie X.L., Xiao X.G. Over-expression of a tobacco nitrate reductase gene in

- wheat (Triticum aestivum L.) increases seed protein content and weight without augmenting nitrogen supplying. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 9, pp. e74678. DOI: 10.1371/journal. pone.0074678.
- Gao Z., Wang Y., Chen G., Zhang A., Yang S., Shang L., Wang D., Ruan B., Liu C., Jiang H., Dong G., Zhu L., Hu J., Zhang G., Zeng D., Guo L., Xu G., Teng S., Harberd N.P., Qian Q. The indica nitrate reductase gene OsNR2 allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency. *Nat Commun*, 2019, vol. 10, no. 1, pp. 5207. DOI: 10.1038/s41467-019-13110-8
- Yi J., Gao J., Zhang W., Zhao C., Wang Y., Zhen X. Differential Uptake and Utilization of Two Forms of Nitrogen in Japonica Rice Cultivars From North-Eastern China. *Front Plant Sci.* 2019, vol. 4, no. 10, pp. 1061. DOI: 10.3389/fpls.2019.01061.
- Bolshakova L.S., Bulgakova N.N. Effect of nitrate nutrition on nitrate compartmentation, nitrate reductase activity and productivity in spring wheat. Wheat: Prospects for Global Improvement. *Developments in Plant Breeding*, 1997, vol. 6, pp. 437–443. DOI 10.1007/978-94-011-4896-2_58.
- 8. Yanagisawa S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Sci*, 2014, vol. 229. pp. 167–171. DOI: 10.1016/j. plantsci.2014.09.006.
- 9. Klimenko S.B., Peshkova A.A., Dorofeev N.V. Aktivnost' nitratreduktazy u ozimoi pshenitsy pri teplovom shoke [Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat]. *Zhurnal stress-fiziologii i biokhimii* [Journal of Stress Physiology and Biochemistry], 2006, vol. 2, no. 1, pp. 50–56. (In Russian).
- 10. Sherrard J.H., Dalling M. J. In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves: I. Stability of highly purified enzyme and its component activities. *Plant Physiol*, 1979, vol. 63, no. 2, pp. 346–353. DOI: 10.1104/pp.63.2.346.
- 11. Evans H.J., Nason A. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol*, 1953, vol. 28, no. 2, pp. 233–254. DOI: 10.1104/pp.28.2.233.
- 12. Gibon Y., Blaesing O.E., Hannemann J., Carillo P., Hohne M., Hendriks J. H., Palacios N., Cross J., Selbig J., Stitt M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays:

comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 12, pp. 3304–3325. DOI: 10.1105/tpc.104.025973.

13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

Информация об авторах

Карлов Г.И., академик РАН, доктор биологических наук, директор Всероссийского научноисследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии, e-mail: karlov@iab.ac.ru

(☑) **Литвинов Д.Ю.**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 127550, Москва, Тимирязевская, 42; e-mail: dlitvinov@gmail.com

Харченко П.Н., академик РАН, доктор биологических наук, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: xpn@iab.ac.ru

Крупин П.Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; e-mail: pavelkroupin1985@gmail.com

Ширнин С.Ю., младший научный сотрудник; e-mail: durandal-1707@bk.ru

Черноок А.Г., младший научный сотрудник; e-mail: Irbis-sibrl@yandex.ru

Назарова Л.А., младший научный сотрудник; e-mail: lpukhova@yandex.ru

Дивашук М.Г., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений; e-mail: divashuk@gmail.com

AUTHOR INFORMATION

Karlov G.I., Academician RAS, Doctor of Science in Biology, Director of All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology; e-mail: karlov@iab.ac.ru

(E) Litvinov D.Y., Candidate of Science in Biology, Senior Researcher, address: 42 Timiry-azevskaya ul, Moscow, 127550, Russia; e-mail: dlitvinov@gmail.com

Kharchenko P.N., Academician RAS, Doctor of Science in Biology, Scientific Director of All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology; e-mail: xpn@iab.ac.ru

Krupin P.Yu., Candidate of Science in Biology, Senior Researcher; e-mail: pavelkroupin1985@gmail.com

Shirnin S.Yu., Junior Researcher; e-mail: durandal-1707@bk.ru

Chernook A.G., Junior Researcher, e-mail: Irbis-sibrI@yandex.ru

Nazarova L.A., Junior Researcher; e-mail: lpukhova@yandex.ru

Divashuk M.G., Candidate of Science in Biology, Head of Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding; e-mail: divashuk@gmail.com

Финансовая поддержка

Благодарим академика Российской академии наук Л.А. Беспалову за любезно предоставленные семена пшеницы различных сортов. Работа выполнена при поддержке государственного задания по теме «Структурно-функциональный анализ организации геномов сельскохозяйственных растений для обеспечения селекционного процесса (0431-2019-0004)».

> Дата поступления статьи 28.10.2019 Received by the editors 28.10.2019