АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им.А.В.ПАЛЛАДИНА

На правах рукописи

МАИДУХ АБУ МОССАЛАМ ТАГ-ЭЛЬ ДИН

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЕМЯН И ПРОРОСТКОВ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ С РАЗЛИЧНОЙ ЖАРОСТОЙКОСТЬЮ

03.00.04 - биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1993

[illegible] логии и экологии растений
Киевского университета им. Тараса Шевченко

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Н.Н.Мусиенко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор СУДЬИНА Е.Г.
кандидат биологических наук
ЛУЦИШИНА Е.Г.

Ведущая организация - Институт клеточной биологии и
генетической инженерии АН Украины

Защита диссертации состоится "25" января 1993 г. в
14 часов на заседании специализированного совета Д 016.07.01
по защите диссертаций в Институте биохимии им.А.В.Палладина
АН Украины (252601, ул. Леонтовича 9).
г.Киев

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биохимии АН Украины.

Автореферат разослан"_____"_____1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета Кирсенко О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Изучение физиолого-биохимических и генетических различий между генотипами представляет собой исключительно важную практическую и теоретическую задачу. Современные достижения биохимии и молекулярной биологии позволили предложить в качестве генетических маркеров молекулы целого ряда органических соединений. Значительного распространения приобрело изучение белковых маркеров, что обусловлено их высокой специфичностью, разнообразием их физико-химических свойств и функций в растительном организме. С относительно недавних пор для этой цели используется анализ запасных белков семян растений (Конарев, 1980; Созинов, 1985; Bourdet, 1963; Kasarda, 1970). С использованием различных модификаций методов хроматографии и электрофореза детально изучен состав запасных белков семян растений (Anderson, 1989; Bietz, 1979; Feillet, 1976), определены хромосомы ответственные за кодирование определенных компонентов, выявлена множественность генов, кодирующая родственные белки, определена первичная структура многих запасающих белков и места расщепления сигнальных пептидов (Forde J., 1985; Halford, 1987; Shewry, 1984, 1988, 1990), выявлены последовательные события, определяющие отложение белков в запас (Farde B., 1985) равно как и другие важные особенности синтеза, накопления и мобилизации белков семян при прорастании (Дмитриева, 1991; Крокер, 1950, Dausant, 1969) .

В этой интенсивно развивающейся области биологии остаётся множество нерешенных вопросов. В первую очередь, они касаются влияния потенциальных генетических возможностей и генетических изменений на состав и содержание тех или иных компонентов. Не менее важной остаётся необходимость поиска биологической и эволюционной значимости близости и различий между белковыми компонентами семян, важность тех или иных белковых блоков, в определении хозяйственно-ценных признаков растений (Созинов, 1985; Fullington, 1980; Kasperska-Palacz, 1977). Число работ в этом направлении, с каждым годом всё увеличивающееся, пока не соответствует сложности и уровню поставленных задач.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование состава запасных белков семян пшеницы украинской и египетской селекции с использованием различных методов экстракции и фракционирования полипептидов, а также поиск возможной связи между компонентным составом белков семян и устойчивостью проростков пшеницы к тепловому шоку.

В связи с этим были поставлены следующие основные задачи:
- последовательно извлечь запасные белки исследуемых сортов семян различными растворителями;
- изучить компонентный состав полипептидов и изоферментов семян различных генотипов пшеницы;
- сопоставить компонентный состав различных фракций белков украинской и египетской селекции;
- разработать интегральные критерии оценки разности компонентного состава белков семян пшеницы;
- определить устойчивость проростков разных сортов пшеницы к тепловому шоку;
- выявить возможные связи и закономерности между составом различных белков и реакцией проростков на тепловой шок.

Научная новизна исследований. Установлено, что по составу альбуминов и глиадинов семян египетские сорта пшеницы Гиза 157, Гиза 156, Гиза 155, Сухаг 1, Саха 69 отличаются высокой вариабельностью компонентов. Для них характерно присутствие компонентов с ММ 80,0 и 79,5 кД, которые не обнаруживаются у украинских сортов (Мироновская 808, Мироновская 61, Одесская 117). Показана возможность идентификации генотипов по компонентному составу полипептидов, экстрагированных из семян пшеницы буфером Лэммли.

На основании ростовой реакции проростков пшеницы на тепловой шок разработаны критерии оценки первичной и адаптационной компоненты устойчивости генотипов пшеницы. Эти критерии позволили провести разделение генотипов пшеницы на основе их первичной и адаптационной устойчивости к тепловому шоку. Выявлено независимое проявление обоих компонент устойчивости у разных генотипов.

Предложена математическая модель, позволяющая количественно оценить индекс близости между сортами пшеницы на основании компонентов белков, выявленных при электрофорезе. Представлены дока

зательства в пользу различной корреляционной связи альбуминового и глиадинового спектров на первичную и адаптационную устойчивость проростков к тепловому шоку. Используя индексы близости генотипов и анализ специфики состава различных групп белков, дана оценка связи между наследованием белковых компонентов и их влиянием - (возможно опосредовано) на жаро- и засухоустойчивость растений.

Теоретическая и практическая значимость работы.

На основании системного анализа компонентов полипептидов выявлен интегральный показатель близости генотипов, который может быть использован, как для оценки родства сортов, так и для выявления влияния тех или иных белковых компонетов на генетически детерминированные физиологические свойства сорта, в частности, устойчивости к тепловому стрессу. Модифицированы и оптимизированы условия проведения экстракций и электрофоретического разделения полипептидов семян пшеницы, что обеспечивает более высокую разрешающую способность метода с целью использования его в биохимическом маркировании. Экспериментально обоснованный критерий разделения устойчивости растений к высоким температурам на первичную и адаптационную (восстановительную) компоненты, может быть использован для выявления стратегии ранжирования отдельных групп растений по признаку устойчивости к высоким температурам. На основе анализа оригинальных результатов и математического моделирования предложен новый научно-методический подход к оценке агрономической устойчивости сортов на ранних этапах онтогенеза растений и их использование в рабочих программах селекции пшеницы. Материалы представленные в диссертации, используются в экспериментальной работе на кафедре физиологии и экологии растений биологического факультета Киевского университета им. Тараса Шевченко и в Департаменте сельскохозяйственной биохимии Айн Шамского университета (Каир, АРЕ).

Апробация работы. Диссертационная работа проводилась в соответствии с планом научных исследований кафедры по теме "Физиолого-биохимические механизмы устойчивости способы ее повышения и продуктивность растений" (Приказ Минвуза N 78 от 23.03.91) и согласно планам научной работы Департамента сельскохозяйственной биохимии Айн Шамского университета Каира (АРЕ) "Биохимия белков пшеницы".

Результаты исследований по теме диссертации обсуждались на конференции молодых ученых ИФРиГ АН Украины (Киев, 1992), VI Ук-

раинском биохимическом сьезде (Киев, 1992), а также итоговых ежегодных конференциях профессорско -преподавательского состава биологического факультета Киевского университета им. Тараса Шевченко (1991-1992).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, восьми глав, выводов, списка использованной литературы. Общий объем диссертации включает 115 страниц машинописного текста, 15 таблиц и 15 рисунков. Список литературы содержит 153 наименований, в том числе 93 иностранных авторов.

Основные положения, которые выносятся на защиту. На основании выполненных исследований, обобщая собственные и литературные данные, на защиту выносятся следующие положения:

1. Компонентный состав запасных белков семян различных сортов пшеницы специфическим образом связан с ранжированием этих же сортов по признаку теплоустойчивости, а именно: глиадины оказывают преимущественное влияние на первичную, тогда как альбумины - на адаптационную компоненту устойчивости;

2. Интегральным показателем родства генотипов может служить, разработанный для количественной оценки разнокачественности белковых спекторов семян индекс близости (F), точность которого возрастает с увеличением числа анализируемых генотипов.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования в работе использовали различные по происхождению сорта пшеницы египетской селекции - Гиза 155, Гиза 156, Гиза 157, Саха 69 и Сухаг 1 и украинской селекции - Одесская 117 , Мироновская 808 и Мироновская 61. В некоторых экспериментах в исследуемый набор сортов пшеницы были включены Саратовская 46, Вега, Кутулукская.

