

УДК 577. 124

СОЗДАНИЕ НАБОРА СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПРИЗНАКУ «СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТИНА В ЗЕРНЕ»

М. А. Ханадеева¹, Н. И. Старичкова²

¹*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов*

Российской Академии наук

Россия, 410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13

E-mail: marina.kushneruk@mail.ru

²*Саратовский национальный исследовательский*

государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Россия, 410010, Саратов, ул. Астраханская, 83

E-mail: natstar-12@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2018 г., принята 22.10.2018 г.

Проведено определение содержания агглютинина зародышей пшеницы (АЗП) в семенах сортов яровой мягкой пшеницы саратовской селекции двумя методами: по реакции гемагглютинации - способности АЗП агглютинировать эритроциты крови кроликов и методом непрямого конкурентного иммуно-ферментного анализа. Экстракты АЗП для анализа получали из шрота пшеницы. Содержание лектина в экстрактах рассчитывали по калибровочной кривой оптической плотности стандартных растворов АЗП с использованием компьютерной программы. По результатам исследования создан наборов сортов, различающихся по содержанию АЗП в зерне.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, агглютинин зародышей пшеницы, реакция гемагглютинации, иммуно-ферментный анализ.

DOI: 10.18500/1682-1637-2018-3-68-76

Пшеницы занимают большие посевные площади в мировом земледелии, эта культура вызывает большой интерес исследователей, так как является одним из основных хлебных злаков. В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных по урожайности и признакам качества зерна пшеницы, в том числе и по белкам, к числу

СОЗДАНИЕ НАБОРА СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

которых принадлежит и агглютинин зародышей пшеницы (АЗП) (Антонюк, 2005; Бебякин, Старичкова, 2005; Злобина и др., 2017).

АЗП, относящийся к группе лектинов, впервые обнаружен и выделен из зародышей пшеницы (что и определило его название), однако, этот белок присутствует в растениях на протяжении всего онтогенеза, и, как оказалось, важен для нормального роста растения и его адаптации к биотическим и абиотическим факторам внешней среды. Считается, что АЗП важен для нормального роста растения и его адаптации к различным стрессовым факторам, а также для формирования симбиоза с ростстимулирующими бактериями, в частности с азоспириллами (Антонюк, 2005; Антонюк, Евсева, 2006; Шакирова, Безрукова, 2007).

Получение прямых доказательств по ряду функций АЗП связано с методическими трудностями, обусловленными, прежде всего, невозможностью получения безлектиновых мутантов растений из-за летальности мутации. Известно, что состав белков растения предопределен генетически, однако, уровень синтеза того или иного белка в зерновках пшеницы зависит от многих факторов, в том числе от условий питания растения, на котором сформированы анализируемые семена (Tabe et al., 2002; Бебякин, Старичкова, 2005; Злобина и др., 2017).

В связи с этим большое значение приобретает создание наборов образцов семян, близких генетически, но значительно различающихся по содержанию АЗП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили сорта яровой мягкой пшеницы саратовской селекции (предоставлены сотрудниками Института сельского хозяйства Юго-Востока, г. Саратов). Все использованные в работе сорта приведены в таблицах 1 и 2. Содержание АЗП в семенах и проростках пшеницы оценивали по биологической активности этого лектина – его способности агглютинировать эритроциты кроликов. В реакции гемагглютинации (РГА) анализировали экстракты семян и проростков пшеницы. При работе в РГА использовали трипсинизированные, то есть обработанные трипсином эритроциты крови кролика.

Экстракт из семян получали следующим образом: целое зерно с неповрежденным зародышем размалывали на лабораторной мельни-

це, к навеске полученного шрота добавляли 0.05 N HCl и оставляли на 24 часа для экстракции, которую проводили при встряхивании; экстракты осветляли центрифугированием, рН доводили до нейтрального с использованием NaOH.

Экстракты осветляли центрифугированием и подщелачивали до рН 7.5.

РГА проводили в иммунологических планшетах с U-образными лунками. В лунки вносили 2-процентную суспензию нативных или обработанных трипсином эритроцитов кролика, фосфатно-солевой буфер и анализируемый экстракт в последовательных двукратных разведениях. Результаты РГА оценивали визуально после двух часов инкубации планшетов при комнатной температуре. О лектиновой активности в экстрактах судили по конечному разведению экстракта, вызывающего реакцию гемагглютинации. Данные представлены в виде среднего из трех повторностей.

