

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В СЕЛЕКЦИИ ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР НА КАЧЕСТВО И УСТОЙЧИВОСТЬ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

О.О. Молодченкова, В.Г. Адамовская, Л.Й. Цисельская,
Ю.А. Левицкий, Л.Я. Безкровная, О.В. Тихонова, Т.В. Сагайдак
Селекционно-генетический институт-Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН

Изучены биохимические показатели, характеризующие качество и устойчивость генотипов сельскохозяйственных культур к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Разработаны новые биохимические методы оценки злаковых культур на устойчивость к фузариозу, гельминтоспориозу и жаростойкости. Предложены новые и усовершенствованы существующие методы оценки селекционного материала по биохимическим качественным показателям зерна.

Triticum aestivum L., Hordeum vulgare L., Zea mays L., фузариоз, гельминтоспориоз, засуха, устойчивость, жирнокислотный состав, углеводный состав, белок, 7S и 11S глобулины

Стратегия современной селекции направлена на создание сортов и гибридов полевых культур, сочетающих высокую продуктивность и качество семян с повышенной адаптивностью к неблагоприятным условиям выращивания. Успех селекционной работы во многом зависит, прежде всего, от наличия исходного материала для селекции, а также эффективных методов оценки селекционного материала и знания физиолого-биохимических механизмов формирования показателей, определяющих качество и устойчивость к стрессовым факторам различной природы. Установлено, что уровень устойчивости растений к фитозаболеваниям и абиотическим стрессам обеспечивается многими физиолого-биохимическими показателями, отвечающими за сохранение жизнеспособности и перестройку метаболизма растений в стрессовых условиях [1, 2]. Показано, что важная роль при формиро-

вании устойчивости растений к фитозаболеваниям и воздействию абиотических стрессовых факторов (температурному, солевому стрессам) принадлежит гликопротеинам типа лектинов и ингибиторам протеиназ, и их содержание в зерне генетически детерминировано [3, 4, 5, 6]. Последние достижения зарубежных и отечественных исследователей по усовершенствованию и созданию новых методов оценки качества зерна полевых культур основываются на изучении и глубоком анализе фракционного состава белков, углеводов, жира [7]. Исходя из этого, целью данных исследований была разработка и усовершенствование биохимических методов оценки устойчивости и качества семян сельскохозяйственных культур, основанных на знании физиолого-биохимических аспектов устойчивости злаковых культур к фузариозу, гельминтоспориозу, засухоустойчивости, жаростойкости, а также биохимических механизмов формирования качественных показателей селекционного материала.

Исследования проведены на 100 генотипах озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), 50 генотипах ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), 20 генотипах кукурузы (*Zea mays* L.), различающихся по устойчивости к фузариозу, гельминтоспориозу, засухо-жаростойкости; 21 генотипе пивоваренных и кормовых сортов ярового ячменя, 20 генотипах сои и 7 генотипах гороха продовольственного направления. Источником инфекции служили сильнопатогенные штаммы *Fusarium graminearum* (для озимой пшеницы), *Fusarium culmorum* (для ярового ячменя) и *Fusarium moniliforme* (для кукурузы). В исследованиях использовали 2 мМ раствор салициловой кислоты.

Активность лектинов определяли по их способности агглютинировать трипсинизированные эритроциты белых крыс при комнатной температуре. За лектиновую активность принимали величину, обратную минимальной концентрации белка, при которой происходит агглютинация эритроцитов (мкг белка/мл)⁻¹. Получение эритроцитов и трипсинизирование проводили по методике [8]. Общее содержание белка в экстракте определяли по методу Лоури.

Активность ингибиторов трипсина определяли по уменьшению скорости гидролиза синтетического субстрата БАПА (N- α -бензоил-dl-аргинин-4-нитроанилида) ферментом в присутствии ингибитора [9]. Ингибиторную активность выражали в мг. инактивированного фермента на 1 г. муки или лиофилизированного материала.

Фракционный состав белков сои проводили по Осборну [10], а 7S и 11 S белки разделяли по разработанной в лаборатории методике.

Фракционирование водо-солерастворимых белков ячменя проводили методом гель-фильтрации на сефадексе G-100 "Pharmacia Fine

Chemicals” (Швеция) [11]. Хроматографию проводили на колонке размером 1,6-30 см. На колонку наносили 1 мг белка. Белок после хроматографии определяли спектрофотометрически на СФ-26 при длине волны 280 нм и методом Лоури. Выделение и электрофорез гордеинов проводили по методу [12].

Жирокислотный и углеводный состав образцов анализировали на газовом хроматографе фирмы “Shimadzu”.

Опыты проводили в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ “Анализ данных электронных таблиц “Microsoft Excel”.

