

РАДЧЕНКО О.М.<sup>✉</sup>, СІРАНТ Л.В., ДИКУН М.О.Інститут фізіології рослин та генетики НАН України,  
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

✉ ales2009@ukr.net

## ПОЛІМОРФІЗМ АЛЬФА-АМІЛАЗ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

**Мета.** Вивчення поліморфізму альфа-амілази у сортів озимої м'якої пшениці. **Методи.** Ізоферменти  $\alpha$ -амілази виявляли за допомогою методу електрофоретичного розділення білків у поліакриламідному гелі. Індекс проростання (GI) розраховували за Walker-Simmons:  $GI = (7x n_1 + 6x n_2 + \dots + 1x n_7) / 7 \times N$ , де  $n_1, n_2, \dots, n_7$  – число насіння пророслих на перший, другий і в подальші дні до сьомого дня відповідно;  $N$  – загальне число зерен. **Результати.** Досліджували сорти Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ; Селекційно-генетичного інституту НААН, м. Одеса та німецькі сорти. Виявлено поліморфізм альфа-амілази зерна пшениці за допомогою методу електрофоретичного розділення білків. Проведено пошук асоціацій між варіантами альфа-амілази та стійкістю до передзбирального проростання зерна сортів м'якої пшениці та визначено індекс проростання у досліджених зразках. **Висновки.** Оцінена частота поширеності варіантів за ізоферментами альфа-амілази у сортів м'якої пшениці. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту AbC відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання зерна. Серед досліджених сортів СГІ НААН та ІФРГ НАН України переважає варіант альфа-амілази AbC. **Ключові слова:** альфа-амілаза, м'яка пшениця, електрофорез, сорт.

Амілолітичні ферменти широко поширені в вищих рослинах. Вони мають велике значення для біохімічних процесів, що відбуваються в зерні. За їх дії відбувається гідроліз крохмалю з утворенням декстринів і мальтози [1].

Крохмаль існує в формі  $\alpha$ -амілози і амілопектину. Альфа-амілоза складається з довгих нерозгалужених ланцюгів, у яких усі D-глюкозні одиниці з'єднані  $\alpha$ -1,4-зв'язками. Молекулярна маса варіює від декількох тисяч до 500000 Да. Молекулярна маса амілопектину може досягати 1000000 Да [2].

У зерні пшениці присутні два специфічних ферменти, які беруть участь у гідролізі кро-

хмалю [3]:  $\alpha$ -амілаза ( $\alpha$ -1,4-глюканогідролаза) (ендоамілаза, що викликає гідролітичні розщеплення  $\alpha$ -1,4 зв'язків крохмалю до низькомолекулярних декстринів і частково до мальтози [4]; фермент названий  $\alpha$ -амілазою, бо він вивільняє глюкозу в  $\alpha$ -формі; кількість глюкози, яка утворюється  $\alpha$ -амілазою, залежить від концентрації ферменту і рН середовища [5]) і  $\beta$ -амілаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-мальтогідролаза) (розщеплює амілозу, перетворюючи її в мальтозу; за її дії на крохмаль шляхом інверсії утворюється  $\beta$ -мальтоза).

У зерні пшениці  $\beta$ -амілаза перебуває в неактивному стані [6]. В процесі дозрівання зерна активна  $\beta$ -амілаза поступово інактивується і переходить у латентний стан. Виведення  $\beta$ -амілази з неактивного стану можливе завдяки протеолізу.

Серед білкових систем фермент  $\alpha$ -амілаза є однією з найбільш генетично поліморфних систем у пшениці. Амілолітичні ферменти зерна належать до групи білків, які за рівнем поліморфізму перевершують інші ферментні системи пшениці (наприклад, естерази, супероксиддисмутази, алкогольдегідрогенази та ін.) і поступаються за цією ознакою тільки запасним білкам. Її можна використовувати в селекційно-генетичних дослідженнях із метою ідентифікації сортів, маркування хромосом, вивчення взаємозв'язку між алелями, кодуючими амілазу, та господарсько-цінними ознаками пшениці [11].

