

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ ПОВЕРХНОСТНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗЕРНА КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.)*

Ѓ.N. RADENOVIĆ^{1, 2}, Г.В. МАКСИМОВ³ ✉, Г.М. КУРАМШИНА⁴,
В.В. ШУТОВА⁵, J. HAO⁶, N.S. DELIĆ¹, M.D. SECHANSKI¹,
A.S. POPOVIĆ¹, D.V. BAJUK-BOGDANOVIĆ²,
M.M. RADOSAVLJEVIĆ¹, J.M. PAVLOV¹

Инфракрасная (ИК) спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) — современные методы, на основе которых успешно формируются биотехнологические подходы, позволяющие проводить генетический и функциональный анализ отдельных органов и тканей растений на молекулярном уровне. В представленной работе с помощью спектроскопии поверхностного внутреннего отражения (ПВО), которая представляет собой модификацию ИК-спектроскопии, впервые зарегистрированы и выявлены различия в содержании и конформации биомолекул в гомогенатах целого зерна гибридов кукурузы ZP 735 и его компонентов (эндосперм, перикарп, зародыш). Нашей целью была разработка методологии спектроскопии поверхностного внутреннего отражения для идентификации органических молекул, их содержания и конформации в семени кукурузы и его тканях. Объектом исследования служили зерна гибрида кукурузы (*Zea mays* L.) ZP 735 (оригинатор — Maize Research Institute, Zemun Polje, г. Белград, Сербия). Методом случайной выборки было отобрано 30 зерен. Для получения ПВО-спектров образцы целых зерен и их частей (эндосперма, перикарпа и зародыша) измельчали, гомогенизировали и помещали в специальную ячейку прибора. Для регистрации ПВО-спектров использовали спектрометр (Nicolet™ iS20 FTIR Spectrometer, «Thermo Scientific», США) с алмазом (diamond ATR crystal, «Thermo Scientific», США), для анализа спектров — пакет программ («Thermo Scientific», США). ПВО-спектры сопоставляли в библиотеке данных программы Advanced ATR correction Algorithm. Метод ПВО-спектроскопии основан на отражении луча света на границе раздела двух фаз: фазы кристалла с высоким показателем преломления, входящего в состав прибора ПВО, и фазы исследуемого образца с более низким показателем преломления. В процессе измерения луч света проникает на небольшую глубину в фазу образца, где частично поглощается. При последующих облучениях образца это явление повторяется, и в результате регистрируется ПВО-спектр. Доказано, что в диапазоне от 400 см⁻¹ до 4000 см⁻¹ ПВО-спектры целого зерна, эндосперма, перикарпа и зародыша гибрида ZP 735 были аналогичны полученным ранее ИК-спектрам зерна, что свидетельствует о возможности использования нового метода для технологий молекулярной селекции. Расположение полос ПВО-спектра характеризует различные формы колебаний валентных связей функциональных групп органических молекул семени, что позволяет идентифицировать не только наличие определенных молекул, но и их конформацию. Доказано, что с помощью анализа амплитуды полос ПВО-спектра (максимальная амплитуда интенсивности и высокая амплитуда интенсивности) в тканях семени можно контролировать изменение содержания ряда органических соединений: протеинов, липидов, сахаров, сложных эфиров, амидов, кетонов, альдегидов, карбоновых кислот, простых эфиров, фенолов, спиртов, ароматических углеводов, ациклических соединений, алкенов, алканов и алкинов. Полученные результаты важны для тестирования наличия в зерне необходимых органических соединений или изменения их конформации в процессе селекции. К важным преимуществам метода ПВО-спектроскопии по сравнению с ИК-спектроскопией относятся, с одной стороны, сохранение нативности объекта (возможность проведения исследования без фиксации или окрашивания) и простая пробоподготовка, с другой — эффективная оценка содержания и конформации молекул с высокой чувствительностью (разрешение порядка 1,0 см⁻¹). Реализация разработанной методики для формирования технологии молекулярной селекции повысит рентабельность культивирования и эффективность селекции не только кукурузы, но и других сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: *Zea mays* L., гибрид, зерно, эндосперм, перикарп, зародыш, инфракрасный спектр, поверхностное внутреннее отражение.

* В Сербии исследования финансировались Исследовательским институтом кукурузы «Земун Поле» (Белград) и Факультетом физической химии Белградского университета, а также Министерством образования, науки и технологического развития Сербии (Projects 03E211, 03E22, TR-20014, № 31028, 31037). В Российской Федерации исследования проводятся под руководством профессора Г.В. Максимова и финансируются проектом РФ № 19-79-30062. Исследование также было поддержано Междисциплинарной научно-образовательной школой Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

В настоящее время существенное внимание уделяется разработке методических приемов, которые позволяют контролировать содержание и конформацию различных молекул в клетках и тканях растений. Инфракрасная (ИК) спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) — современные методы, на основе которых успешно формируются биотехнологические подходы, позволяющие проводить генетический и функциональный анализ органов и тканей растений на молекулярном уровне, что важно для селекции сельскохозяйственных культур (1-4). Быстрый молекулярный мониторинг позволяет эффективно оценивать результаты диагностики и селекции не только в лаборатории, но и в полевых условиях. Кроме того, эти методы могут служить основой для новых технологий оперативного и квалифицированного контроля качества поступающего сырья для обрабатывающей промышленности (5-7).