Одним из показателей формирования защитных механизмов злаковых культур при фузариозе является увеличение содержания белков, инактивирующих ферменты, выделяемые патогеном. К таким белкам относятся ингибиторы трипсина. Изучение содержания ингибитора трипсина в зерне и проростках озимой пшеницы при фузариозе и воздействии салициловой кислоты позволило установить, что устойчивые генотипы озимой пшеницы на инфекционном фоне и при действии салициловой кислоты имели более высокий уровень ингибитора трипсина. Генетический анализ показателя ингибитора трипсина, проведенный путем скрещивания контрастных по содержанию ингибитора трипсина сортов озимой пшеницы, показал, что коэффициент наследуемости ингибитора трипсина достаточно высокий ($H^2=0.81-0.91$), что свидетельствует о генетической обусловленности признака. Исследование взаимосвязи между уровнем ингибитора трипсина в зерне, выращенном на инфекционном фоне и на растворе салициловой кислоты, и устойчивостью генотипов озимой пшеницы к фузариозу показало, что активность ингибитора трипсина в зерне устойчивых генотипов в 1,2-1,4 раза выше по сравнению с контролем. По мере снижения устойчивости отмечалось снижение активности ингибитора трипсина по сравнению с контролем. По результатам исследований была установлена положительная корреляционная связь ($r=0,87$ при $p=0,01$) между активностью ингибитора трипсина в зерне, выращенном на инфекционном фоне, и показателями фитопатологической оценки, характеризующими устойчивость генотипов к фузариозу. Была также установлена положительная корреляционная связь между активностью ингибитора трипсина в зерне, выращенном на растворе салициловой кислоты ($r=0,77$ при $p=0,03$) и устойчивостью генотипов озимой пшеницы к фузариозу. Изучение компонентного состава ингибиторов трипсина показал, что под действием патогена и салициловой кислоты происходило увеличение всех компонентов ингибитора трипсина, а при инфицировании наблюдалось появление нового компонента с молекулярной массой 29 кД, что является ответной реак-

цией растения на действие патогена. Выделенные из инфицированных и обработанных салициловой кислотой проростков пшеницы ингибиторы трипсина не действовали на активность собственных протеаз растения, но подавляли активность ферментов патогена и рост и развитие колоний гриба *Fusarium graminearum*, что свидетельствует о защитной роли данных белков при фузариозе.

На основе полученных результатов были разработаны лабораторные методы оценки генотипов озимой пшеницы на устойчивость к фузариозу по изменению активности ингибитора трипсина в зерне, выращенном на инфекционном фоне и растворе салициловой кислоты. На методы были получены Авторское свидетельство и Патент Украины № 12639 [13].

В ответных реакциях растений при патогенезе принимают участие лектины – белки со специфическими биологическими свойствами, которые обратимо и избирательно связывают углеводы, не вызывая их химического преобразования. Возможность защитной роли лектинов связывают с их способностью специфически взаимодействовать с поверхностью клеток гифов грибов, что приводит к угнетению их роста, а также служить эффекторами для включения сигнальных систем, активизирующих реакции устойчивости растений при патогенезе.

Проведенное нами изучение изменения активности и углеводной специфичности лектинов, выделенных из зародышей и клеточных стенок надземной части и корней проростков озимой пшеницы, ярового ячменя и кукурузы при инфицировании фузариозом, гельминтоспориозом и действии салициловой кислоты, позволило сделать вывод о неодинаковой чувствительности лектинов к действию этих факторов у различных по устойчивости к данным воздействиям генотипов зерновых культур. Можно предположить, что метаболиты, образующиеся при инфицировании растений и под действием салициловой кислоты и выступающие в роли сигнальных молекул, передающих сигнал в генетический аппарат клетки, возможно связаны с неодинаковым потенциалом энергетических и пластических ресурсов для синтеза веществ-посредников, регулирующих индукцию лектиновой активности. По всей видимости, в основе дифференцированной отзывчивости различных по устойчивости генотипов зерновых культур на действие этих факторов лежат как родовые, так и генотипные отличия в специфике накопления и перераспределения лектинов, и, как следствие, в эффективности участия этих белков в адаптивных реакциях.

При исследовании активности лектинов, выделенных из зародышей инфицированных зерен в коллекции сортов ярового ячменя, различающихся по устойчивости к фузариозу и гельминтоспориозу, была

установлена закономерность изменения лектиновой активности в ответ на действие *Fusarium culmorum* и *Bipolaris sorokiiiniana*. При этом генотипы ярового ячменя, устойчивые по данным фитопатологической оценки, отличались более низкой активностью лектинов по сравнению с контролем. При снижении устойчивости генотипов отмечалось увеличение активности лектинов зародышей ярового ячменя. Была установлена положительная корреляционная зависимость ($r = 0,81$ при $p = 0,03$) между активностью лектинов зародышей ярового ячменя на инфекционном фоне и устойчивостью генотипов ярового ячменя к фузариозу и гельминтоспориозу.

