УДК 633.11:581.19

ВАРИАНТЫ ГЛИАДИНА И КОЛИЧЕСТВО ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В БЕЛКОВОМ КОМПЛЕКСЕ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Нецветаев В. П.[1], Копусь М. М.[2], Рыжкова Т. А.[1]

[1]*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия (308015, Белгород, ул. Победы, 85) e-mail: netsvetaev@bsu.edu.ru.*
[2]*ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур им. И.Г. Калиненко Россельхозакадемии» Зерноград, Россия (347720, Зерноград, Научный городок 3). e-mail: kopus@stellberg.ru*

Исследованы варианты глиадина, контролируемые хромосомами 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D в селекционном материале озимой мягкой пшеницы ГНУ Белгородский НИИСХ Россельхозакадемии урожая и влияние их на количество дисульфидных связей белкового комплекса муки. В 2008 году, близком по метеорологическим показателям вегетационного периода к средним многолетним для Белгородской области, обнаружена дифференциация образцов по агрегирующей способности белков. Установлено, что присутствие белков ржи в зерне пшеницы значительно уменьшало число дисульфидных связей между полипептидами и ухудшало физические свойства клейковины. Образованию наибольшего числа дисульфидных связей белкового комплекса среди изученных образцов мягкой пшеницы способствовали следующие генетические факторы, ответственные за синтез глиадинов: *Gld 1A2. 1B1. 1D1. 6A3. 6B7. 6D2.* Различия между вариантами белков, контролируемых 6 гомеологичной группой хромосом, по числу дисульфидных связей были незначительны.

Ключевые слова: мягкая пшеница, запасные белки, глиадины, дисульфидные связи, агрегирующая способность.

VARIANTS OF GLIADIN AND NUMBER OF DISULFIDE BOND IN WHEAT PROTEIN COMPLEXES

Netsvetaev V. P.[1], Kopus M. M.[2], Ryzhkova T. A.[1]

[1] *«Belgorog state national research university», Belgorod, Russia (308015, Belgorod, street Pobeda, 85) e-mail: netsvetaev@bsu.edu.ru.*
[2] *«All-Russian Scientific Research Institute of Grain Crops. IG Kalinenko RAAS», Zernograd, Russia (347720, Zernograd, Science Park 3). e-mail: kopus@stellberg.ru*

Investigated variants of gliadin controlled chromosomes 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D in the breeding material of winter wheat Belgorod State Research Institute of Agricultural and their effect on the number of disulfide bonds in the flour protein complex. In 2008, close to meteorological parameters growing season to the average long-term data for the Belgorod region differentiation of samples detected by protein aggregation ability of the studied samples. Found that the presence of rye proteins in wheat significantly reduced number of disulfide linkages between polypeptides and worsen the physical properties of gluten. The greatest number of disulfide bond formation protein complex among the studied samples of common wheat contributed to the following genetic factors responsible for the synthesis of gliadin: Gld 1A2. 1B1. 1D1. 6A3. 6B7. 6D2. Differences between the variants of proteins controlled gomelogy group chromosomes 6, the number of disulfide linkages were insignificant.

Keywords: common wheat, storage protein, gliadin, disulfide bonds, aggregation ability.

Введение

Исследования генетики запасных белков пшеницы и связь их с качеством муки показало, что на качество влияют как глютелины, так и глиадины зерна [9, 10]. Это основные белковые компоненты эндосперма, формирующие качество выпечки за счет создания белкового каркаса, поддерживающего ее форму. В агрегации белкового комплекса участвуют различные связи. В то же время, не все из них одинаково важны для формирования качества. Так, водородные связи, участвующие в агрегации белков теста, при нагревании разрушаются и, соответственно, мало влияют на форму конечного продукта. В этом отношении большего

внимания заслуживают дисульфидные связи, обладающие достаточной стабильностью при высокой температуре.

