

На правах рукописи



ПРУДНИКОВА ЕЛЕНА ГЕННАДЬЕВНА

**БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНЫЙ КОМПЛЕКС ХЕМОМУТАНТОВ И
ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ**

03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Орел - 2006

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Павловская Нинэль Ефимовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Пузина Тамара Ивановна

кандидат сельскохозяйственных наук,
Джигадло Михаил Иосифович

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур РАСХН

Защита состоится « 2 » ноября 2006 г. в 14 ³⁰ часов на заседании диссертационного совета КМ 220.052.01 в ФГОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет» по адресу: 302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Орловского государственного аграрного университета.

Автореферат разослан « 30 » сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент

Т. Макеева Макеева Т.Ф.

2006А
21432

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Основной зерновой культурой в Центральных районах России является пшеница, так как она содержит большое количество крайне необходимых для жизни человека белков и углеводов. Технологические свойства зерна пшеницы в значительной степени определяются составом запасных белков, образующих клейковину, и функциональными особенностями крахмала.

Между тем уровень производства зерна пшеницы не удовлетворяет растущие потребности населения. Важнейшим резервом повышения урожайности и качества зерна пшеницы является создание и внедрение в производство сортов, устойчивых к заболеваниям и неблагоприятным условиям среды. Этого можно достигнуть, используя биотехнологические приемы в сочетании с методами классической селекции.

Одним из эффективных методов биотехнологии, позволяющий сдвинуть синтез запасных веществ в нужную для потребителя сторону, является индуцированный мутагенез. Особенно важно при этом установить последствие мутагенеза на стабильность признака в поздних репродукциях.

Сорта, полученные в результате мутагенеза, различаются и по содержанию фитогормонов и отзывчивости их к синтетическим аналогам. Однако, если действие мутагенных факторов на растения достаточно хорошо известно, то их последствие практически не изучалось.

Цель и задачи исследований. Цель работы - выявить полиморфизм хемомутантных сортов пшеницы по составу белков и углеводов и установить влияние индуцированного химического мутагенеза на качество зерна пшеницы.

Задачи:

1. Провести идентификацию и паспортизацию хемомутантных сортов пшеницы по белковым и ДНК-маркерам.
2. Провести скрининг хемомутантов пшеницы на фракционный состав белка и связать его с качеством клейковины зерна.
3. Исследовать углеводный комплекс хемомутантов пшеницы.
4. Выявить антипитательные компоненты белка в зерне хемомутантов пшеницы.
5. Установить гормональный статус хемомутантов пшеницы и его влияние на белково-углеводный комплекс зерна.



6. Сформулировать теоретические и экспериментальные предпосылки использования химического мутагенеза в биотехнологии пшеницы.

Научная новизна работы. Впервые проведен скрининг хемомутантных и районированных сортов пшеницы на содержание сырого протеина и фракционный состав белков зерна, осуществлена регистрация сортов по белковым и ДНК – маркерам, изучен углеводный комплекс в семенах и проростках, установлены изменения в гормональном балансе растений. Выделены лектины зародыша, ингибиторы протеиназ и амилаз из семян пшеницы, установлен их полипептидный и углеводный состав; испытана их биологическая активность к бите.

Практическая значимость работы. Составлен электронный каталог хемомутантных сортов озимой пшеницы по белковым и ДНК – маркерам. Дана характеристика питательной ценности зерна пшеницы, выявлены хемомутантные сорта с лучшими показателями качества: Булава, Сибирская нива, Ботовская 1. Установлено инсектицидное и фунгицидное действие лектина зародыша пшеницы (ЛЗП).

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены: на V съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003), на 2-ом Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2004), на научно-методической конференции «Физиологические аспекты продуктивности растений» (Орел, 2004), на научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов «Биологические основы современной агрономии» (Орел, 2004), на международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на 3-ем Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, предложений для производства, приложения, списка литературы, включающего 139 отечественных и 73 иностранных источников. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 57 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационная работа выполнена в НИИЛ ОГАУ в период с 2002-2005г.г. в рамках программы РАСХН 04.02.01. по теме: «Разработать новые эффективные методы оценки мирового разнообразия культурных растений по признакам качества, устойчивости к неблагоприятным абиотическим факторам среды, болезням и вредителям», в соответствии с заданием 04.05.09.01. «Разработать методы контроля однородности и стабильности сортов нового поколения зерновых, зернобобовых и крупяных культур в звеньях первичного семеноводства с использованием белковых и ДНК-маркеров и приемы повышения экологической устойчивости за счет биологически активных веществ».

Материалом для исследований послужили 9 хемомутантов озимой мягкой пшеницы, созданные в лаборатории мутационной селекции и профилактической защиты окружающей среды Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН (Москва): Беседа, Ритза, Волжанка Елена, Ботовская 1, Булава, Сибирская нива, Бешкиль 500, Белая, Имени Рапорта; Московская 39 (стандарт), и 3 районированные в Орловской области сорта озимой и яровой пшеницы: Мироновская 808 (стандарт), Труженица, Крестьянка, всего 13. Все мутанты получены методом химического мутагенеза с использованием обработки семян супермутагеном этиленимином в концентрациях 0,01-0,04% при 24 ч. экспозиции. Исходным материалом служил пшенично-пырейный гибрид 186 (ППГ 186), созданный акад Н.В.Цициным (1954). Схема эксперимента представлена на рис. 1.