У м'якої пшениці альфа-амілаза контролюється локусами, розташованими на довгих плечах хромосом 6A, 6B, 6D та на хромосомах 7A, 7B, 7D [7]. Локуси розташовані на хромосомах 6 гомеологічної групи, отримали назву  $\alpha$ -Amy A1,  $\alpha$ -AmyB1,  $\alpha$ -Amy D1; локуси, розташовані на хромосомах 7 гомеологічної групи, –  $\alpha$ -Amy A2,  $\alpha$ -Amy B2,  $\alpha$ -Amy D2 [7]. В хромосомі 6B розташовані також локуси  $\alpha$ -Amy B3,  $\alpha$ -Amy B4,  $\alpha$ -Amy B5,  $\alpha$ -Amy B6.

Фермент  $\alpha$ -амілази представлений трьома типами ізоферментів: GI і GII, які активні під час формування і дозрівання зерна, і GIII, які активніші у проростаючому зерні. Ізоферменти

GIІІ – амілази проростання (термостабільні, високоефективні ферменти) отримали назву  $\alpha$ -AMY-1; вони є більш лужними і синтезуються через 48 годин після початку проростання. Ця група контролюється генами  $\alpha$ -Amy-A1,  $\alpha$ -Amy-B1 і  $\alpha$ -Amy-D1, локалізованими в хромосомах шостої гомеологічної групи 6A, 6B та 6D. Група ізоферментів GI – амілази дозрівання (термолабільна група ізоферментів, що має слабку гідролітичну здатність) названі  $\alpha$ -AMY-2; вони більш кислі, утворюються на кілька днів пізніше, ніж  $\alpha$ -AMY-1, і контролюються генами  $\alpha$ -Amy-A2,  $\alpha$ -Amy-B2 і  $\alpha$ -Amy-D2, локалізованими в хромосомах сьомої групи (7A, 7B та 7D) [8, 9]. GIІ – тип ізоферментів, які виникають у процесі розвитку зерна, контролюються, генами локалізованими в хромосомах сьомої групи.

Метою нашої роботи було вивчення поліморфізму альфа-амілази у сортів озимої м'якої пшениці.

#### Матеріали і методи

У роботі було використано 13 сортів м'якої пшениці. Зерно попередньо пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері в темноті за кімнатної температури протягом 4 діб. Перед пророщуванням зерно стерилізували в розчині  $\text{KMnO}_4$ , нагрівали до  $75^\circ\text{C}$  протягом 30 с. промивали дистильованою водою [10, 11].

Для екстракції ферменту проросле зерно заливали 0,2 % розчином  $\text{CaCl}_2$ , який містить 30 % цукрози та бромфеноловий синій, кількість екстракційного буфера 1000 мкл на зернівку. Після ретельного подрібнення кожної зернівки скляною паличкою настоювали протягом години і центрифугували 4 хв. за 10000 об/хв.

Електрофорез проводили у пластинах 7,5 % поліакріламідного гелю [12]. Для звільнення від  $\beta$ -амілази в гель додавали 5M сечовину. Розділення ізоферментів проводили в тригліциновому буфері рН 8,4 за сили струму 35 мА 4,5 години.

Інкубацію амілаз проводили в 1,5 % розчині гідролізованого крохмалю в ацетатному буфері рН 5,4, який доводили до кипіння та охолоджували. Гелі витримували у розчині крохмалю 1 годину, потім промивали проточною водою і фарбували. Склад фарби: 0,5 г KI, 260 мг  $\text{I}_2$ , 5 г трихлороцтової кислоти, вода до 100 мл.

Індекс проростання (GI) розраховували за Walker-Simmons:  $GI = (7x_{n1} + 6x_{n2} + \dots + 1x_{n7}) / 7 \times N$ , де  $n1, n2, \dots, n7$  – число насінин, пророслих на перший, другий і в подальші дні до сьомого дня відповідно;  $N$  – загальне число зерен [13–15]. Індекс визначали в трьох повторностях для кожного зразка, аналізували по 50 зерен у повторності.