Ранее с помощью ИК- и КР-спектроскопии были получены важные характеристики не только структуры отдельных молекул, но и изменений их конформации (изменение доли характерных колебаний химических связей в молекулах) (8-11). Например, с помощью КР-спектроскопии мы выявили изменения в содержании и конформации молекул каротиноидов в хлоропластах гибридов кукурузы (7). С использованием ИК-спектроскопии (область $3500-3000\text{ см}^{-1}$) установлено, что в молекулах хлоропластов (вода, углеводы, белки) доля колебаний ОН-групп и внутри- и межмолекулярных Н-связей была максимальной у линии ZPPL 186, а доля колебаний N-H групп амидов (белки) оказалась минимальной у линии ZPPL 225. Для хлоропластов ZPPL 186 была характерна максимальная доля валентных колебаний от молекул алканов, карбоновых кислот (область $2920-2860\text{ см}^{-1}$) и деформационных колебаний ароматических структур (1000 см^{-1}), а для линии M1-3-3-sdms — доля валентных колебания O=C=O связей (2300 см^{-1}). С помощью КР-спектроскопии (области $1250-500\text{ см}^{-1}$ и $1535-1400\text{ см}^{-1}$) было обнаружено, что различия в хлоропластах у линий кукурузы связаны с изменениями конформации молекул каротиноидов, а не целлюлозы. У всех образцов, кроме ZPPL 225, молекулы каротиноидов находились в 15-trans форме с различной конформацией полиеновой цепи. Важно, что конформация молекул каротиноидов линии ZPPL 186 характеризуется минимальной величиной поворота оси молекулы вне плоскости полиеновой цепи и более выраженными колебаниями боковой метильной группы C-CH₃. Предполагается, что у каротиноидов из хлоропластов листьев различных линий кукурузы отсутствуют взаимодействия с ароматическими аминокислотами белков (7).

Внедрение указанных методов анализа конформации молекул в тканях растений, наряду с молекулярно-генетическими технологиями, способствует формированию молекулярных методов селекции в сельском хозяйстве (7).

В представленной работе с помощью спектроскопии поверхностного внутреннего отражения (ПВО), которая представляет собой модификацию ИК-спектроскопии, впервые зарегистрированы и выявлены различия в содержании и конформации биомолекул в зерне, эндосперме, перикарпе и зародыше гибридов кукурузы ZP 735.

Нашей целью была разработка методологии спектроскопии поверхностного внутреннего отражения для идентификации содержания и конформации органических молекул в цельном семени кукурузы и в его тканях.

Методика. Объектом исследования служили зерна гибрида кукурузы (*Zea mays* L.) ZP 735 (оригинатор — Maize Research Institute, Zemun Polje,

г. Белград, Сербия). Эндосперм, перикарп и зародыш зерна отделяли согласно описанной методике (12). Агронамические, морфологические и химико-физиологические свойства гибрида кукурузы ZP 735, включая селекционные, семеноводческие и технологические характеристики, подробно описаны в работе М. Radosavljević с соавт. (13).

Случайным образом отбирали 30 зерен. Для получения ПВО-спектров образцы целых зерен и их частей (эндосперма, перикарпа и зародыша) измельчали, гомогенизировали и помещали в специальную ячейку прибора. Для регистрации ПВО-спектров использовали спектрометр (Nicolet™ iS20 FTIR Spectrometer, «Thermo Scientific», США) с алмазом (diamond ATR crystal, «Thermo Scientific», США), а для анализа спектров — пакет программ («Thermo Scientific», США). Характеристики прибора были следующими: спектральный диапазон — $3800\text{--}375\text{ см}^{-1}$, разрешение — около $1,0\text{ см}^{-1}$, соотношение сигнал/шум — более 20000:1, линейность ординаты — $0,07\%$ T, точность по волновому числу — $0,01\text{ см}^{-1}$, максимальная скорость — 40 сканирований/с. Спектры регистрировали с 32-кратными повторениями и идентифицировали с помощью библиотек данных (более 1500 соединений). ПВО-спектры сопоставляли в библиотеке данных программы Advanced ATR correction Algorithm («Thermo Scientific», США).

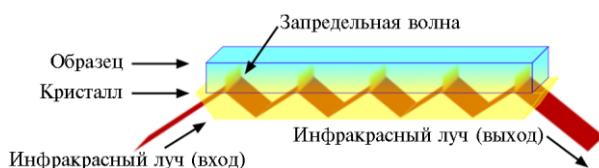


Рис. 1 Оптический путь инфракрасного излучения в кристалле полного внутреннего отражения при проведении ПВО-спектроскопии.

Метод ПВО-спектроскопии основан на отражении пучка света на границе раздела двух фаз: фазы кристалла с высоким показателем преломления, входящего в состав прибора ПВО, и фазы (гомогенной поверхности) исследуемого образца с более низким показателем преломления. В процессе измерения луч света проникает в образец на небольшую глубину, где частично поглощается. При последующих облучениях это явление повторяется, и в результате регистрируется ПВО-спектр.

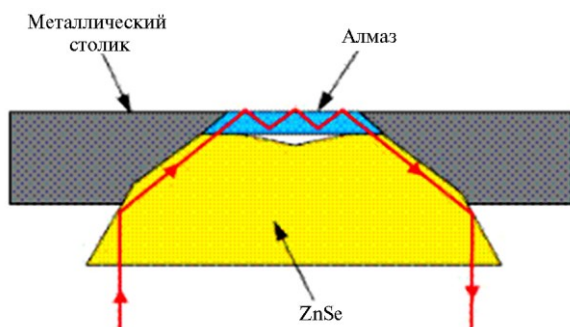


Рис. 2. Схема устройства держателя объекта в приставке ПВО-спектрометра.

При анализе состава образца с помощью ПВО-спектроскопии вещество или объект размещали на поверхности кристалла в приставке ПВО-спектрометра (рис. 1). Далее через кристалл под специально подобранным углом направлялось ИК-излучение, интенсивность которого затем регистрировали на выходе луча света из кристалла.

Важно, чтобы материал кристалла, используемого для ПВО-спектроскопии, обладал высоким коэффициентом преломления (кристаллы алмаза и селенида цинка) (рис. 2).