Рис. 1 – Схема эксперимента

Идентификацию и регистрацию сортов пшеницы – по полипептидному составу белков определяли методом SDS-ПААГ электрофореза по стандартной методике ИОГен; идентификацию образцов по ДНК маркерам – методом ПЦР; содержание протеина в зерне пшеницы - методом Къельдаля; крахмала – поляриметрическим методом; сахарозы, фруктозы - спектрофотометрически с использованием резорцинового реактива (Туркина, Соколова, 1971); глюкозы, мальтозы - колориметрическим методом с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (Рихтер и др., 1960); гемагглютинирующую активность – по Г.Я.Алексидзе (1983); активность ингибиторов протеиназ - казеинолитическим методом М.Л.Какейда (Бенкен, 1982); содержание амилозы, активность α -амилазы – спектрофотометрическим методом в модификации А.И.Ермакова (1987); статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа (Доспехов, 1985) с использованием компьютерных программ «Excel» и «Biotest – D».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Идентификация и паспортизация хемомутантных сортов пшеницы по белковым маркерам. Маркером у пшеницы является глиадин – запасной белок эндосперма, состав электрофоретического спектра которого – генетически обусловленный признак, хорошо отражающий специфические особенности сорта независимо от условий выращивания. Установлено, что все исследованные сорта по уровню и характеру изменчивости полипептидных спектров не идентичны, что отражает характер их внутрисортного полиморфизма. На основании визуальной оценки гелей был составлен каталог электрофоретических спектров глиадина хемомутантных сортов озимой мягкой пшеницы (рис. 1).

Синтез глиадина контролируется шестью локусами тесносцепленных генов, расположенными в хромосомах первой и шестой гомеологических групп. Компоненты электрофоретического спектра, кодируемые генами одного локуса, всегда наследуются сцепленными группами или блоками, поэтому согласно методике ИОГен им.Вавилова, принятой в Министерстве с/х, составлены электрофоретические формулы глиадинов мягкой пшеницы для данных сортов.

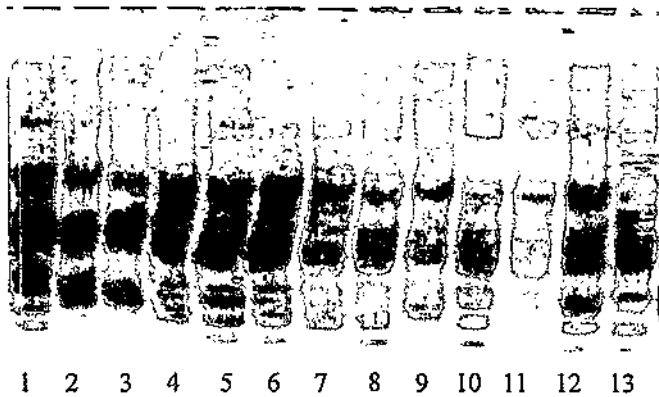


Рис. 1 – Электрофореграммы глинадов хемомутантных сортов озимой пшеницы (1-Беседа, 2-Ритза, 3-Ботовская 1, 4-Волжанка Елена, 5-Имени Рапопорта, 6-Московская 39, 7-Сибирская нива, 8-Булава, 9-Белая, 10-Бешкиль 500) и районированных в Орловской области сортов пшеницы (11-Мионовская 808, 12-Труженица, 13-Крестьянка)

Для количественного выражения и сравнения сортов со стандартом (сорт пшеницы Мионовская 808) проведен компьютерный анализ белковых спектров в программе «Biotest – D». Показателем выраженности полипептидных зон является «светимость», в процентах. Выявлены наиболее существенные отличия у хемомутантных сортов пшеницы Беседа (95%), Имени Рапопорта (86%), Белая (82%) (рис.2).

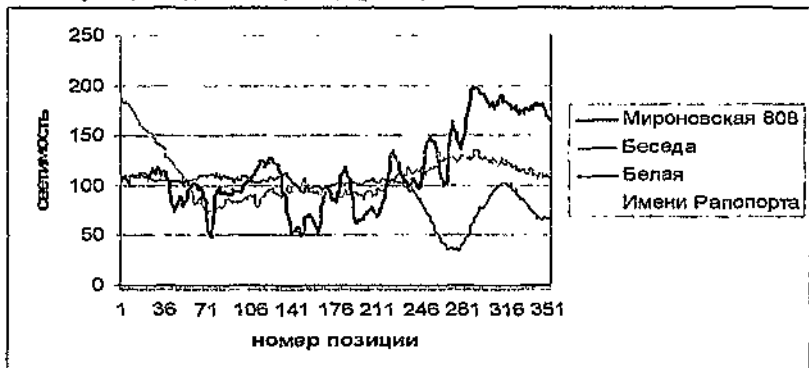


Рис. 2 – Отличие спектров полипептидного состава семян хемомутантных сортов пшеницы (от стандарта Мионовская 808)

Полиморфизм сортов пшеницы по ДНК- маркерам. Идентификация сортов проводилась по ДНК- маркерам ПЦР- анализом. Для амплификации геномной ДНК использовали праймеры 10-ти разновидностей в различной комбинации попарно и по одному. Сортные различия найдены с праймером Raw S6 (рис. 3). Так, фрагменты продукта амплификации ДНК, соответствующие 600-800 п.н., характерны для всех сортов пшеницы, а в зоне от 250 до 600 п.н. обнаружены фрагменты ДНК, дающие возможность выявить межсортной полиморфизм.

