

осадок, центрифугируем при 2 000—3 000 об/мин в течение 2—3 мин и присоединяем надосадочную жидкость к основному раствору в мерной колбе. Повторяем операцию 2—3 раза. Доводим дистиллированной водой до метки ($V = 50$ мл).

5 мл полученного раствора (V_1) смешиваем в центрифужной пробирке с 2 мл 0,5 %-го раствора йода, перемешиваем и оставляем на 15 мин для развития реакции, т.е. осаждения крахмала йодом.

Центрифугируем при 2 000—3 000 об/мин в течение 2—3 мин, прозрачный раствор отбрасываем, а осадок крахмала промываем 2 раза 5 %-ным раствором азотнокислого кальция, содержащим 0,01 % йода. К промытому осадку йодкрахмального соединения добавляем 10 мл 0,1 N раствора NaOH. Пробирку помещаем в кипящую водяную баню на 5 мин.

Раствор переносим в мерную колбу на 50 мл, прибавляем 0,3 мл 0,5 %-го раствора йода, доливаем дистиллированной водой примерно до 40 мл, прибавляем 2 мл 1 N раствора HCl, доводим водой до метки (50 мл), перемешиваем.

Оптическую плотность раствора измеряем при 580—610 нм.

Полученные результаты сравниваем с калибровочной кривой и вычисляем содержание крахмала по следующей формуле:

$$K = (50 \times C_i \times V \times 1000) : (1000000 \times H \times V_1) = (V \times C_i) : 200 \times V_1 \times H, \quad (3.1)$$

где

K — содержание крахмала, % от единицы массы навески;

C_i — концентрация крахмала в колориметрируемом растворе, мкг/мл;

V — общий объем исследуемого раствора, мл;

V_1 — объем исследуемого раствора, взятый для осаждения крахмала йодом (5 или 10), мл;

H — навеска исследуемого вещества, г;

50 — объем окрашенного колориметрируемого раствора, мл;

100 — коэффициент перевода значения в проценты;

1000000 — коэффициент перевода значения в граммы.

Статистическую обработку полученных данных проводим согласно п. 2.3.5.

3.3. Построение калибровочной кривой

Берем 50 мг очищенного крахмала, растираем в ступке с 3 мл 80 %-го раствора азотнокислого кальция, переносим в коническую колбу на 100 мл, промываем ступку 15 мл 80 %-го раствора азотнокислого кальция и кипятим 5 мин. Раствор охлаждаем, переносим в мерную колбу объемом 50 мл и доводим дистиллированной водой до метки. Из этого раствора, содержащего 1 мг крахмала в 1 мл, набираем в центрифужные пробирки 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 мл, доводим каждую до 5 мл 20 %-ным раствором азотнокислого кальция, прибавляем по 2 мл 0,5 %-го раствора йода, перемешиваем и оставляем на 15 мин. После этого центрифугируем и осадок промываем 2 раза 5 %-ным раствором азотнокислого кальция. Растворяем осадки в 10 мл 0,1 N раствора NaOH при нагревании на кипящей бане в течение 5 мин. Растворы переносим в мерные колбы объемом 50 мл, прибавляем по 0,3 мл 0,5 %-го раствора йода, разбавляем дистиллированной водой до 40 мл, прибавляем по 2 мл 1 N раствора HCl, доводим до метки (50 мл) и определяем оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 580—610 нм.

Строим кривую зависимости оптической плотности образцов от содержания крахмала (мкг/мл), проводим линейную аппроксимацию и используем полученную формулу для определения C_i (аналогично определению X_i , описанному в пункте 2.4.).

