

УДК 581.134:547.965:633.11

ИССЛЕДОВАНИЕ α -АМИЛАЗЫ ТРИТИКАЛЕ В СВЯЗИ С ВЫПОЛНЕННОСТЬЮ ЗЕРНОВОК

Н. Е. КУЗНЕЦОВА, Б. П. ПЛЕШКОВ, А. Ф. ШУЛЫНДИН
(Кафедра агрономической и биологической химии)

Существенным недостатком тритикале является склонность растений к формированию недостаточного выполненного зерна, что связано с нарушениями в синтезе и гидролизе крахмала. В процессах разложения крахмала в семенах исключительно важное значение имеют амилолитические ферменты. Немногочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что активность α -амилазы в зрелом зерне тритикале повышена [8, 9, 10]. Величина активности α -амилазы отрицательно коррелирует со степенью выполненности зерновок тритикале и в слабо выполненном зерне по своему уровню может быть приравнена к активности фермента в прорастающем зерне [4, 8, 9].

Особенно важно выяснить специфику действия α -амилазы и причины увеличения ее активности в зерне тритикале, но работ, посвященных этому, пока крайне мало. Определение α -амилазной активности путем биохимического анализа ферментных экстрактов проводилось очень немногими исследователями. В связи с этим мы изучали активность и изоферментный состав амилаз зерна тритикале разной выполненности, а также особенности действия фермента в процессе созревания тритикале в сравнении с соответствующими показателями амилазы пшеницы и ржи.

Материал и методы исследований

Исследовали зерно гексаплоидных тритикале ($2n=42$) селекции А. Ф. Шулындина, а также зерно мягкой пшеницы сорта Мироновская 808 и ржи сорта Харьковская 55, взятое с опытного участка Украинского НИИ растениеводства, селекции и генетики им. В. Я. Юрьева. Исследования проводили в течение 1974—1976 гг.

В цельносмолотом зрелом зерне, а также в процессе его прорастания и созревания определяли активность и изоферментный состав α -амилазы. В 1976 г. пробы отбирали в процессе созревания зерна в фазы молочной, тестообразной, восковой и полной спелости. Зерно, взятое в фазы молочной, тестообразной и восковой спелости, фиксировали в поле жидким азотом. Высушивали лиофильно. Зрелое зерно проращивали при температуре 25° в термостате на дистиллированной воде.

Активность α -амилазы определяли по методу Смита и Роэ [11] с некоторыми изме-

нениями [3]. В качестве ферментного ее раствора использовали экстракт, полученный после настаивания муки с 1%-ным NaCl в холодильнике (соотношение мука: вода=1:10) при частом помешивании в течение 1 ч и последующей тепловой денатурации β -амилазы. Множественные молекулярные формы (или изоферменты) амилазы исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле 7,5%-ной концентрации в щелочной системе [3, 6]. В смесь для разделяющего геля вместо воды вводили равный объем 1%-ного раствора крахмала. По окончании разделения гели инкубировали в растворе 1%-ного крахмала в ацетатном буфере (pH 5,5) при температуре 37° в течение 20—30 мин. Зоны ферментативной активности проявляли с использованием 0,3%-ного раствора йода в 3%-ном KI.

Результаты и их обсуждение

Активность α -амилазы в зерне ржи была несколько выше, чем в зерне пшеницы (табл. 1). У амфидиплоидов удельная активность α -амилазы изменялась в довольно широких пределах — от 11,5 до 28,6 ед., а среднее значение составило 18,9 ед., или

Т а б л и ц а 1

Активность α -амилазы в зерне пшеницы, ржи и тритикале (мг гидролизованного крахмала на 1 мг белка в 1 ч)