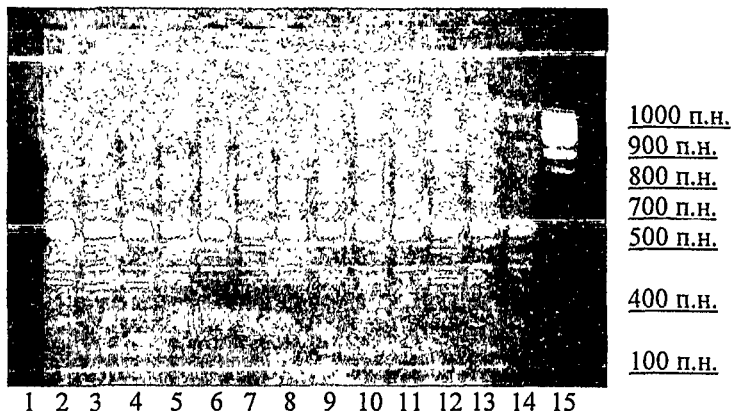


Рис. 3 – Продукты амплификации ДНК сортов пшеницы с праймером Raw S6 (1-Контроль, 2-Ритза, 3-Беседа, 4-Ботовская 1, 5-Сибирская нива, 6-Имени Рапорорта, 7-Белая, 8-Волжанка Елена, 9-Булава, 10-Московская 39, 11-Бешкиль 500, 12-Мироновская 808, 13-Крестьянка, 14-Труженица, 15-Маркер)

Установленные генетически обусловленные различия хемомутантов стали основой для детального изучения белково-углеводного комплекса и выявления источников для улучшения качества зерна пшеницы.

Скрининг хемомутантов на содержание протеина, фракционный состав белка и связь его с качеством клейковины зерна. Исследования 2002-2005г.г. показали, что содержание белка по годам выращивания в зависимости от генотипа изменяется в пределах от 8,42 до 17,55% (рис. 4). Сорта с наиболее высоким содержанием протеина: Сибирская нива, Ботовская 1, Ритза (15,47...17,55%), низким - сорт Булава (9,13%), и мало изменяется по годам выращивания. В

Орловской области высокий показатель протеина у сорта Мионовская 808 (15,08%), несколько ниже у ярового сорта Крестьянка (11,22%) и озимого сорта Труженица (12,13%).

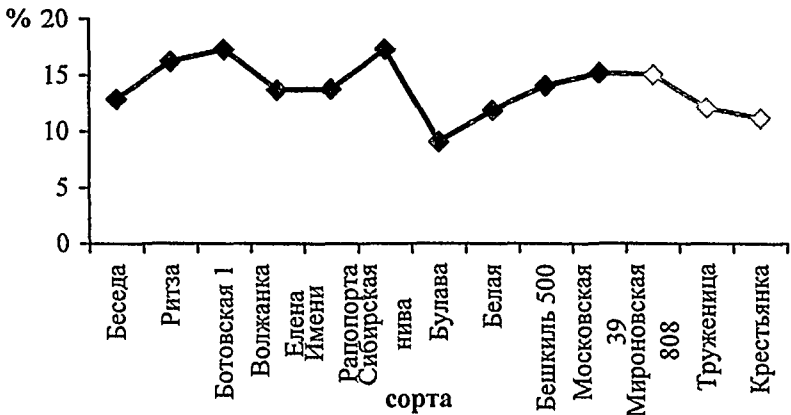


Рис. 4 – Содержание протеина в зерне пшеницы (среднее по годам)

Качество зерна пшеницы зависит не только от содержания белка, но и от соотношения его фракций. Белки зерна пшеницы делятся на несколько фракций. Среднее количество альбуминов (4,2...9,7%), глобулинов (12,5...19,3%) у хемомутантных сортов пшеницы несколько выше по сравнению со стандартными и районированными сортами (4,5...6,6%; 12,5...21,0%) (рис.5). Содержание проламинов (17,1...28,3%) и глютелинов (25,4...39,2%) - запасных белков несколько ниже или на уровне стандарта. Содержание склеропротеинов варьирует от 6% (сорт Бешкиль 500) до 14% (сорт Сибирская нива), небелкового азота (свободных аминокислот, их амидов, нуклеиновых кислот, некоторых пептидов и ряда других) у хемомутантов от 5% (сорт Ботовская 1) до 15% (сорт Булава).

Наибольшие различия по фракционному составу белков выявлены у хемомутантных сортов пшеницы. Так, у сорта пшеницы Булава отмечено высокое содержание фракции глютелинов; у сорта пшеницы Сибирская нива – глобулинов; у Ботовской 1 и Ритзы – альбуминов. Таким образом, химический мутагенез способствует увеличению содержания фракции альбуминов, глобулинов, глютелинов, и в меньшей мере проламинов.

У ярового сорта пшеницы Крестьянка, в отличие от озимого сорта пшеницы Труженица, преобладает содержание фракции глютенинов (на 4%).

