

УДК 581.19:577.1+633.1

B.A. КУЗОВЛЕВ<sup>1</sup>, Н.С. МАМЫТОВА<sup>1</sup>, А.А. АБСАТТАРОВА<sup>2</sup>,  
А.А. ХАКИМЖАНОВ<sup>1</sup>, О.В. ФУРСОВ<sup>1</sup>

## ИНДУКЦИЯ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ В ЗЕРНЕ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ

(<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина

<sup>2</sup>Казахский НИИ Земледелия и Растениеводства)

Проведено исследование влияние влажности и пониженной температуры на активность и компонентный состав  $\alpha$ -амилазы зерновок различных сортов пшеницы. Выявлены сортообразцы, существенно различающиеся по степени индукции фермента в условиях воздействия этих внешних факторов. Предлагается использование данного методического подхода для тестирования генотипов и селекции пшеницы на устойчивость к прорастанию в колосе.

В ряде климатических зон Казахстана при неблагоприятных погодных условиях, таких как высокая атмосферная и почвенная влажность (дождливый сезон) в период созревания и уборки урожая имеет место прорастание зерна в колосе на корню, что приводит к значительному ухудшению его хлебопекарных свойств, а в ряде случаев и полной непригодности для хлебопечения. [1]. Одной из наиболее характерных особенностей проросшего зерна является повышение активности  $\alpha$ -амилазы [2]. Прорастание зерна в колосе в период созревания или при хранении индуцируется синтезом специфической формы фермента -  $\alpha$ -амилазы «прорастания», что приводит к гидролизу гранул крахмала, образованию водорастворимых декстринов и, в конечном итоге, сыропеклости хлеба. [3,4] Установлено, что подверженность пшеницы к прорастанию в колосе зависит от генотипа [5], что открывает перспективы селекции на устойчивость к этому фактору. В свое время нами совместно с селекционерами КазНИИ земледелия, на основе электрофоретического выявления изоферментов  $\alpha$ -амилазы «прорастания» из более чем 200 образцов пшеницы был выделен устойчивый к прорастанию в колосе сорт *Лютесценс 70*.

Однако, как показано рядом исследований последних лет, устойчивость либо склонность к прорастанию зерна пшеницы в колосе является многофакторным признаком и связаны не только с не контролируемым синтезом  $\alpha$ -амилазы «прорастания» в созревающей зерновке. В ряде работ австралийских ученых [6,7] показано суще-

ствование в зерновке ряда генотипов  $\alpha$ -амилазы позднего созревания (*LMA*) - фермента с высокими значениями изоэлектрических точек (ИЭТ). Этими авторами было установлено, что *LMA* форма фермента в пшенице является результатом генетического дефекта, который приводит к аккумуляции в созревающем семени повышенной активности  $\alpha$ -амилазы с высокими ИЭТ в отсутствии условий прорастания (высокой влажности) или других природных факторов. *LMA* фермент в Англии также называют  $\alpha$ -амилазой незрелого зерна (*PMAA*) [8]. Авторы отмеченных выше исследований подчеркивают, что *LMA* или *PMAA* фермент является результатом генетического дефекта, который присутствует у отдельных генотипов пшеницы и, вследствие необратимости селекционеров может распространяться по всему миру посредством селекционных программ. Эта  $\alpha$ -амилаза, синтезированная в созревающей зерновке, сохраняет или увеличивает свою активность за счет температуры хранения (около +12° С), что в последующем приводит к низким показателям «Числа падения» и пагубно влияет на качество конечного продукта – хлеба [9, 10].

Кроме отмеченных выше факторов устойчивости/неустойчивости к прорастанию в колосе нами выявлен еще один фактор – это низкое содержание гормона АБК в зерновке [11]. Как известно, АБК являясь антагонистом ГК, подавляет синтез  $\alpha$ -амилазы «прорастания» и способствует сохранению семени в состоянии покоя [12]. В наших исследованиях показано, что ус-

тойчивые к прорастанию генотипы (*Лютесценс 70*) содержат больше АБК нежели не устойчивые (*Новосибирская 67*).

Таким образом, из приведенного краткого обзора видна генетическая зависимость и многофакторность показателя устойчивости к прорастанию в колосе. Значимость рассматриваемой проблемы подтверждается развитием международных и национальных генетических программ, направленных на изучение этого феномена и поиск устойчивых генотипов [13].