Для изучениния особенностей ростовой реакции и синтеза белков при действии теплового шока использовали 3-10-ти суточные проростки пшеницы, которые выращивали при температуре 25^{0}С и чередовании света (16 ч) с интенсивностью 5500 лк и темноты (8 ч). Тепловому стрессу подвергали трехсуточные проростки пшеницы, которые находились в начале фазы линейного роста при температуре 40 -45^{0}С и влажности воздуха около 80%. Колебания температуры в период шока составляли $\pm$ 0,4^{0}С. Обработку высокими температурами

в водной среде проводили путем погружения проростков в дистиллированную воду, согласно методике описанной, Мусиенко,1990.Температуру стабилизировали в ультратермостате U-10 (ГДР) с точностью до 0,05°С.

Измерение скорости роста растений. Для характеристики степени угнетения ростовых процессов, вызванных тепловым шоком, кинетики их последующего восстановления использовали показатель отношение приростов (ОП) который расчитывали по формуле:

$$\frac{(L_{t_i} - L_{t_o})\ \text{опытных растений}}{(L_{t_i} - L_{t_o})\ \text{контрольных растений}}, \qquad (I)$$

где L_{t_o} и L_{t_i} - соответственно длина проростков, измеренных перед тепловой обработкой и через интервал времени t_i после нее.

Выделение фракций запасных белков пшеницы и ферментов. Растворимые фракции белков /альбумины, глиадины / экстрагировали согласно стандартной методике Гаврилюк, 1973. В отдельных экспериментах применяли для выделения глиадинов модифицированную методику , используемую для выделения зеина кукурузы в присутствии мочевины (Асыка, 1991)

Экстракцию пероксидазы и фенолоксидазы ферментов проводили в трис-боратном буфере (pH - 8,9) в течение 2 ч с последующим центрифугированием в течении 20 мин при 10 тыс.g при комнатной температуре. Супернатант использовался для фракционирования в ПААГ.

Определение состава белков и изозимов ферментов. Полипептиды фракционировали по молекулярной массе электрофорезом в полиакриламидном геле /ПААГ/ в присутствии додецил сульфата натрия /SDS/. Использовали вариант электрофореза по Laemmli, 1970.Содержание составных компонентов концентрирующих гелей /бисакриламида, трис-HCl , сульфата аммония, SDS, N,N,Ń,Ń- тетраметиленбисакриламид (ТЕМЭД) / соответствовало составленным прописям Лефковитс, 1981. Электрофорез проводили в аппарате с вертикальной пластиной размером 190 × 140 × 0,5 мм. При постоянном токе 10 мА на пластинку до тех пор, пока свидетель (бромфеноловый синий) не дойдет до верхней границы разделяющего геля ; затем 20 - 30 мА - до нижней границы разделяющего геля. Фракционирование глиадинов, выделенных в присутствии мочевины проводили согласно методической разработке Асыка, 1991

Электрофорез компонентов изозимного спектра полифенолоксидазы и пероксидазы проводили в аппарате с вертикальной пластиной размером 150× 120 × 1 мм,в течение 2 ч при 350 v, согласно стандартной методике по Davis, 1964. Гели проявляли на пероксидазную (с бензидином и перекисью водорода) и фенолоксидазную (с пирокатехином и п.фенилендиамином) активности, согласно методике Сафонова, 1971.

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики согласно Урбаху, 1964.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВАНИИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ БЕЛКОВ СЕМЯН И ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

В литературе имеются многочисленные сведения о возможности биохимического маркирования генотипов пшеницы на основании состава запасных белков семян [Конарев, 1980; Созинов,1985; Marchylo, 1987; Ono,1977; Wrigley,1973]. Нами была поставлена задача провести сравнительное исследование полиморфизма белков семян различных генотипов пшеницы, затем определить этот показатель в проростках, инкубированных при оптимальных и высоких (стрессовых) температурах. Мы полагаем, что устойчивость растений к высоким температурам может зависеть определенным образом не только от состава и содержания углеводов, служащих субстратами для дыхания и синтеза богатых энергетических соединений, но и от состава запасных белков, которые могут с разной эффективностью гидролизоваться и включаться в экспрессию новых структурных генов.генотипов пшеницы.

Анализ полиморфизма альбуминов. Фотография и схема SDS-электрофореза в ПААГ водорастворимой фракции белков зерна пшеницы различных сортов приведены на рис.1. Зрительный анализ электрофореграмм позволяет выявить 21-27 белковых компонентов разной интенсивности с молекулярными массами между 15 и 90.5 кД. Для идентификации исследованных сортов можно использовать полиморфизм по белкам с ММ 90,5; 78,5; 75,5; 73,0; 67,0; 62,5; 50,0; 36,0; 28,5 и 16,0 кД /на диаграмме рис.1(а) соответственно полосы под номерами 1, 2, 3,...,10 /.Сорт Саха 69 характеризуется отсутствием компонента с ММ 67,0 кД, что является отличительной особенностью альбуминов этого сорта от всех других исследованных сортов. Аналогично, сортовой характеристикой является отсутствие компонента с ММ 62,5 кД у Гизы 155, компонента с ММ 36,0 кД у сорта Сухаг 1 и полосы 10, соответствующей белку с ММ 16,0 кД у

Одесской 117. Можно заметить практическое совпадение электрофоретических спектров альбуминов сорта Мироновская 61 и Гиза 155, отличающихся между собой отсутствием соответственно компонентов с ММ 36,0 и 62,5 кД., что указывает на их генетическую близость. Отсутствие некоторых минорных компонентов в спектре водорастворимых белков семян сорта Мироновская 808, в частности полос с ММ 90,5 и 78,5 кД может лежать в основе характерных признаков этого сорта. Сорт Саха 69 обладает характерным спектром альбуминов. Его можно идентифицировать по наличию компонентов, имеющих ММ 50,0; 28,5 и 16,0 кД. Семена сорта Сухаг 1 легко идентифицируются по отсутствию трех компонентов с ММ 90,5; 75,5 и 28,5 кД.

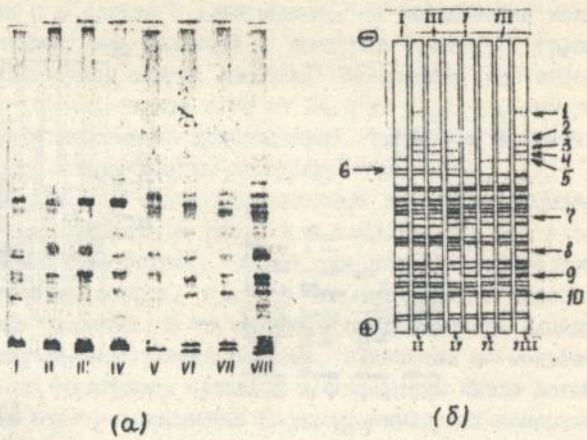


Рис.1. Электрофореграмма (а) и диаграмма (б) водорастворимых белков семян различных сортов пшеницы.

I - Одесская 117 IV - Сухаг 1 VII - Гиза 156
II - Мироновская 61 V - Саха 69 VIII - Гиза 155
III - Мироновская 808 VI - Гиза 157

1,2,3,...,10 - порядковые номера отдельных белковых компонентов спектра альбуминов по мере убывания молекулярной массы

Таким образом, фракция альбуминов позволяет идентифицировать 7 из 8-ми исследованных сортов, т.к. спектры сортов Гиза 156 и Гиза 157 совпадают, что может свидетельствовать в пользу их гене-

тической близости. Группы сортов египетской и украинской селекции по альбуминовым спектрам не проявляют характерных особенностей.