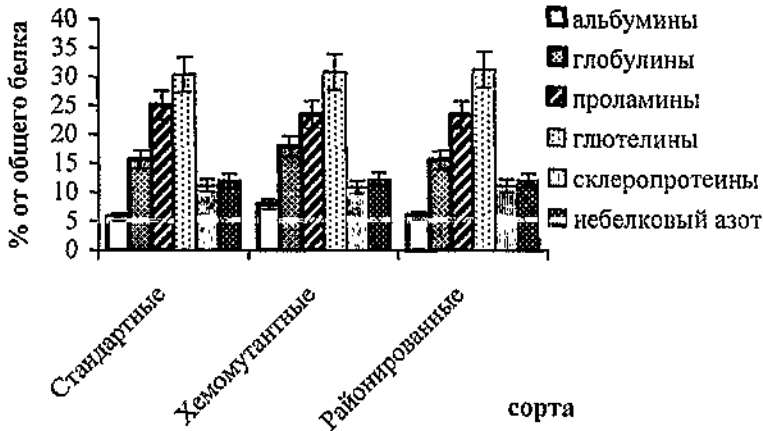


Рис. 5 – Фракционный состав зерна пшеницы (среднее по годам)

Значение запасных белков определяет их участие в формировании клейковины. Глютеин придает клейковине упругие свойства, а глиадин обуславливает растяжимость и связность, но ни один из них в отдельности не обладает всеми характерными реологическими свойствами (растяжимостью, связностью, упругостью, эластичностью) клейковины. Только взаимодействие этих фракций в едином комплексе придает клейковинному белку все присущие ему особенности. Наиболее полноценной считается клейковина, в которой содержится примерно одинаковое количество той и другой фракции, создающее сплошную упругую сетку. В процессе замеса теста и брожения такая масса хорошо удерживает углекислый газ, обеспечивая повышенную пористость, большой объем хлеба и значительно лучшие его вкусовые и питательные свойства.

Содержание клейковины за 2001-2003гг. варьировало в пределах от 19% (сорт Имени Рапорта) до 24% (сорт Волжанка Елена), а у районированных в Орловской области сортов – 22% (табл.1). Самые высокие показатели обусловлены или высоким содержанием глиадинов (Ботовская 1, Бешкиль 500) или глютеина (Волжанка Елена, Сибирская нива), но не обеими фракциями. Низкое содержание

клейковины у сорта Беседа, Имени Рапопорта, Булава, Труженица обусловлено снижением содержания одной из фракций.

Таблица 1 – Содержание клейковины и составляющих ее белков в зерне пшеницы

№	Сорт	Клейковина, % в муке	Содержание клейковинных белков, % от общего белка		
			общее	глиадин	глютенин
1.	Беседа	20,9	53,6	24,5	29,1
2.	Ритза	19,2	52,0	23,7	28,3
3.	Волжанка Елена	24,1	59,5	25,1	34,4
4.	Ботовская I	23,5	57,0	27,5	29,5
5.	Имени Рапопорта	19,0	50,7	24,2	26,5
6.	Московская 39 (стандарт)	22,5	49,0	21,3	27,7
7.	Сибирская нива	23,7	58,8	20,1	38,7
8.	Булава	19,3	52,4	19,3	33,1
9.	Бешкиль - 500	23,4	58,1	27,7	30,4
10.	Белая	22,8	56,2	25,2	31,0
11.	Мироновская 808 (стандарт)	21,8	54,8	25,0	29,8
12.	Труженица	21,2	54,2	25,1	29,1
13.	Крестьянка*	21,7	55,5	21,9	33,6
NCP 0,05		0,58	1,34	0,91	0,72

*- сорт яровой пшеницы

Установлена низкая отрицательная зависимость между содержанием протеина и клейковины ($r = -0,25$) и средняя

положительная – между количеством клейковинных белков и клейковины ($r = 0,57$).

Следует отметить, что ни хемомутанты, ни районированные в Орловской области сорта пшеницы не обладают рекордно высоким (28- 36%) содержанием клейковины.

Особенности углеводного комплекса семян хемомутантных сортов озимой пшеницы. Основную массу зерна пшеницы составляют углеводы. Они являются главным продуктом фотосинтеза, служат основным дыхательным субстратом, формой запасания и транспорта углерода, обуславливают устойчивость растений к низким температурам и другим неблагоприятным условиям среды. В зерне пшеницы углеводы, в основном, представлены крахмалом. За годы исследований показано, что содержание крахмала в зерне варьирует в довольно широких пределах (51,0...66,7%) и в среднем составляет 60,5% (рис.6). Количество крахмала оказалось высоким у хемомутантных сортов озимой пшеницы Булава, Беседа, Имени Рапопорта (62...67%), низким – Ботовская 1, Ритза, Сибирская нива (51...59%). Содержание крахмала у сортов пшеницы, районированных в Орловской области, варьирует от 57% (сорт Мироновская 808) до 64% (сорт Крестьянка).

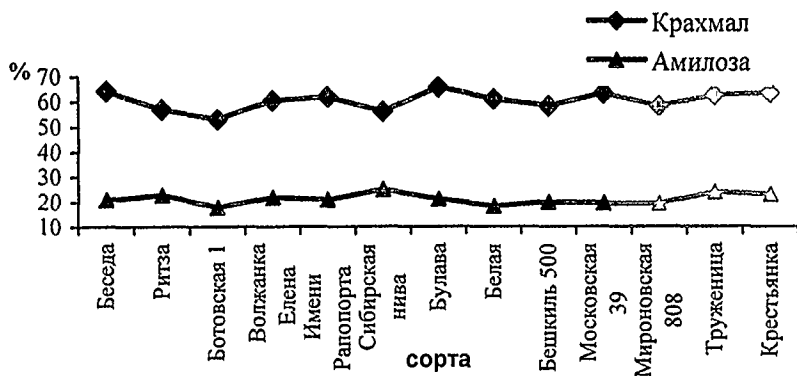


Рис. 6 – Содержание крахмала и амилозы в зерне пшеницы

Функциональные свойства крахмала и качество продуктов, получаемых на их основе, зависят от соотношения основных полисахаридов крахмала - амилозы и амилопектина. Сорта с высоким содержанием амилозы в крахмале можно рассматривать как сырье для получения пшеничной муки, обеспечивающей производство