Нами проведено исследование влияния искусственных модельных условий, провоцирующих процесс прорастания и приближенных к климатическим условиям основных зернопроизводящих Северных регионов Казахстана на активность и изоферментные спектры  $\alpha$  – амилазы зерновок различных мягких пшениц с целью выявления сортов и линий, устойчивых к прорастанию в колосе.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работу были включены несколько сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*), районированных в Казахстане (*Саратовская 29, Казахстанская 10, Казахстанская ранняя, Кайыр, Алмакен, Скарлет, Лютесценс 70, Лютесценс 157, Лютесценс 314, Лютесценс 462*), а также высокоозерненные линии пшеницы из 5-го питомника TIFCOS (Trial of facultative and winter lines in Cono Sur) по программе «Суперпшеница» (*№132 озимая, № 132 яровая, №138 озимая, №138 яровая*) урожая 2007 г. Казахский НИИ Земледелия и Растениеводства АО «КазАгроИнновация».

Для моделирования провокационных условий прорастания, свежесобранные колосья стадии полной спелости изучаемых сортов и линий помещали в климокамеру с контролируемыми условиями температуры и влажности. Дневной температурный режим составлял +18°C, а ночной – +10°C, при постоянном значении влажности – 80%. Контролем служили колосья, хранившиеся при комнатной температуре. Проведенные процедуры обработки (увлажнение и охлаждение) имитировали погодные условия с пониженной температурой и повышенной влажностью в период сбора урожая, характерные для Северных регионов Казахстана.

В контрольном и опытном (подвергнутом обработке) зерне на 3, 7 и 11 день определялись общая амилазная и  $\alpha$ -амилазная активность крахмал-йодным методом, описанным в работе [14]. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ)  $\alpha$ -амилазы проводили в 1 мм пластинах 5% ПААГ в градиенте амфолинов pH 4-9. По окончании ИЭФ гели инкубировали в 1% растворе крахмала в течение 1 часа при +4°C с последующим окрашиванием зон активности фермента раствором Й<sub>2</sub>/КJ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучена изменчивость амилазной активности зерна после обработки пониженной температурой и влажностью по срокам воздействия 3, 7, 11 суток (табл.1). Наглядно видно стимулирующее влияние обработки зерна на суммарную ( $\alpha + \beta$ ) амилазную активность. Причем, для некоторых сортов (*Саратовская 29, Казахстанская 10, Лютесценс 462, №138 озимая*) характерно значительное (свыше 10 крат) увеличение амилазной активности в зерновках. Другие же сортообразцы (*Скарлет, Лютесценс 70, Лютесценс 314*) отличались гораздо меньшим (2,0 – 3,5 раза) ростом общей амилазной активности к 11-м суткам обработки.

Как отмечалось выше, эффект прорастания на корню, вызванный условиями созревания или хранения зерна пшеницы связан с синтезом  $\alpha$  – амилазы. В связи с этим проведено исследование изменчивости активности этого фермента при действии пониженной температуры и влажности (табл.2).

Из представленных данных также виден рост  $\alpha$  – амилазной активности, вызванный обработкой. В контрольных образцах активность  $\alpha$  – амилазы была минимальна и практически не изменилась от времени хранения.

Наибольшее увеличение активности  $\alpha$  – амилазы по отношению к контролю на 11 сутки обработки демонстрировали следующие сорта пшеницы: *Саратовская 29* (412 раз), *Казахстанская 10* (148 раз), *Лютесценс 462* (173 раза), *132 озимая* (116 раз), *132 яровая* (105 раз), *Кайыр* (140 раз). Более стабильными и устойчивыми к обработке были следующие сортообразцы: *Скарлет* (40 раз), *Лютесценс 70* (93 раза), *Лю-*

**Таблица 1. Изменение общей амилазной активности в семенах различных сортов пшеницы при воздействии влажности и низкой температуры**