Определение содержания АЗП в семенах пшеницы методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) проводили в плоскостонных иммунологических планшетах. Для их сенсibilизации, в каждую лунку вносили по 200 мкл коммерческого АЗП («Лектино-тест», Украина) в концентрации 0.5 мкг/мл в 10 мМ фосфатно-солевого буфера (ФСБ с рН 7.2); использовали титр сенсibilизации 1:6000. Планшеты инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 1.5 ч. После этого для удаления не связавшихся с полистиролом молекул белка, как и на всех последующих этапах, лунки трижды промывали ФСБ (рН 6.0 – 7.0), содержащим 0.05 % твин-20 (ФТ). Затем в каждую лунку приливали по 200 мкл ФТ, содержащего 0.5 % желатины (ФТЖ). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Далее для проведения конкурентной реакции в промытые лунки приливали ФТЖ: в лунки для построения концентрационной кривой – по 100 мкл ФТЖ, а в лунки, в экспериментальные лунки – по 80 мкл ФТЖ. После чего добавляли аликвоты анализируемых экстрактов (по 20 мкл в каждую лунку) или чистого препарата АЗП (1 мг/мл) в виде десятичных стандартных разведений. В эти же лунки добавляли по 100 мкл раствора анти-АЗП сыворотки 1:4000, разведенную в ФТЖ (50 мкг анти-АЗП в 10 мл ФТЖ). Смесь выдерживали при 37°C в течение 1 часа. После промывки в лунки приливали по 200 мкл меченых пероксидазой анти-кроличьих антител (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва), разведенных

СОЗДАНИЕ НАБОРА СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

в ФТЖ 1:10000. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C, затем промывали ФТ. Далее в каждую лунку планшета добавляли по 200 мкл субстрата, содержащего 0.05 % ортофенилендиамин, 0.016 % перекись водорода в 0.06 М ФСБ (рН 5.8). Развитие окраски останавливали добавлением 4 н серной кислоты (по 40 мкл в каждую лунку). Интенсивность хромофорного ответа определяли на иммуноферментном анализаторе Multiskan Ascent («Thermo», Финляндия) при длине волны 490 нм.

Экстракты АЗП для анализа получали из зародышей пшеницы таким же образом, как и в случае РГА. Содержание лектина в экстрактах рассчитывали по калибровочной кривой оптической плотности стандартных растворов АЗП с использованием оригинальной компьютерной программы, разработанной сотрудником лаборатории физиологии растений Института биологии Уфимского научного центра РАН д.б.н. И. И. Ивановым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка содержания АЗП в зерновках пшеницы методом РГА. Сорты мягкой пшеницы значительно различались по содержанию лектина в семенах. В коллекции протестированных сортов *T. aestivum* можно выделить три группы: с высоким, низким и средним содержанием лектина. Группа пшениц с высоким уровнем АЗП в семенах включает 3 сорта, это – Саратовская 29, Саратовская 46 и Саратовская 52. У трех вышеупомянутых сортов в АЗП-содержащих экстрактах, разбавленных в 1000 раз и выше, еще выявляется гемагглютинирующая активность этого белка (табл. 1). Наименьший уровень содержания лектина был выявлен у сортов Саратовская 38 и Саратовская 39: в экстрактах, разведенных в среднем более чем в ≈ 180 раз (в среднем), лектиновая активность в случае этих сортов уже не выявлялась. Остальные 12 сортов занимают промежуточное положение по содержанию АЗП в семенах – средние конечные разведения экстрактов, выявляющие тестируемый белок, колебались в этой группе между значениями 1:223 и 1:832. Важно отметить отсутствие резких границ между группой сортов со средним уровнем АЗП, с одной стороны, и группами с низким или высоким содержанием лектина, с другой. Проведенный нами анализ показал, что генотипическая вариабельность признака «содержание лектина пшеницы» у яровых мягких пшениц саратовской селекции исключительно высока: максимальные и минимальные значения этого признака имеют более чем 30-кратные отличия.