Состав спирторастворимых белков семян различных сортов пшеницы /фракция глиадинов /.Экстрагированные этанолом белки семян пшеницы восьми исследованных сортов фракционировали электрофорезом по Laemmli,1970. Результаты приведены на рис.2. и в табл. 26 (стр.20). В семенах различных сортов пшеницы детектируются 25-34 полипептида с ММ в интервалах между 14,0 и 89,5 кД. Различия в 30 компонентах глиадинового спектра позволяют для каждого из исследованных сортов составить специфическую картину полиморфизма по которой возможна четкая идентификация каждого генотипа.

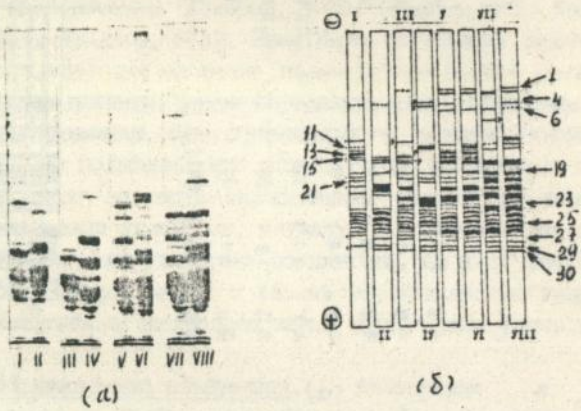


Рис.2. ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА (а) И ДИАГРАММА (б) СПИРТОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

Условные обозначения: I-Одесская117; II-Мироновская 61; III- Мироновская 808; IV- Сухаг 1; V- Саха 69; VI- Гиза 157; VII- Гиза 156; VIII- Гиза 155.
Условия электрофореза: 9 ч при 10-20 mA в 15% ПААГ; буфер:0,1% SDS, 0,192 М глицин, 0,025 М трис, pH-8,3.

Так,семена сортов Саха 69 и Гиза 157 отличаются между собой тем, что первый, в отличие от второго, содержит компонент с ММ 82,5 кД (соответственно полоса 4 и не содержит полипептиды с ММ 56,5 и

47,5 кД (полосы 16 и 19). Отсутствие компонентов с ММ 44,0 и 33 кД и присутствие глиадинов с ММ 83,0 и 82,0 (соответственно полосы 22, 24) может служить основой для тестирования семян сорта Сухаг 1. Семена сорта Одесская 117 содержат полипептиды с ММ - 60,5; 58,5; 57,0 и 56,5 кD (полосы 11,13,15,16), которые отсутствуют у сорта Гиза 155. Последний содержит компоненты полипептидов с ММ 87,0; 80,0; 61,0; 55,5; 47,5; 40,5; 20,0 ; 18,5; 14,0 кД (соответственно полосы 2,6,10,18,19,23), которые отсутствуют в семенах сорта Одесская 117. Как следует из приведенных данных различия в 30 компонентах глиадинового спектра позволяют для каждого из исследованных сортов составить специфическую картину полиморфизма по которой возможна четкая идентификация каждого генотипа.

В целом, как и в случае с альбуминами, не наблюдается каких либо особых специфических различий в спектрах глиадинов группы украинских и египетских сортов пшеницы. Исключение составляет группа низкомолекулярных белков с ММ от 24,0 до 14,0 кД, которые у египетских сортов непременно присутствуют, тогда как в семенах украинской селекции они не всегда обнаруживаются.

Следует отметить, что высокомолекулярные компоненты глиадинового спектра, приведенного на рис.2 и в табл.2б (стр. 20) содержатся в следовых количествах, однако они вносят значительный вклад в идентификацию сортов, т.к. по ним выявляются довольно четкие межсортовые различия. В то же время средняя часть глиадинового спектра сильно перегружена белками. Нанесение же меньшего количества белка на фореграмму приводит к сокращению числа детектируемых полос за счет исчезновения высокомолекулярных компонентов.

Мы попытались улучшить разделение глиадинов в ПААГ в присутствии мочевины и снижением pH до 4,5. Результаты приведены на рис.3 и в табл. 2с (стр. 20). Семена разных сортов содержат 17-25 полипептидов, молекулярный вес которых колеблется в пределах от 12,0 до 102 кД. Эти полипептиды можно разделить на две группы, первая из которых включает высокомолекулярные глиадиновые субъединицы /ВГС/, молекулярный вес которых выше, чем 64 кД, а вторая - все остальные глиадины /низкомолекулярные глиадиновые субъединицы - НГС/. Комбинация ВГС и НГС глиадиновых субъединиц может быть использована для идентификации генотипов пшеницы. На рис.3 показано, что имеются как количественные так и качественные раз-

личия в спектрах глиадинов исследованных восьми сортов пшеницы.

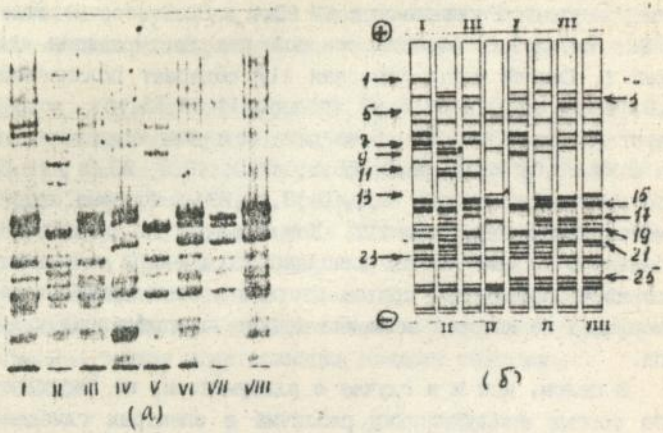


Рис.3. ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА (а) И ДИАГРАММА (б) СПИРТОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПРИСУТСТВИИ МОЧЕВИНЫ

Условные обозначения: I- Одесская 117; II- Мироновская 61; III- Мироновская 808; IV- Сухаг 1; V- Саха 69; VI- Гиза 157; VII- Гиза 156; VIII- Гиза 155.

Условия электрофореза: 4 ч при 10-300 mA в 10% ПААГ; буфер: 0,4% уксусной кислоты, 0,04 % глицирина

Сравнивая результаты электрофореза альбуминов и глиадинов, можно отметить, что между глиадинами, выделенными из семян исследованных сортов пшеницы наблюдаются более существенные различия, чем между альбуминами, поэтому маркирование генотипов пшеницы по спектрам глиадинов более эффективно. Однако, нам не удалось обнаружить каких-либо специфических особенностей в спектрах глиадинов, выделяющих группу египетских и украинских сортов пшеницы, хотя эти две группы сортов существенно отличаются между собой по устойчивости к высоким температурам, согласно приведенным ниже данным по ростовой реакции проростков этих же сортов.

Электрофоретическое разделение суммарных белков семян пшеницы, растворимых в буфере Лэммли. С целью изучения эффекта полиморфизма белков семян пшеницы различных сортов использовали систему экстракции полипептидов и их электрофорез по Лэммли (Fullington, 1980,1983; Laemmli,1970). Результаты фракционирования полипепти-

дов приведены на рис.4 и в табл. 2д (стр. 20).