Сорт пшеницы	Амилолитическая активность ед.активности/мл.час				
	Контроль 0 суток	3 суток	7 суток	11 суток	Контроль 11 суток
1. Саратовская 29	212.80 ± 78,84	820.20 ± 34,44	775.80 ± 24,03	3638.40 ± 167,35	227.20 ± 12,03
2. Казахстанская 10	241.60 ± 10,63	754.20 ± 25,64	706.80 ± 27,92	2534.40 ± 101,38	235.60 ± 9,4
3. Казахстанская ранняя	235.60 ± 8,95	583.60 ± 24,51	784.00 ± 34,49	1407.60 ± 54,95	224.80 ± 7,34
4. Кайыр	220.00 ± 8,80	567.60 ± 18,67	573.00 ± 23,49	1519.20 ± 54,98	229.40 ± 8,47
5. Алмакен	220.40 ± 9,24	637.20 ± 22,93	581.00 ± 22,07	1256.40 ± 52,12	205.20 ± 7,79
6. Скарлет	222.40 ± 8,67	616.20 ± 24,03	525.60 ± 15,22	468.00 ± 21,06	222.10 ± 9,10
7. Лютесценс 70	230.00 ± 9,20	622.20 ± 26,75	536.80 ± 16,08	773.80 ± 30,56	220.40 ± 7,46
8. Лютесценс 462	228.40 ± 8,91	729.60 ± 30,64	853.80 ± 24,02	3048.00 ± 975,36	226.00 ± 10,39
9. Лютесценс 314.	217.40 ± 9,78	679.20 ± 24,45	629.40 ± 22,37	684.00 ± 33,65	225.80 ± 6,13
10. Лютесценс 157	209.40 ± 8,38	414.00 ± 16,97	667.20 ± 24,01	1128.00 ± 43,99	208.60 ± 7,48
11. 132 озимая.	230.00 ± 9,68	1600.80 ± 62,43	1515.60 ± 57,51	2246.40 ± 89,84	229.60 ± 7,78
12. 132 яровая	243.00 ± 10,45	1736.40 ± 69,44	1207.20 ± 48,28	2431.20 ± 92,37	236.60 ± 8,28
13. 138 озимая	229.00 ± 8,24	1286.40 ± 50,15	1090.80 ± 45,76	2580.00 ± 105,78	226.60 ± 9,04
14. 138 яровая	268.20 ± 9,92	899.60 ± 34,16	966.00 ± 41,73	2071.20 ± 86,98	246.60 ± 9,84

**Таблица 2. Изменение  $\alpha$ -амилазной активности в семенах различных сортов пшеницы при воздействии влажности и низкой температуры**

Сорт пшеницы	Амилолитическая активность ед.активности/мл.час				
	Контроль 0 суток	3 суток	7 суток	11 суток	Контроль 11 суток
1. Саратовская 29	4.72 ± 0,18	26.18 ± 1,07	88.02 ± 2,81	1713.60 ± 71,97	4.16 ± 0,18
2. Казахстанская 10	5.66 ± 0,22	15.14 ± 0,59	62.28 ± 19,02	888.00 ± 38,18	5.99 ± 0,25
3. Казахстанская ранняя	4.89 ± 0,16	3.07 ± 0,13	4.62 ± 0,07	418.08 ± 16,30	3.91 ± 0,15
4. Кайыр	3.82 ± 0,14	7.40 ± 0,27	6.21 ± 0,23	525.12 ± 21,03	3.76 ± 0,13
5. Алмакен	5.57 ± 0,13	5.12 ± 0,20	5.61 ± 0,22	321.52 ± 10,44	3.71 ± 0,13
6. Скарлет	4.74 ± 0,19	3.19 ± 0,14	5.00 ± 0,19	126.72 ± 4,43	3.18 ± 0,13
7. Лютесценс 70	4.30 ± 0,14	2.65 ± 0,11	2.00 ± 0,12	432.00 ± 16,76	4.56 ± 0,20
8. Лютесценс 462	4.85 ± 0,18	12.28 ± 0,51	13.76 ± 0,53	752.40 ± 3,08	4.34 ± 0,18
9. Лютесценс 314.	3.78 ± 0,17	6.42 ± 0,24	6.81 ± 0,27	83.76 ± 3,22	4.08 ± 0,16
10. Лютесценс 157	7.49 ± 0,30	5.64 ± 0,25	37.26 ± 1,56	23.80 ± 0,95	3.13 ± 0,13
11. 132 озимая.	8.01 ± 0,32	207.00 ± 8,52	203.76 ± 8,35	711.60 ± 29,86	6.14 ± 0,27
12. 132 яровая	8.13 ± 0,29	269.60 ± 10,29	249.50 ± 9,48	629.40 ± 27,67	6.06 ± 0,24
13. 138 озимая	8.25 ± 0,31	157.32 ± 5,65	121.50 ± 5,10	125.40 ± 52,66	3.93 ± 0,13
14. 138 яровая	8.13 ± 0,31	169.20 ± 6,63	209.70 ± 8,80	645.00 ± 26,44	7.82 ± 0,30