Культура сорт	Масса 1000 зерен, г	Удельная активность α -амилазы
Мироновская 808	35,1	7,2
(пшеница)		
Харьковская 55 (рожь)	30,0	10,0
Тритикале:		
АД 206	45,6	14,8
АД 196	36,2	12,0
АД 201	31,9	18,0
АД 209	43,7	17,9
АД 332	32,0	22,8
АД 333	40,1	11,5
АД 257	39,3	25,8
АД безостый	33,3	19,5
АД 1	31,6	28,6

на 12,2 и 8,9 ед. выше, чем соответственно у пшеницы и ржи. Самой высокой активностью отличалось зерно АД 1, АД 257 и АД 332, у которых она была в 3,2—4 раза выше, чем у пшеницы, и в 2,3—2,9 раза выше, чем у ржи. Зерновки этих амфидиплоидов по сравнению с другими образцами наиболее деформированы, имеют на поверхности вмятины, морщины. При увеличении количества щуплых зерновок в образцах возрастала и активность α -амилазы.

Корреляционный анализ полученных результатов показал, что у тритикале существует обратная связь между массой 1000 зерен и α -амилазной активностью, однако коэффициент корреляции ($r = -0,20$) был статистически недостоверным. Очевидно, это связано с тем, что масса 1000 зерен зависит не только от выполненности зерновок, но и в большей степени от сортовых особенностей амфидиплоидов. В дальнейшем из средних образцов каждого из четырех сортов (АД 206, АД 196, АД 201 и АД 209) мы отбирали по две фракции, четко различающиеся по выполненности зерна.

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что в пределах каждого сорта между активностью α -амилазы и массой 1000 зерен имеется четко выраженная отрицательная коррелятивная связь, которая в этом случае может служить показателем выполненности зерновок. Наибольшая разница в активности наблюдалась у АД 196 и АД 201. У этих сортов при недостаточной выполненности зерна она была в 5,9 раза выше, чем при нормальной выполненности. Разница по выполненности двух отобранных фракций у этих сортов также была максимальной.

Т а б л и ц а 2

Активность α -амилазы нормально выполненного и невыполненного зерна тритикале (мг гидролизованного крахмала на 1 мг белка в 1 ч)

Зерно	Масса 1000 зерен, г	Удельная активность α -амилазы
АД 206 (1974 г.)		
Нормально выполненное	50,9	17
Невыполненное	48,3	55
АД 196 (1974 г.)		
Нормально выполненное	37,5	12
Невыполненное	23,1	71
АД 209 (1975 г.)		
Нормально выполненное	51,2	8
Невыполненное	40,5	40
АД 201 (1975 г.)		
Нормально выполненное	38,8	7
Невыполненное	28,7	41

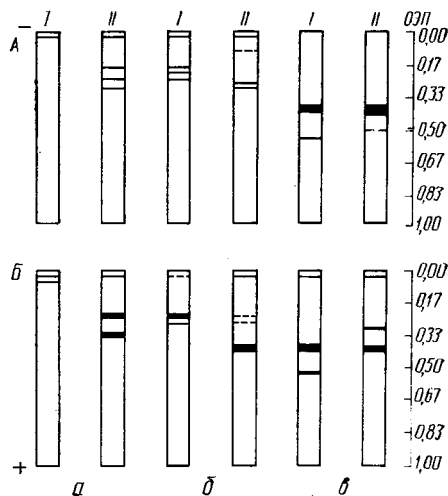


Рис. 1. Изоферментный состав α -амилазы выполненного (I) и щуплого (II) зерна тритикале АД 206 (А) и АД 196 (Б). а — до проращивания; б и в — через сутки и трое после намачивания.