Целью работы было исследовать влияние вариантов глиадинов на образование дисульфидных связей в белковом комплексе муки пшеницы и определить аллели глиадинкодирующих локусов с положительным вкладом в их формирование.

Материал и методы исследования

Исследовались сорта и селекционные формы мягкой пшеницы конкурсного испытания ГНУ Белгородского НИИСХ Россельхозакадемии урожая 2008 года. По климатическим характеристикам этот год был близок к среднемноголетним для Белгородской области [4]. Данные условия наиболее благоприятны для дифференциации технологических особенностей между образцами пшеницы [3–5].

Электрофорез глиадинов эндосперма зерновки выполнялся в ГНУ ВНИИС и ЗК Россельхозакадемии (Зерноград) в крахмальном геле с использованием алюминий лактатного буфера pH 3,1 по методике Созинова и Поперели [7]. Идентификацию аллелей глиадинкодирующих локусов вели в соответствии с символикой обозначения Поперели [10].

Число дисульфидных связей в белковом комплексе зерна определялось с помощью показателей седиментации муки 30 % выхода в соответствии с прописью Нецветаева и др. [3, 5]. Количество дисульфидных связей навески муки относили на процент сухой клейковины данного образца. Индекс деформации клейковины (ИДК) определяли на приборе ИДК-1 в соответствии с инструкцией [6].

Выборки из конкурного испытания для сравнения формировали в соответствии с данными электрофоретического анализа. Оценку существенности различий между полученными выборками вели по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее показано [3–5], что оценка количества дисульфидных связей белкового комплекса муки отражает физические свойства клейковины зерна пшеницы. Так, в 2008 году корреляция между индексом деформации клейковины (ИДК) и числом дисульфидных связей белкового комплекса составила –0,46 ($n=74$, $p>0,999$). Следовательно, в этом году показатель ИДК на 21 % определялся степенью агрегации белков с помощью -S-S- связей. Очевидно, другие связи также играли определенную роль в формировании физических свойств клейковины. Стандартный показатель седиментации, по Пумпянскому-Созинову [6], не обнаружил существенной связи с величиной ИДК ($r=-0,11$; $n=74$; $p<0,95$) [3-5]. В то же время SDS седиментация показала значимую корреляцию с ИДК клейковины ($r=-0,32$; $n=74$; $p>0,99$), что может свидетельствовать о сопряженности в 2008 году данного показателя с физическими свойствами клейковины на уровне 10 %.

Известно, что качество муки зависит от компонентного состава запасных белков эндосперма пшеницы [9, 10]. Предыдущие исследования [3, 5] показали, что число дисульфидных связей связано с вариантами глиадина. В связи с этим, были исследованы варианты глиадина в образцах зерна, некоторые из которых представлены на рис. 1.