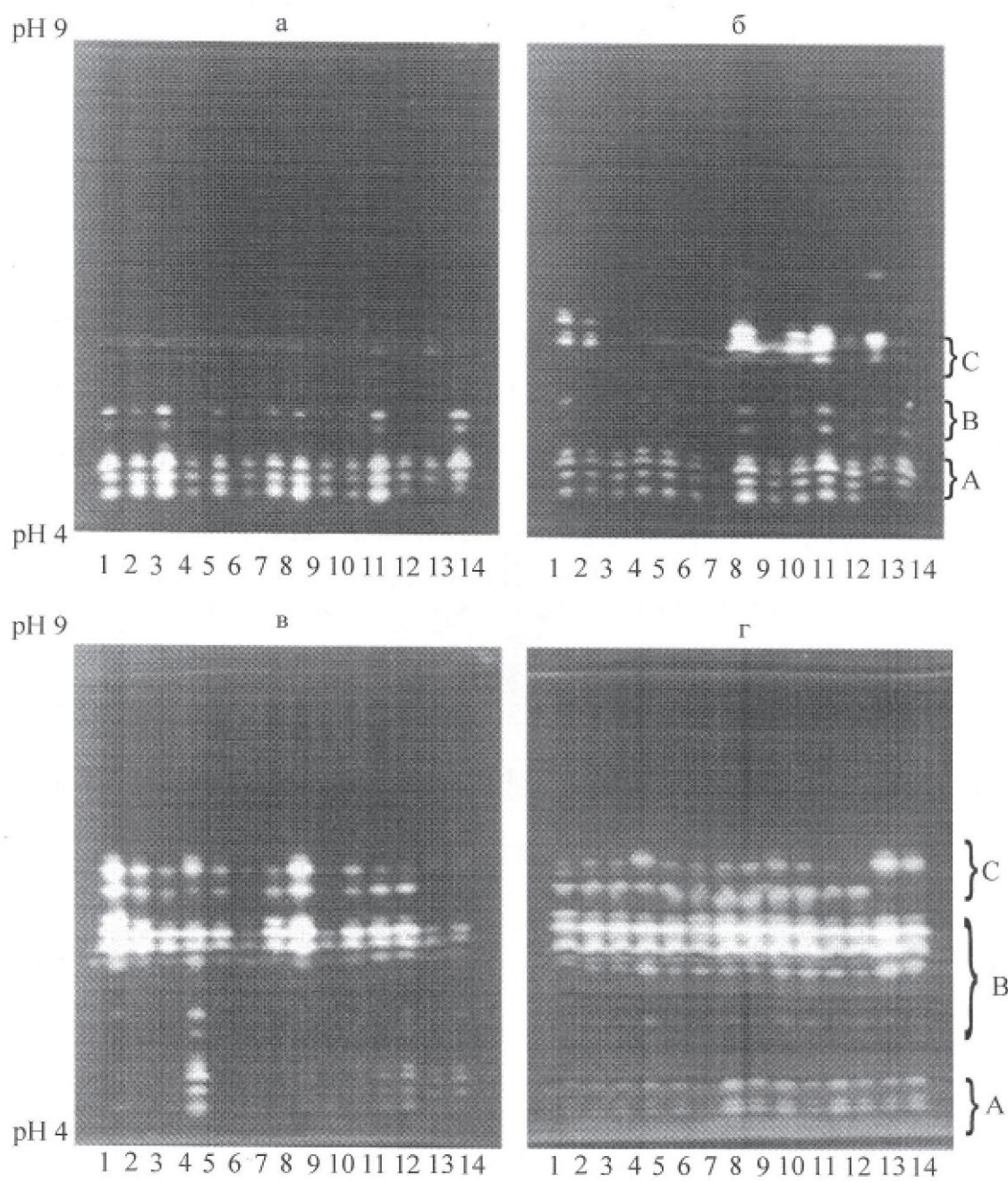


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование  $\alpha$ -амилазы различных генотипов пшеницы.