хлебобулочных изделий с диетическими свойствами. Установлено, что удельный вес амилозы в крахмале в среднем составляет у хемомутантов 21%. У хемомутантных сортов Сибирская нива, Ритза наблюдается повышенное содержание амилозы при низком содержании крахмала. Между содержанием крахмала и амилозы, крахмалом и активностью α -амилазы обнаружена низкая положительная корреляция ($r = 0,14; 0,26$).

Кроме крахмала в зерне пшеницы, выявлены простые сахара. Наличие сахаров в зерне пшеницы и продуктах его переработки, в частности, муке, способствует развитию дрожжей и молочно-кислых бактерий при тестоведении. Хроматографическое исследование углеводного состава зерна пшеницы с использованием стандартных метчиков показало наличие в нем мальтозы, сахарозы, галактозы, глюкозы, арабинозы, фруктозы, ксилозы, рибозы, рамнозы, глюкозамина, глюкурона. Наиболее высокое содержание сахаров, превышающее Московскую 39, отмечено в зерне Волжанки Елена и Булавы (6,1...6,8%), наименьшее - у Ботовской 1 и Беседы (4,8...5,1%) (рис. 7).

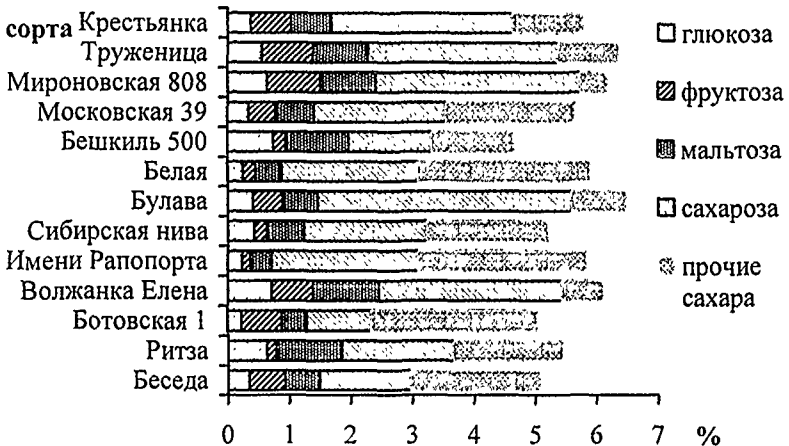


Рис. 7 – Содержание сахаров в семенах различных сортов озимой пшеницы

У районированных сортов наиболее низкие показатели количества определяемых сахаров у сорта яровой пшеницы Крестьянка (5,8%), наиболее высокие у сорта Мироновская 808 (6,6%), что, видимо, отражается на их разной морозостойчивости.

Соотношение белковых веществ и углеводов может меняться как в процессе онтогенеза, так и под влиянием условий внешней среды, что, скорее всего, отразится в накоплении запасных веществ при формировании семени. В наших исследованиях соотношение крахмала к протеину подчиняется обратной корреляционной зависимости, $r = -0,84$. Величина этого соотношения у хемомутантных сортов пшеницы варьирует от 3 (сорт Ботовская 1) до 7 (сорт Белая). Превышение этого показателя над стандартным сортом Московская 39 наблюдается только у сортов пшеницы Беседа, Белая, Булава. У остальных исследованных хемомутантных сортов пшеницы содержание крахмала к белкам находится на уровне (сорт Бешкиль 500) или несколько ниже стандартных сортов пшеницы. У сортов пшеницы, районированных в Орловской области, это соотношение в среднем составляет 5, т.е. выше, чем у хемомутантов.

Скрининг сортов пшеницы на наличие антипитательных и токсичных веществ. Качество муки определяется содержанием белков и углеводов, а компонентами, которые могут снизить потребительские свойства зерна, являются антипитательные вещества, принимающие, как известно, участие в защитных механизмах растений (ингибиторы гидролаз, лектины, алкалоиды и т.д.).

Хемомутанты имеют более высокий показатель гемагглютинирующей активности лектинов (ГА) и ингибиторов протеиназ, чем стандартные и районированные сорта, что определяет их высокие адаптационные свойства (табл.2).

Установлено, что наибольшей ГА обладали следующие хемомутанты: Волжанка Елена, Ботовская 1, Булава ($30,5...36,0$ $[\text{мг/мл}]^{-1}$). У сорта Беседа сохраняется самый низкий показатель ГА за годы исследований — $25,8[\text{мг/мл}]^{-1}$.

Активность ингибиторов протеиназ и α -амилаз в семенах пшеницы незначительно изменялась в годы исследований, что позволяет сделать вывод об отсутствии влияния внешних факторов на их накопление, и данный признак, видимо, является генетически обусловленным. Трипсин ингибирующая активность (ТИА) у хемомутантов изменяется в среднем от 0,03 до 0,30 мг/г, химотрипсин ингибирующая активность (ХИА) несколько выше и варьирует в пределах от 0,06 до 0,41 мг/г. Наибольшей активностью ингибиторов выделяются сорта Беседа, Сибирская нива, Бешкиль- 500 (ТИА- $0,16...0,20\text{мг/г}$; ХИА- $0,15...0,26$). Активность ингибиторов протеиназ

у районированных сортов варьирует не столь значительно (ТИА 0,04-0,22; ХИА 0,10-0,20 мг/г).