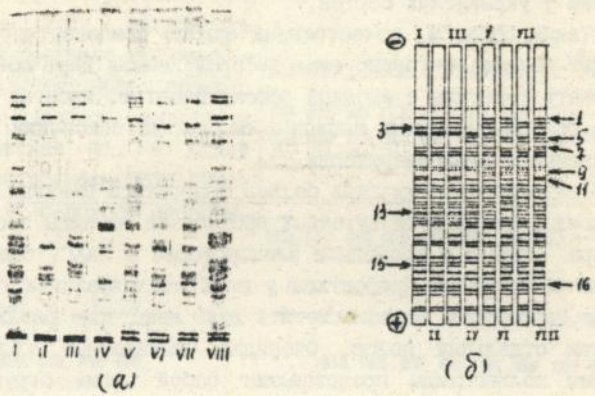


Рис.4. ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА (а) И ДИАГРАММА (б) СУММАРНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ, ЭКСТРАГИРОВАННЫХ БУФЕРОМ ЛЭММЛИ

Условные обозначения: I- Одесская 117; II- Мироновская 61; III- Мироновская 808; IV- Сухаг 1; V- Саха 69; VI- Гиза 157; VII- Гиза 156; VIII- Гиза 155.

Условия электрофореза: 4 ч при 10-20 mA в 15% ПААГ; буфер: 0,1% SDS, 0,192 М глицин, 0,025 М трис, pH- 8,3

Зрительный анализ электрофореграмм позволяет легко обнаружить сортовую специфичность содержания и состава отдельных полипептидов. На приведенных фореграммах можно различить около 46 преобладающих пептидов с ММ между 16 и 92 кД. Вариабельными оказались 16-ть из 46-ти полос. Результаты анализа полипептидов семян пшеницы , растворимых в буфере Лэммли свидетельствуют о том,что - большинство полипептидов являются константными и содержатся в семенах всех разновидностей. Можно наблюдать общую тенденцию - с увеличением ММ межсортовая вариабельность полипептидов возрастает. Семена сортов украинского происхождения Мироновская 808, Мироновская 61 и Одесская 117 по составу полипептидов могут быть отнесены к одной группе, поскольку спектр полипептидов очень близок. Тем не менее, у каждого из этих сортов имеются специфические компоненты.

Египетские сорта характеризуются относительно более высокой вариабельностью компонентов и существенно отличаются от украинс-

ких сортов. У всех египетских сортов присутствуют полипептиды с ММ 80,0 и 79,5 кД (соответственно полосы 5 и 6), которые не обнаружены у украинских сортов.

Таким образом, качественный анализ компонентного состава запасных белков экстрагируемых буфером Леммли дает возможность маркировать генотипы с высокой эффективностью, избегая предварительного фракционирования запасных белков на основании различной извлекаемости в растворителях.

Электрофорез суммарных белков проростков пшеницы. Полипептиды надземной части 5-ти суточных проростков пшеницы экстрагировали в буфере Леммли и проводили электрофорез в ПААГ. Спектры полипептидов контрольных проростков у всех исследованных сортов качественно совпадают. Можно отметить лишь некоторые различия в интенсивности отдельных полос. Очевидно, выявленные обычной окраской Кумаси полипептиды представляют собой копии структурных генов "поддержания дома". В связи с этим они являются консервативными и практически не отличаются у разных сортов пшеницы.

Инкубирование проростков при 40°С в последние 24 ч проращивания приводит лишь к незначительным изменениям содержания белковых компонентов. Можно отметить резкое повышение содержания полипептида с ММ 70 кД, который очевидно представляет собой известный белок теплового шока [Key,1985]. Хотя при тепловом шоке наблюдается включение синтеза большого числа шоковых белков [Nover,-1984], окраской кумаси обнаруживается лишь БТШ с ММ 70 кД. Таким образом, анализ компонентного состава полипептидов проростков пшеницы обычным ЭФ в присутствии SDS и окраской кумаси не позволяет находить существенных различий между сортами пшеницы по этому показателю.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР ИЗОЭНЗИМОВ

В данной главе приведены результаты исследования возможности оценки генотипов и их физиологического состояния на основе анализа активности и состава изоэнзимов пероксидазы и полифенолоксидазы.

Анализ компонентов пероксидазы. Состав пероксидазы анализировали у 8-ми сортов пшеницы при помощи электрофореза в ПААГ, в трис-боратном буфере (pH - 8,9). Исследованию подвергали изоэнзимы, содержащиеся в покоящихся и прорастающих семенах. Результаты изучения полиморфизма пероксидазы приведены на диаграммах - рис.5.

Активность пероксидазы различных семян пшеницы максимально проявляется в четырех полосах, отмеченных по мере возрастания Rf буквами A,B,C,D,E. Активность второго (B) и третьего (C) компонента пероксидазы как правило относительно высока, однако у сорта Мироновская 61, с одной стороны, и Мироновская 808, Гиза 155 и Сухаг 1 , с другой стороны,

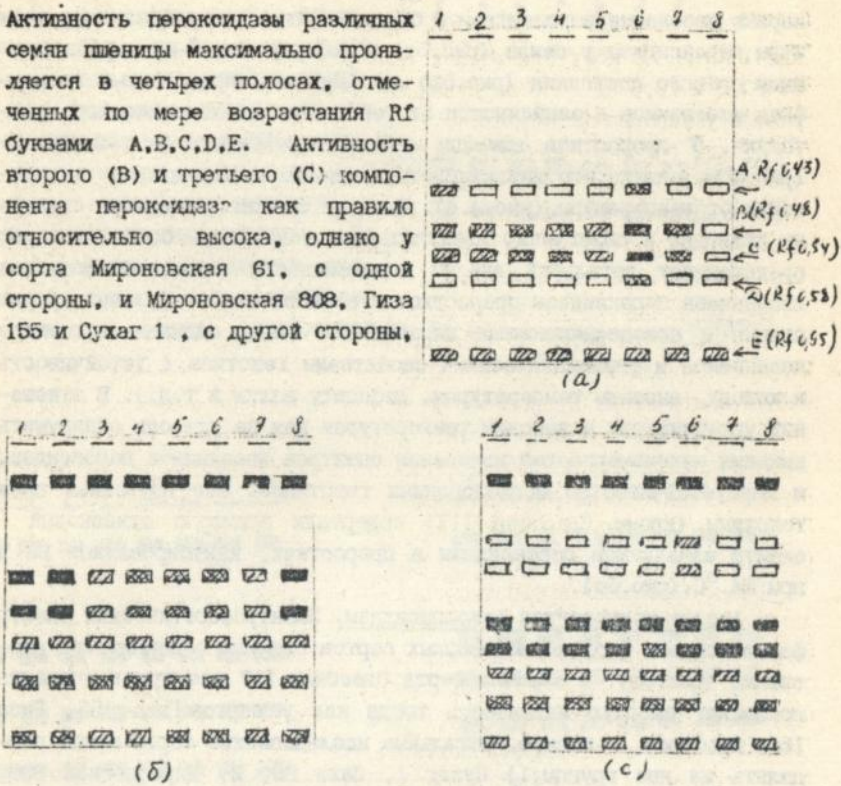


Рис.5.ДИАГРАММЫ ИЗОЭНЗИМОВ ПЕРОКСИДАЗЫ СЕМЯН (а), ПРОРОСТКОВ (б), И ПРОРОСТКОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ ТЕПЛОВОМУ ШОКУ (с)

Условные обозначения: 1- Гиза 155; 2- Сухаг 1; 3- Саха 69; 4- Гиза 156; 5- Мироновская 808; 6- Одесская 117

A,B,C,D,E,I,II,III,IV,V -порядковые номера компонентов изоэнзимов

Интенсивность полос: ▬ > ▭ > ▭ > ▭

Условия ЭФ: 7,5%/ПААГ в 0,03 М трис-глициновом буфере (Ph-8,3) при напряжении 300 v в течение 2 ч

их активность незначительная и малая соответственно. В семенах исследованных сортов пшеницы первый компонент представлен слабо или очень слабо. Только семена сорта Одесская 117 содержат три

