

Н. С. МАМЫТОВА¹, В. А. КУЗОВЛЕВ¹, А. Т. БАБКЕНОВ²,
С. С. МАМЫКОВА², А. А.ХАКИМЖАНОВ¹, О. В. ФУРСОВ¹

МЕТОДЫ ОТБОРА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОРАСТАНИЮ НА КОРНЮ

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы,

²Научно-производственный центр зернового хозяйства им. А. И. Бараева,
Акмолинская обл, Шортандинский р-он, п. Научный

На 14 сортах мягкой яровой пшеницы проведены исследования активности α -амилазы, ИЭФ спектров фермента покоящейся и прорастающей зерновки, влияния экзогенного гормона АБК на эти показатели, а также определение чисел падения в покоящихся семенах. Показано, что наиболее объективным биохимическим методом для отбора устойчивых к прорастанию в колосе генотипов является изоэлектрофокусирование, позволяющее выявлять изоферменты α -амилазы прорастания (α -Amy1) в покоящемся зерне.

Прорастание на корню – явление, при котором зерно пшеницы прорастает в колосе еще до полного созревания. Это явление распространено практически во всех климатических зонах земного шара и связана с погодными явлениями (дожди, росы, резкое колебание температуры воздуха). В ряде климатических зон Республики Казахстан резкие изменения погоды в период созревания вызывают предуборочное прорастание, что приводит к значительному ухудшению хлебопекарных свойств зерна, часто к полной непригодности его для хлебопекарной промышленности [1]. Прорастание на корню (предуборочное прорастание) связано с избыточным синтезом определенных форм α -амилазы, которые гидролизуют крахмал эндосперма, вызывая сыропеклость хлеба, липкость мякиша, изменение цвета и др. [2].

Одним из условий надежной идентификации, т.е. разграничения фенотипов пшеницы на устойчивые и неустойчивые к предуборочному прорастанию является подбор надежных биохимических маркеров. При фенотипировании следует учитывать, что такие показатели, как число падения (ЧП) и активность α -амилазы, отражают не столько собственно предуборочное прорастание, сколько изменения крахмала эндосперма, однако надежно коррелируют с показателем устойчивости [1-3]. Самым лучшим методом определения степени дефектности муки к примеси проросшего зерна будет такой метод, результаты которого тесно коррелируют с основным показателем качества хлеба, т.е. со степенью отклонения свойств мякиша от его нормального состояния. За основной метод определения дефектности зерна принят метод числа падения [4]. Величина этого показателя очень хорошо коррелирует с относительной упругостью мякиша хлеба, с содержанием водорастворимых веществ в мякише. Весьма высокая корреляция существует между величиной ЧП и активностью α -амилазы.

Установлена генетическая природа устойчивости к прорастанию на корню [5]. Устойчивость представляет собой сложное явление, обусловленное, с одной стороны, эффектом Vp-1 генов, контролирующих покой семян, с другой – действием ряда иных механизмов и экспрессией других признаков [6].

Одной из причин высокой активности α -амилазы в созревающем зерне может быть не отсутствие генов/локусов устойчивости к прорастанию на корню, а наличие у сортов дефектных генов, которые обуславливают синтез определенных форм α -амилазы на поздних стадиях развития зерновки без видимых признаков прорастания [8]. Это явление известно как «появление α -амилазы в практически зрелом зерне» (РМАА) или синтез α -амилазы «позднего созревания» (LMA) [6-8]. Оно сопровождается снижением ЧП, ухудшением хлебопекарных свойств зерна, индуцируется температурным шоком (холод и жара) на 25–30 сутки после цветения [5]. Другие формы α -амилазы – α -Amy1 и α -Amy2 – характерны для всех генотипов пшеницы. Степень их проявления зависит от гормонального статуса зерновки.

В регулировании покоя и прорастания участвуют два основных гормона – абцизовая кислота (АБК) и гибберелин (ГК). Количество АБК и ГК и их баланс в зерновке – важнейшие факторы в

контроле развития, созревания и прорастания семян, стимуляции и подавлении синтеза α -амилазы [8].

На зерне сорго [9] выявлены сорта чувствительные, т.е. отзывающиеся на экзогенное внесение гормона ГК повышенным синтезом α -амилазы, а также сорта чувствительные к добавлению АБК, отвечающие репрессией синтеза фермента. В наших исследованиях [10] установлено, что устойчивый к прорастанию в колосе сорт Лютесценс 70 обладал большим содержанием АБК в зерновке по сравнению с неустойчивым – Новосибирская 67.