Таблица 1. Вариабельность признака «содержание АЗП» у сортов яровой мягкой пшеницы саратовской селекции

Table 1. Variability of the mark “content of the AWG” in varieties of spring soft wheat of the Saratov breeding

№	Сорт пшеницы Wheat varieties	Титр РГА Titre of hemagglutination reaction
1.	Саратовская / Saratovskaya 29	1:1024
2.	Саратовская / Saratovskaya 33	1:416
3.	Саратовская / Saratovskaya 36	1:416
4.	Саратовская / Saratovskaya 38	1:181
5.	Саратовская / Saratovskaya 39	1:181
6.	Саратовская / Saratovskaya 42	1:223
7.	Саратовская / Saratovskaya 44	1:416
8.	Саратовская / Saratovskaya 45	1:223
9.	Саратовская / Saratovskaya 46	1:3104
10.	Саратовская / Saratovskaya 48	1:416
11.	Саратовская / Saratovskaya 49	1:223
12.	Саратовская / Saratovskaya 50	1:362
13.	Саратовская / Saratovskaya 51	1:832
14.	Саратовская / Saratovskaya 52	1:6208
15.	Саратовская / Saratovskaya 54	1:416
16.	Саратовская / Saratovskaya 210	1:416
17.	Альбидум / Al'bidum 43	1:223

Оценка содержания АЗП в зерновках пшеницы методом ИФА. Отдельные сорта яровой мягкой пшеницы были оценены по содержанию АЗП также с помощью ИФА. Для иммуноферментного анализа было отобрано четыре сорта яровой мягкой пшеницы, контрастных по содержанию лектина: низколектиновый Альбидум 28, среднелективный Альбидум 29 и высоколектиновые Саратовская 29 и Саратовская 64 (по данным РГА). Полученные методом ИФА результаты подтвердили высокую вариабельность признака «содержание АЗП» у разных сортов яровой мягкой пшеницы (табл. 2).

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, у Альбидум 28 концентрация лектина была самой низкой, у Альбидум 29 – более высокой (209 и 240 нг/г сырой массы, соответственно). Сорта Саратовская 64 и Саратовская 29 показали себя как высоколектиновые. Эти данные хорошо согласуются с результатами РГА (см. табл. 1).

СОЗДАНИЕ НАБОРА СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Таблица 2. Концентрация АЗП в экстрактах, полученных из зародышей яровой мягкой пшеницы по данным ИФА

Table 2. Concentration of AWG in embryo-derived extracts spring soft wheat according to ELISA

№	Сорт пшеницы Wheat varieties	АЗП, нг/г сырой массы зародыша AWG, ng/g wet mass of the embryo
1.	Альбидум 28	209
2.	Альбидум 29	240
3.	Саратовская 64	465
4.	Саратовская 29	1190

Таким образом, оба использованных метода, ИФА и РГА, выявляли высокую вариабельность признака «содержание АЗП» в растениях у яровых мягких пшениц: максимальные и минимальные значения этого признака имели примерно 40-кратные отличия.

Представленные результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными (Антонюк, Евсеева, 2006). В цитируемой работе сравнивали модификационную изменчивость АЗП и пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) – белков, совпадающих по тканевой локализации, но различающихся по функциям. АЗП и ПАИ обнаруживаются в меристематических тканях, причем первый из них локализуется в вакуолях и выделяется в окружающую среду, а второй находится в цитозоле клетки и связан с ее делением. Совокупность полученных ранее и представленных в данной работе результатов свидетельствует о высокой генетической и модификационной изменчивости АЗП, в то время как в случае ПАИ изменчивости признака обнаружить не удалось. Предполагается, что вариабельность признака «содержание лектина» у растений пшеницы обусловлена совокупностью его функций. Коллекция сортов пшеницы, контрастных по содержанию АЗП, может быть использована для дальнейших исследований по изучению функций данного лектина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Антонюк Л. П. Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // Молекулярные основы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растениями. М: Наука, 2005. С. 118 – 159.

М. А. Ханадеева, Н. И. Старичкова

Антонюк Л. П., Евсеева Н. В. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 544 – 549.