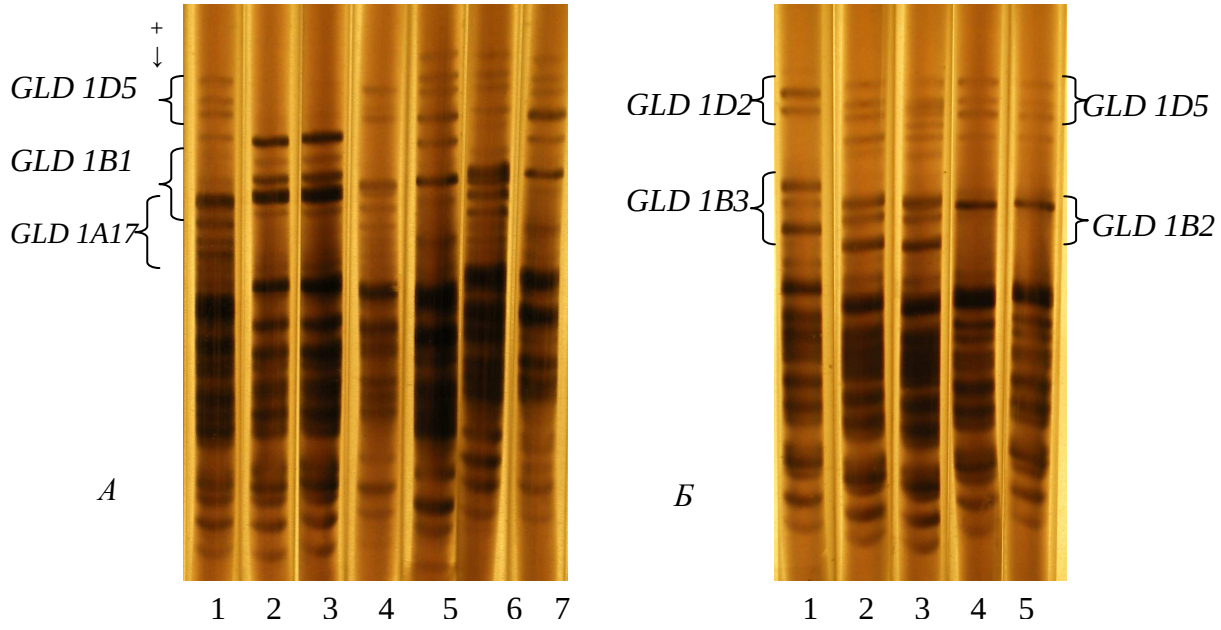

Рис. 1 . Электрофореграммы глиадина сортов А) *Богданка* (1), *Уни 1* (2-3), *6/08* (4), *8/08* (5), *13/08* (6-7); Б) *Синтетик* (1-3) и № *95/08* (4-5)

Это позволило оценить вклад аллелей локусов, контролирующих синтез глиадинов, в формирование межцепочечных -S-S- связей. Для этого провели группировку образцов (табл.) в соответствии с вариантами белков, контролируемых соответствующими аллелями 6 локусов, и оценили средние значения по числу дисульфидных связей.

Таблица

Оценка вклада аллелей глиадинкодирующих локусов (или тесно сцепленных с ними генов) на уровень формирования –S-S-связей белкового комплекса эндосперма

Символы аллелей *Gld* локусов	Количество образцов	Количество межмолекулярных дисульфидных связей, усл. ед.	Отклонение от средней (±), мл/%(сух.клейк)
Хромосома 1А			
А2	20	4,40 ± 0,31	+0,95
А3	10	3,36 ± 0,57	-0,09
А4	28	3,04 ± 0,36	-0,41
А12	5	3,06 ± 1,16	-0,39
А17	4	2,35 ± 0,63	-1,1
Среднее	Σ67	3,45	-
Хромосома 1В			
В1	53	3,91 ± 0.23	+0,46
В3	8	0,78 ± 0,64	-2,67

B4	3	2,54 ± 0.85	-0,91
Среднее	Σ 64	3,45	-
Хромосома 1D			
D1	11	3,94 ± 0,41	+0,58
D2	10	3,82 ± 0,52	+0,46
D4	10	3,07 ± 0,71	-0,29
D5	29	3,02 ± 0,34	-0,34
D7	4	3,84 ± 1,04	+0,46
Среднее	Σ 64	3,36	-
Хромосома 6A			
6A1	8	3,19 ± 0,49	- 0,25
6A3	59	3,49 ± 0,26	+ 0,04
Среднее	Σ 67	3,45	-
Хромосома 6B			
6B1	31	3,18 ± 0,38	- 0,27
6B2	36	3,69 ± 0,29	+ 024
Среднее	Σ 67	3,45	-
Хромосома 6D			
6D1	38	3,41 ± 0,33	- 0,04
6D2	29	3,55 ± 0,33	+ 0,10
Среднее	Σ 67	3,45	-