Значимость обсуждаемой проблемы подтверждается созданием ген-модифицированных растений пшеницы с повышенной устойчивостью к предуборочному прорастанию. Сверхэкспрессия гена AvVp-1, гомолога Vp-1 из дикого овса, в трансгенной пшенице увеличивала чувствительность прорастания к действию АБК и снижала эффект прорастания на корню на 50% [11]. Другое направление придания пшенице повышенной устойчивости к предуборочному прорастанию – это «утилизация» избыточного гормона ГК – достигалось сверхэкспрессией ГК 2-оксидазного гена бобовых в пшенице [12].

Устойчивость зерна к предуборочному прорастанию или прорастанию в колосе имеет генетическую природу и зависит от целого ряда признаков: количества гормонов, наличия деффектных генов, окраски зерновки, длины стебля и др. Исследованию этого явления у нас в Казахстане – одной из крупнейших зернопроизводящих стран мира – уделяется недостаточное внимание. Чтобы восполнить этот пробел, для определения наиболее достоверного способа отбора генотипов пшеницы, устойчивых к прорастанию в колосе, нами на различных сортах яровой пшеницы, возделываемых в республике, проведены исследования изменчивости показателей: число падения, активность α -амилазы, ее гетерогенность в покое и прорастании, воздействие экзогенного гормона АБК.

Материалы и методы

В работе были использованы 13 сортов и одна линия яровой мягкой пшеницы, полученных из Научно-производственного центра зернового хозяйства им. А. И. Бараева. Покоящееся зерно размалывали и проводили экстракцию белков 0,2% CaCl_2 по методике, описанной в работе [13]. Проращивание контрольных образцов проводили при +22-24°C в течение 4-х суток. Опытные образцы проращивали в тех же условиях и на протяжении всего срока эксперимента обрабатывали 10 мМ АБК. Предварительно была проведена работа по определению необходимых для проведения эксперимента концентраций АБК. Установлено, что при концентрации 10 мМ АБК, достигается максимальное подавление активности α -амилазы. Процедуру выделения ферментов осуществляли как и в случае покоящегося зерна.

α -Амилазную активность измеряли крахмал-йодным методом, описанным в работе [13]. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) α -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 одного часа при +4°C с последующим выявлением зон активности фермента раствором J_2/KJ . Число падения определяли на приборе Falling Number 1700 (Perten, Швеция) согласно общепринятому международному стандарту IS03093-2009[14].

Измерение α -амилазной активности проводили в 3-хкратной повторности, в таблице представлены среднестатистические данные.

Результаты исследования

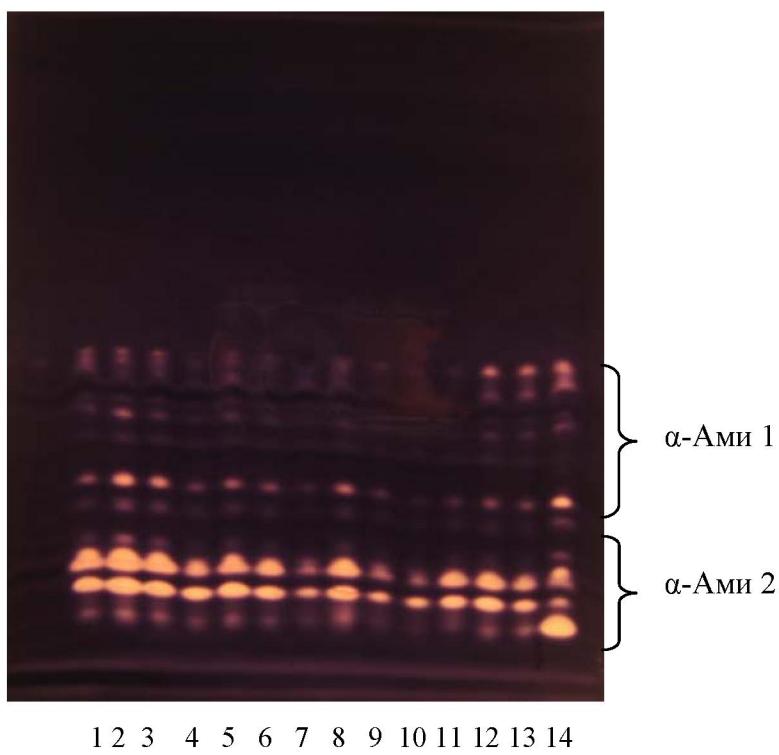
На зерне 14 сортов яровой пшеницы проведено определение числа падения по Хагбергу, активности α -амилазы, ее изоэлектрофоретического спектра и воздействие гормона абцизовой кислоты на активность и гетерогенность фермента. В таблице представлены величины ЧП и активности α -амилазы для исследуемых сортобразцов.