#### Результати та обговорення

Ми вивчали ізоферментний склад альфа-амілази зерна у 13 сортів озимої пшениці з різних селекційних центрів України (табл. 1). Досліджувані сорти були поділені на три групи: сорти Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ; сорти Селекційно-генетичного інституту НААН, м. Одеса та німецькі сорти.

Наявність у верхній частині електрофореграми одночасно трьох компонентів альфа-амілази свідчить про наявність у геномі трьох домінуючих алелів –  $\alpha$ -Amy-A1,  $\alpha$ -Amy-B1 та  $\alpha$ -Amy-D1, які контролюють ізоферменти (рис. 1). Варіанти ізоферментів в електрофоретичних зонах рухливості позначали буквами А, В, С. Для класифікації сортів за ізоферментами великими буквами позначали присутність компонента, а маленькими – відсутність активності у відповідній зоні зимограми.

Серед сортів ІФРГ НАН України переважав варіант альфа-амілази AbC (рис. 2) і поширеність цього варіанта складала 71,42 %. Серед одеських сортів також переважав варіант AbC. Частота цього варіанта була 75 %.

З інших варіантів за альфа-амілази можна відмітити ABC, який був присутній і в сортах селекції СГІ НААН і в сортах селекції ІФРГ НАН України, – 14,28 %. У сортах селекції ІФРГ НАН України також присутній варіант Abc – 14,28 %, а в одеських сортах в цій вибірці такий варіант був відсутній. Німецькі сорти мали два варіанти за альфа-амілазою ABC та AbC. Така диференціація за поширеністю варіантів альфа-амілази, можливо, пов'язана з погоднокліматичними особливостями регіонів.

Серед представлених варіантів альфа-амілази можна відмітити варіант ізоферментів із позначенням AbC, який переважав в обох селекційних центрах. Генотипи, які містять варіант ізоферменту AbC, відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання [11].

Таблиця 1. Варіанти ізоферментів альфа-амілази у досліджуваних сортів м'якої пшениці

Сорт	Походження	Варіанти ізоферментів		
		A	B	C
Бунчук	СГІ НААН, Одеса	A	b	C
Куяльник	СГІ НААН, Одеса	A	b	C
Скаген	Німеччина	A	b	C
Астарта	ІФРГ НАН України	A	b	C
Білява	СГІ НААН, Одеса	A	B	C
Малинівка	ІФРГ НАН України	A	b	C
Кубус	Німеччина	A	B	C
Київська остиста	ІФРГ НАН України	A	b	C
Смуглянка	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	C
Достаток	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	c
Наталка	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	C
Альбатрос одеський	СГІ НААН, Одеса	A	b	C
Дарунок Поділля	ІФРГ НАН України, ЗАТ "Зернопродукт МХП	A	B	C

