

АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ БЕЛКА МУТАНТНЫХ ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ТВЁРДОЙ *TRITICUM DURUM* DESF.

И. В. НАЛЕТОВ

УО «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: grozer27@gmail.com

В. С. ЗАЯЦ

ЗАО «Струнные технологии»
г. Минск, Республика Беларусь, 220089, e-mail: v.zayats@unitsky.com

(Поступила в редакцию 09.06.2023)

В настоящее время внимание в селекции и биотехнологии злаковых культур нацелено на увеличение урожайности. При росте урожайности растения теряется качество самой продукции, в селекции пшеницы твёрдой один из самых важных показателей является показатель белка в зерне. В статье раскрываются основные пути накопления белка в зерновках пшеницы твёрдой (*Triticum durum* desf.) во время вегетации. Предложены схемы селекции оценённых образцов пшеницы твёрдой из полученных мутантов на основании 2–3-летних данных изучения. Исследования проводились на пшенице твёрдой различных сортов, мутантные образцы получали посредством химического (*N*-Нитрозо-*N*-Метилмочевина (NMU), *N* – нитрозо – *N* – этилмочевина (NEU)) мутагенеза. Воздействию подвергались семена сортов Розалия и Ириде. В дальнейшем проводилось изучение физиологических особенностей в ходе роста и развития растений на протяжении 3 лет. Из полученных семян проводили экстракцию белка и дальнейшее его изучение. Свободную форму экстрагировали 0,15 М фосфатным буфером с pH 5,8. С помощью тонкослойной хроматографии определяли процентное содержание аминокислот в структурах белка. Для целей селекционной интерпретации наиболее важное значение имеют мутантные формы, с изменёнными позициями компонентов, так как это, вероятно, может быть сопряжено с проявлением новых, ценных свойств, не проявляемых на уровне фенотипа.

В вариантах мутантного потомства, обнаружены проявления ряда отличий по критериям белкового спектра, в сравнении с исходными формам. Данные отличия дают основу для возможности дальнейшего использования полученных форм пшеницы твёрдой для создания сорта и его внедрения в сельском хозяйстве.

Ключевые слова: пшеница твёрдая, химический мутагенез, физический мутагенез, накопление белка.

Currently, attention in the selection and biotechnology of cereal crops is aimed at increasing yields. With an increase in the yield of a plant, the quality of the product itself is lost; in the breeding of durum wheat, one of the most important indicators is the indicator of protein in the grain. The article reveals the main ways of protein accumulation in grains of durum wheat (*Triticum durum* desf.) during the growing season. Schemes for the selection of evaluated samples of durum wheat from the obtained mutants based on 2–3-year study data are proposed. Studies were carried out on durum wheat of various varieties, mutant samples were obtained by chemical (*N*-Nitroso-*N*-Methylurea (NMU), *N*-nitroso-*N*-ethylurea (NEU)) mutagenesis. The seeds of Rosalia and Iride varieties were exposed to the impact. Subsequently, the study of physiological characteristics during the growth and development of plants was carried out for 3 years. From the obtained seeds, the protein was extracted and further studied. The free form was extracted with 0.15 M phosphate buffer with pH 5.8. Using thin layer chromatography, the percentage of amino acids in protein structures was determined. For the purposes of breeding interpretation, the most important are mutant forms with changed positions of the components, since this may be associated with the manifestation of new, valuable properties that are not manifested at the phenotype level.

In variants of mutant offspring, manifestations of a number of differences were found according to the criteria of the protein spectrum, in comparison with the original forms. These differences provide the basis for the possibility of further use of the obtained forms of durum wheat to create a variety and introduce it in agriculture.

Key words: durum wheat, chemical mutagenesis, physical mutagenesis, protein accumulation.

Введение

В настоящее время внимание селекционеров злаковых культур уделено, в частности, на увеличение урожайности. При росте урожайности культуры теряется качество самой продукции, в селекции пшеницы твёрдой один из самых важных показателей является показатель белка в зерне.

Производство макаронных изделий на территории Беларуси постоянно требует поиска качественного и недорогого сырья для изготовления макарон и хлебобулочных изделий. Главный критерий на входном контроле предприятий выставляется показатель стекловидности и содержание белка.