Из приведенной таблицы видно, что наименьшие величины ЧП свойственны сортам Саратовской группы (Саратовская 73 и 70). Числа падения остальных сортов находились в пределах выше 250 сек, т.е. допустимых для процесса нормального хлебопечения [2].

Число падения и активность α -амилазы зерна различных сортов яровой пшеницы

№	Сорт пшеницы	Число падения	α -Амилазная активность Ед.акт./мл.ч. (покой)	α -Амилазная активность Ед.акт./мл.ч. (4 сут. прорастания)	α -Амилазная активность (4 сут. прорастания в присутствии 10 мМ АБК)	
					Ед.акт./мл.ч	% подавл.
1	Акмола-2	348±86*	650±27,3	583500±25090	79040±3319	85,6
2	Астана	370±94	730±27,75	675600±24321	81120±3163	88,0
3	Шортандинская 95	318±86	690±24,15	693600±26356	97760±3714	86,0
4	Целинная 3С	381±100	600±21,6	719400±25179	88480±3096	87,7
5	Целина 50	284±70	700±28,47	676800±21657	24600±959	96,4
6	Целинная юбилейная	317±78	570±17,67	648600±23349	106400±3724	83,6
7	Шортандинская юбилейная	349±86	300±9,6	319200±13406	47600±1952	85,0
8	Шортандинская 2007	349±86	560±22,96	306600±11957	101600±3861	66,9
9	Асыл сапа	380±100	400±15,2	382500±13005	109200±4695	71,5
10	Омская 35	290±78	590±23,01	325500±12369	37200±1525	88,6
11	Линия 118/94-1с	502±100	490±20,58	314100±11621	84240±3201	73,2
12	Саратовская 70	192±46	950±36,1	256200±9991	80960±3643	68,4
13	Саратовская 73	214±54	830±31,54	165900±5436	26600±905	84,0
14	Альбидум 32	272±70	825±32,17	321600±13185	70960±2696	78,0

* ±сек допустимые согласно стандарта ISO3093-2009 отклонения при проведении испытаний в различных лабораториях (Reproducibility limit).

Рис. 1. ИЭФ спектры α -амилазы покоящегося зерна различных сортов яровой пшеницы:

1 – Акмола-2, 2 – Астана, 3 – Шортандинская 95, 4 – Целинная 3С, 5 – Целина 50, 6 – Целинная юбилейная, 7 – Шортандинская юбилейная, 8 – Шортандинская 2007, 9 – Асыл сапа, 10 – Омская 35, 11 – Линия 118/94-1с, 12 – Саратовская 70, 13 – Саратовская 73, 14 – Альбидум 32

Из представленных табличных данных следует также, что сорта Саратовская 70, Целина 50, Альбидум, Саратовская 73 отличаются относительно высокой α -амилазной активностью.

На основе результатов изоэлектрофокусирования (рис. 1) можно заключить, что высокая активность α -амилазы и низкие показатели числа падения сортов Саратовская 70, Альбидум, Саратовская 73 зависят от появления в спектрах α -амилазы «прорастания» или α -Amy1 и наличия активных компонентов α -Amy2. Сорт Целина 50 отличала высокая активность изоферментов группы α -Amy2 (рис. 2, трек 5). Ранее нами было показано [19], что только совместное действие изоферментов групп α -Amy1 и α -Amy2 приводит к активному гидролизу гранул крахмала, что мы и наблюдаем для сортов группы Саратовская и Альбидум 32.

В последующем изучена активность и компонентные составы α -амилазы прорастающих зерновок этих же сортов (табл., рис. 2).