Существенное преимущество ПВО-спектроскопии заключается в том то, что она позволяет изучать непрозрачные нативные образцы, а также

Результаты. В традиционной ИК-спектроскопии анализируют спектр излучения света, прошедшего через образец, в ПВО-спектроскопии — регистрируют инфракрасное излучение, отраженное от поверхности образца. Метод ПВО-спектроскопии

При анализе состава образца с помощью ПВО-спектроскопии вещество или объект размещали на поверхности кристалла в приставке ПВО-спектрометра (рис. 1). Далее через кристалл под специально подобранным углом направлялось ИК-излучение, интенсивность которого затем регистрировали на выходе луча света из кристалла.

Важно, чтобы материал кристалла, используемого для ПВО-спектроскопии, обладал высоким коэффициентом преломления (кристаллы алмаза и селенида цинка) (рис. 2).

обходиться без длительной пробоподготовки объекта и проводить анализ непосредственно в полевых условиях. Предлагаемая методика дает возможность оценивать состояние (конформацию) и содержание различных биомолекул в цельной ткани (например, лист, корень и т.д.).

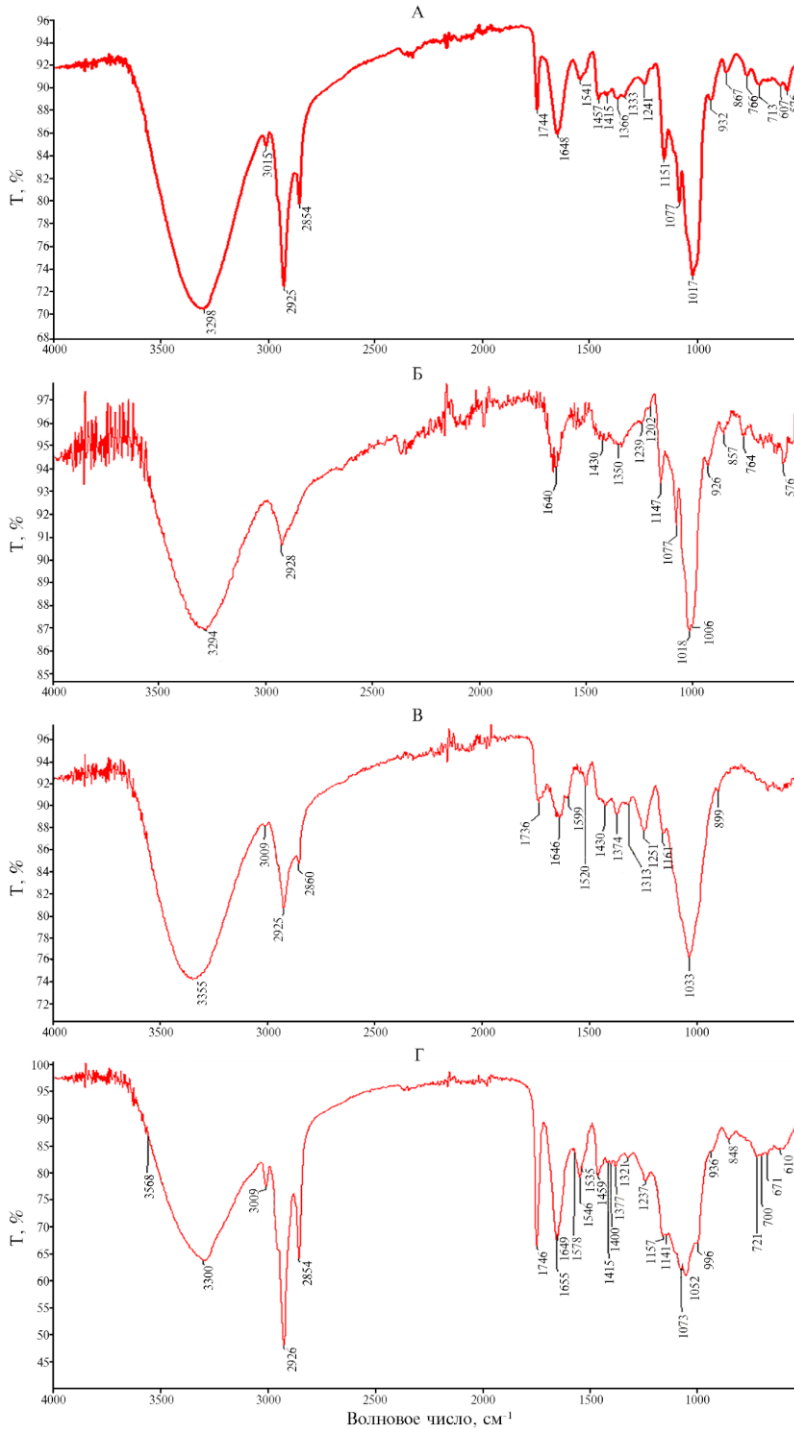


Рис. 3. ПВО-спектры гомогената целого зерна (А), эндосперма (Б), перикарпа (В), зародыша гибрида кукурузы (*Zea mays* L.) ZP 735. Т — коэффициент пропускания (отношение интенсивности света, прошедшего через образец, к интенсивности света, падающего на образец, то есть доля падающего света, которая проходит через испытуемый образец).

Доля эндосперма в зерне гибрида кукурузы ZP 735 составляла 84,75 %, перикарпа — 5,30 %, зародыша — 9,95 % (13). ПВО-спектр гомогената зерна гибрида кукурузы ZP 735 (в диапазоне от 400 см⁻¹ до 4000 см⁻¹) (рис. 3) характеризовался 20 полосами, которые отличались друг от друга амплитудой интенсивности и частотой. Все полосы ПВО-спектра как для гомогената целого зерна, так и для гомогенатов эндосперма, перикарпа и зародыша были разделены на четыре группы по амплитуде максимумов (Т, %).

В целом зерне максимальную (20 % > Т > 6 %) амплитуду интенсивности отмечали при 3298, 2925, 1744 и 1151 см⁻¹, высокую (6 % > Т > 3 %) — на частотах 1648, 1457 и 1077 см⁻¹, низкую (3,0 % > Т > 1,0 %) — на частотах 2854, 1541, 1413, 867 и 766 см⁻¹, очень низкую (1,0 % > Т > 0,2 %) — на частотах 1366, 1333, 1241, 932, 607 и 576 см⁻¹ (табл. 1, 2).