Стекловидность зерна обуславливается высоким содержанием белков легкорастворимых альбуминов и глобулинов, с последующим накоплением проламинов и глютелинов. Именно данные белки способствуют высокому показателю качества и стекловидности. В селекции злаковых культур, а особенно пшеницы твёрдой, должно преобладать направление увеличения питательной ценности и биохимических показателей.

Исходя из целей увеличения содержания белка в семенах, следует рассмотреть путь накопления запасных белков эндосперма зерновки пшеницы твёрдой, а также пути поиска доноров признака увеличения содержания белка, для последующего создания нового перспективного сорта.

Белок, злаковые запасают в основном проламины и глютеины. Остальные белки, которые часто встречаются это альбумины, глобулины, и прочие протеиды. Альбумины – белки растворимые в воде, глобулины – солерастворимые. Растворимая форма белков в воде играет важнейшую часть для растений при прорастании. Протеиды представляют собой простые пептиды, которые включают компоненты не аминокислотные, например протетическая группа [1]. Глютенны являются одним из важнейших запасующих белков, эти белки позволяют семенам пшеницы находиться в длительном хранении, также повышают хлебопекарные свойства муки. Глютен, как и глиадин концентрируются в основном в центральной части эндосперма пшеницы твёрдой. Фракции белка различают по аминокислотному составу, при этом уделяется особое внимание на количественное содержание незаменимых аминокислот. В среднем глютаминовая кислота в клейковине составляет до 39 %, пролин 14 % и лейцин 8 %. Как правило, низкое содержание незаменимых аминокислот в пшеницы приходится на метионин, триптофан, лизин [2, 3].

Количество и качество клейковины у пшеницы твёрдой в зерне, как и у других злаковых зависит от генетических особенностей сорта, а также от воздействия окружающей среды на растения [2]. Полипептидная связь в белках глиадинов построена на связях внутримолекулярных дисульфидных (рис. 1).

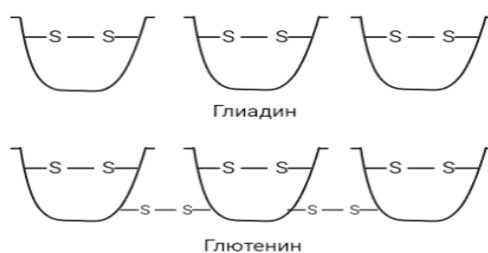


Рис. 1. Структура глиадина и глютеина

Глиадин включает в себя белки с молекулярной массой от 22 до 80 кД и одноцепочные димеры от 36 до 44 кД. Глиадин также является очень ценным источником $-NH_2$ групп и пролина, низкомолекулярные белки такие как альбумин 5–10 %, глобулины до 1,5 % (11–12 кД) и глютеина 6 % (104–125 кД). Также достаточно редкие такие белки, как альфа-глиадины от 30 до 75 кД [3].

Белок глютеин является значительно гетерогенным белковой фракцией в сравнении с глиадином, его молекулярная масса составляет от 50 до 3000 кД. Глютеин имеет линейную структуру, что на прямую воздействует на свойства клейковины, вязкость теста из муки пшеницы твёрдой обусловлена раскачиванием гибких цепей и перемещения их относительно друг друга. Эластичность теста зависит влияния высокомолекулярных субъединиц глютеина массой 100 кД [3]. Растения для синтеза аминокислот используют азот водорастворимый из почвы. В начале цветения пшеница твёрдая значительно сокращает потребление азота из почвы и увеличивает содержание водорастворимые аминокислотные комплексы. После цветения в растениях начинают накапливаться солерастворимые белки (проламины и глютелины), при этом снижается содержание некоторых аминокислот в структурах запасных белков, лизина, триптофана метионина, что приводит к снижению биологической ценности самого белка [4, 5]. К моменту налива зерна, синтез новых белков значительно уменьшается, в этот период начинается отток питательных веществ от листьев к колосу. Азотистые вещества, главным образом аминокислоты, в основном переходят из листьев верхнего яруса (фланговые листья, колосовые ости, междоузлия).