а – контроль (без обработки); б, в, г – 3, 7 и 11 дней обработки семян влажностью и низкой температурой;

1-14 - сорта пшеницы, соответственно Саратовская 29, Казахстанская 10, Казахстанская ранняя, Кайыр, Алмакен, Скарлет, Лютесценс 70, Лютесценс 157, Лютесценс 314, Лютесценс 462, № 132 озимая, № 132 яровая, № 138 озимая, № 138 яровая.

А, В, С – группы компонентов  $\alpha$ -амилазы.

тесценс 314 (21 раз), Лютесценс 157 (74 раза) и №138 озимая (32 раза). Уже по этим приведенным в таблице 2 данным можно судить о различиях в устойчивости генотипов пшеницы к прорастанию, т.е. наличию каких-то эндогенных фак-

торов, препятствующих не контролируемому синтезу  $\alpha$ -амилазы в провокационных условиях.

Для выяснения вклада различных групп изоферментов  $\alpha$ -амилазы в формировании общей амилазной и  $\alpha$ -амилазной активности под воз-

действием провокационных условий нами изучались спектры фермента после разделения методом изоэлектрофокусирования по стадиям обработки (рис.1, а, б, в, г).

В спектрах контрольных образцов (рис.1,а) выявлялась лишь активность изоферментов, так называемой  $\alpha$  – амилазы «созревания» (группа А) [15].

Присутствие компонентов этой группы в покоящейся зерновке контрольных образцов объясняется тем, что зерно для анализа брали в стадии поздней восковой спелости и эти изоферменты, вероятнее всего, не успели перейти в латентное состояние. Увеличение активности  $\alpha$ -амилазы после экспозиции в провокационных условиях связано с новообразованием изоферментов  $\alpha$  – амилазы «прорастания» групп В и С (рис.1 б, в, г). Причем видно, что исследуемые образцы отличались по динамике синтеза данных изоферментов  $\alpha$  – амилазы .

Наибольшие различия между исследуемыми сортами и линиями в изоферментных спектрах  $\alpha$  – амилазы, индуцируемой обработкой, обнаруживались на 7 сутки (рис 1 в). Максимальную активность изоферментов  $\alpha$  – амилазы «прорастания» демонстрировали сорта *Саратовская 29*, *Казахстанская 10*, *Лютесценс 462* , которые отличались высокой активностью фермента и при биохимическом определении (табл.II). Менее гетерогенными оказались изоферментные спектры сортов *Скарлет*, *Лютесценс 70*, *Лютесценс 314*, *Лютесценс 157* и №138 озимая (рис. 1 в).

К концу периода обработки (11 сутки) различия между образцами по изоферментному составу  $\alpha$  – амилазы «прорастания» в значительной степени нивелировались в связи с довольно высокой удельной активностью фермента на данном этапе обработки. Несмотря на это, все же просматриваются различия в изоферментных составах  $\alpha$  – амилазы с высокими изоэлектрическими точками (группа С), проявлявшей активность на 7 сутки обработки провоцирующими прорастание факторами (рис. 1 в, г). Не исключено, что это может быть связано с наличием у некоторых генотипов вышеупомянутой *LMA* формы фермента. Более детальные исследования возможности присутствия *LMA* формы  $\alpha$ -амилазы среди генотипов пшеницы, возделываемых в Казахстане, являются предметом нашей дальнейшей работы.