1. Характеристики полос ПВО-спектра гомогената целого зерна, эндосперма, перикарпа и зародыша у гибрида кукурузы (*Zea mays* L.) ZP 735

Порядок регистрации спектральных полос	Интенсивность полосы, %	Волновое число, см ⁻¹	Спектральные полосы максимальной и высокой интенсивности
Целое зерно			
1	20,8	3298	Протеины, липиды, карбоновые кислоты, сахара, сложные эфиры, амиды, кетоны, альдегиды, нитросоединения, амины, эфиры, фенолы, спирты ароматические углеводороды, ациклические соединения, алкины, алкены, алканы
2	12,5	2925	
3	2,9	2854	
4	7,0	1744	
5	6,1	1648	
6	1,9	1541	
7	3,6	1457	
8	1,8	1413	
9	0,8	1366	
10	0,2	1333	
11	0,4	1241	
12	8,0	1151	
13	6,0	1077	
14	9,2	1017	
15	0,2	932	
16	1,8	867	
17	1,4	766	
18	0,8	713	
19	0,2	607	
20	0,2	576	
Эндосперм			
1	17,9	3294	Карбоновые кислоты, липиды, белки, сахара, сложные эфиры, амиды, кетоны, альдегиды, нитросоединения, амины, эфиры, фенолы, спирты ароматические углеводороды, ациклические соединения, алкины, алкены, алканы
2	4,0	2928	
3	6,0	1640	
4	2,6	1430	
5	0,8	1350	
6	1,1	1239	
7	1,2	1202	
8	6,6	1147	
9	6,0	1077	
10	12,0	1018	
11	11,8	1006	
12	0,4	926	
13	0,4	857	
14	1,8	764	
15	1,6	576	
Перикарп			
1	18,0	3355	Протеины, липиды, карбоновые кислоты, сахара, сложные эфиры, амиды, кетоны, альдегиды, нитросоединения, амины, эфиры, фенолы, спирты, ароматические углеводороды, ациклические соединения, алкины, алкены, алканы
2	0,2	3009	
3	7,0	2925	
4	0,2	2860	
5	5,0	1736	
6	2,4	1646	
7	0,2	1599	
8	1,8	1520	
9	2,0	1430	
10	2,0	1374	
11	2,5	1313	
12	4,0	1251	
13	10,0	1162	
14	11,0	1033	
15	0,2	899	

		З а р о д ы ш	
1	5,0	3568	Протеины, липиды, карбоновые кислоты, сахара, сложные эфиры, амиды,
2	10,0	3300	кетоны, альдегиды, нитросоединения,
3	2,0	3009	амины, эфиры, фенолы, спирты, ароматические углеводороды, ациклические
4	14,0	2926	соединения, алкины, алкены, алканы
5	7,6	2854	
6	13,4	2746	
7	9,1	2655	
8	0,2	1648	
9	2,0	1578	
10	1,6	1546	
11	3,2	1538	
12	0,2	1459	
13	0,2	1415	
14	0,2	1400	
15	0,2	1377	
16	0,2	1321	
17	2,2	1237	
18	4,5	1157	
19	1,6	1141	
20	2,0	1073	
21	2,1	1052	
22	7,4	996	
23	2,0	936	
24	0,4	848	
25	0,2	721	
26	0,2	700	
27	0,2	671	
28	0,2	610	

Примечание. Для всех гомогенатов были выявлены следующие колебания атомов в молекуле: симметричные и антисимметричные валентные (stretching); деформационные плоскостные ножничные (scissoring); деформационные плоскостные маятниковые (rocking); деформационные внеплоскостные веерные (wagging); крутильные внеплоскостные деформационные (twisting); дрожание, валентных связей и молекулярных структур (trembling). Расшифровку полос полученных нами спектров проводили согласно опубликованным данным (14-17).

Зарегистрированные ПВО-спектры гомогената эндосперма, перикарпа и зародыша отличались от ПВО-спектров гомогената зерен как по интенсивности, так и по частоте конкретных полос. Установлено, что амплитуда интенсивности полос ПВО-спектра эндосперма была максимальной на частотах 3294, 1147, 1018 и 1006 см⁻¹, высокой — на частотах 2928, 1640, 1147, 1077, 1018 и 1006 см⁻¹, низкой — на частотах 1430, 1239, 1202, 764 и 576 см⁻¹ и очень низкой — на частотах 1350, 926 и 857 см⁻¹ (см. рис. 3, Б, табл. 1, 2). Интенсивность полос ПВО-спектра гомогената перикарпа была максимальной на частотах 3355, 2925, 1162 и 1033 см⁻¹, высокой на частотах 1736 и 1251 см⁻¹, низкой на частотах 1646, 1520, 1430, 1374 и 1313 см⁻¹ и очень низкой на частотах 3009, 2860, 1599 и 899 см⁻¹ (см. рис. 3, В, табл. 1, 2). Интенсивность полос ПВО-спектра зародышей гибрида кукурузы ZP 735 была максимальной на частотах 3300, 2926, 2854, 2746, 2655 и 996 см⁻¹, высокой на частотах 3568, 1538, 1157 и 996 см⁻¹, низкой на частотах 1578, 1538), 1073, 1052 и 936 см⁻¹ и минимальной на частотах 1648, 1459, 1415, 1400, 1377, 1321, 848, 721, 700, 671 и 610 см⁻¹ (см. рис. 3, Г, табл. 1, 2).

Важно, что ранее в наших работах колебания валентных связей функциональных групп органических молекул были выявлены и в классических ИК-спектрах целого зерна (18, 19).