Как видно, варианты пептидов, контролируемые разными аллелями, обладают не одинаковой способностью к межмолекулярной агрегации в белковый комплекс с помощью дисульфидных связей. Так, например, если вариант GLD 1A2, контролируемый аллелем *Gld 1A2* хромосомы 1A, связан с положительным эффектом в образовании дисульфидных связей, то альтернативный вариант пептидов GLD 1A17, контролируемый аллелем *Gld 1A17* (рис. 1), приводит к негативному влиянию на агрегацию пептидов. Различия по эффекту образования дисульфидных связей белкового комплекса между этими вариантами существенны (рис. 2, t=2,1; n=24; p>0.99). Характерно, что вариант GLD 1A17 связан с интрогрессией в геном пшеницы генетического материала от ржи [2]. Этот вариант известен также под символом GLI A1w (аллель *Gli-A1w*), согласно обозначению Kozub et al. [8].

Подобными эффектами обладают также варианты пептидов, контролируемые другими локусами. Так, если вариант GLD 1B1, контролируемый аллелем *Gld 1B1* локуса *Gld 1B* расположенного в коротком плече хромосомы 1B определяет положительное влияние на образование дисульфидных связей в белковом комплексе зерна (табл., рис. 2), то вариант GLD 1B3, обусловленный альтернативным аллелем *Gld 1B3*, приводит к негативному эффекту.

Хромосома 1A

←–––––––––––––– **2,1**** ––––––––––––→
←––––––1,3 ––––––→ ←––––––– 0,8 ––––––→
←––– 1,0–→ ←– 0,3 –→ ←–0,1–→ ←––0,7––→

A2 (4,4) ≥ ***A3*** (3,4) ≥ ***A12*** (3,1) = ***A4*** (3,0) ≥ ***A17*** (2,35)

←−−−−−− 0,4−−−−−−→
←−−−−−−−−−−−1,4 −−−−−−−−−−→
←−−−−−−−−−− 1,1−−−−−−−−−−→

Хромосома 1B

←−−−−−−**3,1*****−−−−−−→

B1 (3,9) ≥ ***B4*** (2,5) ≥ ***B3*** (0,8)

←−− 1,4−→ ←−− 1,7−→

Хромосома 1D

←−−−−−−−−−−−−−− 0,9 −−−−−−−−−−−−→
←−−−−−−0,1 −−−−−−→ ←−−−−− 0,8 −−−−−→
←−− 0,1−→ ←− 0,0−→ ←−0,7−→ ←−−0,1−−→

D1 (3,9) = ***D7*** (3,8) = ***D2*** (3,8) ≥ ***D4*** (3,1) = ***D5*** (3,0)

←−−−−−− 0,7 −−−−−−→
←−−−−−−−−−−0,8−−−−−−−−−−→
←−−−−−−−−−−0,8−−−−−−−−−−→

Хромосома 6A

A3 (3,5) ≥ ***A1*** (3,2)

←− 0,3 −→

Хромосома 6B

B2 (3,7) ≥ ***B1*** (3,2)

←− 0,5 −→

Хромосома 6D

D2 (3,6) = ***D1*** (3,4)

←− 0,2 −→

Рис. 2. Вклад аллелей в уровень содержания межмолекулярных дисульфидных связей белкового комплекса, мл/% (сух.клейк) (различия существенны при уровнях значимости: * - 95%, ** - 99%, *** - 99,9% для критерия t)

Различия по вкладу в формирование -S-S- связей в 2008 году между этими вариантами белков были существенны (рис. 2; t=3,1; n=61, p>0,999). Следует отметить, что в этом случае негативный эффект на агрегацию был также связан с транслокацией от ржи, но в хромосому

1B [1]. Генетический фактор *Gld 1B3*, контролирующий ржаной вариант пептидов GLD 1B3 (рис.1), расположен в транслоцированном от ржи участке хромосомы 1B.