Таблица 2 – Активность антипитательных веществ в зерне пшеницы

Антипитательные вещества	Хемомутанты	Районированные в Орловской области
Лектин зародыша пшеницы, мг/мл ⁻¹	28,60	24,52
ТИА, мг/г	0,15	0,08
ХИА, мг/г	0,19	0,12
Ингибиторы α-амилаз, мг/г	88,20	91,00

Активность ингибиторов α-амилаз в семенах пшеницы урожая 2001-2003 годов варьирует в пределах 76,5-96,2 мг/г. Наибольшей активностью обладают сорта: Московская 39, Сибирская нива, Бешкиль 500 (92,7...94,2 мг/г).

Уровень содержания фитогормонов у пшеницы и его влияние на белково-углеводный комплекс и качество зерна. Так как процессы метаболизма в растениях управляются фитогормонами, важно было выяснить, как изменяется гормональный статус пшеницы под влиянием химического мутагенеза.

Обнаружены существенные различия в содержании эндогенных фитогормонов (ИУК, зеатина, АБК) у сортов пшеницы Московская 39, Булава, Крестьянка (табл.3). Так, уровень содержания ауксина у Московской 39 выше, чем у хемомутантного сорта Булава и ярового - Крестьянка. Количество эндогенных цитокининов (зеатин) и АБК у сорта Крестьянка в 6-7 раз превысило хемомутантные сорта.

Поскольку известно, что с помощью воздействия фитогормонами и другими индукторами на растения можно сдвинуть синтез запасных веществ в семенах в требуемое для потребителя направление, была поставлена аналогичная задача. Однако, обработка экзогенными гормонами в наших исследованиях не показала однозначной связи между содержанием гормонов и запасных веществ в зерне пшеницы.

Таблица 3 – Содержание фитогормонов в 4-дневных проростках пшеницы (мкг/г сухой массы)

Сорт	ИУК	Зеатин	АБК	Содержание, %		
				белка	крахмала	клейковины
Московская 39 (стандарт)	7,10	4,48	0,16	15,2	63,4	22,5
Булава	0,45	1,42	0,14	9,1	65,9	19,3
Крестьянка	0,20	8,93	1,13	11,2	63,6	21,7

Испытание белковых компонентов на биологическую активность. Токсичные компоненты белкового комплекса могут не только снижать питательную ценность зерна пшеницы, но и обладать высокой биологической активностью, что может послужить разработке экологически чистых инсектицидов. Рекогностировочные испытания на горохе показали, что лектин зародыша пшеницы в концентрации 10^{-7} М стимулирует ростовые процессы растений, повышает активность антиоксидантных ферментов, обладает инсектицидным действием на жизненную активность взрослых особей *Bruchus pisorum* L. (до 50% гибели), тем самым, способствуя увеличению урожая.

Изучение влияния препаратов, созданных нами на основе лектина зародыша пшеницы (ЛЗП), на устойчивость к возбудителю корневых гнилей гороха *Fusarium oxysporum* (рис. 8), *Ascochyta pinodes* и *Ascochyta pisi* (рис. 9,10) показало их положительное воздействие.



Рис. 8 – Испытание ЛЗП на *Fusarium oxysporum* (1-контроль, 2-ЛЗП)

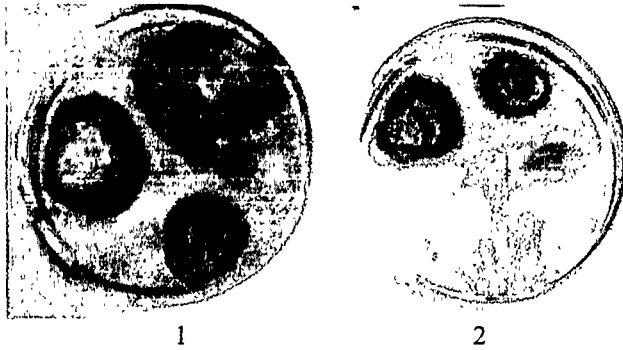


Рис. 9 – Испытание ЛЗП на *Ascochyta pinodes* (1-контроль, 2- ЛЗП)

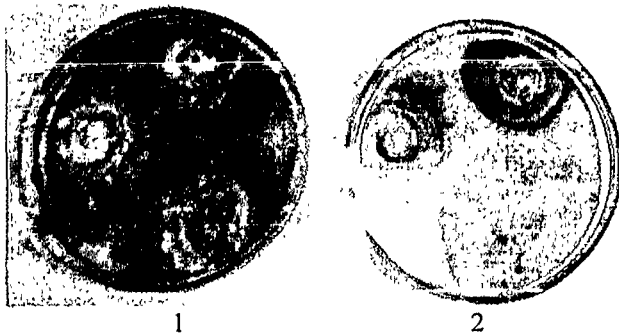


Рис. 10 – Испытание ЛЗП на *Ascochyta pisi* (1-контроль, 2- ЛЗП)

Теоретические и экспериментальные предпосылки к использованию химического мутагенеза в биотехнологии пшеницы

- Биотехнологические приемы индуцированного мутагенеза привели к созданию хемомутантных сортов пшеницы, различающихся морфологией, потребительскими свойствами, и устойчивых к низким температурам и болезням.