Таким образом, мы установили, что с помощью ПВО-спектроскопии, основанной не на поглощении, а на отражении пучка света на границе раздела двух фаз (кристалла и биологического объекта), можно регистрировать спектры, которые позволяют не только анализировать конформацию молекул различных веществ, но и определять их наличие и концентрацию в тканях семян. Впервые была описана структура (совокупность полос) ПВО-спектра гомогената зерна гибрида кукурузы ZP 735 и составляющих

его тканей по амплитуде характерных полос. Эти данные предлагается использовать для исследования содержания и конформации различных молекул веществ в тканях семян по ПВО-спектрам. Такие результаты важны для определения наличия в зерне необходимых органических соединений или оценки изменения их конформации в процессе селекции.

2. Формы колебаний валентных связей органических молекул в гомогенате целого зерна, эндосперма, перикарпа и зародыша гибрида кукурузы (*Zea mays* L.) ZP 735, выявленные с помощью ПВО-спектроскопии

Волновое число, см ⁻¹				Формы колебаний валентных связей функциональных групп органических молекул
целое зерно	эндосперм	перикарп	зародыш	
				Спирты (O—H)
				Амины (N—H), (C—H)
				Алкины (C≡N), (C≡C)
				Кетоны (=C=O)
				Алкены (C=C)
				Эфиры (O—CH ₂ —)
				Липиды (C=O)
				Карбонильные группы (C=O) (эфиры)
				Амиды (N—CH ₂ —), (—CO—N=)
				Аминогруппы (—NH—)
				Первичные амины (—CONH ₂)
				Карбоксильные группы (—CO ₂ H)
				Имиды (—CO—N—CO—)
				Хлорангидриды (—COCl)
				Нитриты (—C≡N)
				Амиды (N—CH ₂ —)
				Карбонильные группы (C=O) (амиды)
				Алифатические углерод-водородные связи
				Альдегиды (—CHO)
3298	3294	3355	3568	
2925	2928	3009	3300	
2854	1640	2925	3009	
1744	1430	2860	2926	
1648	1350	1736	2854	
1541	1239	1646	1746	
1457	1202	1599	1655	
1415	1147	1520	1648	
1366	1077	1430	1578	
1333	1018	1374	1546	
1241	1006	1313	1535	
1151	926	1251	1459	
1077	857	1161	1415	
1017	764	1033	1400	
932	576	899	1377	
867			1321	
766			1237	
713			1157	
607			1141	
576			1073	
			1052	
			996	
			936	
			848	
			721	
			700	
			671	
			610	

Примечание. Расшифровку полос полученных нами спектров проводили согласно опубликованным данным (14, 16, 17).

Представленные нами данные свидетельствуют, что с помощью ПВО-спектроскопии можно дифференцировать состояние и содержание молекул веществ в тканях не только в лаборатории, но и в полевых испытаниях. При этом анализ ПВО-спектров по двум параметрам — максимальной и высокой амплитуде полос дает возможность исследовать изменения содержания и конформацию различных молекул в тканях семян, тогда как полосы с низкой и очень низкой амплитудой интенсивности, которые мы отмечали в ПВО-спектрах зерна ZP 735, вероятно, позволяют только выявить наличие молекул,

присутствующих в тканях семян в низких концентрациях (следовых количествах).

Очевидно, что предлагаемая нами новая методика исследования семян требует более простой по сравнению с ИК-спектроскопией пробоподготовки и при этом позволяет с высокой чувствительностью исследовать изменения конформации и содержания отдельных биомолекул в цельной ткани. Ранее исследования гомогената семени проводились с помощью ИК-спектроскопии (18, 19). Мы доказали, что полосы ИК-спектров семян гибридов кукурузы аналогичны набору полос ИК-спектров чистых линий кукурузы: колебания валентных С—Н связей алкенов и предельных углеводов соответствуют набору полос 2852 см^{-1} , 2926 см^{-1} и 995 см^{-1} , колебания валентных О—Н связей — набору полос 1161 см^{-1} и 1082 см^{-1} вторичных и третичных спиртов, а колебания валентных С=О связей белков амид I и амид II — набору полос 1651 см^{-1} и 1541 см^{-1} (20, 21). В настоящей работе было установлено, что полосы ПВО-спектров гомогенатов семян кукурузы ZP 735 аналогичны набору полос ИК-спектров: колебания валентных С—Н связей алкенов и предельных углеводов соответствовали набору полос 2854 см^{-1} , 2925 см^{-1} и 932 см^{-1} , колебания валентных О—Н связей — набору полос 1151 см^{-1} и 1077 см^{-1} вторичных и третичных спиртов, а колебания валентных С=О связей амид I и амид II белков — набору полос 1648 см^{-1} и 1541 см^{-1} . С помощью другого метода — вибронной спектроскопии (спектроскопия комбинационного рассеяния) в КР-спектрах семян кукурузы были выявлены дополнительные сигналы, а именно полосы, характерные для молекулы каротиноидов (960 , 1006 , 1156 и 1520 см^{-1}), соответствующие валентным колебаниям С—С связей и делокализации π -электронов в молекуле. Было доказано, что структура молекул каротиноидов у гибридов неодинакова. Минимальную длину полиеновой цепи каротиноидов семян выявили у ZP 335. У остальных гибридов этот параметр практически идентичен: у семян чистых линий соотношение I_{1520}/I_{1156} варьировало от 1,5 (ZP 186, ZP 225) до 1,9 (M1-3-3-sdms). С использованием КР-спектроскопии было установлено, что каротиноиды целых семян ZP 341 имеют минимальное значение соотношения I_{960}/I_{1006} среди гибридов, и оно аналогично показателю для семян линий ZPPL 186 и ZPPL 225. Величина соотношения I_{1156}/I_{1190} в КР-спектре каротиноидов была сходной у всех исследованных гибридов, а у семян ZP 434 выявили максимальную величину I_{1120}/I_{1190} . Последнее, вероятно, свидетельствует о высокой доле каротиноидов, связанных с хлорофиллами в семени (18). Отметим, что во всех этих исследованиях не были получены данные по составу и конформации метаболитов в различных тканях семени, что важно для селекции и генетики.