Различия по вкладу аллелей локуса *Gld 1D* в формирование дисульфидных связей белкового комплекса менее значимы (табл., рис. 2). Еще меньшее влияние на агрегацию белков оказывали глиадинкодирующие аллели локусов, расположенных в шестых группах сцепления (табл., рис. 2).

Характерно, что близкие генотипы по *Gld*-локусам с наличием активных аллелей по *1D* хромосоме: *Gld 1A2.1B1.1D5.6A3.6B2.6D2* (n = 3) и *Gld* 1A2.1B1.1D2.6A3.6B2.6D2 (n = 3) в среднем характеризовались наличием межмолекулярных дисульфидных связей в 4,44±0,26; и 4,39±0,10 усл. ед. Следовательно, они практически не отличались между собой. В то же время генотип с аллелями *Gld 1A2.1B1.1D0.6A3.6B2.6D2* (рис. 1, 2–3 дорожки), имевший неактивный аллель – *gld 1D0* в 1D хромосоме, приводил к увеличению этих связей в белковом комплексе зерна до 7,38 усл. ед. Характерно, что глиадины, контролируемые *1D* хромосомой, не образуют межмолекулярных дисульфидных связей, так как добавление в экстрагирующий раствор восстановителей (β-мерпатоэтанола или дитиотриитола) не изменяет подвижности полипептидов этих глиадинов при электрофорезе и не увеличивает их эктрагируемости. Это свидетельствует об отсутствии цистеиновых остатков у этих белков, которые могли бы участвовать в агрегации полипептидов за счет межмолекулярных связей. Интересно, что в данном случае активизировалась активность аллеля *Gld 1B1* в виде увеличения интенсивности полипептидов GLD 1B1 (рис. 1). Реакция этих белков на β-мерпатоэтанол свидетельствует о наличие у них дисульфидных связей.

Таким образом, присутствие глиадинов GLD 1D привело к уменьшению результирующего количества дисульфидных связей в белковом комплексе муки на 2,96 усл. ед. или на треть.

Вегетационный период 2009 г. отличался засушливыми условиями во время формирования и созревания зерна, что способствовало укреплению клейковины. В результате генотип с аллелями *Gld 1A2.1B1.1D0.6A3.6B2.6D2* по наличию межмолекулярных дисульфидных связей характеризовался величиной в 6,25 усл. ед., а формы с аллелями *Gld 1A2.1B1.1D5.6A3.6B2.6D2*, соответственно, - 5,43±0,83 усл. ед. Следовательно, в условиях, способствующих формированию межмолекулярных пептидных агрегатов, отсутствие глиадинов GLD 1D привело лишь к 15 % увеличению количества дисульфидных связей. Это свидетельствует о том, что наиболее эффективно тестировать белковый комплекс эндосперма на количество дисульфидных связей в годы менее благоприятные для формирования высококачественной клейковины.

Оценка физических свойств клейковины между контрастными по количеству дисульфидных связей белкового комплекса образцами в 2008 году показала, что генотипы с аллелем *Gld 1B3* (n=8) имели более высокий индекс деформации клейковины (ИДК) по сравнению с генотипами, несущими аллель *Gld 1B1* (n=52). Так, носители аллеля *Gld 1B3* по этому показателю характеризовались величиной ИДК в 92,0±1,9 ед., а образцы, с альтернативным аллелем *Gld 1B1*, имели ИДК, равный 78,9±1,2 ед. Различия существенны при p>0,999 (n=60, t=4,94). Следовательно, генотипы, несущие вариант ржаного белка GLD 1B3 (рис. 2), имели более слабую клейковину по сравнению с пшеничными вариантами, что обусловлено слабой агрегацией между ржаными и пшеничными пептидами. Подобная картина наблюдалась с генотипами, несущими ржаной вариант белка GLD 1A17 (рис. 1), контролируемый глиадинкодирующим локусом в транслокации от ржи в коротком плече хромосомы 1A.