На основе проведенных исследований предложен экспресс-метод оценки генотипов ярового ячменя на устойчивость к фузариозу и гельминтоспориозу по изменению лектиновой активности зародышей на инфекционном фоне. На данный метод получен Декларативный патент Украины № 43280 [14].

Были установлены дифференцированные изменения активности лектинов зародышей генотипов пшеницы, различающихся по жаростойкости, под влиянием повышенных температур. На основании проведенных исследований был разработан метод оценки жаростойкости генотипов пшеницы. На метод получен Декларационный патент Украины № 69859 [15]. Методы позволяют на ранних этапах селекции и в максимально короткие сроки анализировать большое количество образцов.

Установлены закономерности по изменению активности лектинов, мембранного фермента H^+ -АТФазы и окислительных и антиокислительных процессов в проростках линий кукурузы, различающихся по засухоустойчивости, при водном дефиците, воздействии высоких температур и совместном действии данных стрессовых факторов. Для устойчивых линий было характерно увеличение активности лектинов, H^+ АТФазы (на 14-30% относительно контроля), снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (в 2 раза относительно контроля) одновременно с увеличением уровня глутатиона в 1,5 раз, сохранением активности пероксидазы на уровне контроля, что можно отнести к адаптационным процессам растений кукурузы при засухе, и как следствие – сохранению физиологических процессов растений в норме [16]. Дальнейшие исследования позволят разработать экспрессные биохимические методы оценки засухоустойчивости кукурузы для отбора на ранних этапах селекции.

За последнее десятилетие на мировом рынке пищевых продуктов широкое распространение получают различные продукты из зернобобовых культур, но не из каждого сорта можно получить эти продукты хорошего качества и с высоким выходом. Производство продуктов из

зернобобовых культур ставит перед селекционерами задачу выведения сортов зернобобовых культур продовольственного направления с заданными технологическими параметрами. В лаборатории биохимии растений для последующего включения в селекционную программу по созданию продовольственных сортов зернобобовых культур проводятся исследования по оценке белкового и ферментного комплекса различных сортов сои и гороха с целью отбора сортов, характеризующихся низким содержанием ингибитора трипсина, активности уреазы, липоксигеназы, содержание которых отрицательно сказывается при хранении продуктов переработки сои и гороха, на их пищевой и кормовой ценности. В настоящее время показано, что наиболее перспективными белками зернобобовых культур для производства пищевых продуктов являются глобулины, основные фракции которых имеют константы седиментации 7S и 11S [17]. В результате проведенных исследований установлены различия между генотипами сои и гороха по содержанию и компонентному составу 7S и 11S белков, лектинов. На основании полученных результатов предложен экспресс-метод фракционирования и идентификации 11 S и 7S белков сои и гороха. Разработанный метод позволит селекционерам выбрать правильное направление при создании сортов зернобобовых культур продовольственного направления с заданными технологическими параметрами.

Изучен комплекс биохимических показателей зерна (содержание белка, крахмала, танинов, антоцианогенов, активность α , β -амилазы), характеризующих пивоваренные свойства ярового ячменя. Выявлены четкие сортовые отличия по содержанию различных молекулярных фракций водо-солевых белков и компонентному составу гордеинов с использованием методов гель-фильтрации и электрофореза в коллекции пивоваренных и кормовых сортов ячменя [18]. Установленные закономерности могут быть использованы для дальнейшей разработки и усовершенствования биохимических методов оценки пивоваренных свойств ярового ячменя на ранних этапах селекции.

С целью отбора высокоолеиновых гибридов подсолнечника, генотипов рапса с низким содержанием эруковой кислоты и оценки питательных свойств семян сои, кукурузы отработаны методы идентификации отдельных жирных кислот и сахаров с использованием метода газовой хроматографии.

Методы обеспечивают быстрое и высокоточное выполнение анализов, автоматизированы и внедрены для массовой оценки селекционного материала.

Таким образом, на основе изучения биохимических аспектов, определяющих качество и устойчивость полевых культур к биотическим и

абиотическим факторам окружающей среды, разработаны новые биохимические методы оценки сельскохозяйственных культур на устойчивость к фузариозу, гельминтоспориозу и абиотическим факторам, а также усовершенствованы существующие и предложены новые методы оценки селекционного материала по качественным показателям зерна.