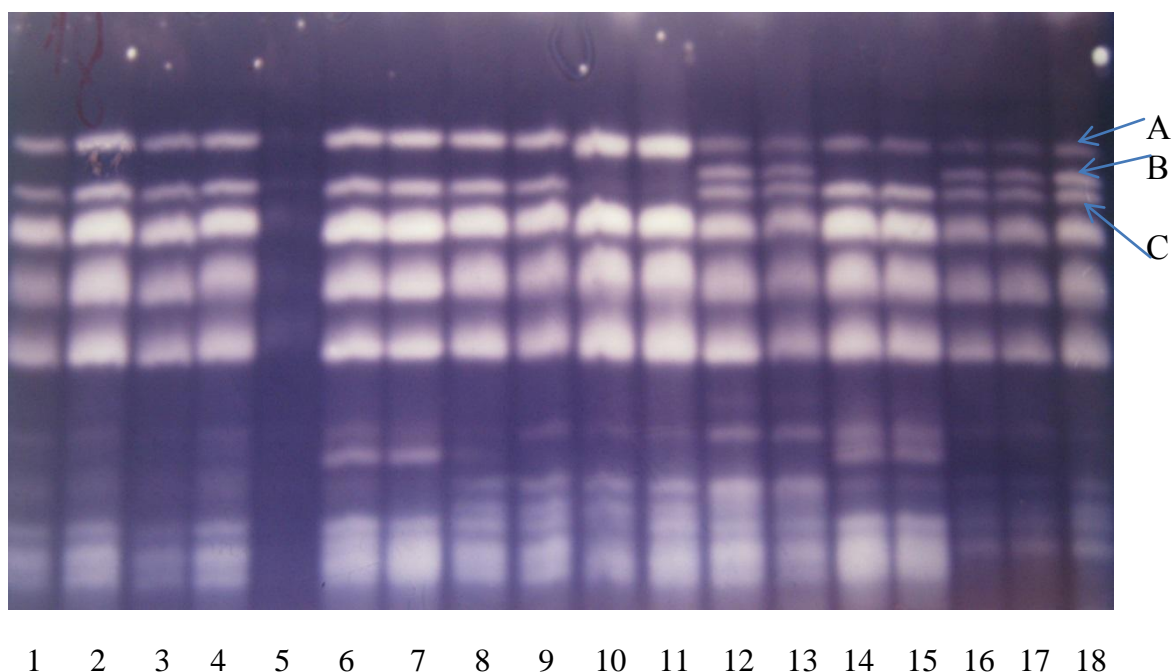
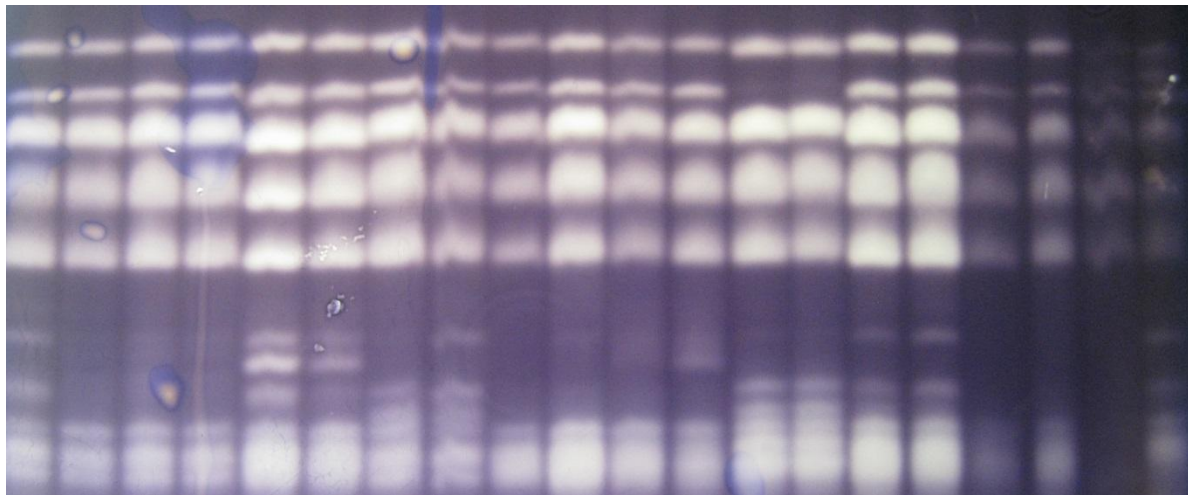


Рис. 1. Зимограми альфа-амілази м'якої пшениці: буквами позначені протестовані варіанти. 1, 2, 3 – Бунчук; 4, 5, 6, 7 – Куяльник; 8, 9 – Скаген; 10, 11 – Астарта; 12, 13 – Білява; 14, 15 – Малинівка; 16, 17, 18 – Кубус.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 2. Зимограми альфа-амілази м'якої пшениці. 1, 2 – Бунчук; 3, 4, 5, 6 – Куяльник; 7, 8 – Скаген; 9, 10 – Київська остиста; 11, 12 – Смуглянка; 13, 14 – Достаток; 15, 16 – Наталка; 17, 18 – Альбатрос одеський; 19, 20 – Дарунок Поділля.