Выводы

Таким образом, вариантный состав запасных белков эндосперма пшеницы определяет способность полипептидов агрегироваться с помощью дисульфидных связей. Степень агрегации белков формирует вязкость клейковины (индекс деформации), что определяет ее качество. Установлено, что присутствие белков ржи в зерне пшеницы уменьшает число дисульфидных связей между полипептидами и ухудшает физические свойства клейковины. Наибольшему числу образования дисульфидных связей белкового комплекса среди изученных образцов мягкой пшеницы способствовали следующие генетические факторы, ответственные за синтез глиадинов: *Gld 1A2. 1B1. 1D1. 6A3. 6B7. 6D2.*

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Соглашение №14.132.21.1323.

Список литературы

1. Козуб Н. А. Ржаные транслокации у некоторых сортов озимой мягкой пшеницы / Н. А. Козуб, И. А. Созинов, Т. А. Собко, О. С. Дедкова, Е. Д. Бадаева, В.П. Нецветаев // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 3. – С. 68–74.

2. Козуб Н. А. Сорта мягкой пшеницы украинской и российской селекции с геном устойчивости к стеблевой ржавчине Sr 1RSAmigo. / Н. А. Козуб, И. А. Созинов, Т. А. Собко, В. Т. Колючий, В. А. Власенко, В. П. Нецветаев // Управление продукционным процессом в агротехнологиях 21 века: реальность и перспективы (Матер. Международ. научно-практ. конф. 15–16 июля 2010 – Белгородский НИИСХ). – Белгород: Отчий край, 2010. – С. 222–225.

3. Нецветаев В. П. Методы седиментации и оценка качества клейковины мягкой пшеницы / В. П. Нецветаев, О. В. Лютенко, Л. С. Пащенко, И. И. Попкова // Научные ведомости БГУ (Серия естественные науки). – Белгород:БГУ. – 2009. – № 11 (66). – Вып. 9/1. – С. 56-64.

4. Нецветаев В. П. Новые подходы к оценке качества зерна озимой мягкой пшеницы / В. П. Нецветаев, О. В. Лютенко, Л. С. Пащенко, И. И. Попкова // Белгордский Агромир. – 2010. – № 1 (54). – С. 27–29.

5. Нецветаев В. П. Оценка качества зерна мягкой пшеницы SDS-седиментацией / В. П. Нецветаев, О. В. Лютенко, Л. С. Пащенко, И. И. Попкова // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 3. – С. 63–70.

6. Созинов А. А. Методические рекомендации по оценке качества зерна / А. А. Созинов, Н. И. Блохин, И. И. Василенко, С. С. Синицин, В. И. Комаров, Н. Д. Тарасенко, Б. Е. Кравцова. – М.: Артес, 1977. – 130 с.

7. Созинов А. А., Попереля Ф. А. Методика вертикального дискового электрофореза белков в крахмальном геле // Информационный бюллетень СЭВ. – Прага, 1974. – Вып. 1. – С. 135–144.

8. Kozub N. A. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine / N. A. Kozub, I. A. Sozinov, T. A. Sobko, V. T. Kolyuchii, S. V. Kurtsov, A. A. Sozinov // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43. – № 1. – С. 69–77.

9. Payne P. I, Holt L. M., Jackson E. A., Law C. N. Wheat storage protein: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding/ Phil. Trans. R. Soc. Lond. – 1984. – P. 359-371.

10. Попереля Ф. О. Три основні генетичні системи якостї зерна озимої м’якої пшениці // Реалізация потенційних можливостей сортів та гибридів селекцийно-генетичного институту в умовах Україні, Зб. Наук. праць СГІ. – Одеса, 1996. – С. 117–132.

Рецензенты:

Сорокопудов В. Н., д.с.-х.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

Смирнова Л. Г., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией адаптивного растениеводства и агроэкологии ГНУ «Белгородский НИИСХ Россельхозакадемии», г. Белгород.