Далее сравним некоторые наши результаты по амплитудам полос для разных тканей семени кукурузы при использовании ИК- и ПВО-спектроскопии. Методом ИК-спектроскопии было установлено, что для семян гибрида ZP 735 амплитуда полосы 1017 см^{-1} максимальна в гомогенате эндосперма и минимальна в гомогенате зародыша. Вероятно, в этой области ИК-спектра (1017 - 1054 см^{-1}) максимумы полос обусловлены ароматическими СН-плоскими деформационными колебаниями (20, 21). В настоящей работе также было установлено, что амплитуда полосы 1018 - 1052 см^{-1} ПВО-спектра максимальна в эндосперме и минимальна в гомогенате зародыша. Амплитуда полосы 1648 см^{-1} ИК-спектра была максимальна в эндосперме и минимальна в гомогенате зародыша. Вероятно, эти полосы обуслов-

лены валентными колебаниями $C=O$ в амидах, деформационными колебаниями $N-H$ и $C-N$ во вторичных амидах белков, пептидов и свободных аминокислот и также характеризуют колебания OH -группы кристаллической целлюлозной воды (20-22). В настоящем исследовании амплитуда полосы 1640 см^{-1} ПВО-спектра тоже была максимальной в эндосперме и минимальной в гомогенате зародыша.

Как известно, с конформационным состоянием фотосинтетических пигментов связана их функциональная активность (23, 24), что важно, в частности, для селекции. Из методов спектроскопии чаще других для идентификации и исследования органических соединений в биологических объектах используется ИК-спектроскопия (25). Кроме того, следует учитывать, что ИК-воздействие стало одним из распространенных способов обработки растительного сырья (26, 27), что требует углубленного изучения ее физико-химических эффектов.

Отметим, что при спектроскопии поверхностного внутреннего отражения регистрируется не поглощение ИК-излучения света, а его отражение образцом. Следовательно, одно из преимуществ ПВО-спектроскопии заключается в том, что, в отличие от ИК-спектроскопии, при которой свет должен пройти образец насквозь, для спектроскопии поверхностного внутреннего отражения толщина образца не имеет значения. Кроме того, в ИК-спектроскопии для получения полезного спектра обычно нужна дополнительная подготовка: гомогенизированные образцы зерна закатывают в таблетку с бромидом калия (KBr , в соотношении компонентов 1:100), тогда как при ПВО-спектроскопии этого не требуется. Предлагаемый подход и оригинальный метод позволят разработать программу скрининг-исследования не только кукурузы, но и других растений при селекции, заболеваниях, а также при анализе воздействия на растения экстремальных факторов внешней среды.

Итак, в диапазоне волновых чисел от 400 до 4000 см^{-1} в спектрах поверхностного внутреннего отражения (ПВО) целого зерна, эндосперма, перикарпа и зародыша гибрида кукурузы ZP 735 выявлены все известные полосы, полученные при инфракрасной (ИК) спектроскопии. С помощью детектирования полос ПВО-спектра с максимальной и высокой амплитудой интенсивности можно контролировать изменения содержания ряда органических соединений (протеинов, липидов, сахаров, сложных эфиров, амидов, кетонов, альдегидов, карбоновых кислот, простых эфиров, фенолов, спиртов, ароматических углеводородов, ациклических соединений, алкенов, алканов и алкинов) в тканях семени. К важным преимуществам метода ПВО-спектроскопии по сравнению с классической ИК-спектроскопией относятся, с одной стороны, простая пробоподготовка, которая не влияет на физико-химические свойства образца, с другой — эффективная оценка содержания и конформации молекул с высокой чувствительностью (разрешение порядка $1,0\text{ см}^{-1}$). Реализация разработанной методики для формирования технологии молекулярной селекции повысит рентабельность культивирования и эффективность селекции не только кукурузы, но и других сельскохозяйственных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Radenović C.N., Maksimov G.V., Tyutyayev E.V., Stanković G.J., Jovanović Z.V., Beljanski M.V. Detecting the phase transition in thylakoid membranes of maize inbred lines by