4. ПРИМЕРЫ АНАЛИЗА ЭНДОГЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ САХАРОВ

4.1. Органоспецифичность распределения свободных сахаров в проростках ячменя

При определении содержания сахаров в проростках одно- и двудольных растений следует тщательно отделить те органы, которые планируем проанализировать. К примеру, у двудольных растений это может быть стебель, корни, семядольные или настоящие листья. Проростки однодольных растений можно разделить на корни, зерновку, первый и последующие листья и колеоптиль — трубкообразный полый орган,

охватывающий первый лист у основания. Ранее считалось, что колеоптиль выполняет только механическую (защитную) функцию, быстро отмирая в ходе развития проростка. Более поздние исследования показали, что колеоптиль может выполнять также регуляторную и запасную функции, т. к. в этом органе обнаружены фитогормоны, белки, фоторецепторы, фотосинтетические пигменты и запасные углеводы.

В нашем эксперименте с использованием первого листа и колеоптиля была исследована органоспецифичность распределения свободных сахаров (моно- и дисахаридов) в 5-дневных этиолированных проростках ячменя. Пример расчета данных представлен в таблице 4, где дана средняя арифметическая, стандартная ошибка средней арифметической (Sx) и показатель точности (Cs). Поскольку величина Cs не превышает 4 %, то полученные результаты считаем хорошими и сравниваем средние величины. Сравнительный анализ внутриклеточной концентрации свободных сахаров в расчете на единицу сырой биомассы показал, что в колеоптиле содержание моносахаридов в 2,2 раза выше, чем в первом листе проростков ячменя, а дисахаридов — в 1,8 раза.

Таблица 4

**Органоспецифичность распределения свободных сахаров
в проростках ячменя**

Орган проростка, повторности	Содержание свободных сахаров, % от сырой массы навески						
		Моносахариды	Sx	$Cs, \%$	Дисахариды	Sx	$Cs, \%$
Лист	1	3,89			0,94		
	2	3,78			0,91		
	3	3,92			0,97		
СРЗНАЧ		3,86	0,04	1	0,94	0,02	2
Колеоптиль	1	1,8			0,51		
	2	1,65			0,59		
	3	1,72			0,55		
СРЗНАЧ		1,72	0,05	3	0,55	0,02	4

4.2. Изменение содержания свободных сахаров при стрессе

В природных условиях растения часто подвергаются действию различных неблагоприятных факторов. Высокая и низкая температура, заморозки, засуха, затопление, высокая интенсивность света, действие патогенов различной природы — далеко не полный перечень природ-

ных стрессовых факторов. Среди антропогенных стрессоров выделяют накопление гербицидов, пестицидов, фотооксидантов, смог, кислотные дожди, дефицит и избыток солей, рост УФ-излучения, глобальное изменение климата и прочие факторы [3]. В отличие от большинства животных организмов, растения не могут избежать действия стрессора и единственная возможность выжить в новых условиях — это устранение разбалансировки обмена веществ, т. е. развитие адаптивных реакций. Предполагается, что стабилизация метаболизма обеспечивается за счет синтеза стрессовых белков, активизации антиоксидантных систем, накопления каротиноидов, изменения гормонального баланса и других процессов. Среди эндогенных соединений, повышающих стрессоустойчивость растений, особое место занимают низкомолекулярные осмотически активные вещества — пролин, глицинбетаин, глицерин, полиолы (сорбитол, маннитол), аминокислоты и свободные сахара [6, 10].

Содержание свободных моно- и дисахаридов определяли в 5-дневных этиолированных проростках ячменя, которые 3 часа выдерживали при 40°C и затем освещали в течение 1 часа при 24°C и 6 000 люкс.

Полученные результаты представлены в таблице 5, где рассчитаны средняя арифметическая, стандартная ошибка средней арифметической (Sx), показатель точности (Cs) и % опыта к контролю (опыт : контроль $\times 100$ %). Поскольку в большинстве случаев величина Cs не превышает 5 %, то полученные результаты считаем вполне удовлетворительными и хорошими. Однако при анализе дисахаридов в колеоптиле получены очень высокие значения Cs — до 12 %, что теоретически сильно снижает точность эксперимента. С помощью критерия Стьюдента, используя формулу 1.7 (см. п. 2.3.5.), оцениваем статистическую достоверность средних арифметических, полученных для содержания дисахаридов в колеоптилях до (контроль) и после (опыт) нагревания:

$$t_{(\text{контроль})} = 0,1 : 0,01 = 10,$$

$$t_{(\text{опыт})} = 0,92 : 0,1 = 9,2.$$

Для имеющегося числа степеней свободы (2) полученные значения $t_{\text{факт}}$ существенно превышают $t_{\text{табл}}$ при уровне значимости 0,05 (см. табл. 2), следовательно, полученные средние арифметические являются достоверными. Проверяем также достоверность различий между сред-