Нами був проведений пошук асоціацій між варіантами альфа-амілази та стійкістю до передзбирального проростання. Був визначений індекс проростання у досліджених зразків. Усі зразки були розділені на 3 групи: стійкі, середні за стійкістю та нестійкі. До стійких відносяться зразки, які мають індекс проростання на рівні 0-27; для зразків, які мають середню стійкість, характерний індекс проростання на рівні 27-70; до нестійких відносяться зразки, які мають індекс проростання 70-100.

Серед зразків із варіантом альфа-амілази AbC: 3 зразки були середні за стійкістю (50 %), 2 – стійкі (33 %), 1 зразок був нестійким (17 %). Таким чином, можна зробити висновок, що ге-

нотипи, які містять варіант ізоферменту AbC, відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання.

### Висновки

Виявлено поліморфізм альфа-амілази зерна пшениці за допомогою методу електрофоретичного розділення білків. Була оцінена частота поширеності варіантів за ізоферментами альфа-амілази у сортів м'якої пшениці. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту AbC, відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання. Серед досліджених сортів СГІ НААН та ІФРГ НАН України переважає варіант альфа-амілази AbC.

### Література

- Horvatova V., Janecek S., Sturdik E. Review Amy lolytic enzymes: the yr specicities, origins and properties. *Biologia*. 2000. Vol. 6. № 55. P. 605–615.
- Ленинджер А. Основы биохимии. Том 1. Перевод с английского. М.: Мир, 1985. 369 с.
- Копусь М.М., Игнатъева Н.Г., Васюшкина Н.Е. та ін. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала. *Зерн. хоз. России*. 2009. № 4. С. 23–27.
- Казаков Е.Д., Карпиленко Г.П. Биохимия зерна и хлебопродуктов. С-Пб.: ГИОРД, 2005. 512 с.
- Tanaka Y., Akazawa T. *Plant Physiol*. 1970. Vol. 46. P. 586.
- Rowse E., Goad L. The constituent of wheat binding latent  $\beta$ -amylase. *Biochem. J*. 1962. Vol. 84. P. 73–78.
- Gale M.D., Marshal G.A. Intensiviti to gibberellin in draw wheat. *Ann. of Botany*. 1973. Vol. 37. № 152. P. 729–732.
- Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*) grain in the U.K. *J. Cereal Sci*. 2001. Vol. 33. P. 313–329.
- Mamytova N.S., Kuzovlev V.A., Khakimzhanov A.A The contribution of different  $\alpha$ -amylase isoenzymes of the commodity grain spring wheat in the formation of faling number values. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. Vol. 50, № 5. P. 531–537.
- Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні на 2018 рік. Київ, 2018. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reiestry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy> (дата звернення: 23.02.2018).

11. Нецветаев В.П., Бондаренко Л.С. Моторина И.П. Полиморфизм альфа-амилаз мягкой пшеницы и сопряженность зимотипов фермента с количественными признаками растений. *Цитогения и генетика*. 2015. Т. 49. № 6. С. 21–29.
12. Davis B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins *Ann. N. J. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121, № 2. P. 404–427.
13. Нецветаев В.П. Распределение аллелей супероксиддисмутазного локуса, SodS, в культуре ярового ячменя по территории бывшего СССР. *Генетика*. 1995. Т. 31, № 12. С. 1664–1670.
14. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. *Theor. Appl. Genet.* 2008. 115. P. 971–980.
15. Xia L.Q., Ganai M.W., Shewry P.R., He Z.H., Yang Y., Röder M.S. Exploiting the diversity of Viviparous-1 gene associated with pre-harvest sprouting tolerance in European wheat varieties. *Euphytica*. 2008. Vol. 159. P. 411–417.