Таким образом, среди исследованных образцов пшеницы нами выявлены устойчивые и неустойчивые к внешним факторам индукции  $\alpha$  – амилазы, т.е. к прорастанию зерна в колосе или в процессе его хранения. Неустойчивые к этому воздействию сорта и селекционные линии отличались ускоренной динамикой синтеза изоферментов  $\alpha$  – амилазы «прорастания». Более стабильные генотипы могут служить основой для селекции на устойчивость к прорастанию.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Хайдарова Ж.С., Морунова Т.М., Фурсов О.В., Дарканбаев Т.Б. Амилазная активность и некоторые технологические показатели пшеницы. Прикл. биохимия и микробиология. 1983. Т19. №4. С. 435-446
- Козьмина Н.П. Биохимия зерна и продуктов его переработки. М.: Наука, 1976. 374 с.
- Kruger J.E. Biochemistry of pre-harvest sprouting in cereals and practical application in plant breeding. Cereal Res. Commun., 1976. V.4. P.187-194
- Mansour K. Sprout damage in wheat and its effect on wheat flour product. In: Walker-Simmons M.K., Ried J.L. (eds) Preharvest sprouting in cereals. 1992. P. 8-9
- Mc Key J. Seed dormancy in nature and agriculture., Quality problem in cereals. A Swedish-Soviet symp. at Svalov, 1975. P.74-82
- Mares D.J., Gale M.D. Control of  $\alpha$ -amylase synthesis in wheat grains. In: Ringland K., Mosleth E., Mares D.J. eds. Proceeding of the fifth international symposium on preharvest sprouting in cereals. Boulder, Colorado: Wesview Press. 1990. P.183-194
- Mrva K., Mares D.J. Control of late maturity  $\alpha$ -amylase synthesis compared to enzyme synthesis during germination. In: Noda K., Mares D.J. eds. Proceeding of the seventh international symposium on preharvest sprouting in cereals. Osaka Japan: Center for Academic Societies. 1996. P. 419-426
- Gale M.D., Flintham J.E., Arthur E.D. Alpha-amylase production in the late stage of grain development: an early sprouting damage risk? In: Kruger E.J., LaBerge E.D. eds. Third international symposium on preharvest sprouting in cereals. Boulder, Colorado: Westview Press. 1983. P.29-35
- Mrva K., Mares D.J. Induction of late maturity  $\alpha$ -amylase in wheat by cool temperature. Australian J. Agr. Res. 2001. V.52. P.477-484
- Mrva K., Wallwork M., Mares D.J.  $\alpha$ -Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains. J.Exp.Bot. 2006. V.57. №4. P.877-885].
- Шалахметова Г.А., Биргынбаева Ш.М., Мамытова Н.С., Галиева Л.Д., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А. Фитогормональная регуляция процессов покоя и прорастания семян пшеницы. Вестник КазНУ. Сер. Биол. 2006. Т.29. №3. С.83-87
- Appleford N.E., Lenton J.R. Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase gene expression in germinating wheat (*Triticum aestivum*) grains. Physiol. Plant. 1997. V.100. P.534-542
- Shi-He Xiao, Xiu-Ying Zhang, Chang-Sheng Yan, Hay Lin. Germplasm improvement for preharvest sprouting resistance in Chinese white-grained wheat: An overview of the current strategy. Euphytica. 2002. V.126. P.35-38].

14. Гильманов М.К. и др. Методы изучения ферментов растений. Алма-Ата. Наука. 1981. 91 с.

15. Fursov O.V., Khaydarova J.S., Darkanbaev T.B. Purification, separation and some properties of  $\alpha$ -amylase components of germinating wheat grains. Biochem. Pflanzen. Phisiol. 1986. V.81. 177-187].

#### Резюме

Бидайдың әртүрлі сорттарының және гибридтерінің дәндөріндегі  $\alpha$ -амилазаның электрофоретикалық күрамы мен белсенділігіне тәменгі температураның және ылғалдылықтың әсерін зерттеу жүргізілді. Осы сыртқы факторлардың әсер етуі нәтижесінде ферменттің индукциялық деңгейінде айырмашылықтары бар сортүлгілері анықталынды. Бұл методикалық тәсілді бидайдың масак

кеzіндегі өсуіне тұрақтылығын селекцияда және генотиптерді тестілеуде пайдалану үшін ұсынылады.

#### Summary

A study the effect of humidity and low temperature on the activity and the component composition of  $\alpha$ -amylase of seeds of different sorts of wheat was carried out. The cultivars, which are essentially differed in according to the degree of the induction of enzyme under the conditions of the action of these external factors are revealed. The using of this methodological approach for testing of genotypes and selection of wheat to the stability to the germination in the ear is proposed.