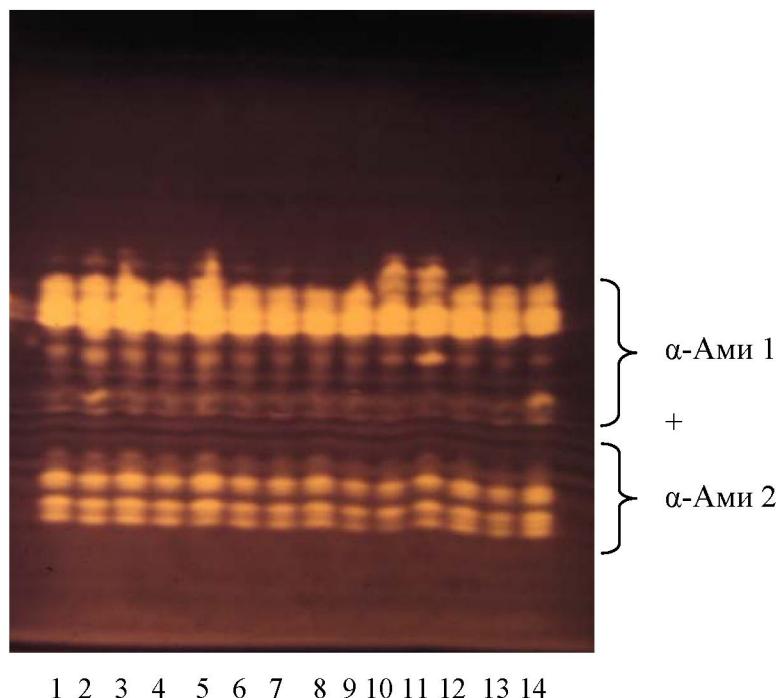


Рис. 2. ИЭФ спектры α -амилазы прорастающего 4 суток зерна различных сортов яровой пшеницы:

1 – Акмола-2, 2 – Астана, 3 – Шортандинская 95, 4 – Целинная 3С, 5 – Целина 50, 6 – Целинная юбилейная, 7 – Шортандинская юбилейная, 8 – Шортандинская 2007, 9 – Асыл сапа, 10 – Омская 35, 11 – Линия 118/94-1с, 12 – Саратовская 70, 13 – Саратовская 73, 14 – Альбидум 32

Установлено, что наиболее высокой потенцией синтеза α -амилазы отличались сорта Целинная 3С, Шортандинская 95, Целина 50, Астана и Целинная юбилейная. Сорта Саратовская 70, Альбидум 32, демонстрировавшие в состоянии покоящего зерна низкие величины чисел падения и высокую активность фермента, не обладали значительной α -амилазой образующей способностью в процессе прорастания (рис. 2).

На изоэлектрофореграммах (рис. 2) прорастающего зерна четко видно, что к 4 суткам прорастивания полностью формируется изоферментный спектр α -амилазы. Причем сорта Целина 50, Омская 35 и линия 118/94-1с демонстрировали наличие активных изоферментов с высокими значениями изоточек (рис. 2, треки 5, 10, 11), что требует их дальнейшего изучения на наличие LMA формы фермента (α -амилаза позднего созревания) [5].

Для выявления потенциальных доноров устойчивости к прорастанию на корню проведено изучение действия экзогенного гормона АБК на активацию α -амилазы и изоферментный состав прорастающего зерна разных сортов пшеницы (табл., рис. 3). Установлено, что сорта яровой пшеницы обладали различной степенью изменчивости α -амилазной активности в ответ на экзогенное добавление в среду прорастивания 10 мкМ АБК (концентрация подобрана экспериментально).