- Идентификация пшеницы по электрофоретическим спектрам белков и ДНК-маркерам подтвердила полиморфизм хемомутантов и позволила создать компьютерную базу данных генетических «паспортов».

- Потребительские свойства зерна пшеницы определяются соотношением углеводов (С) к белкам (N), которое у хемомутантов составляет от 3 до 7.

- Содержание клейковины (19...24%) и её реологические свойства (эластичность, упругость, растяжимость и др.) зависят от количества глиадинов и глютеинов, которое у хемомутантов колеблется в пределах 18...28% и 27...39% соответственно.

- В семенах хемомутантных сортов пшеницы выявлено 11 простых сахаров (мальтоза, сахароза, галактоза, глюкоза, арабиноза, фруктоза, ксилоза, рибоза, рамноза, глюкозамин, глюкуроны), от содержания которых (0,11...2,94%) зависит развитие дрожжей и молочнокислых бактерий при тестоведении, а также криопротекторные свойства растений (зимостойкость).

- С помощью индуцированного химического мутагенеза можно повысить содержание амилозы (более 25%) в крахмале и тем самым улучшить его диетические характеристики.

- Активность антипитательных веществ (ингибиторов гидролазы и лектинов) в белковом комплексе пшеницы может колебаться в известных пределах, что делает вероятным создание сортов с определенными потребительскими свойствами.

- Синтез белков и углеводов у растений определяется фитогормональным статусом (ИУК, кинетин, АБК), от которого зависят аттрагирующие свойства, регулируемые индуцированным химическим мутагенезом.

- Выявленный полиморфизм хемомутантов пшеницы по ДНК-маркерам предполагает воздействие направленного мутагенеза и других методов геномной инженерии на определенные участки генома с целью создания новых идиотипов пшеницы с заранее заданными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Проведена идентификация и паспортизация хемомутантных сортов пшеницы по белковым маркерам, всего 13. Полученные генетические «паспорта» могут быть включены в компьютерную базу данных по биологическому разнообразию флоры и фауны планеты. Установлено четкое разнообразие всех исследованных образцов.

2. ПЦР – анализ ДНК выявил межсортовой полиморфизм изученных хемомутантных и районированных сортов пшеницы.

Праймером Paw S6 установлены маркерные фрагменты в зоне 750, 250-450 п.н.

3. Скрининг 13 сортов озимой пшеницы выявил, что содержание протеина в семенах колеблется от 8,42% до 17,55%, из которых самые высокие показатели у хемомутантов: Сибирская нива, Ботовская 1, Ритза.

4. Фракционный состав белка хемомутантов включает альбумины (6%), глобулины (16%), глютелины (31%), проламины (24%), склеропротейны (11%). Повышенное содержание глиадинов и глютеенинов в хемомутантах соответствует относительно высокому содержанию клейковины.

5. В углеводный комплекс семян хемомутантных сортов пшеницы входит крахмал (51...67%), амилоза (17,5...25,2%). Сорт Булава выделяется среди хемомутантов самым высоким содержанием крахмала (66,7%), а Сибирская нива – амилозы (25%). Активность α -амилазы варьирует от 180 мг/г (сорт Бешкиль 500) до 582 мг/г (сорт Имени Рапопорта).

6. Семена пшеницы содержат 11 простых сахаров: мальтоза, сахароза, галактоза, глюкоза, арабиноза, фруктоза, ксилоза, рибоза, рамноза, глюкозамин, глюкурон. Установлены четкие различия хемомутантов по содержанию простых сахаров. Сорта Волжанка Елена, Булава имеют наивысшие показатели признака (6,05-6,80%), что определяет их высокую морозоустойчивость.

7. Установлено, что фитогормоны существенно не изменяют содержание белка и крахмала у хемомутантов пшеницы по сравнению с районированными сортами, за исключением Булавы (возрастание содержания крахмала на 2%).

8. Антипитательные компоненты белкового комплекса хемомутантов пшеницы представлены лектинами ($11,3...46,7[\text{мг/мл}]^{-1}$), ингибиторами протеиназ (ТИА -0,03...0,30мг/г; ХИА – 0,06...0,41мг/г) и α -амилаз (76,5...96,2мг/г). Хемомутанты Сибирская нива, Бешкиль 500 имеют наивысшую активность ингибиторов протеиназ и α -амилаз. Хемомутанты Волжанка Елена, Ботовская 1, Булава – наивысшую активность лектинов.

9. Лектины зародыша пшеницы и ингибиторы гидролаз проявляют биологическую активность, повышая болезнеустойчивость гороха (на 10-15%), обладают инсектицидным действием (50% от контроля) на гороховой зерновке *Bruchus*.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Для определения сортовой чистоты, семенного контроля, установления авторства и решения арбитражных споров рекомендуется проводить идентификацию сортов пшеницы по белковому «паспорту» методом электрофореза.

2. В биотехнологической промышленности сорта пшеницы Сибирская нива, Бешкиль 500 рекомендуется использовать в качестве сырья для получения ингибиторов гидролаз, лектинов зародыша пшеницы, необходимых для производства лекарственных препаратов и биопестицидов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Прудникова, Е.Г. Изучение крахмала, его свойств и белка в зерне хемомутантных сортов озимой пшеницы / Е.Г.Прудникова, Н.С.Эйгес, Л.И.Вайсфельд, Н.Е.Павловская //V съезд общества физиологов растений России: материалы междунар. конф. – Пенза, 2003. –С.223-224.