Более высокая активность α -амилазы в щуплом зерне тритикале по сравнению с выполненным, по-видимому, обусловлена большей гетерогенностью, появлением дополнительных изоферментов α -амилазы в первом или повышенной активностью отдельных изоферментов α -амилазы, присутствующих и во втором. Возможно и совместное действие этих двух факторов. Для выяснения данного вопроса мы исследовали электрофоретические свойства α -амилазы щуплого и выполненного зерна тритикале АД 206 и АД 196. Оказалось, что выполненное и щуплое зерно тритикале различаются по количеству и электрофоретическим свойствам α -амилазы (рис. 1). В выполненном зерне АД 206 мы обнаружили только 1 компонент α -амилазы (ОЭП 0,03), в то время как в щуплом — 4 компонента (ОЭП 0,03; 0,21; 0,26; 0,29). Подобные различия наблюдались и у АД 196. В выполненном зерне этого сорта мы нашли 2 компонента α -амилазы со слабой подвижностью (ОЭП 0,03 и 0,05), а в щуплом зерне — 3 изофермента (ОЭП 0,03; 0,24; 0,34). В щуплом зерне АД 196 α -амилаза с относительно высокой электрофоретической подвижностью 0,24 и 0,34 отличалась высокой активностью и проявлялась на геле в виде широких неокрашенных зон. Следует отметить, что отсутствие в выполненном зерне некоторых компонентов α -амилазы щуплого зерна не исключает возможности нахождения этих компонентов у первого. Возможно, они имеют очень слабую активность в выполненном зерне и поэтому на электрофореграммах при использованной методике не проявились.

При проращивании семян электрофоретический спектр α -амилаз существенно изменяется. Через сутки после замачивания щуплое и выполненное зерно АД 206 включало 4 компонента α -амилазы, причем 2 из них (ОЭП 0,03 и 0,26) присутствовали в

Изменение активности α -амилазы в процессе созревания зерна
(мг гидролизованного крахмала на 1 мг белка в 1 ч)

Культура (сорт)	Фаза спелости			
	молочная	тестообразная	восковая	полная
Мироновская 808 (пшеница)	22,4	11,6	Следы	Следы
Харьковская 55 (рожь)	31,9	13,3	2,5	8,5
Тритикале:				
АД 206	14,0	6,3	4,8	8,7
МХ-1	19,1	5,4	1,4	25,0

обеих фракциях. В выполненном зерне АД 196 обнаружено 3 изоформы α -амилазы. Все они найдены и в щуплом зерне АД 196, но изоформы с подвижностью 0,21 и 0,26 были очень слабо выражены, а быстрый дополнительный компонент щуплого зерна (ОЭП 0,40) имел максимальную активность.

Через 3-е суток после замачивания во фракциях щуплого и выполненного зерна АД 196 мы обнаружили 2 компонента, идентичных по подвижности (ОЭП 0,03 и 0,40), причем активность компонента с подвижностью 0,40 была очень высокой. Этот компонент присутствовал в наиболее щуплой из всех имевшихся фракций АД 196 уже через сутки после намачивания семян, а у всех остальных в том числе и в выполненном зерне АД 196, появился лишь на 3-и сутки после намачивания. Это свидетельствует о том, что при прорастании новообразование некоторых изоферментов α -амилазы идет более интенсивно в щуплом зерне, чем в выполненном.

Согласно имеющимся в литературе данным, активность α -амилазы максимальная в

ранние фазы созревания зерна, а в фазы восковой и полной спелости она резко снижается [1, 5]. Поскольку активность α -амилазы в зрелом зерне тритикале высокая, представляет интерес изучение активности и изоферментного состава α -амилазы в процессе его созревания. С этой целью мы исследовали зерно тритикале АД 206 и МХ-1, а также зерно пшеницы Мироновской 808 и ржи Харьковской 55 (табл. 3, рис. 2).

Активность α -амилазы в зерне пшеницы и ржи была наиболее высокой в фазу молочной спелости, особенно у ржи. В процессе созревания зерна активность α -амилазы снижалась, причем в зерне пшеницы в фазы восковой и полной спелости она обнаруживалась лишь в следовых количествах. Активность α -амилазы у ржи уменьшалась от молочной до восковой спелости, а затем она вновь возросла более чем в 3 раза.