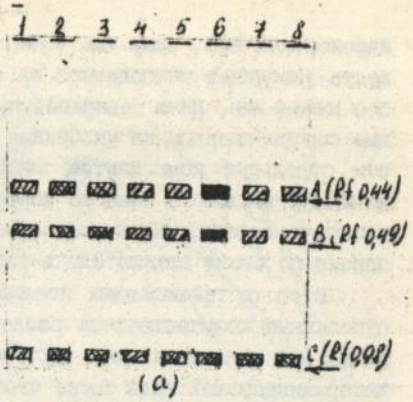
первые изоэнзима пероксидазы с большой активностью Сравнивая спектры пероксидазы у семян (рис.5а) и проростков 8-ми сортов пшеницы разного состояния (рис.5б) мы замечаем определенный изоморфизм изоэнзимов в зависимости от генотипа и физиологического состояния. У проростков пшеницы спектр пероксидазы усложняется - (рис.4б), однако его характеристики одинаково меняются в зависимости от температуры (рис.4.с). В связи с этим усложнение спектра не приводит к облегчению идентификации генотипов. Особый интерес представляет детальный анализ специфичности изменений спектров изоэнзимов пероксидазы проростков в зависимости от условий прорастания и поиска возможных корреляций между сдвигом в спектре изоэнзимов и физиологическими свойствами генотипа (устойчивость к холоду, высоким температурам, дефициту влаги и т.д.). В отношении устойчивости к высоким температурам нам не удалось обнаружить никаких закономерностей изменения спектров изоэнзимов пероксидазы и жароустойчивостью исследованных генотипов. Все изученные нами генотипы (кроме Одесская 117) содержали примерно одинаковый - спектр изоэнзимов пероксидазы в проростках, инкубированных 24 ч при 24 ^{o}C.(рис.5с).

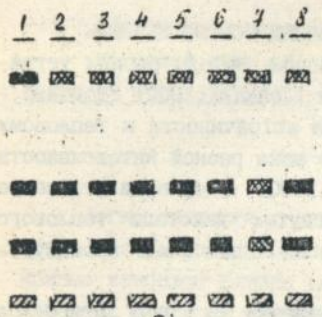
Анализ компонентов фенолоксидазы. Электрофоретический спектр фенолоксидазы всех исследованных сортов пшеницы содержит три изоэнзима (рис.6а). В семенах сорта Одесская 117 все три компонента проявляют высокую активность тогда как у сортов Гиза 155, Гиза 156, наоборот, - низкую. Остальные исследованные сорта можно разделить на две группы:1) Сухаг 1, Саха 69; 2) Мироновская 808, Гиза 157, Мироновская 61. В первой группе сортов относительно большей активностью обладают компоненты А и В изозимного спектра фенолоксидазы по сравнению со второй.

После пятисуточного прорастания у всех исследованных сортов обнаруживаются четыре изоэнзима (рис.6.б). Согласно показателю Rf эти четыре компонента качественно отличны от компонентов изофоретического спектра фенолоксидазы у семян этих же сортов . Полосы I и IV на диаграммах проростков восьми исследованных сортов были практически одинаковой интенсивности. Только у сортов Гиза 157 и Кутулукская компоненты II и III обнаруживают относительно меньшую интенсивность по сравнению с остальными сортами. У Гизы 155 компонент I обладает большей интенсивностью по сравнению с остальными десятью исследованными сортами.

Инкубация проростков пшеницы при 40°C в течение 24 ч не при-

водит к усложнению спектра фенолоксидазы (рис.6с). Как и в случае исследования компонентного состава фенолоксидазы выделенной из необработанных теплом пятисуточных проростков компоненты I и IV имеют одинаковую активность у всех исследованных сортов. По вариабельности компонентов изозимного спектра фенолоксидазы обработанных теплом проростков





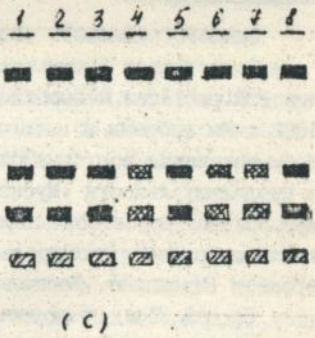


Рис.6. ДИАГРАММЫ ИЗОЭНЗИМОВ ФЕНОЛОКСИДАЗЫ СЕМЯН (а), ПРОРОСТКОВ (б), И ПРОРОСТКОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ ТЕПЛОВОМУ ШОКУ (с)

Условные обозначения: 1- Гиза 155; 2- Сухаг 1; 3- Саха 69; 4- Гиза 156; 5- Мироновская 808; 6- Одесская 117

A,B,C,I,II,III,IV, -порядковые номера компонентов изоэнзимов

Интенсивность полос: ▬ > ▬ > ▨ > ▭

Условия ЭФ: 7,5% ПААГ в 0,03 М трис-глициновом буфере (Ph-8,3) при напряжении 350 v в течение 2 ч

исследованные сорта можно разделить на две группы. К первой группе относятся сорта Гиза 156 и Одесская 117, у которых тепловой шок привел к незначительному снижению активности компонентов II и III. Ко второй группе относятся сорта Мироновская 81, Гиза 157,

Мироновская 808, Саха 63, Сухаг 1 и Гиза 155 , у которых активность указанных компонентов за сутки инкубации при 40°С остается без изменения. Даже поверхностный анализ показывает, что разделение сортов пшеницы на указанные выше группы по изменению активности отдельных компонентов изозимного спектра фенолоксидазы под влиянием теплового шока не коррелирует с жароустойчивостью исследованных сортов. Жароустойчивые сорта Гиза 155 и Одесская 117 попали по этому показателю в разные группы.

В свете проведенных исследований возникает вопрос:насколько отмеченные количественные различия в активности компонентов изозимов исследованных ферментов у разных форм пшеницы генетически детерминированы? Для того, чтобы ответить на этот вопрос необходимо осуществить воспроизводство семян исследованных сортов в строго контролируемых и одинаковых условиях, особенно на фазе созревания семян.

ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

В настоящее время существуют различные методы оценки устойчивости растений к высоким температурам [Генкель,1982; Удовенко,-1983]. Мы выбрали в качестве показателя устойчивости к тепловому шоку изменения ростовых процессов после шока разной интенсивности и продолжительности [Мусиенко,Даскалюк,1990] Оценивали отношение приростов проростков пшеницы, подвергнутых действию теплового шока к приросту контрольных растений за одинаковый промежуток времени [Мусиенко, Даскалюк,1985; 1990].

На рис.7.а приведены кривые отношения суточных приростов опытных растений к контрольным. Опытные растения подвергали тепловому шоку разной продолжительности /см.ось абсцис/ путем погружения в дистиллированную воду при 45°С. Как видно из рисунка, отношения приростов между 3-ми и 4-ми сутками прорастания закономерно убывают с увеличением продолжительности теплового шока. Отношения приростов проростков сорта Мироновская 61 подаваляются вдвое уже после 30 сек. теплового шока при 45°С, тогда как для получения такого же эффекта с проростками сорта Гиза 156 необходима инкубация в течение около 4 мин. Таким образом, одинаковое отношение приростов у двух отмеченных сортов достигают после тепловых доз, отличающихся между собой более чем в 8 раз. Проростки египетских сортов пшеницы оказались более устойчивыми к тепловому шоку, чем украинских сортов, поэтому кривые зависимости отношений приростов от дозы у египетских сортов находятся правее чем

украинских.

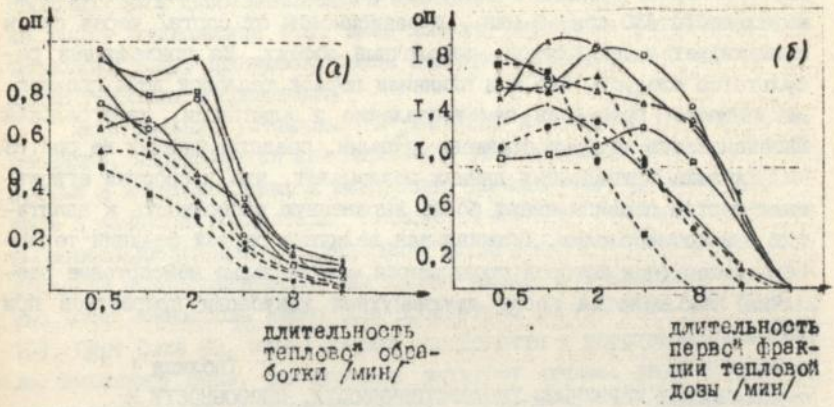


Рис.7.Эффект угнетения роста (а) и эффект фракционирования тепловой дозы (б) на проростки различных сортов пшеницы.