- means of delayed fluorescence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 81: 208-211 (doi: 10.1016/j.plaphy.2014.03.013).
2. Grubbs B.A., Etter N.P., Slaughter W.E., Pittsford A.M., Smith C.R., Schmitt P.D. A low-cost beam-scanning second harmonic generation microscope with application for agrochemical development and testing. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11723-11730 (doi: 10.1021/acs.analchem.9b02304).
 3. Butler H.J., Martin F.L., Roberts M.R., Adams S., McAinsh M.R. Observation of nutrient uptake at the adaxial surface of leaves of tomato (*Solanum lycopersicum*) using Raman spectroscopy. *Analytical Letters*, 2020, 53(4): 536-562 (doi: 10.1080/00032719.2019.1658199).
 4. Hu F., Shi L., Min W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 830-842 (doi: 10.1038/s41592-019-0538-0).
 5. Schiavon M., Pizzeghello D., Muscolo A., Vaccaro S., Francioso O., Nardi S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.*, 2010, 36 (6): 662-669 (doi: 10.1007/s10886-010-9790-6).
 6. Ertani A., Francioso O., Tinti A., Schiavon M., Pizzeghello D., Nardi S. Evaluation of seaweed extracts from *Laminaria* and *Ascophyllum nodosum* spp. as biostimulants in *Zea mays* L. using a combination of chemical, biochemical and morphological approaches. *Front. Plant Sci.*, 2018, 6(9): 428 (doi: 10.3389/fpls.2018.00428).
 7. Radenović Č.N., Maksimov G.V., Shutova V.V., Slatinskaya O.V., Protopopov F.F., Delić N.S., Grčić N.M., Pavlov J.M., Čamdžija Z.F. Complete study of nature and importance of spectral bands contained in Infrared spectra of leaves of maize inbred lines with significant breeding properties. *Russian Agricultural Sciences*, 2019, 45(4): 334-339 (doi: 10.3103/S106836741904013X).
 8. Vollhardt P.C., Schore N.E. *SaplingPlus for organic chemistry: structure and function*. NY, 2018.
 9. Krimm S., Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 1986, 38: 181-364 (doi: 10.1016/S0065-3233(08)60528-8).
 10. Свeрдлов Л.М., Ковнер М.А., Крайнов Е.П. *Колебательные спектры многоатомных молекул*. М., 1970.
 11. Radenovich C.N., Maksimov G.B., Шутова В.В., Hao J., Delich N.S., Sechansky M.D., Попович А.С. Использование инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния для анализа состояния биомолекул у линий кукурузы *Zea mays* L. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 6(5): 948-957 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.948rus).
 12. Gálvez Ranilla L. The application of metabolomics for the study of cereal corn (*Zea mays* L.). *Metabolites*, 2020, 10(8): 200 (doi: 10.3390/metabo10080300).
 13. Radosavljević M., Bekrić V., Božović I., Jakovljević J. Physical and chemical properties of various corn genotypes as a criterion of technological quality. *Genetika*, 2000, 32(3): 319-329.
 14. Jackson M., Mantsch H.H. Infrared spectroscopy, ex vivo tissue analysis by biomedical spectroscopy. In: *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. John Wiley & Sons Ltd., New York, 2006: 131-156 (doi: 10.1002/9780470027318.a0107).
 15. Yu P., McKinnon J.J., Christensen C.R., Christensen D.A. Imaging molecular chemistry of pioneer corn. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(24): 7345-7352 (doi: 10.1021/jf049291b).
 16. *Corn: chemistry and technology* /P.J. White, L.A. Johnson (eds.). American Association of Cereal Chemists, Minnesota, 2003.
 17. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. *Principles of instrumental analysis*. Boston, Cengage Learning, 2018.
 18. Radenović Č.N., Maksimov G.V., Shutova V.V., Delić N.S., Milenković M.V., Pavlović M.D., Beljanski M.V. The study by the methods of infrared spectroscopy of the stretching and twisting vibrations of chemical bonds in functional groups of organic compounds contained in grains of maize inbred lines. *Fisiol. Rast. Genet.*, 2018, 50(4): 322-330 (doi: 10.15407/frg2018.04.322).
 19. Radenović Č.N., Maksimov G.V., Shutova V.V., Slatinskaya O.V., Protopopov F.F., Delić N.S., Grčić N.M., Pavlov J.M., Čamdžija Z.F. Complete study of nature and importance of spectral bands contained in infrared spectra of leaves of maize inbred lines with significant breeding properties. *Russian Agricultural Sciences*, 2019, 45(4): 334-339 (doi: 10.3103/S106836741904013X).
 20. Васильев А.В., Гриненко Е.В., Шукин А.О., Федупина Т.Г. *Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений: уч. пос.* СПб, 2007.
 21. Тарасевич Б.Н. *ИК спектры основных классов органических соединений*. М., 2012.
 22. Amir R.M., Anjum F.M., Khan M.I., Khan M.R., Pasha I., Nadeem M. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat. *J. Food Sci. Technol.*, 2013, 50: 1018-1023 (doi: 10.1007/s13197-011-0424-y).
 23. Слатинская О.В., Раденович Ч.Н., Шутова В.В., Максимов Г.В. Изменение конформации каротиноидов семян гибридов кукурузы при действии ультрафиолета и α -частиц. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2020, 60(4): 371-377 (doi: 10.31857/S0869803120040104).
 24. Слатинская О.В., Протопопов Ф.Ф., Сейфулина Н.Х., Маторин Д.Н., Раденович Ч.Н., Шутова В.В., Максимов Г.В. Исследование состояния фотосинтетических пигментов при

- воздействии ультрафиолета и радиации на семена гибридов кукурузы. *Биофизика*, 2018, 63(4): 776–785 (doi: 10.1134/S0006302918040142).
25. Раденович Ч., Максимов Г.В., Тютяев Е.В., Шутова В.В., Делич Н., Чамдзия З., Павлов Й., Йованович Ж. Идентификация органических соединений в зерне гибридов кукурузы (*Zea mays* L.) сербской селекции с помощью инфракрасной спектроскопии. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(5): 645–653 (doi: 10.15389/agrobology.2016.5.645rus).
 26. Rastogi N.K. Recent trends and developments in infrared heating in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(9): 737–760 (doi: 10.1080/10408398.2010.508138).
 27. Aboud S.A., Altemimi A.B., Al-Hilphy A.R.S., Yi-Chen L., Cacciola F. A comprehensive review on infrared heating applications in food processing. *Molecules*, 2019, 24(22): 4125 (doi: 10.3390/molecules24224125).

¹*Institut za kukuruz «Zemun Polje»*,

11185 Srbija, Beograd-Zemun, ul. Slobodana Bajica 1,
e-mail: radenovic@sbb.rs, ndelic@mrizp.rs, msecanski@mrizp.rs,
pkosanic@mrizp.rs, rmilica@mrizp.rs, jpavlov@mrizp.rs;

²*Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizicku hemiju*,

11000 Srbija, Belgrade, Studentski trg, 12-16,
e-mail: danabb@ffh.bg.ac.rs;

³*ФГБОУ ВО Московский государственный университет*

им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,

119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 12,
e-mail: gmaksimov@mail.ru ✉ ;

⁴*ФГБОУ ВО Московский государственный университет*

им. М.В. Ломоносова, Химический факультет,

119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 3,
e-mail: kuramshi@phys.chem.msu.ru;

⁵*ФГБОУ ВО Национальный исследовательский*

Мордовский государственный университет

им. Н.П. Огарёва,

430005 Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Большевикская, 68,
e-mail: vshutova@yandex.ru;