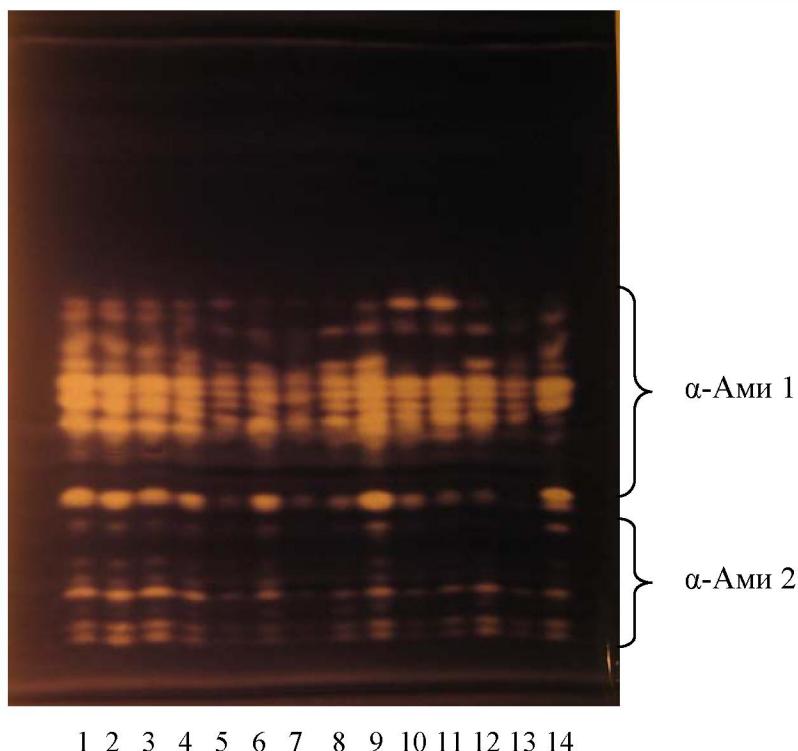


Рис. 3. Влияние экзогенного АБК (10 мкМ) на ИЭФ спектры α -амилазы прорастающего зерна различных сортов яровой пшеницы:

1 – Акмола-2, 2 – Астана, 3 – Шортандинская 95, 4 – Целинная 3С, 5 – Целина 50, 6 – Целинная юбилейная, 7 – Шортандинская юбилейная, 8 – Шортандинская 2007, 9 – Асыл сапа, 10 – Омская 35, 11 – Линия 118/94-1с, 12 – Саратовская 70, 13 – Саратовская 73, 14 – Альбидум 32

Так, наиболее чувствительными к действию гормона оказались сорта Целина 50 (96,4% подавление активности фермента), Омская 35 (88,6%), Астана (88,0%), а наименее чувствительны – Шортандинская 2007 (66,9%), Саратовская 70 (68,4%), и Асыл Сапа (71,5%).

Изоэлектрофокусированием (рис. 3) выявлено действие гормона на отдельные группы изоферментов. Показано, что экзогенный гормон наиболее активно ингибирировал изоферменты группы α -Amy1 у тех сортов, где подавление активности фермента было максимальным. Таким образом, если следовать литературным данным [9], наиболее устойчивыми к проявлению эффекта прорастания на корню являются сорта, наиболее восприимчивые к экзогенной АБК. В нашем случае это Целина 50, Саратовская 73, Омская 35, Шортандинская юбилейная. Наименее устойчивыми оказались сорта Асыл Сапа, Шортандинская 95, Акмола-2 и Саратовская 70. При этом следует отметить, что сорта Саратовская 73, Целина 50, Омская 35 демонстрировали невысокие величины ЧП (менее 300 сек, табл.).

Полученные результаты по числам падения, изменчивости активности α -амилазы и действию АБК на активацию фермента не позволяют однозначно определять устойчивость/склонность сорта к прорастанию в колосе.

Очевидно, что наиболее приемлемым и подтвержденным выведением устойчивого к прорастанию на корню сорта Лютесценс 70 [15] способом отбора является изоэлектрофоретический (ИЭФ) метод выявления генотипов, не имеющих в покоящейся зерновке изоферментов α -Amy1 (α -амилаза прорастания). К таковым в нашем случае можно отнести сорта Целинная 3С, Шортандинская юбилейная, Целинная юбилейная, Асыл Сапа, линия 118/94-1с, обладающих к тому же высокими числами падения (табл.).

Считаем, что исследования должны быть продолжены с использованием условий, провоцирующих прорастание зерна в колосе (влага, температурный шок), что позволит конкретизировать биохимический способ отбора устойчивых генотипов пшеницы с обязательным скринингом селекционного материала на наличие α -амилазы позднего созревания (LMA-форма фермента).