Условные обозначения: · -Гиза 155, ✗ - Гиза 156, ○- Гиза 157, △ -Сухаг 1, ▽ - Саха 69, ● - Одесская 117, ▲ - Мироновская 808, ■ - Мироновская 61

Легко заметить, что степень расхождения кривых отношений приростов неодинакова после различных доз теплового шока. Эти кривые наиболее близко расположены после доз теплового шока, полученных после 16 минутной инкубации, тогда как после двух минутной инкубации при 45°С кривые отношения приростов различных сортов занимают самый широкий интервал значений. Очевидно, именно в этой области показатель ОП отражает первичную теплоустойчивость проростков разных сортов, поскольку она представляет собой область наибольшего разрешения.

Способность растений переносить тепловой шок оценивается не только по первичной реакции на тепловой шок, но также по способности к восстановлению полученных повреждений и к адаптации. Для выявления этих компонентов устойчивости проростки разных сортов пшеницы подвергали тепловому шоку при 45°С разной продолжительности (первая фракция тепловой обработки) затем через сутки подвергали повторному тепловому шоку (45°С,5 мин) -вторая фракция. Результаты выражали как отношения приростов опытных растений /которые получили две тепловые дозы/ к контрольным /получившим только одну тепловую дозу/. Приведенные на рис.7.б. результаты показыва-

ют, что первая фракция тепловой дозы, при определенной ее продолжительности /30 сек.-8 мин., в зависимости от сорта/ через сутки стимулирует у проростков закалочный эффект. Из приведенных результатов следует, что под влиянием первой тепловой дозы произошла индукция процессов восстановления и адаптации, интегральная интенсивность которых отражена кривыми, представленными на рис.7б.

Анализ приведенных данных показывает, что проростки египетских сортов пшеницы имеют более выраженную способность к адаптации и восстановлению. Оптимальная величина первой фракции теплового шока (при которой проявляются максимальные межсортовые различия) наблюдается после двухминутной инкубации проростков при 45°С.

Таблица 1

ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРВИЧНОЙ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ, СПОСОБНОСТИ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ И ОБЩЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

Сорт	Компоненты устойчивости		Общая устойчивость
	Первичная	Адаптационная	
Гиза 155	0,82	1,30	0,81
Гиза 156	0,96	2,03	1,95
Гиза 157	0,78	2,03	1,58
Саха 69	0,83	1,18	0,98
Сухаг 1	0,47	1,65	0,78
Мироновская 808	0,38	1,75	0,66
Мироновская 61	0,32	1,02	0,33
Одесская 117	0,45	1,30	0,59
$НСР_{0.05}$	0,06	0,08	0,08

В табл.1 приведены показатели ОП после такой обработки, которые отражают способность разных сортов пшеницы к восстановлению тепловых повреждений и к адаптации. Проростки египетских сортов и по этому показателю, как правило, оказались более приспособленные к высоким температурам, чем украинские. Следует, однако, отметить, что не у всех сортов наблюдается прямая связь между первичной устойчивостью проростков к тепловому шоку и их способностью к восстановлению. Проростки Саха 69 характеризуются более высокой первичной теплоустойчивостью по сравнению с проростками сортов

Гиза 157, Сухаг 1 и особенно Мироновская 808 и в то же время по способности к восстановлению и адаптации оказались ниже. Проростки сорта Мироновская 808, имея низкую первичную устойчивость к тепловому шоку, проявляют очень высокую способность к восстановлению тепловых повреждений.

Интегральная устойчивость растений к высоким температурам, очевидно, определяется как первичной устойчивостью так и способностью к восстановлению и адаптации. По-видимому, разумно предложить в качестве показателя теплоустойчивости генотипа значение произведения показателя первичной устойчивости и показателя способности к восстановлению. Из табл.1 видно, что наибольшее значение этот показатель имеет для проростков сортов Гиза 156 и Гиза 157. Сорт Саха 69, из-за слабой способности к восстановлению после теплового шока, значительно уступают первым двум сортам по этому показателю. Благодаря высокой способности к восстановлению, общая теплоустойчивость проростков сортов Гиза 155, Сухаг 1 и даже Мироновская 808 оказалась довольно высокой. Пределы варьирования общей теплоустойчивости колеблятся от 0,33 для сорта Мироновская 61 до 1,95 для сорта Гиза 156.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что проростки группы египетских сортов пшеницы различаются от группы сортов украинской селекции, как по первичной устойчивости к тепловому шоку, так и по их способности к восстановлению полученных повреждений.

АНАЛИЗ КАЧЕСТВЕННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕЛКОВЫХ СПЕКТРОВ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

Для количественной оценки разнокачественности белковых спектров семян различных сортов пшеницы мы предлагаем метод вычисления индексов близости (F) вариантов на основании анализа компонентного состава полипептидов. Вариабельные компоненты располагали в ряд по мере понижения молекулярных масс. Присутствие компонента в образце обозначали плюсом (+), а отсутствие - минусом (-). Сводка вариабельных компонентов водорастворимых белков спирторастворимых компонентови общих полипептидов, извлекаемых буфером Лэммли в таблице 2(д)

Компоненты полипептидов		Сорта пшеницы							
№ п/п	ММ /кД/	Одесская 117	Миросовская 61	Миросовская 808	Сурхат I	Саша 69	Гюна 157	Гюна 158	Гюна 156
1	80,5	-	+	-	-	-	-	-	+
2	78,5	-	+	-	+	-	-	-	+
3	75,5	-	+	+	-	-	-	-	+
4	73,0	-	+	+	+	-	-	-	+
5	67,0	+	+	+	+	-	+	+	+
6	62,5	+	+	+	+	-	-	-	-
7	60,0	-	+	+	+	+	+	+	+
8	36,0	-	-	-	+	-	-	-	+
9	28,5	+	+	+	-	+	+	+	+
10	18,0	-	+	+	+	+	+	+	+

(а)

Компоненты полипептидов		Сорта пшеницы							
№ п/п	ММ /кД/	Одесская 117	Миросовская 61	Миросовская 808	Сурхат I	Саша 69	Гюна 157	Гюна 158	Гюна 156
1	102,0	+	-	+	-	-	+	-	-
2	97,5	-	+	-	-	+	+	+	+
3	86,0	+	+	+	-	+	-	+	+
4	81,0	-	+	+	-	-	+	+	+
5	79,5	+	-	-	+	+	-	-	-
6	80,5	+	-	+	-	+	-	+	+
7	77,0	+	+	+	-	+	+	+	+
8	75,0	+	+	-	+	-	-	+	-
9	73,0	-	+	-	-	+	+	-	-
10	70,0	+	+	+	-	-	-	-	-
11	68,5	-	+	-	-	-	-	-	-
12	64,0	-	+	+	-	-	-	-	-
13	56,0	-	-	-	+	-	-	-	-
14	52,0	+	+	+	+	-	+	+	+
15	50,0	+	+	+	-	+	+	+	+
16	48,0	-	+	-	-	-	-	-	-
17	46,5	-	+	-	+	-	+	+	+
18	43,5	+	+	-	-	-	+	+	+
19	41,0	+	+	+	-	+	+	+	+
20	39,5	-	+	-	-	-	-	-	-
21	37,0	+	+	+	-	+	+	+	+
22	35,0	-	+	+	+	+	+	+	+
23	33,0	+	+	-	-	+	+	-	-
24	30,0	+	+	+	-	-	+	+	+
25	28,0	-	-	-	-	+	+	+	+