Бебякин В. М., Старичкова Н. И. Фенотипическая стабильность показателей амилотической активности зерна яровой мягкой пшеницы в зависимости от генотипа // Вестник СГАУ им. Н.И. Вавилова. 2005. № 2. С. 1 – 5.

Злобина Л. Н., Кулеватова Т. Б., Бекетова Г. А., Старичкова Н. И. Оценка сортов яровой мягкой пшеницы саратовской селекции по признакам качества зерна // Достижения и проблемы современной науки: сб. ст. по матер. XXVI Междунар. науч.о-практ. конф. СПб.: Globus, 2017. С. 12 – 17.

Шакирова Ф. М., Безрукова М. В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журнал общей биологии. 2007. Т. 68, № 2. С. 98 – 114.

Tabe L., Hagan N., Higgins T. J. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability // Current Opinion in Plant Biology. 2002. Vol. 5, № 3. P. 212 – 217.

Образец для цитирования:

Ханадеева М. А., Старичкова Н. И. Создание набора сортов яровой мягкой пшеницы, различающихся по признаку «содержание лектина в зерне» // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2018. Т. 16, вып. 3. С. 68 – 76.
DOI: 10.18500/1682-1637-2018-3-68-76.

СОЗДАНИЕ НАБОРА СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

UDC 577. 124

CREATION OF A SET OF VARIETIES OF SPRING SOFT WHEAT DIFFERING ON THE MARK OF “LECTIN CONTENT IN GRAIN”

M. A. Chanadeeva¹, N. I. Starichkova²

¹ *The Russian Academy of Sciences' Institute of Biochemistry
and Physiology of Plants and Microorganisms
13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia
E-mail: marina.kushneruk@mail.ru*

² *N. G. Chernyshevsky Saratov State University
83 Astrakhanskaya Str., Saratov 410012, Russia
E-mail: natstar-12@mail.ru*

Received 18 October 2018, Accepted 22 October 2018

The determination of the content of agglutinin of wheat germ (AWG) in seed varieties of spring soft wheat of Saratov breeding is carried out by two methods: by the reaction of hemagglutination - the ability of AWG to agglutinate erythrocytes of blood rabbits and the method of indirect competitive immuno-enzyme analysis. AWG extracts for analysis were obtained from wheat flour. The content of the lectin in the extracts was calculated by the calibration curve of the optical density of the standard solutions of the AWG using a computer program. According to the results of the study, sets of varieties differing in content of AWG in grain were created.

Key words: spring soft wheat, wheat germ agglutinin, hemagglutination reaction, immuno-enzyme analysis.

DOI: 10.18500/1682-1637-2018-3-68-76

REFERENCES

Antonyuk L. P. Plant lectin as a factor of communication in symbiosis. In: *Molecular basis of the interaction of associative microorganisms with plants*. Moscow: Nauka Publ., 2005. pp. 118 – 159.

Antonyuk L. P., Evseeva N. V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Microbiology*, 2006, vol. 75, iss. 4, pp. 470 – 475. doi: 10.1134/S0026261706040175

Bebyakin V. M., Starichkova N. I. The fenotypical stability of amylolytic activity indexes of spring wheat grain in dependence with genotype. *N. I. Vavilov bulletin of the Saratov State Agrarian University*, 2005, vol. 2, pp. 1 – 5.

М. А. Ханадеева, Н. И. Старичкова

Shakirova F. M., Bezrukova M. V. Current knowledge about presumable functions of plant lectins. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 2007, vol. 68, iss. 2, pp. 98 – 114.

Tabe L., Hagan N., Higgins T. J. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, vol. 5, iss. 3, pp. 212 – 217.

Zlobina L. N., Kulevatova T. B., Beketova G. A., Starichkova N. I. Evaluation of varieties of spring soft wheat of the Saratov breeding based on the quality of grain. In: *Achievements and problems of modern science: Proc. XXVI Conf.* St. Petersburg: Globus, 2017. pp. 12 – 17.

Cite this article as:

Chanadeeva M. A., Starichkova N. I. Creation of a set of varieties of spring soft wheat differing on the mark of “lectin content in grain”. *Bulletin of Botanic Garden of Saratov State University*, 2018, vol. 16, iss. 3, pp. 68 – 76. (in Russian).
DOI: 10.18500/1682-1637-2018-3-68-76.