Библиографический список

1. *Свтушенко М.Д., Лісовий М.П., Пантелеев В.К., Слюсаренко О.М.* Імунітет рослин. – Київ. - Колобiг. - 2004. – 304 с.
2. *Василенко И.И., Комаров В.И.* Оценка качества зерна. – Агропромиздат. – 1987. – 207 с.
3. *Мосолов В.В.* Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений. – Фитонциды. Бактериальные болезни растений. – Материалы конф. - Львов. - 1990. - С.50-51.
4. *Хайрулин Р.М., Шакирова Ф.М., Максимов И.В., Безрукова М.В., Ямалеев А.М.* Изучение содержания лектина, абсцизовой и индолилуксусной кислот в растениях пшеницы, инфицированных *Septoria S. novorum*. Berk // Физиология и биохимия культурных растений. - 1993. – Т.25, № 2. - С. 138-144.
5. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Хайрулин Р.М.* Увеличение уровня лектина в проростках пшеницы под влиянием солевого стресса // Изв. РАН. Серия биол. - 1993. - № 1. – С. 142.
6. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Шахметов И.В.* Влияние теплового стресса на динамику накопления АБК и лектина в клетках каллуса пшениц // Физиология растений. - 1995. – Т. 42, № 5. - С. 700-702.
7. *Masci S., D'Ovidio R., Lafandra D., Kasarda D.D.* Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer // Plant Physiol. - 1998. - V. 118 – P. 1147-1158.
8. *Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д.* Лектины. - Львов. - Вища школа. - 1981.155 с.
9. *Левицкий А.П.* Методы определения ингибиторов трипсина /Сб.научных трудов биохимические методы исследования селекционного материала. – Одесса. - ВСГИ. – 1979. – Т. 15. – С. 68-72.
10. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П.* Методы биохимического исследования растений. – Ленинград. - Агропромиздат. – 1987. – 430 с.
11. *Narziß L., Rottger W,* Über den Einfluß des Malzungen – und Brauverfahrens auf die Molekulargewichtsverteilung der Stickstoffsustanzen in Wurze und Bier. – Brauwissenschaft. – 1973. – V. 26. – N. 5. – P. 148-159.
12. *Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Созинов А.А.* Полиморфизм культурного ячменя (*Hordeum vulgare*) по гордеинам // Генетика. – 1985.

13. Пат.12639 Україна, А 01 Н1/04. Способ оценки генотипов пшеницы на устойчивость к фузариозу/ *В.Г. Адамовская, С.В. Вовчук, О.О. Молодченкова, А.П. Левицкий, Л.Т. Бабаянц, О.В. Гонтаренко.* (Украина); Селекционно-генетический институт. - № 96020534; Заявл. 14.02.96; Опубл. 28.02.97. Бюл.№ 1.
14. Декларацийний патент 43280 Україна, А01Н1/04. Спосіб оцінки генотипів ярового ячменю на стійкість до фузаріозу / *В.Г. Адамовська, А.А. Лінчевський, О.О. Молодченкова, Л.Й. Цисельська, С.В. Бірюков, О.В. Бабаянц.* (Україна); Селекційно-генетичний інститут. - № 2001063808; Заявл. 06.06.2001; Опубл.15.11.2001. Бюл. № 10.
15. Декларацийний патент 69859 Україна, А01Н1/04. Спосіб визначення жаростійкості озимої пшениці / *Феоктистов П.О., В. Г. Адамовська, І.П. Григорюк* (Україна); Селекційно-генетичний інститут. - № 20031211386; Заявл. 11.12.2003; Опубл. 15.09.2004. Бюл. № 9.
16. *Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Тихонова О.В., Вареник Б.Ф., Цисельская Л.Й.* Особенности реакций проростков кукурузы на воздействие биотических и абиотических факторов // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39. - № 6. – С. 496-505.
17. *Алексенко А.Ю., Николаев І.В., Вінецкий Ю.П.* Характер варіабельності запасного білка 11 S-глобуліну сої // Сільськогоспо-дарська біологія. – 1987. - № 2. – С. 13-18.
18. *А.А. Лінчевський, В.Г. Адамовская, О.О. Молодченкова, Л.Й. Цисельская, С.В. Бірюков.* Поиск стабильных биохимических показателей, определяющих пивоваренную ценность зерна ячменя // Зернові продукти і комбікорми. – 2003. - № 3. – С. 39-42.

Вивчені біохімічні показники, які характеризують якість і стійкість генотипів сільськогосподарських культур до біотичних і абіотичних факторів навколишнього середовища. Розроблені нові біохімічні методи оцінки злакових культур на стійкість до фузаріозу, гельмінтоспоріозу і жаростійкості. Запропоновані нові і удосконалені існуючі методи оцінки селекційного матеріалу за біохімічними показниками якості зерна.

The biochemical aspects of agricultural crops quality and resistance to biotic and abiotic factors of environment were studied. The new biochemical methods for selection of cereal crops resistance to *Fusarium* spp., *Bipolaris* spp. and heat resistance were developed. The new and existing methods for selection of breeding material using biochemical quality characteristics are proposed.