(б)

Компоненты полипептидов		Сорта пшеницы							
№ п/п	ММ /кД/	Одесская 117	Миросовская 61	Миросовская 808	Сурхат I	Саша 69	Гюна 157	Гюна 158	Гюна 156
1	89,5	-	-	+	-	+	+	-	+
2	87,0	-	-	+	-	+	+	+	+
3	83,0	+	-	-	+	-	+	-	+
4	82,5	+	+	-	+	+	-	-	+
5	82,0	-	-	-	+	+	-	-	+
6	80,0	-	-	-	-	+	+	+	+
7	75,5	-	-	-	-	-	-	+	+
8	73,0	+	-	-	-	-	-	-	+
9	66,0	-	-	+	-	-	+	-	+
10	61,0	-	-	-	-	+	+	+	+
11	60,5	+	-	-	-	+	+	+	+
12	59,0	+	-	-	-	-	+	+	+
13	58,5	+	-	-	-	+	+	-	-
14	57,5	-	-	-	-	+	+	-	-
15	57,0	+	+	+	-	+	+	-	-
16	56,5	+	+	-	-	+	+	-	-
17	56,0	-	+	-	-	-	-	-	-
18	56,5	+	+	-	-	-	+	+	+
19	47,5	-	-	-	-	-	+	+	+
20	46,5	+	-	+	+	-	+	+	+
21	40,5	+	+	-	+	-	+	+	+
22	44,0	+	+	-	+	+	+	+	+
23	42,5	-	-	+	+	+	+	+	+
24	33,0	+	+	+	-	+	+	+	+
25	28,5	+	+	+	-	+	+	+	+
26	24,0	+	-	+	+	+	+	+	+
27	20,0	-	+	-	+	+	+	+	+
28	18,5	-	+	-	+	+	+	+	+
29	17,0	+	+	-	+	+	+	+	+
30	14,0	-	+	+	+	+	+	+	+

(с)

Компоненты полипептидов		Сорта пшеницы							
№ п/п	ММ /кД/	Одесская 117	Миросовская 61	Миросовская 808	Сурхат I	Саша 69	Гюна 157	Гюна 158	Гюна 156
1	89,5	+	+	+	-	+	+	-	+
2	87,0	-	+	+	-	+	+	+	+
3	85,0	+	-	+	-	+	+	+	+
4	82,5	+	+	+	+	+	-	-	+
5	80,0	-	-	-	+	+	+	+	+
6	79,5	-	+	-	+	+	+	+	+
7	78,0	-	-	-	-	-	-	-	+
8	73,0	-	-	-	-	+	+	+	-
9	70,0	-	-	-	-	+	+	+	-
10	68,0	-	-	-	-	+	+	+	-
11	66,0	+	-	+	-	-	-	-	+
12	57,0	+	-	+	+	+	+	-	-
13	50,9	+	+	+	+	+	-	+	+
14	44,0	+	-	+	-	+	+	+	+
15	33,0	+	+	+	-	+	+	+	+
17	25,2	+	+	+	-	+	+	+	+

(д)

Таб.2. Наличие вариабельных компонентов альбуминов (а), глиадинов (б), спирторастворимых полипептидов, экстрагированных в присутствии мочевины (с) и буфером Лэммли (д).

При установлении индекса близости F между образцами различных двух вариантов (F_{i_1}, F_{i_2}) определяли суммы всех событий при сравнивании всех компонентов образцов по формуле:

$$F_{i_{1,2}} = \sum_{j=1}^{n} W_{C_i} + \sum_{j=1}^{n} W_{O_i} - \sum_{j=1}^{n} W_{H_i} \qquad (9).$$

Для каждого компонента сравниваемой пары возможно только одно из трех отмеченных событий:

$\sum_{j=1}^{n} W_{C_i}$ -присутствие; $\sum_{j=1}^{n} W_{O_i}$ - отсутствие; $\sum_{j=1}^{n} W_{H_i}$ - несовпадение

Индекс отражает близость качественного состава полипептидов двух образцов с учетом их экспрессии во всей совокупности исследуемых вариантов. Численное значение F определяется набором вариантов и числом детектируемых компонентов. Константные компоненты не вносят вклад в значение F, поскольку наличие компонента во всех вариантах не дает "предпочтение" в близости любой сравниваемой пары. Вот почему на рис.8 отмечены только вариабельные компоненты белковых спектров и присутствие или отсутствие каждого такого компонента в исследуемых сортах. Данные (табл.2) были использованы для вычисления состава полипептидов в исследуемых сортах. Результаты суммированы в таблицах на (стр.22). Индексы близости, приведенные в таблицах на стр.22 варьируют между нулем и максимальным значением, получаемом при сравнении образца с самим собой (в последнем случае все события указывают на близость). Колебания веса реальных событий обусловливает не совпадение максимальных значений F у разных сортов.

Вариабельность F, вычисленных на основании состава глиадинов (табл.3б), оказалась выше, чем на основании альбуминов (табл.3а). Здесь мы наблюдаем близкое родство всех египетских сортов (Гиза 155, Гиза 156, Гиза 157 и Саха 69). В то же время не наблюдается родства между Гизой 155 и Мироновская 61 (F = 38). Как и в случае с анализом состава альбуминов, в полном одиночестве оказался сорт Сухаг 1, индекс близости которого с любым из сортов не превышал 38 (при максимальном значении к самому себе F= 285). Украинские сорта, очевидно, содержат много "чужеродной крови", поэтому индексы близости между ними значительно уступают таковым между египетскими сортами.

При фракционировании глиадинов растворенных в буфере с мочевиной при низком pH (табл.3в) в целом отмечены такие же закономерности, какие выявлены при обсуждении данных табл.3б: близость египетских сортов; особое положение сорта Сухаг 1; относительно не

	Одесская 117	Мироновская 61	Мироновская 808	Сухаг 1	Сакха 69	Гиза 157	Гиза 156	Гиза 155
Одесская 117	133	24	54	26	62	59	69	0
Мироновская 61		139	92	59	32	31	21	104
Мироновская 808			122	66	55	73	73	69
Сухаг 1				137	30	21	21	67
Сакха 69					128	102	102	34
Гиза 157						120	120	41
Гиза 156							120	41
Гиза 155								139

(а)

	Одесская 117	Мироновская 61	Мироновская 808	Сухаг 1	Сакха 69	Гиза 157	Гиза 156	Гиза 155
Одесская 117	298	79	157	54	104	123	132	135
Мироновская 61		309	126	0	75	94	130	116
Мироновская 808			298	22	69	88	117	157
Сухаг 1				327	35	55	62	48
Сакха 69					298	131	138	181
Гиза 157						298	162	179
Гиза 156							298	258
Гиза 155								284

(с)

	Одесская 117	Мироновская 61	Мироновская 808	Сухаг 1	Сакха 69	Гиза 157	Гиза 156	Гиза 155
Одесская 117	291	103	50	26	39	61	46	56
Мироновская 61		284	56	0	36	3	37	38
Мироновская 808			287	31	76	39	16	2
Сухаг 1				295	6	1	38	31
Сакха 69					284	176	129	147
Гиза 157						270	111	149
Гиза 156							273	172
Гиза 155								273

(б)

	Одесская 117	Мироновская 61	Мироновская 808	Сухаг 1	Сакха 69	Гиза 157	Гиза 156	Гиза 155
Одесская 117	180	137	161	56	70	37	23	103
Мироновская 61		189	153	70	66	63	39	83
Мироновская 808			187	39	80	63	40	118
Сухаг 1				216	42	0	15	31
Сакха 69					180	154	137	83
Гиза 157						207	141	50
Гиза 156							208	71
Гиза 155								180

(д)

Табл.3 Индексы близости у различных сортов пшеницы по спектральному анализу альбуминов (а), глиадинов (б), спирторастворимых полипептидов, экстрагированных в при-сутствии мочевины (с) и буфером Лэммли (д).