В фазу молочной и тестообразной спелости активность фермента в зерне тритикале АД 206 и МХ-1 была ниже, чем в зерне пшеницы и ржи. У АД 206, как и у ржи, в завершающий период созревания активность α -амилазы увеличилась; в зрелом зерне этого сорта она была значительно выше, чем у пшеницы, и примерно соответствовала активности α -амилазы в зерне ржи. Очень резкое увеличение активности этого фермента в завершающий период созревания наблюдалось у МХ-1. В фазу полной спелости она оказалась даже выше, чем в начале налива зерна, и была в 3 раза выше, чем в зрелом зерне ржи. Следует отметить, что зерно амфидиплоида МХ-1 было выполнено очень слабо. Очевидно, именно в период от восковой спелости до полного созревания произошел интенсивный гидролиз крахмала, что привело к образованию щуплых зерновок. Величина активности α -амилазы в этот период примерно соответствовала активности фермента в прорастающем зерне.

Исследование электрофоретических свойств амилаз в процессе созревания зерна показало, что увеличение активности α -амилазы в зерне ржи и тритикале от восковой до полной спелости может сопровождаться как увеличением гетерогенности α -амилазы, так и появлением отдельных компонентов, обладающих очень высокой активностью (рис. 3).

В фазу молочной и тестообразной спелости у всех трех культур обнаружено толь-

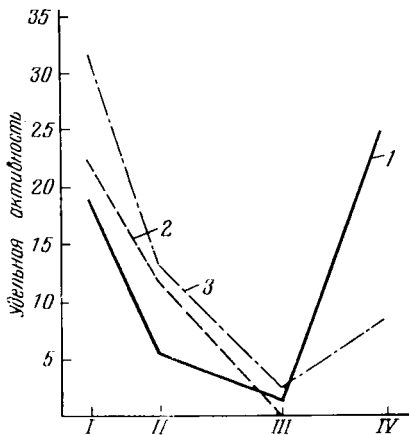


Рис. 2. Изменение активности α -амилазы в зерне тритикале МХ-1 и родительских сортов пшеницы и ржи в процессе созревания.

1 — МХ-1; 2 — пшеница Мироновская 808; 3 — рожь Харьковская 55; I — фаза молочной спелости; II — тестообразной; III — восковой; IV — полной спелости.

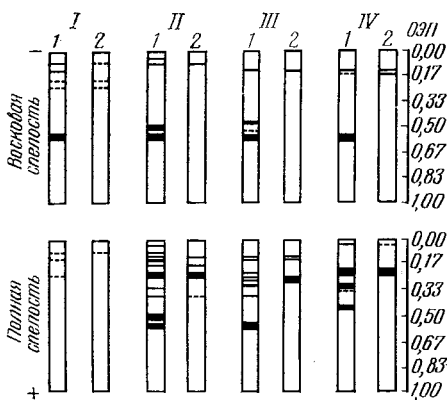


Рис. 3. Изменение изоферментного состава суммарных амилаз (1) и α -амилазы (2) в зерне в период от фазы восковой до фазы полной спелости.

I — пшеница Мионовская 808; II — рожь Харьковская 55; III — АД 206; IV — МХ-1.

ко по одному из ферментов α -амилазы. У пшеницы в фазу восковой спелости α -амилаза проявлялась в виде очень слабых 3 зон активности, а в фазу полной спелости обнаружен только 1 изофермент α -амилазы с очень слабой активностью.

Большие изменения в фазу восковая — полная спелость наблюдались у ржи и амфидиплоидов. В этот период существенно усложнился спектр суммарных амилаз и α -амилазы. В зерне ржи количество изоферментов α -амилазы увеличилось от 1 до 4. Электрофоретический спектр АД 206 в фазу полной спелости включал 3 изофермента