2. Прудникова, Е.Г. Фракционный состав белков мутантных форм и районированных сортов пшеницы / Е.Г.Прудникова, Н.С.Эйгес, Л.И.Вайсфельд //Физиологические аспекты продуктивности растений: материалы науч.-метод. конф. [В 2 ч.], – Орел, 2004. – Ч.1.– С.250-253.

3. Прудникова, Е.Г. Анализ мутантных сортов пшеницы по содержанию белков и углеводов //Биологические основы современной агрономии: матер. науч.-практ. конф. молодых уч. и аспирантов фак. агробизнеса и экологии. – Орел, 2004. –С.99-102.

4. Прудникова, Е.Г. Антибиотические свойства лектинов зародыша пшеницы на патогенные организмы / Е.Г.Прудникова, Н.Е.Павловская //Второй съезд общества биотехнологов России: материалы Второго съезда Общества Биотехнологов России (13-15 окт., 2004г., Москва). – М., 2004. –С.78-79.

5. Прудникова, Е.Г. Содержание сахаров в зерне и проростках хемомутантных сортов озимой пшеницы / Е.Г.Прудникова, Н.С.Эйгес, Л.И.Вайсфельд, Н.Е.Павловская //Естествознание и гуманизм: сб. науч. работ - Томск, 2004. - Т.1, №2. –С.66-67.

6. Прудникова, Е.Г. Фракционный состав белков мутантных сортов озимой пшеницы, полученных методом химического мутагенеза /Е.Г.Прудникова, Н.С.Эйгес, Л.И.Вайсфельд, Н.Е.Павловская

//Актуальные и новые направления сельскохозяйственной науки: матер. первой междунар. конф. молодых уч., аспирантов и студентов. – Владикавказ, 2005. –С.3-4.

7. Шалимова, О.А. Иммунокоррекция устойчивости растений гороха и пшеницы с помощью лектинов растительного происхождения /О.А.Шалимова, И.Н.Гагарина, Е.Г.Прудникова //Пути повышения устойчивости сельскохозяйственного производства в современных условиях: матер. Всеросс. науч.-практ. конф. – Орел, 2005. –С.296-303.

8. Гагарина, И.Н. Биотехнологический подход к использованию лектиносодержащих препаратов /И.Н.Гагарина, Е.Г.Прудникова, Н.Е.Павловская //Третий съезд общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: матер. третьего съезда общества биотехнологов России (25-27 окт. 2005г., Москва). – М., 2005. -С.102.

9. Шалимова, О.А. Индуцирование устойчивости у гороха и пшеницы лектиносодержащими препаратами /О.А.Шалимова, И.Н.Гагарина, Е.Г.Прудникова, Н.Е.Павловская //Третий съезд общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: матер. третьего съезда общества биотехнологов России (25-27 окт. 2005г., Москва). – М., 2005. -С.130-131.

10. Гагарина, И.Н. Сравнительный анализ полипептидного состава токсичных веществ зерновых и бобовых культур /И.Н.Гагарина, Е.Г.Прудникова //Научные основы повышения эффективности сельскохозяйственного производства: матер. науч.-практ. конф. молодых уч. и аспирантов, факультета агробизнеса и экологии. –Орел, 2005. –С. 120-128.

11. Прудникова, Е.Г. Идентификация сортов и линий зерновых и бобовых культур по электрофоретическим спектрам запасных белков / Е.Г. Прудникова, К.Ю. Зубарева, И.Н. Гагарина //Вклад молодых ученых в решении проблем аграрной науки: матер. межрегиональной науч.-практ. конф. молодых уч. –Воронеж, 2005. –С. 107-109.

12. Шалимова, О.А. Иммунокоррекция устойчивости растений гороха и пшеницы с помощью лектинов растительного происхождения / О.А. Шалимова, И.Н. Гагарина, Е.Г. Прудникова, Н.Е. Павловская //Агрохимия. - 2005. - №12. –С.36-41.

13. Прудникова, Е.Г. Количественный и качественный состав сахаров в зерне пшеницы и гороха / Е.Г. Прудникова, К.Ю. Зубарева //Научные основы повышения эффективности сельскохозяйственного производства: матер. науч.-практ. конф. молодых уч. и аспирантов, факультета агробизнеса и экологии. –Орел, 2005. –С. 151-153.

14. Гагарина, И.Н. Новый биоинсектицид на основе ингибиторов гидролаз /И.Н.Гагарина, Е.Г.Прудникова, Н.Е.Павловская //Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений: матер. конф. Орловского регионального отделения общества физиологов растений РФ. – Орел, 2006 – Ч.1. -С.218-221.

Выражаю искреннюю благодарность зав. лабораторией мутационной селекции и профилактической защиты окружающей среды Московского института биохимической химии им. Н.М.Эмануэля РАН, Н.С.Эйгес и сотруднику лаборатории Л.И.Вайсфельд за предоставленные для исследований сорта озимой пшеницы и постоянную помощь на всех этапах выполнения работы, а также зав. лабораторией иммунитета и защиты растений ГНУ ГНЦ ВНИИЗБК, кандидату сельскохозяйственных наук Г.А.Борзенковой за проведенные испытания препаратов.

Издательство ОрелГАУ, 2006, Орел, Бульвар Победы, 19.

Заказ 15/4. Тираж 100 экз.

2006A
21432

№ 21432