высокая близость украинских сортов (хотя несколько выше, чем по данным табл.3б).

Анализ родства сортов на основании оценки состава полипептидов семян выделеных и фракционированых по Леммли (табл.3д) дают основание для более глубоких размышлений. Как и во всех других случаях совершенно особняком стоит сорт Сухаг 1. Египетские сорта сохранили высокую близость, но как и в случае анализа близости на основании состава альбуминов сорт Гиза 155 оказался ближе к украинским сортам, чем к египетским. Очевидно, в этом случае сказалось влияние на спектральный состав полипептидов альбуминов изв-

леченных в буфере Леммли.

Приведенный анализ индексов близости позволяет нам сделать определенные предположения. По видимому, разные группы белков наследуются с той или иной степенью зависимости, поскольку, очевидно, они могут кодироваться ДНК различных хромосомами. Поэтому в процессе селекции они могут отбираться блоками, в связи с чем наблюдается специфичность белковых спектров близких генотипов.

Из приведенного выше следует, что интегральная оценка близости сортов на основании величины индекса близости позволяет выявить характерные отличия среди близких генотипов. Особенно интересная информация получается при сравнении индексов близости полученных на основании анализа качественно различных белков. В нашем случае это относится к альбуминам и глиадинам. Благодаря этому, выявлено особое положение сорта Гиза 155 среди египетских генотипов пшеницы и сорта Мироновская 61 среди украинских. Учитывая функциональные различия между белками , следует выявить влияние тех или иных особенностей белкового спектра на биологические свойства сорта. Выявление указанных закономерностей при помощи показателя F позволяет нам ставить задачу поиска корреляционных и функциональных связей между теми или иными характеристиками F с физиологическими различиями между генотипами. Особенно перспективными представляются исследования с хорошо изученными гибридами, с параллельной оценкой их биохимических и физиологических свойств.

Сравнение значений индексов близости исследованых сортов, вычисленных на основании анализа спектрального состава отдельных групп белков и теплоустойчивости проростков этих же сортов пшеницы, определенных по ростовой реакции проростков пшеницы на тепловой шок, в общем удовлетворительно объясняет физиологические особенности сортов пшеницы. Египетские сорта пшеницы оказались более устойчивыми чем украинские. Среди них сорт Гиза 155 имел среднюю первичную теплоустойчивость и относительно не высокие показатели восстановления, тогда как проростки сорта Саха 69 относительно высокую первичную устойчивость и не высокую восстановительную и адаптационную способности. Если при этом анализировать величины F, вычисленные по составу отдельных групп белков, не трудно заметить сравнительно низкие значение F с другими египетскими сортами, вычисленными на основании состава альбуминов семян сорта Гиза 155 и высокие значения этого показателя, определенные на основа-

нии состава глиадинов. Сопоставляя эти данные можна полагать, что восстановительные и адаптационные способности проросткаов каким то образом связаны с составом альбуминов. Именно различия в составе этой группы белков приводят к снижению индекса близости сорта Гиза 155 с другими египетскими сортами, что, по видимому, связано с более низкой восстановительной способностью проростков этого сорта пшеницы. Сорт Мироновская 808 проявляет относительно высокую способность проростков к восстановлению, при относительно высоком F с альбуминами египетских сортов, которые характеризуются высокой восстановительной способностью.

По аналогии можно предположить, что первичная устойчивость проростков каким то образом определяется составом глиадинов. Египетские сорта по этим двум показателям оказались очень близкими. В то же время индексы близости, вычисленные на основании альбуминов украинских и египетских сортов оказались низкими, а теплоустойчивость проростков была понижена. Подбирая широкий набор генотипов с различными физиологическими показателями и одновременно оценивая индексы близости с определением белковых компонентов, влияющих максимально на значения F, возможен поиск белковых компонентов, влияющих на тот или иной физиологический признак проростков. Целенаправленный поиск в этом направлении представляет несомненный интерес и определяет перспективы практического изучения молекулярных механизмов, вовлекаемых в определенные физиологические реакции растений.

ВЫВОДЫ

1. Экстрагируемые спиртом запасные белки /глиадины/, водой - альбумины, а также растворимые в буффере Лэммли белки семян различных сортов пшеницы характеризуются межсортовой вариабельностью, что и обусловливает возможность их применения в качестве маркеров генотипов.

2. Выявлены специфические для каждого из исследованных сортов спектры запасных белков. По составу альбуминов и глиадинов египетские сорта пшеницы отличаются более высокой вариабельностью компонентов. Для них характерно присутствие компонентов с ММ 80,0 и 79,5 кД которые не обнаруживаются у украинских сортов.

3. Преобладающие полипептиды проростков различных сортов пшеницы константны, поэтому не применимы для биохимического тестирования генотипов.

4. После 24 ч теплового шока в проростках всех генотипов окраской Кумасси детектируется полипептид с ММ 70 кD, соответствующий данному компоненту белков теплового шока.

5. Семена различных генотипов пшеницы характеризуются количественными различиями в активности отдельных компонентов изозимных спектров пероксидазы и полифенолоксидазы. Качественных различий в изозимных спектрах указаных ферментов не обнаружено.

6. Прорастание семян и тепловой шок приводит к усложнению изозимного спектра пероксидазы и полифенолоксидазы, что может быть использовано для оценки стрессового состояния растений.

7.Проростки исследованных сортов пшеницы различаются между собой как по первичной устойчивости к тепловому шоку, так и по их способности к восстановлению полученных повреждений. Выявлены сорта пшеницы, которые характеризуются:

-повышенной первичной устойчивостью к тепловому шоку и высокой способностью к восстановлению тепловых повреждений.

-повышенной устойчивостью к тепловому шоку, но относительно слабой способностью к восстановлению повреждений,

- слабой первичной устойчивостью и высокой способностью к восстановлению.

8. Предложена математическая модель - интегральный показатель близости генотипов в виде индекса, вычисленного на основании системного анализа вариабельных компонентов полипептидов. С его помощью возможна оценка родства (близости) сортов культурных растений и выявление влияния тех или иных компонентов на генетически детерминированные физиологические свойства растения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. М.М.Таг ель Дін, Харламов О.В. Використання різноманітних електрофоретичних методів для вивчення та порівняльної характеристики запасних білків рослин (пшениця) // Вісник Київського університету.- 1991.- 3.- С. 41-44.
2. Мусієнко М.М., М.М.Таг ель Дін, Харламов О.В.Використання різноманітних електрофоретичних методів для вивчення та порівняльної характеристики запасних білків рослин // Вісник Київського університету.- 1991.- 3.- С. 38-41.
3. Тагель Дин М.Абу Моссалам Сравнительное исследование белковых фракций семян сортов пшеницы египетской и украинской селекции //Физиол.и биохимия культ.раст.- 1992.- 24, N 5.- С. 488-492.

4. М.М.Тагель Дин, Харламов А.В. Особенности аминокислотного состава белков семян конских бобов и пшеницы // Тез.докл.конф. молодых ученых "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики".- Киев: Изд-во АН Украины, 1992.- С. 55-56.
5. Погоріла Н.Ф., М.М.Тагель Дін, Харламов О.В., Макаренко В.І. Лектиноподібна активність проростків різного екологічного походження // Тези доповідей VI Українського біохімічного з"їзду.- Київ: Видавництво УСГА, 1992.- С. 52-53.
6. Харламов О.В., М.М.Тагель Дін SDS-електрофорез загальных білків пшениці як метод сортової ідентифікації // Тези доповідей VI Українського біохімічного з"їзду.-Київ: Вид-во УСГА, 1992.- С. 63-64.

Зак. №354. тир. 100. Видавничо — полиграф. центр, КУ.
Киев. 17. Бульвар Шевченка, 14.

Ав 26.433