ЛИТЕРАТУРА

1. Бах А. Н., Опарина А. И., Венер Р. А. Количественные изменения ферментов в зреющих, покоящихся и прорастающих зернах пшеницы. В кн. А. Н. Бах: Собр. тр. по химии и биохимии. М., Изд-во АН СССР, 1950, с. 615—621. — 2. Орлова И. Н. Цитологические исследования тритикале. В сб.: Тритикале. Проблемы и перспективы, ч. 2. Каменная степь, 1976, с. 36—43. — 3. Плешков Б. П., Практикум по биохимии растений. М., «Колос», 1976. — 4. Плешков Б. П., Шульгин А. Ф., Кузнецова Н. Е. Некоторые биохимические свойства белкового комплекса зерна тритикале. В сб.: Тритикале. Проблемы и перспективы, ч. 2. Каменная степь, 1976, с. 130—137. — 5. Проскураков Н. И., Маслова И. К., Чиждова К. Н. Изменение автолитической активности и углеводно-амилазного комплекса при созревании и прорастании ржи. «Биохимия», 1946, т. 11, № 6, с. 473—

α -амилазы, в то время как в восковой спелости проявлялся лишь 1 изофермент. Таким образом, увеличение активности α -амилазы в зерне ржи и АД 206 в завершающий период созревания было связано с увеличением количества активных молекулярных форм этого фермента.

В зрелом зерне МХ-1 мы обнаружили только 2 изофермента (ОЭП 0,03 и 0,21), из которых медленный компонент обладал слабой активностью. Очень высокой активностью отличался изофермент с относительной электрофоретической подвижностью 0,21. Этот компонент проявлялся на геле в виде широкой зоны активности. Согласно полученным, данным, активность α -амилазы в зрелом зерне МХ-1 чрезвычайно высокая. Электрофоретические исследования показали, что эта необычайно высокая активность обусловлена наличием компонента с относительной электрофоретической подвижностью 0,21.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в период завершения созревания в зерновках амфидиплоидов, склонных к сморщиванию, начинаются физиолого-биохимические процессы, связанные с началом преждевременного прорастания семян. Определенной зависимости между МХ-1 и родительскими сортами пшеницы (Мионовская 808) и ржи (Харьковская 55) и активности α -амилазы в зерне в течение всего периода созревания зерна не обнаружено. Отсутствие этой связи, так же как и очень высокая активность фермента в зрелом зерне тритикале МХ-1, очевидно, является следствием глубоких процессов генетической несовместимости пшеницы и ржи, о которых свидетельствуют цитогенетические исследования некоторых авторов [2, 7].

480. — 6. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. В кн.: Биохим. методы в физиол. растений. М., «Наука», 1971, с. 113—137. — 7. Шевченко В. Е., Веллибеков М. Д. Цитогенетические исследования тритикале в связи с селекцией на продуктивность. В сб.: Тритикале. Проблемы и перспективы, ч. 2. Каменная степь, 1976, с. 9—26. — 8. Dedio W., Simmonds D. H., Hill R. D., Shealy N. I. "Can. J. Plant Sci.", 1975, vol. 55, N 1, p. 29—36. — 9. Klassen A. J., Hill R. D., Zarter E. N. "Crop. Sci.", 1971, vol. 11, N 2, p. 265—267. — 10. Rao V. R., Mehta S. L., Joshi M. G. "Phytochemistry", 1976, vol. 15, N 6, p. 893—895. — 11. Smith B. W., Roe J. H. "J. Biol. Chem.", 1949, vol. 179, N 1, p. 53—59.

Статья поступила 9 марта 1978 г.

SUMMARY

The activity and isoenzymatic composition of α -amylase of triticale kernel of different plumpness, as well as of soft wheat and rye kernel were studied. It has been shown that high activity in α -amylase in triticale is due to underplumpness in caryopsides: enzyme activity in spare kernel is 3—6 times higher than in plump kernel. In the process of ripening in amphidiploids inclined to development of spare caryopsides the activity grows sharply in the period between dough stage and full maturity. Higher activity of α -amylase in triticale kernels in the final period of ripening may be due to greater amount of isoenzymes of α -amylase or to appearance of certain components of high activity.