### References

1. Horvatova V., Janecek S., Sturdik E. Review Amyolytic enzymes: the yr specificities, origins and properties. *Biologia*. 2000. Vol. 6, № 55. P. 605–615.
2. Leninger A. Fundamentals of Biochemistry. Volume 1. Translation from English. M.: Mir. 1985. 369 p.
3. Kopus MM, Ignatieva NG, Vasyushkina N.E. etc. Genetic polymorphism of amyolytic enzymes of wheat grains and genetics of starch biosynthesis enzymes. *Z.H. Russia* 2009. No. 4. P. 23–27.
4. Kazakov Y.D., Karpilenko G.P. Biochemistry of grain and bakery products. S-Pt.GIORD. 2005. 512 p.
5. Tanaka Y., Akazawa T. *Plant Physiol.* 1970. Vol. 46. P. 586.
6. Rowsel E., Goad L. The constituent of wheat binding latent  $\beta$ -amylase. *Biochem. J.* 1962. Vol. 84. P. 73–78.
7. Gale M.D., Marshal G.A. Intensiviti to gibberellin in draw wheat. *Ann. of Botany*. 1973. Vol. 37, № 152. P. 729–732.
8. Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*) grain in the U.K. *J. Cereal Sci.* 2001. Vol. 33. P. 313–329.
9. Mamytova N.S., Kuzovlev V.A., Khakimzhanov A.A. The contribution of different  $\alpha$ -amylase ssoenzymes of the commodity grain spring wheat in the formation of faling number values. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. Vol. 50, № 5. P. 531–537.
10. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2018. Kyiv, 2018. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reistry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy>. (Last accessed: 23.02.2018).
11. Netsvetaev V.P., Bondarenko L.S. Motrin I.P. Polymorphism of alpha-amylase of soft wheat and the conjugacy of zymotypes of the enzyme with quantitative signs of plants. *Cytology and genetics*. 2015. Vol. 49, № 6. P. 21–29.
12. Davis B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. J. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121, № 2. P. 404–427.
13. Netsvetaev V.P. Distribution of alleles of superoxide dismutase locus, SodS, in the culture of spring barley on the territory of the former USSR. *Genetics*. 1995. Т. 31, № 12. P. 1664–1670.
14. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. *Theor. Appl. Genet.* 2008. 115. P. 971–980.
15. Xia L.Q., Ganai M.W., Shewry P.R., He Z.H., Yang Y., Röder M.S. Exploiting the diversity of Viviparous-1 gene associated with pre-harvest sprouting tolerance in European wheat varieties. *Euphytica*. 2008. Vol. 159. P. 411–417.

### RADCHENKO O.M., SIRANT L.V., DYKUN M.O.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: ales2009@ukr.net*

### POLYMORPHISM OF ALPHA-AMYLASE OF SOFT WHEAT

**Aim.** Study of polymorphism of alpha amylase in winter wheat varieties. **Methods.** Isoenzymes of alpha-amylase were detected by electrophoretic protein separation in a polyacrylamide gel. The germination index (GI) was calculated by Walker-Simmons:  $GI = (7x_{n1} + 6x_{n2} + \dots + 1x_{n7}) / 7 \times N$ , where  $n_1, n_2, \dots, n_7$  is the number of seeds sprouted on the first, second, and further days to the seventh day, respectively, N – the total number of grains. **Results.** Varieties were explored: Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Odesa and german varieties. The polymorphism of wheat grain alpha-amylase was detected by the method of electrophoretic protein separation. We searched associations between variants of alpha-amylase and resistance to pre-harvest germination, the germination index in the studied samples was determined. **Conclusions.** The frequency of the prevalence of variants for isoenzymes of alpha-amylase in soft wheat varieties was estimated. It was shown that genotypes containing the variant of the isoenzymes AbC are more resistant to pre-harvest germination. Among the studied varieties of PBGI NAAS and IPPG NAS of Ukraine, the variant of alpha-amylase AbC.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, soft wheat, electrophoresis, varieties.