Основная часть

Химический мутагенез: Семена растений пшеницы твёрдой сортов Ириде и Розалия [6] замачивали в растворе химического мутагена в экспозициях и трёх временных отрезков – 6 часов; 12 часов; 24 часа, концентрация мутагена 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005 % (N-Нитрозо-N-Метилмочевина (NMU), N – нитрозо – N – этилмочевина (NEU)). Отдельную партию семян предварительно проростили и подвергли химическому мутагенезу при помощи «мутагенно-мази» – изготовленной самостоятельно, после экспозиции времени промыли в водопроводной стерильной воде.

Для изготовления мутагенно-мази, используется концентрат ланолина 5 г. с добавлением жидкой части мутагена, согласно концентрациям. После добавления растворенного мутагена включая дополнительно 5-бромурацил (5BU) всё перемешивается и хранится при температуре – 20 °С. Для приготовления стерильной воды, использовали 2 литра водопроводной воды, помещённой в стеклянную коническую колбу и погруженную для стерилизации в автоклав в течении 20 минут при температуре + 120 °С. В процессе промывания задействовали шейкер лабораторный ULab US-1350L, промывание семян происходило в конических колбах на 250 мл, установленных в шейкер и в течении 2 часов со скоростью 150 об/мин. производилось удаление мутагено-мази/мутагена после вымачивания проросших семян.

Исследования проводились на растениях пшеницы твёрдой *Triticum durum* Desf. прошедших физический и химический мутагенный процесс, с последующим изучением физиологических особенностей в ходе роста и развития растений на протяжении 3 лет. Выделение (экстрагирование) белка из семян.

Свободную форму экстрагировали 0,15 М фосфатным буфером с рН 5,8 добавляют цитозоль клеток в 2М хлористом калии, гидрофобно-связанную форму 0,2 % растворе тритона X-100, ковалентно-связанную в 0,5 % растворе папаина. Тритон X 100 – позволяет растворить мембраны клеток без повреждения цитозолей. Раствор папаина – полипептид позволяющий растворять фосфолипиды мембран клеток, применение возможно при совместном добавлении трис-буфера, что растворяет гидрофобные белки без их денатурации.

Аминокислотный состав определяли при помощи тонкослойной хроматографии [7,8]. Бумагу для определения обрабатывают 0,5% раствором нингидрина в ацетоне с последующим прогревом от 90 до 110 °С. Также отдельно был проведён анализ на содержание аминокислот при помощи электрофореза.

При помощи тонкослойной хроматографии удалось получить расслоение на отдельные компоненты белка (аминокислоты) в структурах запасных белков зерновки пшеницы твёрдой *Triticum durum* Desf. (табл. 1). Тонкослойная хроматография позволяет оценить процентное содержание аминокислот в структурах белка.

Таблица 1. Средний состав запасных питательных белков (%) зерновок пшеницы твёрдой, полученных при использовании химического мутагенеза за 2020–2022 гг.

Сорт	Временная экспозиция, ч.	6				12				24			
	Концентрация мутагена, %	0,05	0,025	0,01	0,005	0,05	0,025	0,01	0,005	0,05	0,025	0,01	0,005
N-Нитрозо-N-Метилмочевина (NMU)													
	Контроль, %												
Ириде	16,30	15,78	16,50	16,40	17,06	15,24	15,65	16,10	16,52	15,41	15,84	16,14	16,33
Розалия	15,73	15,64	16,10	16,44	16,54	16,08	16,28	16,41	17,40	15,87	16,25	16,37	16,42
N – нитрозо – N – этилмочевина (NEU)													
Ириде	16,30	15,81	16,47	16,33	16,81	15,09	15,74	17,92	16,40	15,37	15,93	16,77	17,61
Розалия	15,73	15,58	16,21	16,30	16,83	16,17	16,36	16,48	16,92	15,76	16,04	16,17	16,80
Растения, обработанные «мутаногено-мазью»													
N-Нитрозо-N-Метилмочевина (NMU)													
Ириде	16,30	15,70	11,20	16,70	16,74	15,91	15,82	15,96	15,77	15,46	15,61	15,66	15,87
Розалия	15,73	14,84	14,58	14,67	14,43	13,02	13,17	13,06	13,91	13,14	13,17	13,77	13,15
N – нитрозо – N – этилмочевина (NEU)													
Ириде	16,30	10,16	10,27	10,15	16,27	10,57	10,58	10,00	15,11	8,30	8,49	9,27	9,14
Розалия	15,73	9,77	9,68	11,94	11,61	10,68	10,94	11,47	14,72	9,77	9,74	10,43	15,87
5-Бромурацил (5BU)													
Ириде	16,30	14,26	14,57	16,18	16,73	15,71	15,49	16,40	16,07	16,49	16,71	16,03	15,34
Розалия	15,73	14,58	16,44	16,07	14,15	13,48	15,70	15,37	15,71	15,04	15,77	16,41	16,37