ними арифметическими, полученными для содержания дисахаридов в колеоптилях до и после нагревания, также используя t -критерий (формулы 1.8 и 1.10, см. п. 2.3.5.):

$$t_{\text{факт}} = (0,92 - 0,1) : 0,1 = 8,1,$$

что значительно выше, чем $t_{\text{табл}}$ при уровне значимости 0,01 ($df = 4$).

Таблица 5

**Изменение содержания свободных сахаров
в листьях ячменя при стрессе**

Вариант, повторности	Содержание свободных сахаров, % от сырой массы навески					
	Моносахариды			Дисахариды		
		Sx	CS, %	Sx	CS, %	
ЛИСТ						
Контроль(24°C)	1	4,65		0,62		
	2	4,31		0,59		
	3	4,88		0,56		
СРЗНАЧ		4,61	0,17	4	0,59	0,02
Опыт (40°C)	1	4,03		1,7		
	2	4,11		1,66		
	3	4,08		1,81		
СРЗНАЧ		4,07	0,02	1	1,72	0,05
% опыта к контролю		88		292		
КОЛЕОПТИЛЬ						
Контроль(24°C)	1	2,1		0,1		
	2	2,3		0,08		
	3	2,48		0,12		
СРЗНАЧ		2,29	0,11	5	0,1	0,01
Опыт (40°C)	1	2,9		0,9		
	2	2,77		1,1		
	3	3,11		0,75		
СРЗНАЧ		2,93	0,10	3	0,92	0,10
% опыта к контролю		128		920		

Следовательно, нагревание проростков приводило к достоверному повышению содержания свободных сахаров в листе и колеоптиле проростков ячменя за исключением содержания моносахаридов в листе, которое незначительно снижалось ($t_{\text{факт}} = (4,61 - 4,07) : 0,167 = 3,23$, что достоверно при $P = 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. М., 1976
2. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош, Ю. В. Перуанский, Н. П. Луковникова, М. И. Иконникова; Под ред. А. И. Ермакова. 3-е изд. Л., 1987.
3. Полевой В. В. Физиология растений: Учеб. пособие для биолог. спец. вузов. М., 1989.
4. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. Киев, 1976.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Мн., 1967.
6. Bohnert H. J., Sheveleva E. Plant stress adaptations — making metabolism move // Current Opinion in Plant Biology. 1998. Vol. 1. P. 267—274.
7. Dijkwel P. P., Huijser C., Weisbeek P. J., Chua N. H., Smeekens S. C. M. Sucrose control of phytochrome A signaling in Arabidopsis // Plant Cell. 1997. Vol. 9, N 3. P. 583—595.
8. Ho S-L, Chao Y-C, Tong W-F, Yu S-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms // Plant Physiology. 2001. Vol. 125. P. 877—890.
9. Pammenter N. W., Loreto F., Sharkey T. D. End product feed-back effects on photosynthetic electron transport // Photosynthesis Research. 1993. Vol. 35. P. 5—14.
10. Roitsch T. Source-sink regulation by sugar and stress // Current Opinion in Plant Biology. 1999. Vol. 2, N 3. P. 198—206.
11. Winder T. L., Sun J., Okita T. W., Edwards G. E. Evidence of the occurrence of feedback inhibition of photosynthesis in rice // Plant Cell Physiology. 1998. Vol. 39. P. 813—820.
12. Yu S-M. Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation // Plant Physiology. 1999. Vol. 121. P. 687—693.