⁶*Shenzhen MSU-BIT University, Biology Department*,

No 299, Ruyi Road, Longgang District,
Shenzhen, Guangdong, 518172 China,
e-mail: haojingrao@126.com

Поступила в редакцию

16 июня 2022 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 5, pp. 933–944

USE OF INTERNAL REFLECTION SPECTROSCOPY FOR MAIZE (*Zea mays* L.) GRAIN DIAGNOSIS

Č.N. Radenović^{1, 2}, G.V. Maksimov³ ✉, G.M. Kuramshina⁴, V.V. Shutova⁵,
J. Hao⁶, N.S. Delić¹, M.D. Sechanski¹, A.S. Popović¹, D.V. Bajuk-Bogdanović²,
M.M. Radosavljević¹, J.M. Pavlov¹

¹*Maize Research Institute, Zemun Polje*, ul. Slobodana Bajica 1, 11185 Belgrade-Zemun, Serbia, e-mail radenovic@sbb.rs, ndelic@mrizp.rs, msecanski@mrizp.rs, pkosanic@mrizp.rs, rmilica@mrizp.rs, jpavlov@mrizp.rs;

²*University of Belgrade, Faculty for Physical Chemistry*, 12-16 Studentski trg, 11000 Belgrade, Serbia, e-mail danabb@ffh.bg.ac.rs;

³*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology*, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia, e-mail gmaksimov@mail.ru (✉ corresponding author);

⁴*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry*, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia, e-mail kuramshi@phys.chem.msu.ru ;

⁵*Ogarev National Research Mordovia State University*, 68, ul. Bolshevistskaya, Republic of Mordovia, Saransk, 430005 Russia, e-mail vshutova@yandex.ru;

⁶*Shenzhen MSU-BIT University, Biology Department*, No 299, Ruyi Road, Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518172 China, e-mail haojingrao@126.com

ORCID:

Radenović Č.N. orcid.org/0000-0002-4997-7635

Maksimov G.V. orcid.org/0000-0002-7377-0773

Kuramshina G.M. orcid.org/0000-0002-4044-471X

Shutova V.V. orcid.org/0000-0001-6437-3621

Hao J. orcid.org/0000-0003-4256-5969

Delić N.S. orcid.org/0000-0003-4020-0114

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

In Serbia, research was funded by the Zemun Pole Maize Research Institute (Belgrade) and the Faculty of Physical

Sechanski M.D. orcid.org/0000-0003-2070-4366

Popović A.S. orcid.org/0000-0002-4569-6799

Bajuk-Bogdanović D.V. orcid.org/0000-0003-2443-376X

Radosavljević M.M. orcid.org/0000-0002-1026-4582

Pavlov J.M. orcid.org/0000-0002-0310-1902

Abstract

Infrared (IR) spectroscopy and Raman spectroscopy (RS) are modern methods on the basis of which biotechnological approaches are being successfully developed that allow genetic and functional analysis of individual plant organs and tissues at the molecular level. In the present work, using surface internal reflection spectroscopy (SIR), which is a modification of IR spectroscopy, differences in the content and conformation of biomolecules in grain homogenates and its components (endosperm, pericarp, germ) of ZP 735 maize hybrids were first recorded and revealed. Our goal was to develop a methodology for surface SIR for the identification of organic molecules, their content and conformation in corn seed and its tissues. The grains of the corn hybrid (*Zea mays* L.) ZP 735 (originator Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade, Serbia) served as the object of the study. Thirty grains were selected by random sampling. To obtain SIR spectra, samples of grains and their parts (endosperm, pericarp, and embryo) were crushed, homogenized, and placed in a special cell of the device. A spectrometer (FT-IR spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) with diamond (diamond ATR crystal, Thermo Scientific, USA) was used to record the SIR spectra, and a software package (Thermo Scientific™) was used to analyze the spectra. The SIR spectra were compared in the data library of the Advanced ATR correction Algorithm program. The SIR spectroscopy method is based on the reflection of a light beam at the interface between two phases: the phase of a crystal with a high refractive index, which is part of the SIR device, and the phase of the sample under study with a lower refractive index. During the measurement, the light beam penetrates to a small depth into the phase of the sample, where it is partially absorbed. During subsequent irradiation of the sample, this phenomenon is repeated, and as a result, the SIR spectrum is recorded. It has been proven that in the range from 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} ATR spectra of whole grain, endosperm, pericarp and embryo of the ZP 735 hybrid are similar to the previously obtained IR spectra of grain, which indicates the possibility of using a new method for molecular breeding technologies. The location of the bands of the SIR spectrum characterizes various forms of vibrations of the valence bonds of the functional groups of the organic molecules of the seed, which makes it possible to identify not only the presence of certain molecules, but also their conformation. It has been proved that by analyzing the amplitude of the SIR spectrum bands (maximum intensity amplitude and high intensity amplitude), it is possible to control changes in the content of a number of organic compounds in seed tissues: proteins, lipids, sugars, esters, amides, ketones, aldehydes, carboxylic acids, simple ethers, phenols, alcohols, aromatic hydrocarbons, acyclic compounds, alkenes, alkanes and alkynes. The obtained results are important for testing the presence of the necessary organic compounds in the grain or changes in their conformation during the selection process. The important advantages of SIR spectroscopy compared to IR spectroscopy include, on the one hand, the preservation of the nativeness of the object (the possibility of conducting research without fixing or staining the object) and simple sample preparation, on the other hand, an effective assessment of the content and conformation of molecules with high sensitivity (resolution about 1.0 cm^{-1}). The implementation of the developed methodology for the formation of molecular breeding technology will increase the profitability of cultivation and the efficiency of breeding not only corn, but also other agricultural plants.

Keywords: *Zea mays* L., hybrid, grain, endosperm, pericarp, embryo, surface internal reflection spectroscopy.