При исследовании запасных белков у мутантных образцов пшеницы твёрдой, были выделены заметные изменения как лучшую сторону по содержанию белка, так и худшую сторону. Наибольший процент накопления питательных белков наблюдался при действии 0,01 % 12 ч экспозиции NEU на сорт Ириде (17,92 %), по сравнению с контролем (16,30 %) – увеличение составляет 9,1 % от контроля. У сорта Розалия при действии 0,005 % NMU 12 ч экспозиции увеличение по сравнению с контролем составило 10,6 %. При применении мутагено-мази по большей части происходило уменьшение концентрации белка, вплоть до 9,68 % в сорте Розалия 0,025 % 6 ч экспозиции NEU (уменьшение на 38,4 % от контроля).

Заключение

Согласно полученным результатам, применение химического мутагенеза влияет на накопление белка в зерновке пшеницы твёрдой сортов Ириде и Розалия. При действии 0,01 % N-нитрозо-N-этилмочевина и 12 ч экспозиции на сорт Ириде удалось получить процент на накопления белка на 9,1 % выше, чем у контроля. На сорт Розалия большее влияние оказало действие N-нитрозо-N-метилмочевины в течение 12 ч в концентрации 0,005 %. Увеличение оказалось 10,6 % по сравнению с контролем. Таким образом, данные растения могут быть использованы для создания сорта с увеличенным содержанием запасных питательных белков, что является важным критерием для возделывания пшеницы твёрдой в Республике Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

- Eskin N. A. M., Shahidi F. Biochemistry of foods. – 2012.
- Максютова, Н. Н. Сравнительное исследование действия абсцизовой кислоты и сАМР на синтез белков зерновок пшеницы в условиях засухи / Н. Н. Максютова, Л. В. Викторова // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – № 4. – С. 523-528. – EDN OONYVD.
- Максютова, Н. Н. Изменение интенсивности синтеза белков зерновок пшеницы в зависимости от времени суток / Н. Н. Максютова, И. А. Тарчевский // Физиология растений. – 1975. – Т. 22. – № 2. – С. 289-294. – EDN TXZSXZ.
- Белова, Л. П. Влияние хлорамфеникола и циклогексана на синтез белков различных фракций у пшеницы / Л. П. Белова, Н. Н. Максютова, И. А. Тарчевский // Физиология растений. – 1978. – Т. 25. – № 2. – С. 230–235. – EDN NXXVKQ.
- Авторское свидетельство № 1734758 А1 СССР, МПК А61К 35/64. Способ регуляции биосинтеза белка в растении: № 4770320: заявл. 26.12.1989: опубл. 23.05.1992 / Н. Н. Максютова, Т. Б. Мартынова, С. И. Панкратова; заявитель КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ. – EDN HQJHLM.
- Дуктова, Н. А. Твёрдая пшеница–новая зерновая культура в Беларуси: проблемы и перспективы / Н. А. Дуктова, В. П. Дуктов, В. В. Павловский // Известия Нац. акад. наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2016. – Т. 1. – № 3. – С. 85–92.
- Ворожейкин, С. Б. Из истории разделения аминокислот методом тонкослойной хроматографии / С. Б. Ворожейкин, В. В. Манзаев // ФГОС 3++ по направлению 04.03. 01 химия: проблемы подготовки и перспективы внедрения. – 2017. – С. 48–53.
- Bele, A. A. An overview on thin layer chromatography / A. A. Bele, A. Khale // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2011. – Vol. 2. – №. 2. – 256 p.