ЛИТЕРАТУРА

1. Хайдарова Ж.С., Морунова Г.М., Фурсов О.В., Дарканбаев Т.Б. Амилазная активность и некоторые технические показатели пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. – 1983. – Т. 9, № 4. – 435-446 с.
2. Козьмина Н.П. Биохимия зерна и продуктов его переработки. – М.: Наука, 1976. – 374 с.
3. Drapron R., Jodan B. Role of enzymes in baking. In Enzymes and Their role in Cereal Technology / J.E. Kruger, D. Lineback, C.E.Stauffer, Eds. // Amer. Assoc. Cereal Chem.. – St.Paul M.N. 1987. – P. 281-324.
4. Hagberg S.A. Rapid method for determining alpha-amylase activity // Cereal Chem. – 1960. – V. 3. – P. 218-222.
5. Mrva K., Mares D.J. Control of late maturity α -amylase synthesis compared to enzyme synthesis during germination // In: Noda, K., Mares, D.J. (Eds.), Seventh International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. – Center for Academic Societies. – Japan, Osaka, 1996. – P. 419-426.
6. Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S. and Scott R.K. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in the UK // Jour. Cereal Sci. – 2001. – 33. – P. 313-329.
7. Mares D.J., Gale M.D. Control of α -amylase synthesis in wheat grains // In: Ringlund, K., Mosleth, E., Mares, D.J. (Eds.) / Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. – Westview Press, Boulder, Co, USA, 1990. – P. 183-194.
8. A.A. Khakimzhanov, V.A. Kuzovlev, O.V. Fursov. Peculiarity of hormonal and sugar regulation of α -amylase isoenzymes in embryo and aleurone of cereal grains // Physiologia plantarum. – V. 133. – Issue 3. – July, 2008.
9. Pagano E.A., Benech-Arnold R.L., Wawczkiewici M., Steinbach H.S. α -Amylase activity in developing Sorghum caryopses from sprouting resistant and susceptible varieties // The role of ABA and GA its regulation. Annals of Botany. – 1997. – V. 79. P. 13-17.
10. Шалахметова Г.А., Ыргынбаева Ш.М., Мамытова Н.С., Галиева Л.Д., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А. Фитогормональная регуляция процессов покоя и прорастания в семенах пшеницы // Вестник КазНУ им. аль-Фараби. – Серия биол. – 2006. – № 3. – 83-87 с.
11. Wilkinson M., Lenton J., Holdsworth M. Transcripts of Vp-1homoeologues are alternatively spliced within the Triticeae tribe // Euphytica. – 2005. – V. 143. – P. 243-246.
12. Appleford N.E.J., Wilkinson M.D., Ma Q., Evans D.J., Stone M.C., Pearce S.P., Powers S.J., Thomas S.G., Jones H.D., Phillips A.L., Hedden P., Lenton J.R. Decreased shoot stature and grain α -amylase activity following ectopic expression of a gibberellin 2-oxidase gene in transgenic wheat // Jour. Exp. Botany. – 2007. – V. 58. – P. 3213-3226.
13. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. – Алма-Ата: Наука, 1981. – 91 с.
14. International Standard. 2S03093-2009. Wheat, rye and flours, durum wheat and durum semolina. – Determination of the falling number according to Hagberg-Perten.
15. Новохатин В.В., Уразалиев Р.А., Абугалиев С.К. Рейтер Б.Г., Фурсов О.В. Свидетельство № 5993 № 7 от 12 февраля 1993г. Всероссийская государственная комиссия по сортопропаганде сельскохозяйственных культур на сорт Лютеценс 70.

Н. С. Мамытова, В. А. Кузовлев, А. Т. Бабкенов, С. С. Мамыкова, А. А. Хакимжанов, О. В. Фурсов

БИДАЙ ДӘНІНІҢ ТАМЫРЫНДА ӨСҮГЕ ТӨЗІМДІЛІГІН ТАНДАУ ӘДІСТЕРИ

Жаздық жұмысқаң бидайдың 14 сұрыбының тыныштық күйі мен өсу кезіндегі дәнддердегі α -амилазаның белсенділігі және ферменттік ИЭФ спектрі зерттеліп, осы көрсеткіштерге АБҚ гормонының экзогенді есері, сонымен қоса дәнддердің тыныштық күйінің тұсу саны анықталды. Масакта тұрып өсуге төзімді генотиптерді тандау үшін тыныштық күйіндегі өсу α -амилазасының (α -Amy1) изоферментін анықтайтын изоэлектрофокустеу әдісі тиімді биохимиялық тәсіл екендігі көрсетілді.

N. S. Mamytova, V. A. Kuzovlev, A. T. Babkenov, S. S. Mamykova, A. A. Hakimzhanov, O. V. Fursov

METHODS OF SELECTION FOR RESISTANCE OF WHEAT GRAIN TO PRE-HARVEST SPROUTING

On 14 varieties of soft spring wheat investigated activity of α -amylase, IEF spectra of enzymes dormant and sprouting grains, the effects of exogenous hormone ABA on these indicators and identification of falling number in seeds. It is shown that the most objective biochemical method for the selection of resistant genotypes germination in the ear is isoelectric focusing, enabling the identification of germination α -amylase (α -Amy1) isozymes in the dormant seeds.